

**Untersuchung des Einflusses von
„Transient Receptor Potential“ - Proteinen
auf den Ca^{2+} - Einstrom in
B-Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Michael Engelke

Dezember 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Biochemie II der Fakultät für Chemie an der Universität Bielefeld in der Zeit von Oktober 1999 bis Dezember 2002 unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn

Prof. Dr. J. Frey

angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für das interessante Thema und die großzügige finanzielle Unterstützung, aber auch für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seinen fachlichen Rat bedanken. Seine große Kooperationsbereitschaft und die engagierte Unterstützung der Umsetzung meiner Vorstellungen, deren freie Gestaltung mir ermöglicht wurde, haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:	Prof. Dr. P. Jutzi
Referent:	Prof. Dr. J. Frey
Koreferent:	Prof. Dr. J. Wienands
zusätzlicher Prüfer:	Dr. A. Brockhinke
Termin der mündlichen Prüfung:	07. Februar 2003

Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. Wienands danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Ich danke Prof. Dr. A. Lückhoff und Dr. C. Zitt für die sehr gute Kooperation.

Prof. Dr. T. Kurosaki möchte ich für die Überlassung der TRPC1-defizienten DT40-Zellen danken.

Prof. Dr. G. W. Bornkamm danke ich für die Bereitstellung der Zelllinien P493.6 und EREB2.5.

Prof. Dr. M. Jücker danke ich dafür, dass er mir die Vektoren und Zelllinien für das retrovirale Transfektionssystem zur Verfügung gestellt hat.

Prof. Dr. F. Wittinghofer und besonders Oliver Rocks danke ich für die Bereitstellung und Betreuung der konfokalen Lasermikroskopie.

Den Kolleginnen und Kollegen des TRP-Projektes danke ich sehr für die angenehme und kooperative Atmosphäre. Namentlich erwähnen möchte ich Dr. Petra Budde, die dieses Projekt bis 2001 wissenschaftlich betreut hat und insbesondere Dr. Olaf Friedrich, mit dem eine außerordentlich effiziente und freundschaftliche Zusammenarbeit bestand.

Christina Geerds, Melanie Duckert und Doris Piekorz möchte ich herzlich für die freundschaftliche Kollegialität und die ausgezeichnete praktische Unterstützung danken, die mir die Arbeit enorm erleichtert hat.

Bei meinen Blockpraktikanten Norman Woller, Daniel Koch und Simon Mügge möchte ich mich für die sehr engagierte Beteiligung an meinem Projekt bedanken. Daniel Koch danke ich zudem für seine Hilfe bei der „Real Time PCR“.

Sven Dittmann und Michael Lohf gebührt Dank für Ihre Unterstützung im Rahmen Ihrer Ausbildung.

Meinen ehemaligen Kommilitonen Martin Schlee und Oliver Rocks danke ich für Ihre Freundschaft, die fruchtbaren Diskussionen sowie die vielen kleinen „Transferleistungen“. Besonders mit Martin Schlee habe ich meinen wissenschaftlichen Weg seit 1994 geteilt, wovon ich sehr profitiert habe.

Bei der Arbeitsgruppe Biochemie I von Prof. Dr. J. Wienands, insbesondere bei Niklas Engels bedanke ich mich für die Kooperationsbereitschaft und das „know how“ in Sachen B-Zell-Signaltransduktion.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Studiums.

I'm grateful to Prof. Israel Pecht („Weizmann Institute of Science“) for the wonderful time in Israel.

I want to thank all members of Biochemie II, especially Hamad Al Riyami, for the friendly and helpful atmosphere in the Lab.

“Science is 95% frustration!”

Diese im Grunde recht optimistische Einschätzung von Polly Matzinger vom “National Institute of Health” in Bethesda hat manche Unannehmlichkeit für uns Wissenschaftler zur Konsequenz, ist aber für das persönliche Umfeld ebenso alles andere als ein Vergnügen. Ich möchte daher meiner Familie und meinen engen Freunden Ralf Wussogk und Stefan Forero für ihre moralische Unterstützung danken.

Einen besonderen Anteil an dieser Arbeit, für den jeder Dank unzureichend ist, hat aber meine Freundin Gaby, die geduldig alle schwierigen Situationen des Studiums und der Promotion ertragen hat und mir durch ihre positive Ausstrahlung und ihren gnadenlosen Optimismus immer neuen Halt und Mut gegeben hat. Ihr möchte ich diese Arbeit widmen.

Teile dieser Dissertation sind in der folgenden Veröffentlichung publiziert worden:

Engelke, M., Friedrich, O., Budde, P., Schäfer, C., Niemann, U., Zitt, C., Jüngling, E., Rocks, O., Lückhoff, A., Frey, J. (2002)

Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1 β .

FEBS Lett. **523**, 193-199.

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungen	VII
II	Symbole für Aminosäuren	XIII
III	Symbole für Nucleotide	XIII
1	Einleitung	1
1.1	Freisetzung von Ca ²⁺ aus intrazellulären Speichern	3
1.1.1	Aktivierung von PLC-β durch heterotrimere G-Proteine	4
1.1.2	Aktivierung von PLC-γ in B- und T-Lymphocyten	4
1.2	Ca ²⁺ -Einstrom über die Plasmamembran: Calciumionenkanäle	6
1.2.1	Das Konzept des speicherregulierten Ca ²⁺ -Einstroms (SOC)	8
1.2.2	„Ca ²⁺ -release-activated current“ (I _{CRAC})	9
1.2.3	Aktivierungsmechanismen von speicherregulierten Ca ²⁺ - Kanälen	10
1.2.3.1	Ca ²⁺ -Influx-Faktor	10
1.2.3.2	Protein-Protein-Interaktion	11
1.2.3.3	„Secretion-like coupling model“	11
1.3	Die „Transient Receptor Potential“-Proteinfamilie	12
1.3.1	Die TRPV-Subfamilie	15
1.3.2	Die TRPM-Subfamilie	16
1.3.3	Die TRPC-Subfamilie	17
1.3.3.1	Struktur und Funktionen von TRPC1 (TRP1)	20
2	Problemstellung	23
3	Zusammenfassung	25
4	Material	27
4.1	Materialien und „Kits“	27
4.2	Geräte	27
4.3	Chemikalien	29
4.4	Puffer, Medien und andere Lösungen	30
4.5	Enzyme	33
4.6	Antikörper	34

4.7	Bakterienstämme	35
4.8	Zelllinien	35
4.8.1	HEK293	35
4.8.2	PlatE	36
4.8.3	IIA1.6	36
4.8.4	WEHI231	36
4.8.5	DT40	36
4.8.6	DT40 TRP1,- Klon Y20-14	36
4.8.7	EREB2.5	36
4.8.8	P493.6	37
4.9	Vektoren und cDNAs	37
4.10	Oligonukleotide	39
4.11	Computersoftware	42
5	Methoden	43
5.1	Molekularbiologische Methoden	43
5.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	43
5.1.1.1	CTAB-lyse zur Plasmidisolierung (Del Sal et al., 1988)	43
5.1.1.2	Plasmidpräparation über Ionenaustauscher-Säulen	43
5.1.2	Hydrolyse von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen	43
5.1.3	Auffüllen von 5'-Überhängen und gleichzeitiger Abbau von 3'-Überhängen an Restriktionsfragmenten	44
5.1.4	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	44
5.1.5	Agarosegelelektrophorese	44
5.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	44
5.1.7	Transformation chemisch kompetenter E.coli	45
5.1.7.1	MC1061	45
5.1.7.2	SCS110	45
5.1.7.3	XL1Blue	46
5.1.8	Anzucht und Lagerung von Bakterien	46
5.1.9	Isolierung von genomischer DNA aus DT40 Zellen	46
5.1.10	Isolierung von RNA aus Kulturzellen	47
5.1.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
5.1.12	Reverse Transkription von mRNA	47
5.1.13	Polymerase-Kettenreaktion	47

5.1.14	„Real Time PCR“	48
5.1.15	PCR-Produkt-Klonierung	49
5.2	Zellbiologische Methoden	50
5.2.1	Kulturbedingungen	50
5.2.2	Bestimmung der Zellzahl	50
5.2.3	Medienwechsel und Teilung von adhärennten Kulturzellen	50
5.2.3.1	Vorbereitung von HEK293-Zellen für Immunfluoreszenz-Analysen	51
5.2.3.2	Vorbereitung von HEK293-Zellen für Ca ²⁺ -Imaging-Messungen	51
5.2.4	Kultivierung von nicht adhärennten Kulturzellen	51
5.2.4.1	Abschalten der EBNA2-Expression in EREB2.5-Zellen	52
5.2.4.2	Abschalten der c-myc-Expression in P493.6 Zellen	52
5.2.4.3	Aktivierung der Tetracyclin-regulierten Genexpression in IIA1.6 Tet-On Zellen	52
5.2.4.4	Vorbereitung von Suspensionszellen für die Immunfluoreszenz	52
5.2.5	Auftauen und Einfrieren von Zellen	52
5.2.6	Transfektion von adhärennten Zellen mit aktivierten Dendrimeren	53
5.2.6.1	Stabile Transfektion von HEK293 mit „Superfect“	53
5.2.6.2	Transfektion von PlatE mit „Fugene“ zur Produktion rekombinanter Viren	54
5.2.7	Stabile Transfektion von IIA1.6 durch Elektroporation	54
5.2.8	Transfektion mit rekombinanten Retroviren	55
5.2.8.1	Transfektion von DT40-Zellen mit rekombinanten Retroviren	56
5.2.8.2	Transfektion von WEHI231 Zellen mit rekombinanten Retroviren	56
5.2.9	Etablierung von Tetracyclin-regulierbarer Genexpression in IIA1.6-Zellen	57
5.2.10	Bestimmung von Oberflächen IgM am Durchflusszytometer	57
5.2.11	Lokalisierungsstudien an transfizierten HEK293 Zellen	57
5.2.12	Immunfluoreszenzmikroskopie an IIA1.6Tet-On-Zellen	58
5.2.13	Immunfluoreszenzmikroskopie an stabil transfizierten DT40 Zellen	59

5.2.14	Immunfluoreszenzmikroskopie an transient transfizierten WEHI231-Zellen	59
5.2.15	Beladung von Zellen mit den calciumsensitiven Fluorophoren Fura2 und Fluo3	60
5.2.15.1	Beladung von HEK293 Zellen mit Fura2	60
5.2.15.2	Beladung von Suspensionszellen mit Fluo3	60
5.2.16	„Single-Cell-Ca²⁺-Imaging“ an HEK293-Zellen	61
5.2.17	Ca²⁺-Messungen an Suspensionszellen im Durchflusszytometer	61
5.3	Proteinbiochemische Methoden	63
5.3.1	Immunpräzipitation an stabil transfizierten HEK293-Zellen	63
5.3.2	Immunpräzipitation von HA-Fusionsproteinen aus stabil exprimierenden DT40 Zellen	63
5.3.3	SDS-Gelelektrophorese	63
5.3.4	Western Blot-Analyse	64
5.3.4.1	Immunologischer Nachweis von Proteinen in der Western Blot-Analyse	65
5.3.4.2	Stripping von Western Blot-Membranen	65
6	Ergebnisse	66
6.1	Klonierung von mTRP1β-HA Fusionsproteinen und Deletionsmutanten	66
6.2	Funktionelle Untersuchung von mTRP1β und Deletionsmutanten in HEK293 Zellen	67
6.2.1	Expression und Lokalisierung von TRP-Proteinen in stabil transfizierten HEK293-Zellen	67
6.2.2	Ca²⁺-Messungen an stabil transfizierten HEK293-Zellen	71
6.3	Einfluss von mTRP1β auf den Ca²⁺-Einstrom in der Maus B-Zelllinie IIA1.	75
6.3.1	Regulierbare Expression von mTRP1β in IIA1.6-Zellen	75

6.3.2	Ca²⁺-Messungen an regulierbar mTRP1β exprimierenden IIA1.6-Zellen	76
6.4	Einfluss von mTRP1β oder Deletionsmutanten auf den Ca²⁺-Einstrom in WEHI231-Zellen	78
6.4.1	Transiente Expression von mTRP1β oder Deletionsmutanten in WEHI231-Zellen durch retroviralen Gentransfer	78
6.4.2	Ca²⁺-Messungen an transient mTRP1β oder Deletionsmutanten exprimierenden WEHI231-Zellen	80
6.5	Untersuchung des Ca²⁺-Einstroms in TRPC1-defizienten DT40-Zellen	82
6.5.1	Untersuchung des Ca²⁺-Fluxes in wt DT40- und TRPC1-defizienten DT40-Zellen	82
6.5.1.1	Ca ²⁺ -Messungen an wt DT40- und TRPC1-defizienten DT40-Zellen nach BCR-Quervernetzung	83
6.5.1.2	Ca ²⁺ -Messungen an wt DT40- und TRPC1-defizienten DT40 Zellen nach ER-Depletion	85
6.5.2	Expression von mTRP1β und Deletionsmutanten in TRPC1-defizienten DT40-Zellen	86
6.5.2.1	Ca ²⁺ -Einstrommessungen nach ER-Depletion bei mTRP1 β und Deletionsmutanten exprimierenden DT40 TRPC1 ^{-/-} -Zellen	89
6.5.2.2	Ca ²⁺ -Einstrommessungen nach BCR-Quervernetzung bei mTRP1 β und Deletionsmutanten exprimierenden DT40 TRPC1 ^{-/-} -Zellen	92
6.6	Ca²⁺-Flux Studien an den B-Zelllinien EREB2.5 und P493.6	94
6.6.1	Expression von TRP-Proteinen in Abhängigkeit von EBNA2 oder c-myc in EREB2.5- und P493.6-Zellen	95
6.6.2	Einfluss von EBNA2 oder c-myc auf die IgM-Expression	97
6.6.3	Ca²⁺-Messungen an EREB2.5 und P493.6-Zellen	98
6.6.3.1	Die Expression von c-myc verändert die Ca ²⁺ -Flux Eigenschaften von P493.6-Zellen	98
6.6.3.2	Die EBNA2-Aktivierung hat keinen Einfluss auf die Ca ²⁺ -Flux Eigenschaften von EREB2.5-Zellen nach ER-Depletion	100
6.6.3.3	Inhibition des Ca ²⁺ -Einstroms in P493.6-Zellen durch Gd ³⁺ -Ionen	102

7	Diskussion	103
7.1	Expression und Lokalisierung von mTRP1 β und Deletionsmutanten	105
7.2	Einfluss der mTRP1 β -Expression auf den Ca ²⁺ -Einstrom über die Plasmamembran	111
7.3	Einfluss der cytosolischen Domänen von mTRP1 β auf den Ca ²⁺ -Einstrom über die Plasmamembran	116
7.4	Ein neues Modellsystem für die Untersuchung von TRP-Proteinen: Ca ²⁺ -Einstrom-Untersuchungen an den konditionalen B-Zelllinien P493.6 und EREB2.5	121
8	Literaturverzeichnis	125
9	Anhang	161
9.1	Klonierungsschema der Deletionsmutante mTRP1 β Δ DK-Epitop	161
9.2	Aminosäuresequenz von mTRP1 β	162
	Abbildungsverzeichnis	163
	Tabellenverzeichnis	164

I Abkürzungen

[Ca ²⁺]	Calciumionenkonzentration
[Ca ²⁺] _{ex}	extrazelluläre Calciumionenkonzentration
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
[Ca ²⁺] _{rel}	relative Calciumionenkonzentration
°C	Grad Celsius
Δ	Deletion
μM	Micromolar
A	Ampere
AA	Acrylamid-Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
Amp	Ampicillin
AMPS	Ammoniumpersulfat
ank	Ankyrin-ähnliche Wiederholungen
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCR	B-Zellrezeptor
Blk	„B-lymphoid kinase“
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Btk	„Bruton's tyrosine kinase“
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclische Adenosin-3',5'-phosphorsäure
cc	„coiled-coil“
CCE	„capacitative calcium entry“
CCh	Carbachol
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	komplementäre DNA

cGMP	cyclische Guanosin-3',5'-phosphorsäure
CIF	„Calcium Influx Factor“
CM-Dil	Chloromethylbenzamido Dil (Vybrant®)
CMV	Cytomegalievirus
CRAC	„Ca ²⁺ -released-activated Ca ²⁺ -channel“
CS	„chicken serum“
CT	Carboxy-Terminus
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromide (Cetyltrimethylammoniumbromide)
Cy	Cyanin
d	Schichtdicke bei OD-Messungen
DAG	Diacylglycerol
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyriobonuklease
dNTP	Desoxyribonucleotidtrisphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dys	Dystrophin-ähnlich
EBNA	„EBV nuclear antigen“
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	“Enhanced Chemiluminescence”
ECS	„extracellular solution“
EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Dinatriumsalz der Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N, N, N',N'- tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
est	Östrogen („Estradiol“)
F(ab)	antigenbindendes Fragment („Fragment antigen binding“)
FACS	„fluorescent activated cell sorter“
Fc	kristallisierbares Fragment von Antikörpern („fragment crystalline“)
FcR	Fc-Rezeptor

FCS	fötales Kälberserum
FcεR	Fc-Rezeptor für IgE
FcγR	Fc-Rezeptor für IgG
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLAG	Epitop-Tag: DYDDDDDK, ® eingetragenes Warenzeichen der Firma Sigma-Aldrich
Fluo-3	4-(2,7-Dichloro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)-4'-methyl-2,2'-(ethyendioxy)dianilin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Fluo-3-AM	Fluo-3-tetrakis-(acetoxymethyl)-ester
fS	Femtosiemens
Fura-2	1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Fura-2-AM	Fura-2-pentakis-(acetoxymethyl)-ester
Fyn	„fgr/yes-related novel tyrosine kinase“
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
Gads	„Grb2-related adapter protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GFP	„green fluorescent protein“
Gms	Gentamycinsulfat
Grb	„growth factor receptor binding protein“
GTP	Guanosin-5'-trisphosphat
G _{αβγ}	trimeres G-Protein
h	human oder Stunde/n
HA	Epitop-Tag: YPYDVPDYA (aus Hämagglutinin)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
I _{CRAC}	durch Ca ²⁺ -Freisetzung aktivierter Ca ²⁺ -Strom (“Ca ²⁺ -released-activated Ca ²⁺ -current”)
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ -R	IP ₃ -Rezeptor
IP ₄	Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat

IRES	„internal ribosomal entry site“
ITAM	„Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif“
ITIM	„Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif“
Itk	„Interleukin 2-inducible T-cell kinase“
JNK	„c-Jun N-terminal kinase“
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LAT	„linker for activation of T-Cells“
LB	Luria Broth
Lck	„Lymphoid cell kinase“
LGCC	ligandkontrollierter Ca^{2+} -Kanal („ligand-gated Ca^{2+} -channel“)
LMP-Agarose	niedrig schmelzende Agarose („Low Melting Point“)
LMW	Proteinmarker für SDS-PAA-Gele bis 94 kDa („low molecular weight“)
Lsg.	Lösung
LTR	retrovirale „long terminal repeat“-Sequenzen
Lyn	„lck/yes-related novel tyrosine kinase“
m	Maus
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
mcs	„multiple cloning site“
min	Minute
mind.	mindestens
mM	millimolar
MMLV	„Moloney Murine Leukemia Virus“
mRNA	„messenger“-RNA
mTRP1 β	„mouse transient receptor potential 1 splice variant β “ (Maus-TRPC1 β)
myc	Epitop-Tag: EQKLISEEDL (AS 410 bis 419 von c-myc)
NFAT	„nuclear factor of activated T-cells“
NF κ B	„nuclear factor for κ -gene in B-cells“
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NP40-Ersatz	Nonidet P40-Ersatz

o/n	über Nacht
OAc	Acetat
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycerol, DAG-Derivat
OctA	pAk gegen das FLAG-Epitop
OD	Optische Dichte
OdT	oligo-Desoxythymidin
pA	Picoampere
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pac	Gen das für die Puromycin-N-Acetyltransferase kodiert
pAk	polyklonaler Ak
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	„Platelet-derived growth factor“
pF	Picofarad
PFA	Polyformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PMCA	„plasma membrane Ca ²⁺ -ATPases“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pp	potentielle Porenregion
PPI	Proteinphosphatase 1
PP2a	Proteinphosphatase 2a
proz.	prozentig
pS	Picosimens
PTK	Proteintyrosinkinasen
RACC	rezeptoraktivierte Ca ²⁺ -Kanäle („receptor-activated Ca ²⁺ -channels“)
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

ROC	„receptor operated channel“
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
rtTA	reverser Tetracyclintransaktivator
RT-PCR	reverse Transkription-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde/n
SERCA	„sarco-endoplasmatic reticulum-Ca ²⁺ -ATPase“
SH	„src-homology“
SLP	„SH2-domain containing leukocyte protein“
SOC	„store operated Ca ²⁺ -channel“
src	„rous sarcoma oncogene“
Strep	Streptomycin
SV	Simian Virus
Syk	„spleen Tyrosine kinase“
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCR	T-Zellrezeptor
tec	„Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma“
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetracyclin
Tet-On/Off	Tet-reguliertes Expressionssystem der Firma Clontech
Tfb	Transformationspuffer (m für MC1061, x für XL1-Blue)
TM	Transmembransegment/e
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X100	4-(2',2',4',4',-Tetramethylbutyl)-phenyldecaethylglycol
TRP	„Transient Receptor Potential“
tTA	Tetracyclintransaktivator
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaureat
U	Einheit der Enzymaktivität
V	Volt
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
VOCC	spannungsregulierter Ca ²⁺ -Kanal („voltage-gated Ca ²⁺ -channel“)
Vol.	Volumen

W	Watt
w/v	Verhältnis Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZAP70	„zeta-chain associated protein of 70kDa“

II Symbole für Aminosäuren

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

III Symbole für Nucleotide

Nucleotid	
Desoxyadenosin	a
Desoxycytidin	c
Desoxyguanosin	g
Desoxythymidin	t

1 Einleitung

Ein in London vor etwa 120 Jahren durchgeführtes Experiment, das aus nachvollziehbaren Gründen heutigen Standards kaum genügen würde, bildet den Anfang der seither für die Biowissenschaften immer bedeutenderen Geschichte des Ca^{2+} -Ions. Sidney Ringer (Ringer, S. (1883) J. Physiol. 45, 29-43) untersuchte die Kontraktion von isolierten Rattenherzen. In ersten Experimenten hatte Ringer die Herzen in einer Kochsalzlösung resuspendiert, für die er, wie er zugab, Londoner Leitungswasser von hoher Härte verwendete. Die Herzkontraktion war dauerhaft und deutlich zu erkennen. Als er in weiteren Experimenten das Leitungswasser durch destilliertes Wasser ersetzte, machte Ringer die Beobachtung, dass die Kontraktionen zunehmend schwächer wurden und nach etwa 20min aufhörten. Er fand heraus, dass zur Aufrechterhaltung der Kontraktionen die Zugabe von Ca^{2+} -Salzen erforderlich war. Auf diesem Weg wurde erstmals gezeigt, dass Ca^{2+} , das ursprünglich als rein strukturbildendes Element angesehen wurde, physiologische Aktivität in einem Gewebe zeigte, das weder mit Knochen noch mit Zähnen in Zusammenhang steht. Erstaunlicherweise entstanden in den folgenden Jahrzehnten nur wenige Arbeiten auf diesem Gebiet und kaum jemand hatte die Vision, die große physiologische Bedeutung des Ca^{2+} vorherzusehen (Carafoli, 2002).

Seit den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts wird die Rolle von Ca^{2+} als Übermittler von Signalen intensiv erforscht. Calciumionen spielen eine zentrale Rolle in vielen zellulären Prozessen, wie etwa Muskelkontraktion, Freisetzung von Neurotransmittern, Zellproliferation, Gentranskription und Apoptose (zur Übersicht Berridge et al., 2000).

Die Eignung von Ca^{2+} als Botenstoff resultiert neben der guten Bioverfügbarkeit aus den günstigen koordinativen Eigenschaften dieses Ions. Während die Komplexbildung von Mg^{2+} mit organischen anionischen Strukturen, wie z.B. Aminosäureresten, im Vergleich zum größeren Ca^{2+} sterisch ungünstig ist, sind die elektrostatischen Wechselwirkungen von Liganden mit Ba^{2+} und Sr^{2+} , die zudem schlechter bioverfügbar sind, aufgrund der größeren Ionenradien im Vergleich zu Ca^{2+} kleiner. Eine weitere, für die Funktion als Signalüberträger günstige Eigenschaft ist die große Flexibilität der Ligandensphäre von Ca^{2+} . Diese erlaubt einen schnellen Austausch von Liganden, der bei Mg^{2+} nicht beobachtet wird (Eigen, 1960).

Der grundsätzliche Mechanismus von Ca^{2+} -Signalen ist die Erhöhung der cytosolischen freien Ca^{2+} -Konzentration, die im Ruhezustand etwa 50–100nM beträgt, auf bis zu 10 μM . Die erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Konzentration führt zur Aktivierung von diversen Enzymen über prinzipiell zwei Mechanismen. Zum einen gibt es Enzyme die direkt durch Bindung von Ca^{2+} beeinflusst werden, wie z. B. die Phospholipase A2 (White et al., 1990) oder die Protein Kinase C (PKC) (zur Übersicht Dekker und Parker, 1994; Newton, 1997; Oancea und Meyer, 1998). Zum anderen werden Enzyme über Ca^{2+} -bindende Proteine reguliert (zur Übersicht Carafoli und Klee, 1999). Eine zentrale Rolle spielt dabei Calmodulin, das zur Familie der EF-Hand Proteine gehört. An zwei gegenüberliegenden Helix-Schleife-Helix-Motiven können je zwei Ca^{2+} -Ionen binden. Dieser Calmodulin- Ca^{2+} -Komplex kann eine Vielzahl von Proteinen regulieren (zur Übersicht Weinstein und Mehler, 1994; Ikura, 1996).

Zur Anhebung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration stehen der Zelle generell zwei Quellen zur Verfügung.

Zum einen ist das extrazelluläre Milieu eine schnell verfügbare Quelle für Ca^{2+} , da bei einer extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von etwa 1,5mM ein steiler Gradient über der Plasmamembran besteht. Dieser Gradient wird unter ATP-Verbrauch durch Ca^{2+} -Pumpen in der Plasmamembran (PMCA) und im endoplasmatischen /sarcoplasmatischen Retikulum (SERCA) sowie durch den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter, der seinen Antrieb aus dem negativen Membranpotential von -180mV in der Matrix von Mitochondrien bezieht, aufrecht erhalten (Gunter und Gunter 1994; Pozzan et al. 1994). Kombiniert mit dem negativen inneren Plasmamembranpotential, das typischerweise bei -60mV in ruhenden Zellen beträgt, resultiert eine große Triebkraft für den passiven Eintritt von Ca^{2+} nach Depolarisation oder rezeptorvermittelter Stimulation der Zelle (Berridge, 1993; Carafoli und Klee, 1999).

Die zweite Quelle sind intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher, wie das ER sowie in Muskelzellen, das SR (Berridge, 1993; Berridge et al. 2000). Die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern ist im allgemeinen transient und reicht nicht aus, den cytosolischen Ca^{2+} -Spiegel über mehrere Minuten anzuheben.

Eine wichtige Eigenschaft von Ca^{2+} -Signalen ist die Tatsache, dass diese Signale in den Dimensionen Raum und Zeit differenziert wird. Dazu gehören neben der Dauer des Signals auch die Frequenz und Amplitude von Ca^{2+} -Oszillationen, die einen erheblichen Einfluss auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren haben (zur

Übersicht Berridge, 1997; Dolmetsch et al., 1998; Berridge et al. 2000). Insbesondere in Zellen des Immunsystems spielen diese Eigenschaften eine zentrale Rolle. In B- und T-Lymphozyten hat die Aktivierung über den BCR oder TCR in unterschiedlichen Entwicklungsstadien völlig unterschiedliche Konsequenzen für die Zelle. Für eine vollständige Aktivierung einer T-Zelle ist ein bis zu 20h anhaltendes Ca^{2+} -Signal erforderlich. Kürzere Signale führen zu Anergie oder Apoptose (Iezzi et al, 1998). Die Co-Quervernetzung von BCR und $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ auf reifen naiven B-Zellen führt zu einer zeitlichen Verkürzung des Ca^{2+} -Signals im Vergleich zur BCR-Quervernetzung allein und somit zur nicht Aktivierung der Zelle (Choquet et al., 1993; Budde et al., 1994). Eine in Abhängigkeit von der Form des Ca^{2+} -Signals modulare Gentranskription wird in B-Lymphocyten beobachtet. So werden der Transkriptionsfaktor $\text{NF-}\kappa\text{B}$ und JNK („Jun N-terminal-kinase“) durch einen großen transienten Ca^{2+} -Einstrom ins Cytosol aktiviert, NFAT hingegen durch ein niedriges aber lang anhaltendes Plateau (Dolmetsch et al. 1997). Untersuchungen in T-Lymphocyten ergaben, dass NFAT effektiv durch repetitive Ca^{2+} -Spitzen aktiviert wird, wohingegen bei Oszillationen mit niedriger Frequenz nur $\text{NF-}\kappa\text{B}$ aktiviert wird (Dolmetsch et al. 1998).

Der zusätzliche Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum ist demnach eine außerordentlich wichtige Komponente der Signaltransduktion über diesen Botenstoff.

1.1 Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern

Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER oder SR von elektrisch erregbaren Zellen erfolgt über Ryanodinrezeptoren, während in nicht elektrisch erregbaren Zellen die Freisetzung aus dem ER aus der Aktivierung von IP_3 -Rezeptoren resultiert (Berridge, 1993).

Beide Kanaltypen sind in Ihrer Struktur und in einigen physiologischen Eigenschaften eng miteinander verwandt (Fill und Coronado, 1988; Bootmann und Berridge, 1995; Mackrill, 1999). Sie bestehen aus vier Untereinheiten mit je acht Transmembrandomänen und einer langen N-terminalen cytosolischen Sequenz, die 80% des Proteins ausmacht und wichtig für die IP_3 -Bindung ist (Ferris und Snyder, 1992).

Die Aktivierung des IP_3 -Rezeptors erfolgt durch seinen Liganden IP_3 (Berridge und Irvine, 1989). Die zentrale Rolle für die Bildung von IP_3 aus Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphaten (PIP_2) spielt die Phospholipase C (PLC). Bislang sind 11 Isoformen dieses Enzyms bekannt, die gemäß ihrer Struktur und Regulationsmodi in die Sub-

familien β , γ , δ und ε unterteilt werden (zur Übersicht Rebecchi und Pentylala, 2000, Rhee, 2001).

1.1.1 Aktivierung von PLC- β durch heterotrimere G-Proteine

Über 1000 Rezeptoren, die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind, stehen für die Signalübermittlung in einer Vielzahl von Zellen zur Verfügung. Sieben Transmembranregionen sind ein gemeinsames Strukturmerkmal dieser Rezeptorfamilie. In den verschiedenen gekoppelten heterotrimeren G-Proteinen enthält jeweils die Untereinheit $G\alpha$ die Guanin-Nukleotid-Bindungsstelle und ist über einen Myristoyl- oder Palmitoylrest in der Membran verankert (Strader et al., 1994). Nach Bindung des Agonisten an den Rezeptor wird durch eine Konformationsänderung die Bindung des Heterotrimers, das aus den Untereinheiten α , β und γ besteht und im Ruhezustand GDP gebunden hat, ermöglicht. Die Bindung wiederum begünstigt den Austausch von GDP durch GTP, was die Dissoziation von $G\alpha$ und den Untereinheiten $G\beta\gamma$ zur Folge hat, wodurch ein neues Heterotrimer an den Rezeptor binden kann. Die Untereinheiten üben unterschiedliche Funktionen im Rahmen der Signaltransduktion aus (Taylor, 1990). Unterschieden werden $G\alpha$ -Untereinheiten, die die Adenylatcyclase aktivieren ($G_s\alpha$), die Adenylatcyclase hemmen ($G_i\alpha$) oder, wie $G_q\alpha$, über die Aktivierung der PLC- β den IP3-Weg aktivieren (Sternweis et al., 1992). Die $G\alpha$ -Untereinheiten sind langsame GTPasen, die sich nach Hydrolyse des GTP wieder mit den $G\beta\gamma$ -Untereinheiten zum heterotrimeren G-Protein verbinden. Für die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten werden diverse Funktionen beschrieben, zu denen ebenfalls die Aktivierung von PLC- β zählen kann (Morris und Scarlata, 1997). Muscarinische Acetylcholinrezeptoren der Subtypen M1, M3 und M5 gehören zu den Rezeptoren, die mit $G_q\alpha\beta\gamma$ koppeln (Lechleiter et al., 1989). Ein muscarinischer Acetylcholinrezeptor, der zur Aktivierung von PLC- β führt, wird endogen in der humanen Nierenepitelzelllinie HEK293 exprimiert und kann über synthetische Agonisten wie Carbachol aktiviert werden (Nakai et al., 1988).

1.1.2 Aktivierung von PLC- γ in B- und T-Lymphocyten

Der B-Zell-Antigen-Rezeptor (BCR) gehört genau so wie der T-Zell-Antigen-Rezeptor (TCR) zur Familie von Immunrezeptoren, deren signalübermittelnde Funktion auf charakteristischen Tyrosin-haltigen Peptidmotiven, den ITAMs („Immunoreceptor

Tyrosine based Activation Motif“), basiert (Reth, 1989; Cambier, 1995; Qian und Weiss, 1997). Andere Rezeptoren dieser Familie sind z.B. der hochaffine IgE-Rezeptor (Fc ϵ RI) und der GPVI-Thrombocyten-Kollagen-Rezeptor (zur Übersicht Leeuwen und Samelson, 1999).

Ein zentrales Ereignis nach Aktivierung ITAM-tragender Rezeptoren ist die Aktivierung von PLC- γ . Dabei wird die Isoform γ 2 hauptsächlich in B-Zellen (Hempel et al., 1992) und die Isoform γ 1 vornehmlich in T-Zellen exprimiert (Mustelin et al., 1992). Auf dem Weg zur Aktivierung von PLC- γ sind Proteintyrosinkinasen (PTK) aus drei Proteinfamilien, die src-, tec- und Syk/ZAP70-PTK, involviert. Nach Rezeptoraktivierung phosphorylieren die src-Kinasen Lck, Fyn, Blk und Lyn die ITAM-Tyrosinreste (Cambier et al., 1995; Flaswinkel und Reth 1994; Reth und Wienands, 1997; Bolen und Brugge, 1997; Campbell, 1999; Kurosaki, 1999). Ein an beiden Tyrosinresten phosphoryliertes ITAM bildet eine Bindestelle für die zwei tandemartig angeordneten SH2-Domänen der PTKs Syk („Spleen Tyrosine Kinase“) in B-Zellen bzw. ZAP70 („Zeta-chain Associated Protein of 70kDa“) in T-Zellen. Diese Assoziation sowie die Transphosphorylierung über src-Kinasen initiiert ihre Aktivierung (Nagai et al., 1995; Aoki et al., 1995; Kurosaki et al., 1995; Wienands et al., 1995; Fütterer et al., 1998). Co-stimulatorische Signale über z.B. CD28 in T-Zellen und CD19 in B-Zellen führen zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase, die aus PIP₂ PIP₃ an der Innenseite der Plasmamembran generiert (Rhee, 2001; Salim et al., 1996; Toker and Cantley, 1997). PTKs der Tec-Familie (Itk in T-Zellen und Btk in B-Zellen) können über ihre Pleckstrin-homologe Domäne an PIP₃-Motive binden, werden so an die Plasmamembran rekrutiert und auf diese Weise effektiv durch src-Kinasen aktiviert (Mahajan et al., 1995; Rawlings et al., 1996; Scharenberg und Kinet, 1998; Scharenberg et al., 1998). Aktivierte Btk/Itk und Syk/ZAP70 phosphorylieren eine Reihe von Signalproteinen und aktivieren als zentralen Schritt dieses Prozesses PLC- γ (Takata et al., 1994; Takata et al., 1995; Fluckiger et al., 1998; Wang et al., 2000; Irvin et al., 2000).

Neben PTKs erfordert der Aktivierungsprozess von PLC- γ eine Reihe von Adapterproteinen, die den Initiationskomplex dieser Signalwege organisieren (zur Übersicht Yablonski und Weiss, 2001; Leo et al., 2002). Das transmembrane Adapterprotein LAT („linker for activation of T-cells“) rekrutiert in T-Zellen über Phosphotyrosin-SH2-Interaktionen PLC- γ 1 und Gads („Grb2-related adapter protein“) an die Plasmamembran (Zhang et al., 2000). LAT ist membranproximal palmitoyliert und auf diese

Weise in speziellen Mikrodomänen der Plasmamembran („Lipid Rafts“) lokalisiert (Zhang et al., 1998). Gads wiederum ist in der Lage über seine C-terminale SH3-Domäne an eine prolinreiche Region des Adapterproteins SLP-76 („SH2-domain containing leukocyte protein of 76 kDa“) (Liu et al., 1999; Asada et al. 1999; Law et al., 1999) zu binden. SLP-76 interagiert mit der SH2-Domäne von I κ B und rekrutiert diese Kinase so in den Signalkomplex (Su et al., 1999; Bunnell et al., 2000). Zudem bindet SLP-76 PLC- γ 1 über deren SH3-Domäne (Yablonski et al., 2001). Die Organisation von Signalkomplexen in Mikrodomänen der Plasmamembran mit verminderter lateraler Fluidität, die hohe Konzentrationen an Cholesterin, Glykosphingolipiden und PIP₂ aufweisen, ist ein wichtiges Konzept in der Signaltransduktion und Voraussetzung für die Generierung eines dauerhaften Signals (Xavier et al., 1998; Aman et al., 2000; Simons et al. 1997).

In B-Zellen werden LAT und SLP-76 nicht exprimiert. Das SLP-76 analoge B-Zell-Adapterprotein SLP-65 ist in der Lage, mit Grb2, Btk und PLC- γ 2 zu interagieren (Fu et al., 1998; Wienands et al., 1998). Die Rekrutierung dieses Komplexes an die Plasmamembran ist nicht vollständig geklärt. Sowohl die Existenz eines B-Zell-Analogons von LAT, als auch eine direkte Interaktion mit dem BCR (Engels et al., 2001) wird diskutiert.

1.2 Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran: Calciumionenkanäle

In elektrisch erregbaren Zellen, wie Muskel-, Nerven oder endokrinen Zellen, vermitteln hoch selektive spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle den Ca²⁺-Einstrom in die Zelle in Folge einer Depolarisierung der Plasmamembran. Diese Kanäle produzieren Ca²⁺-Ströme mit unterschiedlichen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften, die in L- („long-lasting“), N- („neuron“), P- („Purkinje“), Q- , R- („resistant“), und T- („transient“) Typen eingeteilt werden (zur Übersicht Catterall, 2000). In Skelettmuskeln interagieren aktivierte Kanäle (Ca_v1.1) direkt mit Ryanodinrezeptoren des SRs und bewirken neben ihrer eigenen Kanalfunktion auf diese Weise mittelbar einen cytosolischen Ca²⁺-Anstieg (Catterall, 2000). Spannungsabhängige Kanäle bilden heteromultimere Komplexe, wobei die α 1-Untereinheit über vierfach wiederholte Einheiten mit je sechs Transmembrandomänen den eigentlichen Ionenkanal formiert (Tanabe et al., 1987).

Spannungsunabhängige Ca²⁺-permeable Kanäle tragen zu zahlreichen unterschiedlichen Ca²⁺-Einstrom-Wegen mit diversen physiologischen Funktionen, z.B. in

Zellen des Immunsystems, Endothel- und Epithelzellen oder Zellen des Nervensystems, bei.

Eine Einteilung der spannungsunabhängigen Ca^{2+} -Kanäle nach Aktivierungsmechanismen oder physiologischen Eigenschaften wurde von diversen führenden Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet vorgenommen (z.B. Fasolato et al., 1994; Barrit, 1999). Barrit (1999) unterscheidet Kanaltypen nach ihrem Aktivierungsmechanismus in ligandenkontrollierte Kationenkanäle (LGCC) und rezeptoraktivierte Ca^{2+} -Kanäle (RACC).

LGCC zeigen geringe Kationenselektivität, können aber einen substantiierten Ca^{2+} -Einstrom nach Ligandenbindung vermitteln. Zu den LGCC zählen Neurotransmitter-Rezeptoren, wie Serotoninrezeptoren, nAChRs („nicotinic acetylcholine receptors“) und NMDA-Rezeptoren (N-Acetyl-D-Aspartat-Rezeptoren) (zur Übersicht Carafoli und Klee, 1999; Nowycky und Thomas, 2002).

RACCs sind als Plasmamembran-Kanäle definiert, die nach Bindung eines Agonisten an seinen Rezeptor geöffnet werden, wobei das Rezeptorprotein vom Kanalprotein getrennt ist und der Öffnungsmechanismus keine Depolarisation der Plasmamembran erfordert (Putney und Bird, 1993; Fasolato et al., 1994; Berridge 1995; Clapham, 1995-a; Parekh und Penner, 1997). RACCs umfassen eine Vielzahl von Kanaltypen, die sich sowohl im Hinblick auf die Ionenselektivität als auch die Aktivierungsmechanismen erheblich unterscheiden können, so dass eine weitere Differenzierung dieser Kanäle in ROCs („Receptor operated channels“) und SOCs („Store-operated Channels“) sinnvoll ist (z.B. Berridge, 1997).

Eine wichtige Gruppe der ROCs sind CNG-Ionenkanäle („Cyclic nucleotide-gated“), die über cyclische Nukleotide aktiviert werden. CNG-Kanäle sind nicht selektive Kanäle, die durch direkte Bindung von cAMP oder cGMP geöffnet werden (zur Übersicht Kaupp und Seiffert, 2002). Zuerst wurden diese Kanäle in retinalen Photorezeptoren und olfaktorischen Rezeptoren in Neuronen des Geruchsepithels identifiziert (Haynes und Yau, 1985; Nakamura und Gold, 1987). Obgleich sie kaum spannungsabhängig sind, gehören sie aufgrund Ihrer heterotetrameren Struktur mit je sechs Transmembrandurchgängen (Analogie zu spannungsabhängigen K^{+} -Kanälen) zur Superfamilie der Spannungsabhängigen Ionenkanäle (Kaupp und Seiffert, 2002).

Während die bislang vorgestellten Ionenkanaltypen in Bezug auf Struktur und Regulation gut verstanden werden, besteht für die RACC-Subgruppe der

speicherregulierten Ca^{2+} -Kanäle („store operated channels“ (SOC) oder „capacitative Ca^{2+} -entry“ (CCE)) ein unvollständiges Bild über Struktur, Regulation und Aktivierung dieser Ionenkanäle (Lewis und Cahalan, 1989; Hoth und Penner, 1992; Putney und Bird, 1993; Berridge 1995; Clapham, 1995-a; Birnbaumer et al., 1996; Friel, 1996; Lepple-Wienhues und Cahalan, 1997; Montell, 1997; Parekh und Penner, 1997). Die Hypothese der SOCs basiert auf der Vorstellung, dass diese Kanäle nach einem Abfall der Ca^{2+} -Konzentration in IP_3 -sensitiven Speichern geöffnet werden (Casteels und Droogmans, 1981; Putney, Jr., J. W., 1986; Putney und Bird, 1993).

1.2.1 Das Konzept des speicherregulierten Ca^{2+} -Einstroms (SOC)

Für die Aktivierung des Einstroms von Ca^{2+} über die Plasmamembran nach Rezeptoraktivierung, der nicht über CNG-Kanäle erfolgt, wie z.B. in Zellen des Immunsystems werden diverse Mechanismen diskutiert (zur Übersicht Zitt et al., 2002), die bis heute auf molekularer Ebene ungeklärt sind. Dabei wird dem Einstrom über Plasmamembrankanäle, die nach Depletion IP_3 -sensitiver Speicher aktiviert werden, eine zentrale Rolle zugeschrieben (Putney, 1986; Putney 1990; Berridge, 1995; Parekh und Penner, 1997). Ähnlich einem Kondensator im elektrischen Stromkreis verhindern IP_3 -sensitive Speicher dabei einen Ca^{2+} -Einstrom, wenn sie gefüllt sind, und fördern den Ca^{2+} -Einstrom ins Cytosol, sobald sie geleert sind (daher auch kapazitiver Einstrom (Putney, 1986)). Die Bezeichnung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms mit der implizierten Analogie zu elektrischen Kondensatoren beschreibt den Mechanismus nicht exakt, so dass der Begriff der „store operated channels“ (SOC) vorgeschlagen wurde (Clapham, 1995b).

Die Hypothese der SOCs wurde mittlerweile experimentell in vielen Punkten bestätigt. Ein Pionierexperiment war die Untersuchung des Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Einstroms in azinösen Zellen der Parotis (Ohrspeicheldrüse) einer Ratte (Putney, 1976a). Dabei wurde die submembrane cytosolische Ca^{2+} -Konzentration über den Efflux von $^{42}\text{K}^+$ und $^{86}\text{Rb}^+$ durch Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle gemessen. Die Applikation von Carbachol führte zu einer biphasischen Freisetzung des Radioisotops aus $^{86}\text{Rb}^+$ -beladenen Zellen. Die schnelle transiente Effluxphase war dabei von extrazellulärem Ca^{2+} unabhängig, wohingegen ein dauerhafter Ausstrom von $^{86}\text{Rb}^+$ sowohl durch Chelatierung von extrazellulärem Ca^{2+} als auch durch Zugabe von La^{3+} unterbunden wurde. Unidirektionale Einstromstudien belegten die Aufnahme von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nach Carbachol-Stimulation von azinösen Ohrspeicheldrüsen-

zellen (Putney, 1976b). In späteren Arbeiten wurden, auch aufgrund der Entwicklung Ca^{2+} -sensitiver Fluorophore (Grynkiewicz et al., 1985; Tsien et al., 1985; Poenie et al., 1985), weitere experimentelle Beweise für den Mechanismus des Ca^{2+} -Einstroms über SOCs erarbeitet (zur Übersicht Putney 1990; Parekh und Penner, 1997).

Ein wichtiges Instrument zur Untersuchung von SOCs ist der SERCA-Inhibitor Thapsigargin, ein Sesquiterpenlacton aus *Thapsia garganica*, das durch Hemmung mikrosomaler ATPasen zur passiven Entleerung des ER aufgrund spontaner Ca^{2+} -Durchlässigkeit führt (Thastrup et al., 1989; Thastrup et al., 1990). Thapsigargin erlaubt die Untersuchung von SOCs unabhängig von einer Rezeptoraktivierung. In diversen nicht elektrisch erregbaren Zellen wurde dadurch gezeigt, dass ein Ca^{2+} - oder Mn^{2+} -Einstrom unabhängig von rezeptoraktivierenden Liganden erfolgt (Takemura et al., 1989; Merrit et al., 1989).

Elektrophysiologische Untersuchungen der Ionenselektivität und Leitfähigkeit von SOCs zeigen erhebliche Unterschiede in diversen Zellsystemen (zur Übersicht Parekh und Penner, 1997; Fasolato und Nilius, 1998). Zudem gibt es Hinweise, dass in manchen Zellsystemen zusätzlich nicht-selektive Ionenkanäle (Krause et al., 1996) oder mehrere SOCs (Zimmermann, 1998) aktiviert werden.

1.2.2 „ Ca^{2+} -release-activated current“ (I_{CRAC})

Eine umfangreiche elektrophysiologische Studie des Ca^{2+} -Einstroms in Mastzellen von Hoth und Penner (1992) führte zur Beschreibung eines Stroms, der als „ Ca^{2+} -release-activated current“ (I_{CRAC}) bezeichnet wurde. Dieser Strom wurde nach Speicherdepletion durch IP_3 in Gegenwart des Ca^{2+} -Chelators EGTA im Cytosol zur Unterbindung von Rückkopplungseffekten gemessen. Zu den charakteristischen Eigenschaften von CRAC-Kanälen zählen eine sehr geringe Leitfähigkeit von 24fS und eine sehr hohe Spezifität für Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$), die bei anderen SOC-vermittelten Strömen und auch bei spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen nicht beobachtet wird (Hoth und Penner, 1993). I_{CRAC} zeigt eine charakteristische Strom-Spannungs-Abhängigkeit und ist vom Membranpotential unabhängig (Parekh und Penner, 1997). Durch bi- und trivalente Kationen in der Reihenfolge $\text{La}^{3+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Be}^{2+} = \text{Co}^{2+} = \text{Mn}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ wird I_{CRAC} inhibiert, wobei für Mn^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} eine kompetitive Hemmung und für die übrigen Kationen eine Blockierung der Kanäle angenommen wird (Parekh und Penner 1997). I_{CRAC} wurde in einer Reihe von Zellen nachgewiesen, darunter mit Makrophagen und T-Zellen in weiteren Zelltypen des

Immunsystems (Fasolato et al., 1993; Zweifach und Lewis, 1993; McDonald et al., 1993; Malayev und Nelson, 1995; Somasundaram et al., 1995; Zhang und McCloskey, 1995; Delles et al., 1995). I_{CRAC} ist dabei nur über die Eigenschaften im Hinblick auf die Ionenselektivität und Stromstärke unter bestimmten Bedingungen definiert und erfordert nicht zwangsläufig die Depletion IP_3 -sensitiver Speicher (Krause et al., 1999).

1.2.3 Aktivierungsmechanismen von speicherregulierten Ca^{2+} -Kanälen

Entgegen der Tatsache, dass die Depletion IP_3 -sensitiver Speicher als entscheidender Schritt der Aktivierung von SOCs in vielen Arbeiten hinreichend bewiesen wurde, und die elektrophysiologischen Eigenschaften vieler SOCs charakterisiert wurden, ist die Frage, wie die Information über den Beladungsstand der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher an die Plasmamembran weitergeleitet wird, um dort die Ca^{2+} -Kanäle zu aktivieren, weitgehend ungeklärt. In diversen Arbeiten wurden Hinweise für hauptsächlich drei unterschiedliche Modelle der SOC-Aktivierung erarbeitet.

1.2.3.1 Ca^{2+} -Influx-Faktor

Hinweise für die Existenz eines mobilen Botenstoffes, der nach Speicherentleerung entsendet wird, wurden durch Arbeiten an *Xenopus*-Oocyten (Parekh et al., 1993) und der humanen T-Zelllinie Jurkat (Randriamampita und Tsien, 1993) gefunden.

Randriamampita und Tsien präparierten Extrakte aus Jurkat-Zellen, die mit Haemagglutinin stimuliert wurden. Diese Extrakte waren in der Lage, unabhängig von der Entleerung IP_3 -sensitiver Speicher den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran in diversen Zellen zu aktivieren, auch nach extrazellulärer Applikation. Weitere Charakterisierungen des postulierten „calcium-influx-factors“ (CIF) ergaben, dass es sich um eine Substanz mit einem Molekulargewicht von $<500Da$ handelt, die offenbar über Dephosphorylierung inaktiviert wird, da Phosphataseinhibitoren die Ca^{2+} -Antwort über den CIF erhöhen (Randriamampita und Tsien, 1995).

Parekh et al. (1993) aktivierten *Xenopus*-Oocyten und zeigten durch elektrophysiologische Untersuchungen, dass eine Exzision der Membran-Patches von der Plasmamembran den gemessenen Ionenstrom unterband. Der Strom wurde nach Relokalisierung der Patches in die Zellmembran wieder hergestellt. Dieser Ca^{2+} -Einstrom ist Phosphataseinhibitor-sensitiv und wurde auch von Jurkat-Extrakten hervorgerufen (Thomas und Hanley, 1995). Obgleich der CIF seit den ersten

Experimenten von Randriamampita und Tsien (1993) und Parekh et al. (1993) weiter aufgereinigt werden konnte (Kim et al., 1995) und andere aktuelle Studien die Existenz von CIF untermauern (Csutora et al., 1999), gibt es bis heute keine weitere chemische Charakterisierung des CIF, und die Existenz dieses Faktors wird in anderen Arbeiten kritisch beurteilt (Bird et al., 1995; Gilon et al., 1995).

In weiteren, nicht abschließend bestätigten Studien wird die Beteiligung von cGMP (Xu et al., 1994) oder die Beteiligung von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten, möglicherweise in Zusammenhang mit mobilen Faktoren, diskutiert (von zur Mühlen et al., 1991; Krautwurst et al., 1992; Berven et al., 1994; Fasolato et al., 1994; Iwasawa et al., 1997; Macrez-Leprêtre et al., 1997; Parekh und Penner, 1997).

1.2.3.2 Protein-Protein-Interaktion

Unter der Annahme einer Analogie zu spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen wurde die Hypothese aufgestellt, SOC würden über direkte Protein-Protein-Wechselwirkung mit den Ca²⁺-Speichern aktiviert (Irvine, 1990; 1992). Berridge (1995) erweiterte diese Hypothese durch das „conformational-coupling-model“, in dem er eine direkte Interaktion des IP₃-Rezeptors nach Konformationsänderung bei depletierten Speichern mit den SOC vorschlägt. Obgleich in einigen Studien Hinweise erarbeitet wurden, die mit dieser Hypothese in Übereinstimmung zu bringen sind (siehe Abschnitt 1.3.3), ist die Relevanz eines solchen Mechanismus nicht vollständig geklärt.

1.2.3.3 „Secretion-like coupling model“

Während die beiden bislang vorgestellten Modelle der SOC-Aktivierung von einer konstanten Anzahl von Kanälen in der Plasmamembran ausgehen, wird im Modell des „secretion like couplings“ (Patterson et al., 1999) die Möglichkeit diskutiert, dass eine schnelle und effektive Regulation der Anzahl von Kanälen oder Kanalaktivatoren in der Plasmamembran der entscheidende Parameter des speichregulierten Ca²⁺-Einstroms ist (Yao et al., 1999; Patterson et al. 1999).

Yao et al. (1999) zeigten, dass der Ca²⁺-Einstrom in *Xenopus*-Oocyten durch eine konstitutiv aktive Form des kleinen G-Proteins Rho inhibiert und durch Inaktivierung von wt-Rho verstärkt wurde. Generell sind kleine G-Proteine häufig in den Transport von Vesikeln oder vesikulären Proteinen involviert (Van Aelst und D'Souza-schorey, 1997). Zudem wurde von Yao et al. (1999) die Notwendigkeit des Proteins SNAP-25 für den Ca²⁺-Einstrom in *Xenopus*-Oocyten gezeigt. SNAP-25 ist für das Andocken

von Vesikeln an die Plasmamembran essentiell und steuert so den vesikulären Transport an die Plasmamembran (Calakos und Scheller, 1996).

Diese Daten wurden durch Patterson et al. (1999) untermauert. Der Ca^{2+} -Einstrom nach Bradikinin- oder Thapsigargin-Stimulation wurde hier durch Jasplakinoid und Calyculin A inhibiert. Während Jasplakinoid die Polymerisation und Stabilisierung von Aktinfilamenten bewirkt, ist Calyculin A ein Inhibitor der PPI und PP2A Phosphatasen und führt zur Bildung von kondensierten Aktinschichten an der Plasmamembran. Cytochalasin D hatte keinen Einfluss auf den Bradikinin-induzierten Ca^{2+} -Einstrom, stellte aber den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran in Calyculin A-behandelten Zellen wieder her.

Eine alternative Interpretation dieser Daten erfolgte durch Rosado und Sage (2000), die ebenfalls einen Einfluss von G-Proteinen auf den Ca^{2+} -Einstrom in humanen Thrombocyten zeigen konnten. Sie schlagen ein Modell vor, in dem ein reversibler Transport von ER-Teilen an die Plasmamembran nach Speicherentleerung erfolgt.

1.3 Die „Transient Receptor Potential“-Proteinfamilie

Trotz der intensiven wissenschaftlichen Arbeit auf dem Gebiet des speicherregulierten Ca^{2+} -Einstroms seit 1976 besteht ein unvollständiges Bild über die beteiligten Proteine und die Struktur der Kanäle. Aussichtsreichste Kandidaten für SOC-bildende Komponenten sind Mitglieder der in den letzten Jahren rasant anwachsenden Familie der „transient receptor potential“ (TRP)-homologen Proteine (zur Übersicht Zitt et al., 2002; Vennekens et al., 2002).

Im Gegensatz zu Photorezeptoren in Vertebraten, ist der Mechanismus der Phototransduktion in *Drosophila melanogaster* über G-Proteine an PLC gekoppelt (zur Übersicht Hardie und Minke, 1995; Hardie und Raghu, 2001). Versuche, die Komponenten dieses Mechanismus aufzuklären, führten zur Identifikation einer Mutante, die im Gegensatz zu wt-*Drosophila* nur ein transientes lichtinduziertes Rezeptorpotential aufbaut (Pak et al., 1970). Aus genetischen Untersuchungen ging hervor, dass diese Mutante defizient für ein Gen ist, das als *trp* („transient receptor potential“) bezeichnet wurde (Montell und Rubin, 1989). Hardie und Minke (1992) vermuteten, dass *trp* für einen Ca^{2+} -Kanal codiert, weil das fehlende dauerhafte Rezeptorpotential in TRP-Mutanten durch eine verminderte Permeabilität der Plasmamembran für Ca^{2+} bedingt ist. Aus der Aminosäuresequenz postulierten Phillips et al. (1992) eine große Strukturhomologie von TRP sowie dem eng

verwandten TRPL („TRP-like“) zu spannungsabhängigen Kanälen. Während TRPL-defiziente Mutanten einen reduzierten lichtinduzierten Einstrom von Ca^{2+} mit veränderten Kanaleigenschaften zeigen, sind TRP/TRPL doppelt defiziente Mutanten nicht in der Lage, einen Ca^{2+} -Einstrom nach Lichtinduktion aufzubauen (Hardie et al. 2001). Eine Speicherabhängigkeit dieser Ca^{2+} -Kanäle muss nach Untersuchungen in IP_3 -Rezeptor-negativen Mutanten, die einen Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran zeigen, angezweifelt werden (Acharya et al., 1997; Raghu et al., 2000). Eine alternative Hypothese, wonach die Aktivierung von TRP/TRPL DAG abhängig ist, wurde durch Stimulation von isolierten *Drosophila* Photorezeptorzellen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Chyb et al., 1999) und durch Untersuchungen an einer DAG-Kinase-defizienten Mutante (*rgdA*) gefestigt (Raghu et al., 2000).

Ein wichtiger Aspekt, sowohl der *Drosophila*-Phototransduktion als auch des Ca^{2+} -Einstroms generell, ist die Organisation des Signalkomplexes. In diesem Zusammenhang wurde in *Drosophila melanogaster* das Adapterprotein INAD identifiziert, das über fünf PDZ-Domänen (zur Übersicht Fanning und Anderson, 1999) Komponenten wie TRP, TRPL, $\text{PLC}\beta$, Rhodopsin sowie PKC rekrutieren kann und zudem in der Lage ist, homomere Komplexe zu bilden (Tsunoda und Zuker, 1999; Hardie et al., 2001).

Im Verlauf der letzten Jahre wurde eine Vielzahl von TRP-homologen Proteinen aus *Ceanorhabditis elegans* (13 Gene) (Harteneck et al., 2000) und diversen Säuger-Genomen kloniert (zur Übersicht Clapham et al., 2001; Vennekens et al., 2002; Zitt et al., 2002). In humanen Zellen wurden bislang 18 und in murinen Zellen 20 Gene identifiziert, die für TRP-homologe Proteine codieren. Harteneck et al. (2000) erarbeiteten anhand der *C. elegans*-TRP-Gene einen ersten Vorschlag, die zunächst verworrene Nomenklatur dieser Proteine zu ordnen. In Anlehnung an die Einteilung in STRP („short“), LTRP („long“) und OTRP („Osm-9-like“) nahmen Clapham et al. (2001) eine Einteilung der Säuger-Homologen in die Subfamilien TRPC („canonical“), TRPM („melastatin“) und TRPV („vanilloid“) vor.

Als gemeinsames Strukturmerkmal weisen alle bekannten TRP-Proteine sechs Transmembranregionen (TM) auf, wobei die Schleife zwischen TM 5 und 6 als membranständig postuliert wird und vermutlich die Porenregion ausbildet (Wes et al., 1995; Harteneck et al., 2000; Clapham et al., 2001). In Analogie zu spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, oder auch CNG-Kanälen wird für die Bildung eines Kanals die Oligomerisierung von vier TRP-Proteinen angenommen, wobei

sowohl rein homomere Kanäle, als auch heteromere Strukturen diskutiert werden (Birnbaumer et al., 1996). Die terminalen Regionen sind cytosolisch und weisen bei TRPC und TRPV am N-Terminus zwei bis vier Ankyrin-ähnliche Wiederholungen sowie bei TRPC eine „coiled-coil“-Domäne auf. Die C-Termini von TRP-Proteinen sind sehr variabel und weisen einige interessante Strukturmerkmale auf (Abschnitt 1.3.1- 1.3.3). Tang et al. (2001) zeigten in einer *in vitro*-Studie, dass die C-Termini aller TRPC-Proteine Calmodulin- und IP₃-R-Bindemotive aufweisen. In TRPC-Proteinen ist nahe der sechsten TM-Region das Aminosäuremotiv EWKFAR konserviert mit einer daran anschließenden Prolin-reichen Region, die auch in TRPM-Proteinen vorhanden ist (Wes et al., 1995; Friedrich, 2001; Clapham et al., 2001; Vennekens et al., 2002; Zitt et al., 2002). Die Peptidlänge der Proteine variiert von 500AS bei Mitgliedern der TRPC-Familie bis zu 2000AS bei Mitgliedern der TRPM-Familie. Basierend auf Sequenzvergleichen ergibt sich für die TRP-Proteine der in Abb. 1.1 dargestellte phylogenetische Stammbaum.

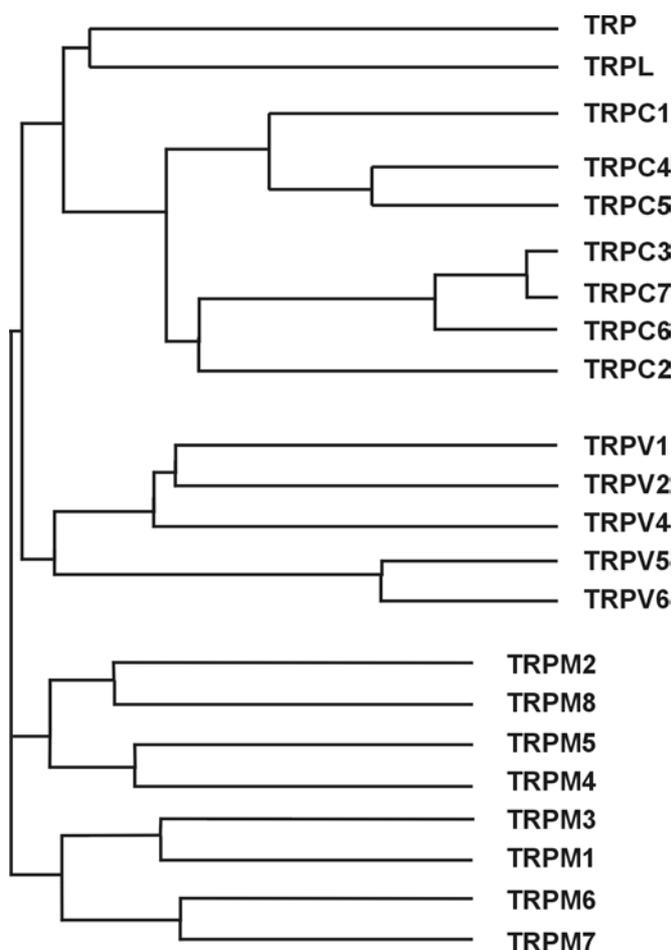


Abb. 1.1 Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Proteinfamilie

Phylogenetische Zusammenhänge in der TRP-Proteinfamilie wurden anhand der „neighbour-joining-method“ (Saitou und Nei, 1987) analysiert. Die evolutionäre Distanz wird durch die Zweiglänge angegeben (Clapham et al., 2001).

1.3.1 Die TRPV-Subfamilie

Derzeit sind fünf TRPV-Proteine bekannt, die aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in drei Untergruppen eingeteilt werden können (TRPV1/2, TRPV4, TRPV5/6). Die Kanaleigenschaften, sowie bekannte Aktivierungs- und Regulationsmechanismen sind in Tab. 1.1 zusammengefasst (zur Übersicht Gunthorpe et al., 2002).

Das derzeit am besten untersuchte Protein dieser Subfamilie ist der Vanilloidrezeptor (TRPV1), der nicht durch Thapsigargin, aber durch Capsaizin, einer Pfeffersubstanz, und auch durch moderate Hitze ($\geq 43^{\circ}\text{C}$) und niedrige pH-Werte ($\leq 5,9$) aktivierbar ist (Caterina et al., 1997; Garcia-Martinez et al., 2000; Jordt und Julius, 2002). Premkumar und Ahern (2000) konnten zudem die Aktivierung von TRPV1 durch PKC zeigen. Untersuchungen an einer TRPV1-defizienten Maus bestätigen, dass dieses Kanalprotein zur Reaktion auf schmerzhafte Substanzen sowie thermale Stimuli beiträgt (Caterina et al., 2000).

TRPV2 ist 50% identisch zu TRPV1, insensitiv gegenüber Capsaizin sowie niedrigen pH-Werten und benötigt Temperaturen $\geq 52^{\circ}\text{C}$ zur Aktivierung (Caterina et al., 1999). Im Vergleich zu TRPV1, das nur in sensorisch neuronalen Geweben exprimiert wird, impliziert die Präsenz von TRPV2 in nicht-sensorischen Geweben andere Funktionen (Caterina et al., 1999). Kanzaki et al. (1999) fanden einen durch IGF-1 („insuline-like-growth factor“) stimulierten Transport von TRPV2 an die Plasmamembran.

TRPV4 bildet einen nicht selektiven Kanal, der durch einen Abfall der Osmolarität im Extrazellularraum, oder auch durch Phorbolster-Derivate aktiviert wird (Strotmann et al., 2000; Liedke, et al., 2000; Wissenbach et al., 2000; Watanabe et al., 2002).

TRPV5 und TRPV6 zeigen in heterologen Expressionssystemen elektrophysiologische Eigenschaften, die im Hinblick auf die Ionenselektivität I_{CRAC} sehr ähneln (Vennekens et al., 2000; Nilius et al., 2000; Yue et al., 2001; Vennekens et al., 2001; Nilius et al., 2001). TRPV5 wird in allen untersuchten Geweben gemeinsam mit Calbindin exprimiert, und es wird eine Funktion bei der aktiven Reabsorption von Ca^{2+} in der Niere angenommen (Hoenderop et al., 2002; Muller et al., 2001; Hoenderop et al., 2000). Untersuchungen von TRPV6 nach heterologer Expression in CHO-K1-Zellen veranlassten Yue et al. (2001) zu der Annahme, TRPV6 sei zumindest am CRAC-Kanal beteiligt.

Tab. 1.1 Funktionale Eigenschaften von Kanalproteinen der TRPV-Subfamilie (Referenzen siehe 1.3.1)

Name	Selektivität (P_{Ca}/P_{Na})	Einzelkanal-leitfähigkeit (pS)	Regulation	Expressionsverteilung
TRPV1 (VR1)	3 (Hitze) 9 (Vanilloid)	35-110 (Ca^{2+} -frei)	Capsaizin, Hitze, PKC	Rückenmark, sensorische Neuronen
TRPV2 (VRL1, GRC)	3	nicht bestimmt	Hitze, Wachstumsfaktoren	Rückenmark, Gehirn, Milz, Darm, sensorische Neuronen
TRPV4 (OTRPC4, TRP12)	6	90	Osmolarität, Phorbolster-Derivate	Niere, Skelettmuskeln, Ohr, Gehirn, Luftröhre
TRPV5 (ECa2, CaT2)	>100	75 (Ca^{2+} -frei)	niedrige $[Ca^{2+}]_i$, Speicherdepletion	Darm, Niere, Plazenta, Gehirn, Pankreas
TRPV6 (ECa1, CaT1)	>100	42-58 (Ca^{2+} -frei)	niedrige $[Ca^{2+}]_i$	Darm, Plazenta, Prostata, Pankreas

1.3.2 Die TRPM-Subfamilie

Die Subfamilie der TRPM-Proteine umfasst derzeit acht Mitglieder, die aufgrund ihrer Struktur in vier Untergruppen eingeteilt werden können (TRPM1/3, TRPM2/8; TRPM4/5, TRPM6/7). Die bekannten Eigenschaften der Kanalproteine sind in Tab. 1.2 zusammengestellt.

TRPM1 vermittelt den Ca^{2+} -Einstrom nach heterologer Expression in HEK293-Zellen und wird über eine kurze cytosolische Isoform dieses Proteins negativ reguliert (Xu et al., 2001). Offenbar korreliert die Expression von TRPM1 reziprok mit der Metastasierungsrate von Melanomzellen (Xu et al., 2001). Zu TRPM3 existieren derzeit keine Daten.

TRPM8 ist ein Ca^{2+} -permeabler Kanal, der durch Temperaturen $<26^{\circ}C$ und durch Bindung „kalter“ Substanzen wie Menthol aktiviert wird (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002).

Ein besonders interessantes Mitglied dieser Subfamilie ist TRPM2 (Nagamine et al., 1998). Dieses Kanalprotein (1503AS) enthält am cytosolischen C-Terminus eine NUDT9-homologe Domäne. Diese Domäne ist in der Lage, als ADP-Pyrophosphatase zu fungieren, und Einzellkanalmessungen zeigen Hinweise, dass ADP-Ribose den Kanal aktiviert (Perraud et al., 2001, Sano et al., 2001). Ein Zusammenhang zwischen der enzymatischen Aktivität und dem Öffnungsmechanismus des Kanals ist daher möglich. Hara et al. (2002) konnten zudem sowohl nach heterologer Expression in HEK293-Zellen als auch durch „antisense“-Experimente eine Aktivierung durch H_2O_2 und damit eine Sensitivität gegenüber einer Veränderung des Redox-Status nachweisen, die vermutlich auf eine

agonistische Bindung von β -NAD⁺ (Nikotinamidadenindinukleotid) an das MUT-Motiv der NUDT9-Domäne zurückzuführen ist (Hara et al., 2002).

Während zu TRPM6 derzeit keine Daten vorliegen, handelt es sich bei TRPM7 (1863AS) um ein weiteres TRP-Protein mit enzymatischer Aktivität. Allerdings wird kontrovers diskutiert, ob die C-terminale Kinasedomäne, die eine Reihe von Substraten einschließlich TRPM7 selbst phosphorylieren kann, einen Einfluss auf den Öffnungsmechanismus des Kanals hat (Runnels et al., 2001; Nadler et al., 2001; Hermosura et al., 2002). Runnels et al. (2002) fanden in Herzzellen und heterologen Expressionssystemen eine Inaktivierung von TRPM7 durch PLC-vermittelte Hydrolyse von PIP₂. Die Unterbrechung des TRPM7-Gens durch homologe Rekombination in DT40-Zellen erwies sich als letal (Nadler et al., 2001).

Tab. 1.2 Funktionale Eigenschaften von Kanalproteinen der TRPM-Subfamilie (Referenzen siehe 1.3.2)

Name	Selektivität (P _{Ca} /P _{Na})	Einzelkanal-leitfähigkeit (pS)	Regulation	Expressionsverteilung
TRPM1 (Melastatin, LTRPC1)	nicht selektiv	nicht bestimmt	Translokation?	Auge
TRPM2 (TRPC7, LTRPC2)	0,3	nicht bestimmt	ADP-Ribose, H ₂ O ₂	fötales und adultes Gehirn, Plazenta, Lunge, Milz, Auge
TRPM3	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
TRPM4	nicht selektiv	nicht bestimmt	nicht bestimmt	Prostata, Luftröhre, Herz
TRPM5	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	Darm, Leber, Lunge, Niere
TRPM6 (ChaK2)	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
TRPM7 (ChaK1, TRP-PLIK)	0,34 (P _{Ca} /P _{Cs})	105	Mg ²⁺ -ATP, Phosphorylierung	Niere, Herz, Leber, Milz Lunge, Gehirn
TRPM8 (CMR1, TRP-p8)	3,2	83	Kälte (<26°C), Menthol	Prostata, dorsale Wurzelganglien

1.3.3 Die TRPC-Subfamilie

TRPC-Proteine zeigen die engste strukturelle Verwandtschaft zu den „Gründungsmitgliedern“ der TRP-Proteinfamilie aus *Drosophila melanogaster*. Bislang sind aus dem Mausgenom sieben und aus dem Humangenom fünf TRPC-Proteine identifiziert, die nach ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften in die Subgruppen TRPC1, TRPC3/6/7, TRPC4/5 und TRPC2 unterteilt werden können. Die zuerst klonierte cDNA dieser Subfamilie kodiert für TRPC1 (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1995). TRPC1 hat eine zentrale Bedeutung in der vorliegenden Arbeit und wird

daher in Abschnitt 1.3.3.1 explizit vorgestellt. Mittlerweile liegen für TRPC-Proteine eine Vielzahl von zum Teil widersprüchlichen Daten, sowohl aus heterologen Systemen als auch aus „antisense“-Experimenten in diversen Zellsystemen vor (zur Übersicht Zitt et al., 2002). Die funktionalen Eigenschaften dieser Proteine sind in Tab. 1.3 zusammengefasst.

Während TRPC2 im menschlichen Genom ein Pseudogen zu sein scheint (Wissenbach et al., 1998), wurden in der Maus vier Isoformen gefunden, von denen die kürzeren Isoformen α und β dem Rattenhomolog ähneln (Liman et al., 1999; Vannier et al., 1999; Hofmann et al., 2000). TRPC2 ist u.a. im Vomeronasalorgan von Ratten (Liman et al., 1999) und in den Köpfen von Mausspermien (Jungnickel et al. 2001) lokalisiert. Heterologe Expression der längeren Isoformen A und B in COS-M6-Zellen führt zur Erhöhung des Thapsigargin- und Rezeptor-induzierten Ca^{2+} -Einstroms (Vannier et al. 1999). Die Isoformen α und β sind nach Expression in HEK293-Zellen nicht auf der Plasmamembran lokalisiert und haben keinen Einfluss auf den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran. Möglicherweise ist TRPC2 an dem Ca^{2+} -Signal in Spermien nach Fertilisation beteiligt (Jungnickel et al., 2001).

TRPC3, TRPC6 und TRPC7 sind zu 75% identisch, bilden Kanäle mit geringer Ionenselektivität und sind auf PKC-unabhängige Weise durch DAG-Analoga stimulierbar (Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999). Die Daten bezüglich der Speicherabhängigkeit von TRPC3 sind widersprüchlich. Insbesondere in Zusammenhang mit der Beschreibung der Interaktion des IP_3 -Rezeptors mit TRPC3 (Kiselyov et al., 1998; Kiselyov et al., 1999; Boulay et al., 1999; Lockwich et al., 2001) wurde zunächst eine Speicherregulierung von TRPC3 postuliert, die auch in einigen Studien beobachtet wurde (Zhu et al., 1996; Preuss et al., 1997; Groschner et al. 1998; Wu et al., 2000). Dagegen charakterisierten Zitt et al. (1997) TRPC3 als Ca^{2+} -abhängigen, konstitutiv aktiven Kanal, der nicht speicherreguliert ist. Die TRPC3- IP_3 -R-Interaktion erfolgt über eine Calmodulin-Bindungsdomäne in TRPC3, die bei Aktivierung durch den IP_3 -R besetzt wird (Zhang et al., 2000). Untersuchungen von Venkatachalam et al. (2001) in TRPC3-exprimierenden wt- und IP_3 -R-defizienten-DT40-Zellen ergaben keine Speicherabhängigkeit, wohingegen Vazquez et al. (2001) eine speicherregulierte Aktivierung auf IP_3 -R-abhängige und -unabhängige Weise fanden. Auf den Thapsigargin-induzierten Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran haben sowohl TRPC6 als auch TRPC7 keinen Einfluss (Okada et al., 1999; Boulay et al. 1997). TRPC6 ist ein essentieller Teil des α_1 -Adrenorezeptor-aktivierten Kationen-

kanals in Kaninchen-Portalvenen-Myocyten und hat somit möglicherweise physiologische Funktionen in Herzzellen (Inoue et al., 2001). Hassock et al. (2002) fanden Hinweise, dass TRPC6 den speicher-unabhängigen Ca^{2+} -Kanal in Thrombocyten bildet. TRPC7 wurde bislang nur aus dem Mausgenom kloniert (Okada et al., 1999).

Murines TRPC4 und TRPC5 können homomere Kationenkanäle bilden, die sowohl nach Stimulation von G_q -gekoppelten Rezeptoren, als auch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert werden (Okada et al., 1998; Schäfer et al., 2000). Die Speicherabhängigkeit beider Kanalproteine ist nicht vollständig geklärt. Während in „antisense“-Studien sowohl eine Beteiligung von TRPC4 an SOCs (Birnbaumer et al., 1996; Zhu et al., 1996), als auch eine Abhängigkeit von DAG-Derivaten (Wu et al., 2002) beschrieben wurde, zeigen andere Daten eine konstitutive Aktivität von TRPC4, die nicht weiter durch PLC oder Speicherdepletion beeinflussbar ist (McKay et al., 2000). Offenbar ist der Effekt von TRPC4 stark vom verwendeten Zellsystem abhängig. Ein alternativer Mechanismus der Aktivierung könnte eine gemeinsame Rekrutierung von PLC, TRPC4 und TRPC5 durch den „ Na^+/H^+ -exchanger regulatory factor“ (NHERF) sein, die durch Interaktion der NHERF-PDZ-Domäne mit der PDZ-Bindedomäne von TRPC4 und TRPC5 vermittelt wird (Tang et al., 2000). Die PDZ-Bindedomäne von TRPC4 kontrolliert zudem die Lokalisation in der Plasmamembran von HEK293-Zellen (Mery et al., 2002). Untersuchungen an einer TRPC4-defizienten Maus implizieren eine Funktion in der Endothel-abhängigen Vasorelaxation von Blutgefäßen (Freichel et al., 2001).

Tab. 1.3 Funktionale Eigenschaften von Kanalproteinen der TRPC-Subfamilie (Referenzen siehe 1.3.3/1.3.3.1)

Name	Selektivität ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$)	Einzelkanal-leitfähigkeit (pS)	Regulation	Expressionsverteilung
TRPC1 (TRP1)	Nicht selektiv	nicht bestimmt	Speicher-regulation?	verbreitet
TRPC2 (TRP2)	Nicht bestimmt	nicht bestimmt	Speicher-regulation?	Vomeronasalorgan, Hoden, Herz, Gehirn, Spermien
TRPC3 (TRP3)	1,5	66	DAG, IP_3 -R	Gehirn, Plazenta, Herz, Muskel
TRPC4 (CCE1, TRP4)	7	41	Rezeptorge-steuert, Spei-cherdepletion	Gehirn, Hoden, Plazenta, Herz, Nebenniere, Endothelzellen
TRPC5 (CCE2, TRP5)	9	63	Rezeptorge-steuert, Spei-cherdepletion	Gehirn, Hoden
TRPC6 (TRP6)	5	35	DAG	Lunge, Gehirn, Muskel, Herz, Niere
TRPC7 (TRP7)	2	nicht bestimmt	DAG	Herz, Lunge, Auge, Milz, Hoden

1.3.3.1 Struktur und Funktionen von TRPC1 (TRP1)

TRPC1 ist ein über die Spezies extrem homologes Protein (bovines, murines und humanes TRPC1 sind zu >95% identisch). Derzeit sind für murines TRPC1 vier Spleißvarianten bekannt (Sakura und Ashcroft, 1997). Aus der AS-Sequenz des 776AS langen Maus-TRPC1 β (in dieser Arbeit mTRP1 β) wurden folgende Strukturmerkmale postuliert (Wes et al., 1995; Minke und Selinger, 1996). Gemäß der Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte-Doolittle werden sechs Transmembranregionen (TM) im Bereich von AS 331-627 mit der potentiellen Porenregion (AS 538-601) gebildet. Die cytosolische Schleife zwischen der zweiten und dritten TM ist dabei mit 47 AS deutlich länger als die anderen Schleifen. Der cytosolische N-Terminus enthält drei Ankyrin-ähnliche Wiederholungen (AS 61-170) und eine „coiled-coil“-Region (AS 220-265). Der cytosolische C-Terminus enthält neben der für TRPC-Proteine typischen EWKFAR- und Prolin-reichen Region (AS641-675) eine Dystrophin-ähnliche Domäne (AS 683-776), die eine weitere „coiled-coil“-Region enthält (AS 724-760). Das Konsensusmotiv für die Aktin-Bindungsdomäne von Dystrophin (Vancompernelle et al., 1991; Vancompernelle et al., 1992; Prekeris et al., 1996) ist allerdings nicht enthalten.

Erste elektrophysiologische Messungen an TRPC1-exprimierenden CHO-Zellen ergaben eine geringe Selektivität für Ca^{2+} und Speicherabhängigkeit (Zitt et al., 1996). Die Speicherabhängigkeit von TRPC1 wurde ebenso in vaskulären glatten Muskelzellen beschrieben (Xu and Beech, 2001). In SF9-Zellen bildet TRPC1 einen konstitutiv aktiven Ionenkanal (Sinkins et al., 1998). Sowohl die Expression von TRPC1, als auch die Injektion von „antisense“-Konstrukten in *Xenopus*-Oocyten zeigten keine Beeinflussung des speicher-abhängigen Ca^{2+} -Einstroms (Brereton et al., 2000). Aus „antisense“-Experimenten in HSG-Zellen (Liu et al., 2000) und in A549 sowie Endothelzellen (Brough et al., 2001) geht hervor, dass endogenes TRPC1 einen Einfluss auf den speicherregulierten, aber nicht den DAG induzierten Ca^{2+} -Einstrom hat. Singh et al. (2000) stellten fest, dass nach Expression einer TRPC1-Mutante mit deletiertem cytosolischem C-Terminus ein deutlich höherer Einstrom von Ca^{2+} nach Thapsigarginstimulation in HSG-Zellen erfolgte, als nach Expression von wt TRPC1.

Im Zusammenhang mit TRPC1 wurden die ersten Hinweise auf heteromere TRP-Kanäle gefunden. Strübing et al. (2001) zeigten, dass nach Co-Expression von TRPC1 und TRPC5 Kanäle mit vollständig veränderten Kanaleigenschaften, wie z.B:

einer Spannungsabhängigkeit, entstehen. Eine Interaktion von TRPC1 und TRPC5 konnte durch Co-Präzipitation nachgewiesen werden. Die Co-Expression von TRPC1 und TRPC3 führte ebenfalls zu veränderten Kanaleigenschaften (Linschinger et al., 2000). Diese Daten wurden durch „antisense“-Experimente mit TRPC1- und TRPC3-Konstrukten bestätigt, in denen ein wesentlich größerer Effekt durch kombinierte TRPC1/TRPC3-„antisense“-Konstrukte auftrat, als durch einzelne Konstrukte (Wu et al., 2000). Friedrich (2001) konnte nach transienter Expression in COS-Zellen TRPC1 mit TRPC2 und TRPC3 co-präzipitieren. In dem gleichen Modellsystem fand er zudem eine Interaktion von TRPC1 mit LAT. Ein weiterer Interaktionspartner mit entfernter Verwandtschaft zu TRP-Proteinen ist PKD2 („polycystic kidney disease“), das sowohl über den C-Terminus, als auch über Transmembranbereiche mit TRPC1 interagiert (Tsiokas et al., 1999). Rosado und Sage (2000) zeigten eine von der Depletion des ER abhängige Interaktion von endogenem TRPC1 mit dem IP₃-R in Blutplättchen. Weitere Studien zeigen, dass eine Reorganisation des Cytoskeletts für den speicherregulierten Ca²⁺-Einstrom in Thrombocyten erforderlich ist (Rosado et al. 2000a; 2000b; 2001), und TRPC1 über einen „secretion-like coupling“-Mechanismus in diesen Prozess involviert ist (Rosado und Sage, 2001; Rosado et al., 2002). An dieser Stelle sollte allerdings auf Studien von Ong et al. (2002) hingewiesen werden, die die Spezifität des in vielen Arbeiten für die Detektion oder Präzipitation von endogenen TRPC1 verwendeten polyklonalen Antikörpers anzweifeln. Lockwich et al., (2000) postulierten nach Co-Präzipitationsexperimenten in HSG-Zellen eine Assoziation von TRPC1 in „lipid rafts“ mit Caveolin, Gα_{q/11} und dem IP₃-R.

Neben wenigen Studien an IP₃-R-defizienten DT40-Zellen (1.3.3) liegt bezüglich einer Funktion von TRP-Proteinen beim Ca²⁺-Einstrom in B-Zellen nur die Arbeit von Mori et al. (2002) vor. Durch homologe Rekombination wurde hier das Gen des Huhn-homologen TRPC1 in DT40-Zellen unterbrochen und damit inaktiviert. Ca²⁺-Messungen ergaben einen reduzierten aber nicht vollständig unterdrückten Ca²⁺-Einstrom in die TRPC1-defizienten Zellen nach Thapsigargin- und BCR-Stimulation. Die Oszillationsfrequenz ist gegenüber dem wt deutlich reduziert, was zu einer geringeren NF-AT-Aktivität führt. Zudem wurde eine abgeschwächte Mobilisierung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern nach BCR-Aktivierung beobachtet. Dieses Erkenntnis ist mit allen bisherigen Daten über TRP-Proteine schwer in Übereinstimmung zu bringen und richtet ein neues Licht auf die Untersuchung von

TRP-Proteinen. In scheinbarer Übereinstimmung mit diesen Daten ist die Erkenntnis von Hassock et al. (2002), dass TRPC1 in Thrombocyten in intrazellulären Membranstrukturen lokalisiert ist. Nicht untersucht ist hier ein möglicher Einfluss einer Aktivierung auf die Lokalisation von TRPC1.

Ogleich eine Vielzahl von Daten über TRP-Proteine, insbesondere für TRPC1, vorliegen, besteht in Bezug auf genaue Struktur, Funktion und Regulation dieser Kanalproteine auch aufgrund von widersprüchlichen Daten ein unklares Bild. Dies gilt insbesondere für den Einfluss von TRP-Proteinen auf den Ca^{2+} -Einstrom in Lymphocyten. Neben dem grundlagenwissenschaftlichen Interesse der Identifikation und Charakterisierung von Ca^{2+} -Kanälen in Immunzellen, besteht im Hinblick z.B. auf die Therapie von Autoimmunerkrankungen oder nach Gewebetransplantationen zudem eine medizinisch-pharmakologische Relevanz.

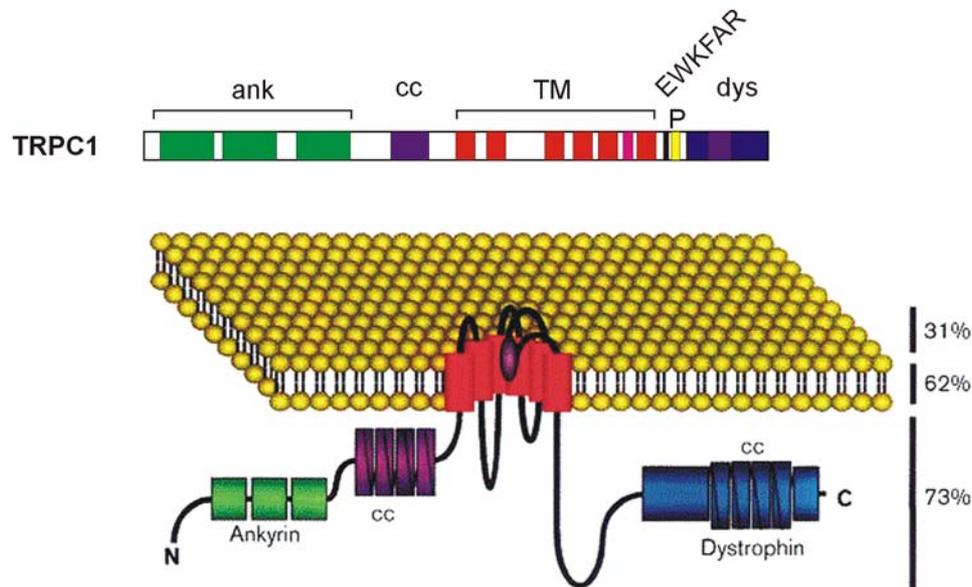


Abb. 1.2 Domänenstruktur von mTRP1

Die Transmembranregionen sind in rot dargestellt mit der potentiellen Pore (magenta). Die Prozentangaben zeigen den Grad der Übereinstimmung von TRPC1 zu TRP. Die „coiled-coil“ Strukturen sind mit cc bezeichnet und die prolinreiche Region (P) ist gelb markiert.

2 Problemstellung

Eine wichtige Komponente der Aktivierung von B-Lymphocyten ist die Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Neben der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern, wie dem ER, ist für die vollständige Aktivierung von B-Zellen ein Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran erforderlich. Während die Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem ER nach Rezeptoraktivierung sehr gut untersucht ist, liegen über die Zusammensetzung, Aktivierung und Regulation von Ca^{2+} -permeablen Kanälen, die den Einstrom über die Plasmamembran ermöglichen, kaum Daten vor (zur Übersicht siehe Einleitung). Potentielle Kandidaten für Ca^{2+} -Kanal-bildende Proteine sind die Mitglieder der TRP-Proteinfamilie (Clapham et al., 2001; Zitt et al., 2002; Vennekens et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von TRP-Proteinen auf den Ca^{2+} -Einstrom in B-Zellen untersucht werden. Das zur TRPC-Subfamilie gehörende Protein mTRP1 β , das in den meisten B-Zelllinien exprimiert wird, wurde dabei in das Zentrum dieser Untersuchungen gestellt. TRPC1 ist zudem das einzige TRP-Protein, für das durch parallel zu dieser Arbeit von Mori et al. (2002) durchgeführte Studien erste Hinweise für eine Beteiligung am Ca^{2+} -Einstrom in der Hühner-B-Zelllinie DT40 vorliegen.

Ein Manko der bisherigen Erforschung von TRP-Proteinen ist, dass in Abhängigkeit des verwendeten Zellsystems nach heterologer Expression oder in „antisense“-Experimenten sehr unterschiedliche, teilweise widersprüchliche Daten publiziert wurden (zur Übersicht siehe Einleitung). Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche B-Zell-Modellsysteme etabliert werden. Die durchgeführten Untersuchungen wurden strategisch in drei Bereiche unterteilt.

Zum einen sollte der Einfluss von mTRP1 β auf den Ca^{2+} -Einstrom in B-Zelllinien nach heterologer Expression untersucht werden. Erstmals sollten für eine solche Untersuchung verschiedene Zelllinien verwendet werden, die sich insbesondere in der endogenen Expression von TRPC1 unterscheiden. Um Informationen über die funktionelle Einbindung von TRPC1 in den Signalkomplex von B-Zellen zu erhalten, sollten die Zellen sowohl über den BCR als auch durch ER-Depletion mit Thapsigargin stimuliert werden.

Zudem sollten Deletionsmutanten von mTRP1 β heterolog in B-Zellen und in der für Ca²⁺-Einstrom-Untersuchungen in vielen Studien etablierten Zelllinie HEK293 exprimiert werden, um den funktionellen Einfluss verschiedener Domänen zu untersuchen. In diesen Mutanten wurden postulierte cytosolische Domänen (Wes et al., 1995), wie die Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen, die „coiled-coil“-Region am N-Terminus, die über TRPC-Proteinen stark konservierte EWKFAR-Sequenz oder die Dystrophin-ähnliche Domäne sowie die postulierte Porenregion deletiert (Engelke, 1999; Friedrich, 2001). Zusätzlich sollte zur Identifikation einer negativ regulierenden Domäne (Friedrich, 2001) eine Mutante generiert werden, in der 35AS von EWKFAR bis zur Dystrophin-ähnlichen Domäne deletiert sind.

Eine neue Strategie zielt darauf ab, den Einfluss von TRP-Proteinen auf den Ca²⁺-Einstrom in B-Zellen zu untersuchen, die, aufgrund einer konditionalen Veränderung des Zellzyklus, das Expressionsmuster von TRP-Proteinen anpassen. Ohne die Beeinflussung eines einzelnen TRP-Proteins durch heterologe Expression oder „antisense“-RNA erfolgt so endogen eine vollständige Anpassung der für das Ca²⁺-Signal erforderlichen Komponenten in der untersuchten Zelle. Damit werden erstmals TRP-Proteine unter Bedingungen charakterisiert, die eine Korrelation von Ca²⁺-Einstrom und der physiologischen Situation der Zelle mit den beteiligten Kanalproteinen ermöglichen.

Besonders durch die Kombination verschiedener Modellsysteme werden, im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, nicht nur Rückschlüsse auf die Ca²⁺-Permeabilität der Plasmamembran, sondern auch auf den Einfluss von TRP-Proteinen im Kontext mit dem Signaltransduktionskomplex von B-Zellen ermöglicht.

3 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von TRP-Proteinen auf den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran in B-Lymphocyten untersucht werden. Dazu wurde eine Strategie gewählt, die durch Kombination verschiedener Modellsysteme sowohl auf die Aufklärung der Beteiligung von TRP-Proteinen an dem Ca^{2+} -Signal abzielt, als auch Einblick in die funktionelle Bedeutung cytosolischer Domänen und die Einbindung von TRP-Proteinen in den BCR-Signalkomplex ermöglicht.

In dieser Arbeit wurden erstmalig umfangreiche Lokalisierungsstudien vorgenommen, die zeigen, dass mTRP1 β hauptsächlich in der Plasmamembran, aber auch in intrazellulären Membranstrukturen lokalisiert ist.

Durch Western Blot-Analyse konnten Hinweise erarbeitet werden, die die aufgrund von Strukturhomologien zu spannungsabhängigen Ionenkanälen postulierte Tetramerisierung von TRP-Proteinen beweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Deletion der „coiled coil“-Domäne in mTRP1 β die Bildung von Homotetrameren begünstigt.

Durch Ca^{2+} -Einstrom-Untersuchungen an verschiedenen B-Zelllinien wurde gezeigt, dass eine heterologe Expression von mTRP1 β nur dann einen Einfluss auf den rezeptoraktivierten Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran hat, wenn in der untersuchten Zelllinie TRPC1 endogen exprimiert wird, wohingegen der Ca^{2+} -Einstrom nach Speicherdepletion mittels Thapsigargin, unabhängig von der endogenen TRP-Expression, durch mTRP1 β erhöht wird. Durch diese Daten wurde erstmals belegt, dass die Funktion von mTRP1 β von weiteren, spezifischen Komponenten und der Organisation im Signalkomplex von B-Zellen abhängig ist.

In dieser Arbeit wurden die Daten von Mori et al. (2002) aus Untersuchungen an TRPC1-defizienten DT40-Zellen nicht nur ergänzt, sondern in entscheidenden Punkten korrigiert. Es konnte eindeutig widerlegt werden, dass TRPC1 einen Einfluss auf die Mobilisierung von Ca^{2+} aus dem ER nach BCR-Quervernetzung hat.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Deletionsmutanten zur Charakterisierung funktioneller Domänen eingesetzt, die zu neuen Erkenntnissen über die Funktion von mTRP1 β geführt haben.

- Die funktionelle Untersuchung von mTRP1 β -Mutanten mit deletierter 5. und 6. Transmembranregion in HEK293- und B-Zellen bestätigen experimentell die durch Wes et al. (1995) postulierte Porenregion von mTRP1 β .
- Die Messungen des Ca²⁺-Einstroms an Zellen, die die TRP1 β -Mutante mit deletierten Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen exprimieren, deuten darauf hin, dass diese Domäne für die Organisation von mTRP1 β im Signalkomplex der Zelle essentiell ist.
- In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die „coiled-coil“-Domäne von mTRP1 β eine strukturbildende Funktion hat und möglicherweise die Zusammensetzung heteromerer TRP-Kanäle determiniert.
- Es wurde eine negativ regulierende AS-Sequenz identifiziert, die prolinreich ist und 35AS beginnend bei der hochkonservierten EWKFAR-Sequenz umfasst.

Zudem wurde in dieser Arbeit ein neuartiges Modellsystem zur Untersuchung von TRP-Proteinen gefunden. Die Analyse des Ca²⁺-Einstroms in humanen B-Zelllinien, in denen eine endogene Steuerung der Expression von TRPC1, TRPV2 und TRPM2 durch die konditionale Expression von c-myc und EBNA2 erfolgt, belegt, dass einzelne TRP-Proteine nicht isoliert zu betrachten sind, sondern in Kombination mit weiteren Kanalproteinen und anderen noch zu identifizierenden Komponenten im Signalkomplex von B-Zellen organisiert sind.

Zusammenfassend liefern die Untersuchungen an den verschiedenen Modellsystemen Hinweise, dass TRP-Proteine heterotetramere Strukturen bilden, einen Einfluss auf den Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran von B-Zellen haben und in Abhängigkeit vom Signalkomplex aktiviert und reguliert werden. Eine einfache Aktivierung von TRP-enthaltenden Ionenkanälen durch eine Interaktion mit dem IP₃-Rezeptor, wie in zahlreichen Studien postuliert (vergl. 1.2.3, 1.3), kann nach den Erkenntnissen dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

4 Material

4.1 Materialien und „Kits“

Deckgläser	Roth
ECL-Filme	Amersham
„High Pure PCR-Produkt Purification Kit“	Roche
Lumi Light (plus)	Roche
Multiwell-Objektträger	ICN Biomedicals
Pipettenspitzen, Zentrifugenröhrchen und Kulturröhrchen	Greiner
Plastikwaren für die Zellkultur	Nunc; Greiner; TPP
Präparationskit für Plasmid-DNA („Nucleo-Spin Plus“, „Nucleobond 500“)	Macherey-Nagel
Präparationskit für RNA (RNAII)	Macherey-Nagel
Protein A-Sepharose	Pharmacia
PVDF-Immobilon Membran (0,45µm)	Millipore
QuantiTect SYBR Green RT-PCR-Kit	Qiagen
Quarzkapillaren	Roche
Sterilfilter	Millipore, Roth
Transfektionsreagenz „Fugene“	Roche
Transfektions-Kit „SuperFect“	Qiagen

4.2 Geräte

Autoklav	Technorama
Begasungsbrutschrank Steri-Cult 2000	Forma Scientific
Blotapparatur „Semi dry“	Werkstatt Univ. Göttingen
Durchflusszytometer FACSort	Becton Dickinson
Elektrophoresekammer DNA, SDS-PAGE	Werkstatt Univ. Bielefeld
Elektroporator Gene Pulser System	Biorad
Fluoreszenzmikroskop BX50/RFLT3	Olympus
Geldokumentationssystem Bio Doc II	Biometra
Konfokalmikroskop TCS SP2	Leica

Imaging System Camera IMAGO + Monochromator Polychrome II „LightCycler“ Mikroskop zum Imaging System IX70 pH-Meter pH 540 GLP Photometer Ultrospec 3000	T.I.L.L. Photonics Roche Olympus WTW Pharmacia- Biotech
PCR-Prozessor DNA Thermo-Cycler 9700/2400 Reinstwasseranlage ELGA STAT Spannungsquellen 2197 Power-Supply GPS 200/400	Perkin Elmer Elga Pharmacia- Biotech
Schüttelinkubatoren Series 25 LabShaker/LabTherm	New Brunswick Scientific Co., Inc. Adolf Kühner AG
Sicherheitswerkbank Lamin-Air HBB 2472 Vakuumtrocknungszentrifuge Speedvac Concentrator Digitalkamera RT Slider 2.3.1 Thermomixer Comfort Waagen A 120-S, L 610 D	Haereus Savant Visitron Systems Eppendorf Sartorius
Zentrifugen: Kühlzentrifuge J2-21 (Rotoren JA10, JA14, JA20) Biofuge A (Rotor 1478) Centrifuge 5417C Centrifuge 5415	Beckmann Haereus Eppendorf Eppendorf

4.3 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, werden Chemikalien der Qualität p.A. eingesetzt. Die verwendeten Chemikalien wurden von Sigma, Molecular Probes, Roche und Merck bezogen.

Spezielle Chemikalien sind nachfolgend aufgelistet:

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%/0,8%)	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
Blasticidin S HCl	Invitrogen
BodipyTR-X Thapsigargin	Molecular Probes
CellTracker™ CM-Dil	Molecular Probes
Doxicyclin	Sigma
Fluo-3-AM	Molecular Probes, Inc.
Fura-2-AM	Molecular Probes, Inc.
G418	Calbiochem Novabiochem
Gentamycinsulfat	Serva
Hygromycin	Roche
Kanamycin	Sigma
LMP-Agarose	FMC Bioproducts
LMW-Marker	Amersham Pharmacia Biotech
Milchpulver, fettarm (Sucofin)	TSI-Trade Service International
Mowiol 4-88	Hoechst
Pluronic F-127	Molecular Probes, Inc.
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma
Puromycin	Sigma
Poly-D-Lysin	Sigma
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche
Tetracyclin	Serva
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco BRL

4.4 Puffer, Medien und andere Lösungen

Die für die molekularbiologischen Arbeiten eingesetzten Lösungen und Medien sind 30min bei 121°C autoklaviert oder sterilfiltriert. Medien für *E. coli* werden maximal 15min autoklaviert. Die Basalmedien für die Zellkultur wurden von den Firmen PAA (RPMI 1640) und Gibco (DMEM) bezogen. Das FCS stammt von Bio Whitaker und Gibco, das tetracyclinfreie FCS von Clontech und das CS von Sigma. Die Lagerung erfolgt, falls nicht anders angegeben, bei RT. Alle Puffer und Medien werden, soweit nicht anders angegeben, in wässriger Lösung angesetzt.

Agarplatten	LB Medium 1,5% (w/v) Bacto-Agar nach dem Abkühlen entsprechendes Antibiotikum zufügen; 4°C
Acrylamid-Lsg.....	30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid; 4°C
Beladungspuffer IIA1.6	Clicks 5% (v/v) FCS; 0,02% (w/v) Pluronic F- 127; 1µM Fluo3-AM
Beladungspuffer Daudi/WEHI231	RPMI 1640 5% (v/v) FCS; Goodies M; 0,02% (w/v) Pluronic F-127; 1µM Fluo3-AM
Beladungspuffer DT40.....	RPMI 1640 5% (v/v) FCS; 0,5% (v/v) CS; 0,015% (w/v) Pluronic F-127; 1,5µM Fluo3- AM
Beladungspuffer HEK293	DMEM 10% (v/v) FCS; Goodies F, 0,05% (w/v) Pluronic F-127; 5µM Fura2-AM
CTAB-Lsg.....	5% (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid; 0,5M NaCl
DMEM (für HEK293, PlatE)	DMEM Basalmedium; 30ml Goodies F; 10% (v/v) FCS; 4°C
DNA-Probenpuffer (10x).....	30% (w/v) Ficoll; 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 0,05% (w/v) Xylencyanol; 4°C

ECS	140mM NaCl; 5mM KCl; 1mM MgCl ₂ ; (extracellular solution) 10mM D-Glukose; 15mM Hepes (pH 7,4); 0,1% (w/v) BSA; alternativ 0,5mM EGTA oder 1,8mM CaCl ₂ ; 4°C (autoklaviert ohne BSA)
Elektrophoresepuffer	25mM Tris; 192mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
Fluo3-Stammlösung	1mM Fluo3-AM in DMSO (-20°C)
Fura2-Stammlösung	1mM Fura2-AM in DMSO (-20°C)
G418 Stammlösung	51mg/ml G418 (78% Aktivität); 100mM HEPES (pH 7,5); 4°C
Goodies F	40mM L-Glutamin; 40mM Pyruvat; essentielle und nicht essentielle AS (Gibco); Vitaminlösung (Gibco); -20°C
Goodies M	10 mM KCl, 5 mM Na-Pyruvat, sowie essen- tielle und nicht essentielle AS (Gibco); -20°C
Krebs-Ringer-Lösung	140mM NaCl; 4mM KCl; 1mM MgCl ₂ ; 10mM D-Glukose; 10mM Hepes (pH 7,4); alternativ 0,5mM EGTA oder 1mM CaCl ₂ ; 4°C (autoklaviert oder sterilfiltriert)
Laemmli-Probenpuffer (2x).....	100mM Tris-HCl pH 6,8; 200mM 2-Mercaptoethanol; 20% (w/v) Glycerin ; 4% (w/v) SDS; 0,02% (w/v) Bromphenolblau; 4°C
LB-Medium	1% (w/v) Baktotrypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) Natriumchlorid; 4°C
LB-AMP-Medium	LB-Medium; 50µg/ml Ampicillin; 4°C
LB-Kan-Medium.....	LB-Medium; 30µg/ml Kanamycin; 4°C
PBS	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 4,3mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4mM KH ₂ PO ₄ (für Immunfluoreszenzen 0,5mM CaCl ₂)
PBST	PBS 0,05% (w/v) Tween 20
Polylysin	0,01% (w/v) Poly-L-lysin (MW 70000- 150000 Da); 4°C

Ponceau-Lösung	0,1% (w/v) Ponceau S; 5% (w/v) Essigsäure
5x RT Puffer (Gibco).....	250mM Tris-HCl pH 8,3; 15mM MgCl ₂ ; 375mM KCl; -20°C
Puffer K.....	1/10 10xPCR-Puffer (Quiagen), 200µg/ml Proteinase K, 0,5% (w/v) TritonX100 ; -20°C
Ripa-Puffer	158mM NaCl; 10mM Tris-HCl pH 7,4; 5mM Na-EDTA; 10µM Na ₄ P ₂ O ₇ ; 10mM NaF; 1mM Na ₃ VO ₄
RPMI (für WEHI231, EREB2.5).....	RPMI 1640 Basalmedium; 10% (v/v) FCS; 15ml Goodies M; 0,05mM β- Mercaptoethanol; 4°C
RPMI (für P493.6).....	RPMI 1640 Basalmedium; 10% (v/v) tetracyclinfreies FCS; 15ml Goodies M; 0,05mM β-Mercaptoethanol; 4°C
RPMI (für DT40)	RPMI 1640 Basalmedium; 10% (v/v) FCS; 1% CS; 3mM Glutamin; 0,05mM β- Mercaptoethanol; 4°C
SOB-Medium	2% (w/v) Bacto Tryptone; 0,05% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Yeast Extract; 2,5mM KCl (pH=7,0) für Kompetenz zusätzlich 20mM MgSO ₄
STET-Puffer.....	8% (w/v) Saccharose; 50mM Na-EDTA; 0,1% (w/v) Triton X-100; 50mM Tris-HCl pH 8,0
Stripping-Puffer.....	62,5mM Tris-HCl pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 100mM β-Mercaptoethanol
TAE-Puffer.....	40mM Tris/Essigsäure pH 7,8; 10mM NaOAc; 1mM Na-EDTA
TE-Puffer	10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM Na-EDTA
TBS	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 25mM Tris/HCl pH 7,0
TBST	TBS; 0,1 % (v/v) Tween 20

Transferpuffer	25mM Tris; 20mM Glycin; 20% (v/v) Methanol
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05% (w/v) Trypsin; 0,02% (w/v) EDTA in PBS; 4°C
Tfb-Puffer.....	10 mM MES (pH=6,3 mit KOH) 45 mM MgCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 100 mM KCl 3 mM Hexamincobaltchlorid
Tfbm1	30mM KOAc, 50mM MnCl ₂ , 100mM KCl, 10mM CaCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin, steril filtrieren und bei 4 °C lagern
Tfbm2	10mM Na-Mops, 75mM CaCl ₂ , 10mM KCl, 15% (v/v) Glycerin, pH 7,0, steril filtrieren und bei 4°C lagern
Tfbx1	100mM RbCl, 50mM MnCl ₂ , 30mM KOAc, 5mM CaCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8, steril filtrieren und bei 4°C lagern
Tfbx2	20mM Na-Mops, 10mM RbCl, 37,5mM CaCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin, pH 6,8, steril filtrieren und bei 4°C lagern
TYM-Medium	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,1M NaCl, 0,01M MgCl ₂ , steril filtrieren

4.5 Enzyme

Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche und New England Biolabs bezogen.

Die verwendete Ligase stammt von MBI Fermentas.

Die DNA-Polymerasen stammen von den Firmen Roche (Klenow), Qiagen (Taq) und Gibco (Elongase Mix). Die Reverse Transkriptase aus MMLV wurde von Gibco und die Alkalische Phosphatase wurde von Roche bezogen.

Alle Enzyme werden gemäß den von den Herstellern angegebenen Vorschriften verwendet.

4.6 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Spezifität	Hersteller	Anwendung
9E10	Maus	α -c-myc	Roche	Immunfluoreszenz, Immunpräzipitation, Western Blot
3F10	Ratte	α -HA	Roche	Immunfluoreszenz, Western Blot
12CA5	Maus	α -HA	Roche	Immunpräzipitation
α CT	Kaninchen	α -mTRP1	Friedrich (2001)	Western Blot
F(ab) ₂ Esel- anti-Ratte- Cy3	Esel	α -Ratte IgG	Dianova	Immunfluoreszenz
Kaninchen- anti-Maus	Kaninchen	α -Maus IgG/IgM	Dianova	<i>in vitro</i> Stimulation von IIA1.6
Kaninchen- anti-Ratte	Kaninchen	α -Ratte Fc γ	Dianova	Immunpräzipitation
M2	Maus	α -FLAG	Sigma	Immunfluoreszenz, Immunpräzipitation, Western Blot
M4	Maus	α -Huhn IgM	Southern Biotechnology	<i>in vitro</i> Stimulation von DT40
OctA	Ziege	α -FLAG	Santa Cruz (nicht mehr erhältlich)	Immunfluoreszenz Immunpräzipitation Western Blot
α TRPC1	Kaninchen	α -TRPC1	Becton Dickinson	Immunpräzipitation, Western Blot
Ziege-anti- Huhn IgM- FITC	Ziege	α -Huhn IgM	Bethyl	FACS
Ziege-anti- Kaninchen- Peroxidase	Ziege	α -Kaninchen IgG	Dianova	Western Blot

F(ab) ₂ Ziege-anti-Maus	Ziege	α-Maus IgM μ-Ketten spezifisch	Dianova	<i>in vitro</i> Stimulation von WEHI231
Ziege-anti-Maus-Cy5	Ziege	α-Maus IgG	Dianova	Immunfluoreszenz
Ziege-anti-Maus-Cy2	Ziege	α-Maus IgG	Dianova	Immunfluoreszenz
F(ab) ₂ Ziege-anti-Mensch	Ziege	α-Mensch IgG/IgM	Dianova	<i>in vitro</i> Stimulation von Daudi, P493.6 und EREB 2.5
Ziege-anti-Ratte-Peroxidase	Ziege	α-Ratte IgG	Dianova	Western Blot

4.7 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> MC 1061	F ⁻ <i>araD139</i> D(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7696, D <i>lacY74</i> , <i>galU</i> ⁻ , <i>galK</i> ⁻ , <i>hsdR</i> ⁻ , <i>hsdM</i> ⁺ , <i>StrA</i> ^r	Hanahan, 1985
SCS110	<i>rpsL</i> (Str ^r), <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>endA</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacy</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44Δ</i> (<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 proAB lacI^qZΔM15</i>]	Stratagene, 2002-a
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene, 2002-b

4.8 Zelllinien

4.8.1 HEK293

Diese humane Zelllinie wurde aus einer primären embryonalen Niere etabliert und mit Adenovirus Typ 5 transformiert (ATCC-Nr. CRL-1573; DSMZ ACC305).

4.8.2 PlatE

Diese Helferzelllinie zur Produktion ecotropher rekombinanter Retroviren basiert auf der Zelllinie HEK293T. HEK293T-Zellen wurden stabil mit *gag-pol* und *env* (ecotroph) von MMLV transfiziert. Dabei wurden im Gegensatz zu anderen Verpackungszelllinien wie Phönix-E die Gene unter die Kontrolle des EF1 α Promotors gestellt. Beide Konstrukte wurden über eine IRES direkt mit den Selektionsmarkern Blasticidin (*gag-pol*) und Puromycin (*env*) verbunden (Morita et al., 2000).

4.8.3 IIA1.6

Diese Maus-B-Zelllinie wurde aus der Zelllinie A20 etabliert und exprimiert IgG2a aber keine Fc γ -Rezeptoren (Jones et al., 1986; Van Den Herik-Oudijk et al., 1994).

4.8.4 WEHI231

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um ein murines B-Zelllymphom, das Oberflächen-IgM exprimiert (ATCC-Nr. CRL-1702). WEHI231 wird häufig als Modellsystem für unreife B-Zellen verwendet.

4.8.5 DT40

Die Hühner-B-Zelllinie DT40 ist ein durch ALV („avian leukosis virus“) induziertes bursales Lymphom, das von einem „Hyline SC“ Huhn abstammt. Das originäre Lymphom wurde durch Infektion eines Huhns (ein Tag alt) mit dem Rous assoziierten Virus 1 induziert. Die Zellen exprimieren Oberflächen-IgM (ATCC-Nr. CRL-2111).

4.8.6 DT40 TRP1-,- Klon Y20-14

Diese Zelllinie wurde aus DT40 etabliert. Mittels homologer Rekombination durch eine Neomycin- und eine Histidinol-Kassette wurde das Gen für TRP1 unterbrochen. Der Klon Y20-14 ist einer von zwei publizierten TRP1-/-Klonen (Mori et al., 2002)

4.8.7 EREB2.5

Bei diesem humanen B-Zellsystem handelt es sich um ein Modell für eine konditional lymphoblastoide Zelllinie. Sie wurde durch Infektion von Nabelschnurblut mit EBNA2-defekten EBV-Partikeln (P3H1) und einem Virus, das ein Fusionsprotein aus Östrogenrezeptor und EBNA2 enthielt, etabliert. Nur bei Zugabe von Östrogen wird das Fusionsprotein in den Kern transportiert, und die Zelle proliferiert (Kempkes et al., 1995).

4.8.8 P493.6

Diese konditionale Burkitt Lymphom Zelllinie wurde aus EREB2.5-Zellen durch Transfektion mit einem Vektor, der c-myc unter der Kontrolle des tTA enthält, etabliert. In Abwesenheit von Tetracyclin wird c-myc exprimiert, und die Zelle ist in der Lage, ohne EBNA2-Zielgene zu proliferieren (Pajic et al., 2000).

4.9 Vektoren und cDNAs

Name	Eigenschaften	Referenz
Klonierungsvektoren		
pBluescript KS und SK	multiple Klonierungsstelle, Ampicillinresistenzgen, α -Peptid des lacZ-Gens	Stratagene, 2002-c
pUC 19	Polylinker, Ampicillinresistenzgen, α -Peptid des lacZ-Gens	Yanish-Perron et al. 1984
Expressionsvektoren für Säugerzellen		
pBI-G	TRE, CMV _{min} -Promotor, Poly-A-Signal, β -Galktosidase-Gen als Reporter, Polylinker, Neo- und Amp-Resistenzgen	Clontech, 2002-a
pIRES2-EGFP	bicistronischer Vektor, der durch eine IRES die gleichzeitige Expression von dem	Clontech, 2002-b

	klonierten Gen und EGFP ermöglicht, CMV-Promotor, Poly-A-Signal, SV40-Replikationsursprung, multiple Klonierungsstelle, Neo- und Kan-Resistenzgen	
pSV2pac	Vektor zur Vermittlung von Puromycin-resistenz bei Verwendung von Expressionsvektoren ohne Resistenzgen. Puromycin-N-acetyltransferase-Gen unter Kontrolle des SV40-Promotors.	Vara et al., 1986
pTet-On	enthält den reversen Tetracyclintransaktivator zur Generierung Tetracyclin regulierbarer Zelllinien. Das Plasmid enthält sowohl ein Neomycin-resistenzgen zur Selektion in Säugerzellen, als auch ein Ampicillinresistenzgen.	Clontech, 2002-b
Vektoren zur Produktion rekombinanter Retroviren		
P5N-M-rtTA-IRES hph	Der Vektor enthält 5' und 3' LTR sowie das Verpackungssignal ψ von MMLV. In der ursprünglichen Version enthält das Plasmid ein rtTA-IRES-Hygromycinphosphotransferase Konstrukt. Die rtTA cDNA wurde über <i>NotI</i> in p5n-M-X-IRES hph kloniert. In dieser Arbeit wurde die rtTA-DNA über <i>NotI</i> mit diversen Konstrukten ausgetauscht. Zur Vermehrung in <i>E. coli</i> enthält das Plasmid ein Ampicillinresistenzgen.	Labor Dr. Manfred Jücker, Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie, UKE Hamburg
pHCMV-VSV-G	zur Pseudotypisierung rekombinanter Retroviren enthält dieser Vektor den kompletten Leserahmen von VSV-G vom <i>Vesicular stomatitis Virus</i> unter der Kontrolle des CMV-Promotors, Poly-A-Signal, Amp-Resistenzgen	Labor Dr. Manfred Jücker, Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie, UKE Hamburg

Die cDNA von mTRP1 β wurde aus IIA1.6-Zellen anhand der Genbank Acc. No. U95167 kloniert (Friedrich, 2001; Schäfer 1998). Diese cDNA wurde am 3' Ende mit der Sequenz fusioniert, die für das FLAG Epitop codiert (Engelke, 1999). In Zusammenarbeit mit Dr. Olaf Friedrich wurde alternativ eine für das HA Epitop (Roche) oder das c-myc Epitop (Roche) codierende Sequenz an das 3' Ende kloniert. Im Rahmen dieser Dissertation wurden zudem die Deletionsmutanten trp1 Δ ank, trp1 Δ acc und trp1 Δ dys (Engelke, 1999) sowie trp1 Δ pp und trp1 Δ EWKFAR (Friedrich 2001) eingesetzt.

4.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der MWG-Biotech AG synthetisiert:

Primer	Target	Sequenz (5'-3')
actin5'	Detektion von Aktin in RT-PCR und genomischer PCR	ACC AAC TGG GAC GAC ATG GA
actin3'	Detektion von Aktin in RT-PCR und genomischer PCR	GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC
Flag3'	Detektion von FLAG Transkripten	CGT CGT CAT CCT TGT AGT CG
hTRPC1 2531 5'	Detektion von htrpC1 Transkripten	TCA ACA TCA TTC CCT CAC CA
hTRPC1 3122 3'	Detektion von htrpC1 Transkripten	CCA AGC AGC ATG CTA ACA AA
hTRPC3 1835 5'	Detektion von htrpC3 Transkripten	GAC TTT GGG ATG CTG TCC AT
hTRPC3 2083 3'	Detektion von htrpC3 Transkripten	GTA CGC AAT CCG AGA GAA GC
hTRPC4 918 5'	Detektion von htrpC4 Transkripten	AGG AAC TGA GCA AGG TGG AA
hTRPC4 1217 3'	Detektion von htrpC4 Transkripten	CTG CCC AGT GTC TTC TCC TC
hTRPC5 1443 5'	Detektion von htrpC5 Transkripten	GCT GCA ACT GTG TGG AGT GT

hTRPC5 1792 3'	Detektion von htrpC5 Transkripten	CTT CAA CTT GGC CAG GTC AT
hTRPC6 2685 5'	Detektion von htrpC6 Transkripten	ACT TTG AGG AGG GCA GAA CA
hTRPC6 3081 3'	Detektion von htrpC6 Transkripten	TTC AGT TCC CCT TCG TTC AC
hTRPM2 4801 5'	Detektion von htrpM2 (htrpC7) Transkripten	GAA TGA CGT GGA GCT GAA CA
hTRPM2 5149 3'	Detektion von htrpM2 (htrpC7) Transkripten	ACC TTG ACC CCT TCC AGT TC
hTRPM3 2722 5'	Detektion von htrpM3 Transkripten	GTG AGG AGA ATG AGG CCA AA
hTRPM3 3221 3'	Detektion von htrpM3 Transkripten	ATC TGT GGC CCA GAA GTC AC
hTRPM4 1947 5'	Detektion von htrpM4 Transkripten	CCT CTT TGG CGA GTG CTA TC
hTRPM4 2447 3'	Detektion von htrpM4 Transkripten	AGC AGG TAG CTG ACC ACG TT
hTRPM5 2773 5'	Detektion von htrpM5 Transkripten	GAG ATT GAT GAA GCC CGT GT
hTRPM5 3176 3'	Detektion von htrpM5 Transkripten	TTC TGG ACT GTC TCC CAG GT
hTRPM6 3634 5'	Detektion von htrpM6 Transkripten	CAG GAT CTC TCT GCC CTG AC
hTRPM6 4232 3'	Detektion von htrpM6 Transkripten	GCA ATA GGC TCG TGC TTT TC
hTRPM7 5077 5'	Detektion von htrpM7 Transkripten	ACT AGG CCT CTG TGC CAA AA
hTRPM7 5417 3'	Detektion von htrpM7 Transkripten	CAA ACC ACT GTC CTG CTG AA
hTRPV2 2028 5'	Detektion von htrpV2 Transkripten	ATT GGT GGT GCA GGA AGA AG

hTRPV2 2209 3'	Detektion von htrpV2 Transkripten	CTC GAG AGT TCG AGG GAC AC
hTRPV4 1099 5'	Detektion von htrpV4 Transkripten	CCC GTG AGA ACA CCA AGT TT
hTRPV4 1546 3'	Detektion von htrpV4 Transkripten	ATG ACC ATG GCA CAC AGG TA
hTRPV5 897 5'	Detektion von htrpV5 Transkripten	TTG AGC ATG GAG CTG ACA TC
hTRPV5 1396 3'	Detektion von htrpV5 Transkripten	GTA GAC GCA GCA CGT GGT AA
hTRPV6 1392 5'	Detektion von htrpV6 Transkripten	TGT CAT TGG GGC TAT CAT CA
hTRPV6 1943 3'	Detektion von htrpV6 Transkripten	GCA ATG AGG AGG TTG AGC AT
K2723	Detektion von Hühner TRP1 in genomischer PCR 5'	TAG AAG AGT CAC GCA ATC AGC TTA GTT
K2725	Detektion von Hühner TRP1 in genomischer PCR 3'	CGC AGA TAA CTC AGC ACA TTA GCA AAT GC
MEmtrp1S (Flag5')	5'-Primer zu Flag3' für mtrp1 (Position 2348)	TGC TTC ACA AGA GCT TCC AG
rtTA 5'	Detektion von reversen Tetracyclin Transaktivator	AAT GAG GTC GGA ATC GAA GG
rtTA 3'	Detektion von reversen Tetracyclin Transaktivator	TAG CTT GTC GTA ATA ATG GCG G
Staege237 (c-myc5')	Detektion von humanem c- myc, 5'-Primer	TCA AGA GGC GAA CAC ACA AC
Staege442 (c-myc3')	Detektion von humanem c- myc, 3'-Primer	TTT CCG CAA CAA GTC CTC TT
TRP1delEWK- 675_3'	3'-Primer für die Deletions- mutante mTRP1 β Δ DK	TAA TGA GCT CTG ATC AAT TTA TCC TCA TGA TTT GCT ATC AG
TRP15' 1923	5'Primer für Deletions- mutante mTRP1 β Δ DK	GCT TTT GCA AAC GTT CTG AG

4.11 Computersoftware

Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems Incorporated
CELL Quest 3.3	Becton Dickinson Immunocytometry Systems
COREL DRAW 9	COREL CORPORATION LIMITED
FlowJo alias 2.7.8	Stanford University, Tree Star, Inc.
MAC APP 3.1.3	Apple Computer, Inc.
Mac OS 8.6	Apple Computer, Inc.
MetaVue 5.03	Universal Imaging Corporation
MS Office 2000	Mircosoft GmbH
Till Vislon v3.3	T.I.L.L. Photonics Imaging System Software, T.I.L.L. Photonics GmbH, Impuls GmbH
Windows 95/98/NT 5.0	Mircosoft GmbH
Genpro 5.00	Riverside Scientific

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

Die Methoden wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Handbuch „Molecular Cloning“, J. Sambrook, E.F. Fritsch und T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989 entnommen und gegebenenfalls wie beschrieben modifiziert.

5.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

CTAB-lyse zur Plasmidisolierung (Del Sal et al., 1988)

3ml einer *E. coli* Übernachtskultur werden 2min bei 7000rpm pelletiert, in 400µl STET-Puffer resuspendiert, mit 8µl einer frischen Lysozymlösung (50mg/ml) versetzt und 10min unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend erhitzt man 45sec auf 95°C zur Denaturierung von Proteinen und genomischer DNA. Die Zelldebris und denaturierte Bestandteile werden durch 10min Zentrifugation bei 13000rpm pelletiert. Der Überstand wird zwecks Fällung der Plasmid-DNA mit 16µl CTAB-Lsg. versetzt und das Gemisch wird 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 200µl einer 1.2M NaCl-Lsg. gelöst und erneut 2min abzentrifugiert. Aus dem Überstand wird die DNA mit 750µl absolutem Ethanol (-20°C) präzipitiert, nach 20min Pelletieren bei 20000xg mit 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 20µl TE gelöst (5min 70°C).

Plasmidpräparation über Ionenaustauscher-Säulen

Zur Isolierung reiner Plasmid-DNA für Sequenzierungen oder Transfektionen wurden kommerzielle Maxi-, Midi- und Mini-„Kits“ der Firmen Macherey-Nagel und Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

5.1.2 Hydrolyse von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen (Fuchs und Blakesley, 1983)

250ng-1µg Plasmid-DNA werden mit 2-3U einer Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 10µl für 90min inkubiert. Pufferbedingungen und Inkubationstemperatur werden gemäß den Angaben der Hersteller eingestellt. Bei Inkubationstemperaturen von >37°C wird das Reaktionsgemisch mit Mineralöl überschichtet, um der Verdunstung von Wasser vorzubeugen. Die Inaktivierung der

Enzyme erfolgt durch 15min Inkubation bei 65°C, falls vom Hersteller keine höhere Temperatur empfohlen wird.

5.1.3 Auffüllen von 5'-Überhängen und gleichzeitiger Abbau von 3'-Überhängen an Restriktionsfragmenten

Dazu werden dem jeweiligen Restriktionsansatz nach erfolgter Spaltung 2µl dNTP (10mM jeden Nucleotids), 1µl 10xH Puffer sowie 2U Klenow-Fragment zugesetzt und mit Wasser auf ein Volumen 20µl gebracht. Bei 3'-Überhängen erfolgt die Zugabe der dNTP erst nach 5min Inkubation bei RT, da die 3'-5'-Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragments ohne dNTP am größten ist. Nach Zugabe der dNTP wird für 25min bei 37°C inkubiert. Die Hitzedeaktivierung erfolgt bei 85°C für 10min.

5.1.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um eine Religation von linearisierter Vektor-DNA zu vermeiden, wird der Restriktionsansatz mit 1U alkalischer Phosphatase für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Enzym bei 65°C für 15min inaktiviert.

5.1.5 Agarosegelelektrophorese (McDonell et al., 1977)

Je nach Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente wird die Agarosekonzentration des Gels zwischen 0,8% und 1,5% gewählt, um im gewünschten Größenbereich eine optimale Auftrennung zu erreichen. Zur Herstellung eines Gels wird Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (0,5µg/ml) versetzt. Bei Präparationen von DNA-Fragmenten für eine Ligation wird LMP-Agarose eingesetzt. Die DNA-Proben werden mit DNA-Probenpuffer versetzt und im Agarosegel bei 5V/cm Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt.

5.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten werden dephosphorylierte Plasmid-DNA und Insert-DNA in einem LMP-Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechenden DNA-Banden werden auf einem UV-Illuminator aus dem Gel präpariert, bei 65°C geschmolzen und in dem mindestens doppelten Volumen Wasser aufgenommen. Die DNA-Mengen werden mit Hilfe des verwendeten DNA-Markers abgeschätzt.

10-15ng Vektor-DNA (je nach Größe, bei 3kb 10ng) werden mit der Insert-DNA und einem 1/10 Vol. Ligationspuffer versetzt (Gesamtvolumen 20µl ±5µl). Das molare Verhältnis Vektor/Insert sollte dabei 1/5 bei „blunt-end“-Ligationen und 1/3 bei kohäsiven Enden betragen. Die Ligation erfolgt durch Zugabe von 2U T4-DNA-Ligase für 2h bei RT (kohäsive Enden) oder über Nacht bei 16°C („blunt end“).

5.1.7 Transformation chemisch kompetenter E.coli (modifiziert nach Hanahan, 1985 und Sambrook et al., 1989)

5.1.7.1 MC1061

Kompetenz wird diesem Stamm vermittelt, indem die Bakterien auf einer LB/Strep-Platte (600µg/ml) ausgestrichen werden und eine Kolonie in 5ml TYM/Strep (600µg/ml) o/n bei 37°C und 250rpm angezogen wird. 2,5ml der frischen Kultur werden in 250ml TYM verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀=0,5 kultiviert. Die Kultur wird bei 4°C und 4000rpm für 15min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 20ml Tfbm1 resuspendiert und nach einer 5min Inkubation auf Eis für 15min bei 4°C und 4000rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 10ml Tfbm2 resuspendiert und die Bakteriensuspension in 500µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -70°C gelagert. Zur Transformation werden 100µl der auf Eis aufgetauten Zellen mit 1/4 des Ligationsansatzes (bei „blunt-end“ 1/2l) 30min auf Eis inkubiert und 5min bei 37°C inkubiert (Hitzeschock). Nach Zugabe von 1ml LB-Medium erfolgt zur Regeneration der Bakterien 45min Inkubation bei 37°C. Die Zellen werden 2min bei 7000rpm abzentrifugiert und in 30-50µl LB-Medium auf einer vorgewärmten LB-Platte (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen.

5.1.7.2 SCS110

Von einer frischen LB-Platte werden 5-10 Kolonien in 1mL SOB-Medium resuspendiert und dann in 50mL SOB-Medium verdünnt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,53 wird 10min/4°C inkubiert, dann 10min mit 4000xg bei 4°C pelletiert. Es wird in 20mL Tfb resuspendiert und 10min auf Eis inkubiert, dann bei 4°C für 10min bei 4000xg pelletiert, in 4mL Tfb resuspendiert und 140µL DND zugegeben. Nach 15min auf Eis werden erneut 140µL DND zugegeben und weitere 15min auf Eis inkubiert. Es werden von dieser Suspension 200µL Aliquots zur Transfektion eingesetzt. Der komplette Ligationsansatz wird hinzu gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Der

Hitzeschock erfolgt für 2min bei 42°C. Nach Abkühlen für 2min auf Eis wird für 45min bei 37°C regeneriert. Die Zellen werden bei 7000rpm für 2min abzentrifugiert und in 30-50µl auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

5.1.7.3 XL1Blue

Eine XL1-Blue-Kolonie von einer LB/Tet-Platte (12,5µg/ml) wird in 5ml LB/Tet (12,5µg/ml) resuspendiert und o/n bei 37°C und 250rpm angezogen. 4ml der frischen Kultur werden in 400ml LB/Tet (12,5µg/ml) verdünnt und bis zu einer $OD_{600}=0,4$ kultiviert. Nach einer 10min Inkubation auf Eis wird die Kultur bei 4°C und 4000rpm für 15min zentrifugiert und das Pellet in 50ml Tfbx1 resuspendiert. Nach einer 5min Inkubation auf Eis wird für 15min bei 4°C und 4000rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 10ml Tfbx2 resuspendiert und die Bakteriensuspension in 500µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bei -70°C gelagert. Zur Transformation werden 200µl der kompetenten Zellsuspension mit dem ganzen Ligationsansatz versetzt und für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2min bei 42°C und anschließender 2min Inkubation auf Eis erfolgt nach Zugabe von 1ml LB-Medium die Regeneration bei 37°C für 45min. Die Selektion der Bakterien erfolgt nach Ausstreichen des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten, die ein geeignetes Antibiotikum enthalten.

5.1.8 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht der Bakterien erfolgt in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 250rpm. Die Bakterien werden aus Einzelkolonien in LB-Medium mit einem dem Resistenzgen des transformierten Plasmids entsprechenden Antibiotikum angeimpft.

Für Glycerinkulturen werden o/n-Kulturen mit 15% Glycerin in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bei -70°C gelagert. Zur Wiederverwendung werden aus den Glycerinkulturen die Bakterien mit einer Impföse auf dem Selektionsmedium ausgestrichen.

5.1.9 Isolierung von genomischer DNA aus DT40 Zellen

DT40 Zellen werden mit PBS gewaschen und in einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ /ml in Puffer K resuspendiert und für 45min bei 56°C inkubiert. Nach Inaktivierung der Proteinase K für 10min bei 95°C kann der Ansatz direkt als Templat in der PCR eingesetzt werden.

5.1.10 Isolierung von RNA aus Kulturzellen

$2-4 \cdot 10^6$ Zellen werden 5min bei 300xg abzentrifugiert und mit dem Kit RNAll von Macherey und Nagel gemäß den Herstellerangaben weiterbehandelt. Die RNA wird bei -70°C gelagert.

5.1.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgt photometrisch bei den Wellenlängen von 260nm und 280nm. Als Referenz dient Wasser. Eine OD_{260} von 1 bei einer Küvettentiefe von 10mm entspricht einer Konzentration von $50\mu\text{g/ml}$ DNA oder $40\mu\text{g/ml}$ RNA. Durch das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ wird die Reinheit der DNA und RNA (Verunreinigungen durch Proteine) bestimmt. Dieser Quotient sollte im Bereich von 2 bis 1.7 liegen.

5.1.12 Reverse Transkription von mRNA (Foley et al., 1993)

Zunächst wird die isolierte RNA mit oligo-dT geprimt. Dazu werden $5\mu\text{g}$ RNA mit H_2O auf ein Volumen von $10\mu\text{l}$ gebracht und $1\mu\text{l}$ OdT_{12-18} (Gibco) dazu pipettiert. Nach 10min Erhitzen auf 70°C , werden die Proben in Eiswasser abgekühlt. Danach erfolgt die eigentliche reverse Transkription, indem $4\mu\text{l}$ 5xRT-Puffer, $2\mu\text{l}$ dNTP, $2\mu\text{l}$ 0,1M DTT und $1\mu\text{l}$ MMLV Reverse Transkriptase zu der geprimten mRNA gegeben wird. Nach 60min Inkubation bei 37°C wird das Enzym durch 10min Erhitzen auf 65°C inaktiviert.

5.1.13 Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et. Al., 1986; White et al., 1989)

PCRs, die zur Mutagenese oder Fusion von Epitopen dienen, wurden mit Elongase Mix in 100µl Ansätzen durchgeführt:

Template-DNA	100pg bis 1ng
Primer 5' (100pmol/µl)	1µl
Primer 3' (100pmol/µl)	1µl
dNTP (10nM jeden Nucleotids)	0,5µl
Puffer 5x A	10µl
Puffer 5x B	10µl
Elongase Mix (Gibco)	1,5µl (bei Fragmenten <500bp 2µl)
H ₂ O	→ 100µl

Die PCRs zur Analyse der Gentranskription oder genomische PCRs werden in 25µl Ansätzen mit Taq Polymerase durchgeführt:

Produkt aus Reverser Transkription oder genomische DNA	1,3µl
Primer 5' (100pmol/µl)	0,25µl
Primer 3' (100pmol/µl)	0,25µl
dNTP (10nM jeden Nucleotids)	0,15µl
Puffer 10x PCR (Qiagen)	2,5µl
Taq (5U/µl)	0,15µl
H ₂ O	→ 25µl

Alle PCRs werden mit einer einmaligen Denaturierung für 5min bei 94°C gestartet. Im Anschluss an den letzten Zyklus wird für 7min bei der entsprechenden Elongationstemperatur (Taq 72°C; Elongase Mix 68°C) inkubiert bevor auf 14°C bis zur Weiterbearbeitung abgekühlt wird.

Tab. 5.1 PCR-Bedingungen

Primer	Temperatur-Zeit-Profil	Zyklenzahl
Aktin	30s 94°C / 30s 60°C / 30s 72°C	25 (qualitativ) 15-17 (quantitativ)
K2723/2725	40s 94°C / 40s 63°C / 40s 72°C	30
rtTA5'/rtTA3'	30s 94°C / 60s 58°C / 30s 72°C	30
TRP15' 1923/ TRP1delEWK -675_3'	35s 94°C / 35s 57,5°C / 35s 68°C 35s 94°C / 35s 57,5°C + 0,1°C/Zyklus / 35s 68°C 35s 94°C / 35s 58,5°C / 35s 68°C	10 10 10
alle weiteren Primerpaare	30s 94°C / 30s 60°C / 30s 72°C	30 (qualitativ) 20 bis 30 (quantitativ)

5.1.14 „Real Time PCR“

Die „Real-Time-PCR“ ermöglicht die quantitative Bestimmung von Genexpressionen. Die Reaktion läuft in einem „Lightcycler“ (Roche) ab. Dabei handelt es sich um einen PCR-Thermocycler, in dem die PCR-Reaktion in Quarzkapillaren erfolgt und nach jedem einzelnen Zyklus die Inkorporation des Farbstoffes „SYBR Green I“ in die sich vermehrende doppelsträngige DNA laserinduziert optisch ausgelesen wird. Die Fluoreszenzzunahme entspricht dann der Zunahme an doppelsträngiger DNA. Durch die online-Detektion wird es möglich, jede einzelne PCR-Reaktion in ihrer exponentiellen Phase zu quantifizieren. In der exponentiellen Phase vermehrt sich die DNA-Menge in jedem Zyklus um den gleichen Faktor E (ca. 2), weshalb sich die PCR hier wie eine Gleichung erster Ordnung verhält :

$$(1) [N]_C = [N]_0 \cdot E_C$$

$[N]_C$ = Konzentration der DNA nach Zyklus C

$[N]_0$ = Konzentration der DNA vor Beginn der PCR

C = Zyklenzahl

E = Effizienz (Vermehrungsfaktor der DNA pro Zyklus)

Nach vielen PCR-Zyklen mit DNA-Vermehrung kommt die Reaktion in die Plateauphase, weil sich die Ausgangsstoffe (Primer, dNTPs etc.) verbrauchen. Hier steht die Fluoreszenz nicht mehr in berechenbarer Abhängigkeit von der Zyklenzahl

und Ausgangsmenge der cDNA allein, sondern der Faktor E verändert sich. Zur Auswertung der „Real-Time-PCR“ verwendet man daher die Phase des logarithmischen DNA-Zuwachses. Dazu legt man willkürlich eine „Crossing Line“ in einen Bereich der Fluoreszenz, wo sich alle betrachteten PCR-Reaktionen noch im logarithmischen Bereich befinden. Der Schnittpunkt der sigmoiden Kurve (Fluoreszenzintensität gegen Zyklenzahl) mit der „Crossing-Line“ stellt den Crossingpunkt C_p dar. Dieser Parameter wird für den Vergleich von Expressionstärken herangezogen.

In dieser Arbeit wurde die „Real-Time-PCR“ mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR-Kit von Qiagen gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (Volumen/Ansatz 20 μ l). Die Ausgangsmenge an Gesamt-RNA betrug dabei 300ng (bei TRPC1-PCR 1 μ g). Folgende Programmeinstellungen wurden verwendet:

- Reverse Transkription 20min bei 50°C
- Denaturation 15min bei 95°C
- Amplifikation 55 Zyklen 94°C für 15s/60°C für 20s/72°C für 5s

5.1.15 PCR-Produkt-Klonierung

Dazu wird zunächst die DNA aus dem PCR-Ansatz gefällt, indem 90 μ l des PCR-Produktes mit 110 μ l H₂O versetzt werden. Nach Zugabe von 1/10 Vol. 3M Natriumacetat und 2,5x Vol. Ethanol wird 30min auf -70°C abgekühlt. Die ausgefallene DNA wird 30min bei 20000xg und 4°C pelletiert. Die DNA wird mit 70% Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 20 μ l TE gelöst. Alternativ wird die DNA mit dem Aufreinigungskit „High Pure PCR-Produkt Purification Kit“ von Roche aufgereinigt. Diese DNA kann nun für die weitere Klonierung eingesetzt werden, indem sie, entsprechend den Restriktionsschnittstellen im Primer, mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen nach 6.1.3 hydrolysiert werden. Alle Produkte werden zunächst in pBKS kloniert und bei der MWG-Biotech AG sequenziert.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Kulturbedingungen

Die Zellen werden bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert.

5.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Auf die Zählkammer wird ein angefeuchtetes Deckgläschen gelegt und bis zur Ausbildung von Newton'schen Ringen angepresst. Anschließend werden 10µl der Zellsuspension unter das Deckgläschen pipettiert und die 16 Grundquadrate im inneren Achsenkreuz der Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl ergibt sich nach zweimaligem Zählen aus:

$$(2) \text{ Mittelwert} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

5.2.3 Medienwechsel und Teilung von adhärennten Kulturzellen

Die adhärent wachsenden Zelllinien HEK293 und PlatE werden in DMEM 10% FCS kultiviert (vergl. 4.4), wobei PlatE unter Selektionsdruck mit 2µg/ml Puromycin und 10µg/ml Blasticidin gehalten werden. Ein Mediumwechsel erfolgt spätestens alle drei Tage. Sind die Zellen konfluent, werden sie in einem Verhältnis von maximal 1:5 geteilt. Dazu werden die Petrischalen einmal mit 37°C warmen PBS gewaschen und für 1min bei RT mit einem Volumen Trypsin/EDTA-Lsg. inkubiert, das den Boden der Petrischalen bedeckt. Danach werden die Zellen in DMEM 10% FCS aufgenommen und ausgesät. Laut ATCC-Empfehlung ist eine Trypsinbehandlung von HEK293-Zellen nicht erforderlich. Insbesondere für die Vorbereitung von Immunfluoreszenzen und Ca²⁺-Imaging-Messung wirkt sich eine Trypsinierung aber sehr vorteilhaft aus, da es die Aggregation von HEK293-Zellen deutlich unterdrückt.

Vorbereitung von HEK293-Zellen für Immunfluoreszenz-Analysen

Zur Durchführung von Immunfluoreszenz-Analysen werden die Zellen entweder in 12-well Platten auf 24mmØ Deckgläser oder auf 12-well Objektträger gesät. Beide Systeme werden mit Polylysin vorgecoatet, indem ca. 5-20µl Polylysin-Lsg. mit der Pipette auf dem Glas verstrichen werden und 10min bei RT inkubiert wird. Vor dem Aussähen der Zellen wird mit PBS gewaschen. Für 12 well Platten werden 10⁵

Zellen/well und für 12-well Objektträger werden $5 \cdot 10^5$ Zellen/Objektträger ausgesät. Die Immunfluoreszenzen werden 40h nach dem Aussähen gestartet.

Vorbereitung von HEK293-Zellen für Ca^{2+} -Imaging-Messungen

Für Ca^{2+} -Imaging-Messungen werden 60mm \varnothing Petrischalen verwendet, in die ein 10mm \varnothing Loch gestanzt wurde. Die Petrischalen werden mit 70% Ethanol sterilisiert, ausführlich mit Millipore Wasser gespült und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet. Auf die Öffnung wird von der Unterseite ein 24x24mm großes Stück Parafilm und darauf ein 24x24mm großes Deckglas gelegt. Die Befestigung des Deckglases erfolgt durch Erhitzen des Parafilms mittels Fön. Nachdem überschüssiges Parafilm, insbesondere im Bereich des Loches, mit einem Skalpell entfernt ist, wird das Glas mit ca. 5 μ l Polylysinlösung vorgecoated (analog 5.2.3.1). Pro Probe werden für 40-45h Inkubation $1,5 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät. Die Inkubation erfolgt dabei in DMEM mit 10% FCS und 50 μ g/ml Gentamycinsulfat.

5.2.4 Kultivierung von nicht adhärennten Kulturzellen

Die Zelllinie IIA1.6 wird in Clicks 10% FCS in einer Dichte von $0,2-1 \cdot 10^6$ Zellen/ml kultiviert. DT40 Zellen werden in einer Dichte von $0,1-1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in RPMI 10% FCS 1% CS gehalten. Die Zelllinien WEHI231, EREB2.5 und P493.6 werden in dem Medium RPMI 10% FCS in einer Dichte von $0,3-1 \cdot 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Für Zelllinien mit Tetracyclin-regulierbarer Genexpression wird FCS verwendet, das tetracyclinfrei ist. EREB2.5 Zellen werden in Gegenwart von 1 μ M Östrogen kultiviert.

5.2.4.1 Abschalten der EBNA2-Expression in EREB2.5-Zellen

Um die Expression von EBNA2 zu unterdrücken werden die Zellen dreimal mit östrogenfreiem RPMI 10% FCS gewaschen und in einer Dichte von $7 \cdot 10^5$ Zellen /ml in RPMI 10% FCS resuspendiert. Die Zellen können bis maximal 72h nach Östrogenentzug kultiviert werden, proliferieren jedoch nicht mehr.

5.2.4.2 Abschalten der c-myc-Expression in P493.6 Zellen

Bei P493.6 Zellen wird die c-myc Expression durch Zugabe von 0,1 μ g/ml Tetracyclin abgeschaltet. Danach können die Zellen bis zu 72h kultiviert werden und proliferieren nicht mehr.

5.2.4.3 Aktivierung der Tetracyclin-regulierten Genexpression in IIA1.6 Tet-On Zellen

Bei IIA1.6 Zellen, die mit dem rtTA transfiziert sind, wird zur Aktivierung der Genexpression Doxycyclin in einer Konzentration von 1 µg/ml ins Medium gegeben.

5.2.4.4 Vorbereitung von Suspensionszellen für die Immunfluoreszenz

10^5 Zellen werden bei 300xg abzentrifugiert und in 100 µl PBS resuspendiert. 50 µl dieser Suspension werden pro Well eines 12 Well Objektträgers ausgesät. Nach 30min Inkubation bei 37°C wird die Immunfluoreszenz gestartet.

5.2.5 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden 5min bei 300xg und 4°C zentrifugiert und in einer Dichte von ca. $1-1,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml in kaltem 10% (v/v) DMSO enthaltenden DMEM 10%FCS (IIA1.6, WEHI231), DMEM 20% FCS (HEK293 und PlatE) oder FCS mit 10% DMSO (DT40, EREB2.5, P493.6) resuspendiert. In einem Einfrierröhrchen werden die Zellen in einer geschlossenen Styroporbox zunächst o/n bei -70°C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Das Auftauen der Einfrierproben erfolgt durch ca. 1min Inkubation im 37°C Wasserbad. Die aufgetauten Zellen werden direkt in das entsprechende Kulturmedium überführt und nach Pelletierung bei 300xg in frischem Kulturmedium resuspendiert und ausgesät. Bei EREB2.5 und P493.6 werden die Zellen zunächst für 18h-24h in 1/3 des Mediumvolumens vertikal in einer Kulturflasche kultiviert.

5.2.6 Transfektion von adhärennten Zellen mit aktivierten Dendrimern (Albritton, 1997; Tang und Szoka, 1997)

Dendrimere sind hochverzweigte sphärische Moleküle, deren Verzweigungen von einem Kernmolekül ausgehen und mit Aminogruppen enden können. Die Größe und Form von Dendrimern ist präzise definiert. Durch Entfernen einiger tertiärer Aminogruppen wird die Flexibilität des Moleküls größer, was die Effizienz der Transfektion um zwei bis drei Größenordnungen erhöht. Durch die Interaktion der Aminogruppen der aktivierten Dendrimere mit den Phosphatgruppen der DNA werden kompakte Strukturen gebildet, die durch unspezifische Endozytose in die Zelle gelangen. In der Zelle können die Dendrimere nach Fusion der Endosomen mit

Lysosomen den pH der Lysosomen puffern, dadurch Nucleasen inhibieren und somit der Degradation vorbeugen.

Stabile Transfektion von HEK293 mit „Superfect“

Am Tag vor der Transfektion werden HEK293-Zellen in der Dichte in 60mmØ Schalen gesät, so dass sie am folgenden Tag 40-80% Konfluenz erreicht haben. 5µg DNA (minimale Konzentration 0,1µg/µl) werden mit serumfreiem DMEM auf ein Volumen von 150µl gebracht und gut vermischt. Nach Zugabe von 20µl SuperFect-Reagenz wird der Ansatz für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen werden die Zellen mit 4ml serumfreiem Medium gewaschen. Zu dem Transfektionsansatz wird 1ml DMEM 10% FCS pipettiert, und nach Vermischung wird die Lösung gleichmäßig auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 3h im Brutschrank werden die Zellen zweimal sehr vorsichtig mit 4ml serumfreiem Medium gewaschen, bevor frisches DMEM 10%FCS mit 50µg/ml Gentamycinsulfat zugegeben und die Zellen 48h kultiviert werden. Nach 48h werden die Zellen in dem Selektionsmedium mit 400µg/ml G418 kultiviert (Mediumwechsel alle 3 Tage). Nach 10-12 Tagen sind die ersten Klone auf der Schale sichtbar. Diese werden ab einer Größe von ca. 500-1000 Zellen in 24-well-Platten überführt und danach entsprechend der maximalen Teilungsrate von 1:4 weiter expandiert.

5.2.6.2 Transfektion von PlatE mit „Fugene“ zur Produktion rekombinanter Viren (modifiziert nach Morita et al., 2000)

PlatE Zellen werden einen Tag vor der Transfektion in einer 30% Konfluenz entsprechenden Dichte auf 60mmØ Schalen ausgesät. Für die Produktion ecotropher Viren wird 2,5µg DNA werden mit 100µl serumfreiem RPMI vermischt und mit 7,5µl Fugene versetzt. Bei Pseudotypisierung mit VSV-G wird 2µg DNA und 0,5µg pHCMV-VSV-G eingesetzt. Der Ansatz wird 30min bei RT inkubiert. Auf die Zellen wird frisches RPMI 10% FCS entsprechend der zu infizierenden Zelllinie mit 50µg/ml Gentamycinsulfat gegeben. Das Transfektionsgemisch wird gleichmäßig in der Schale verteilt. Nach 48h Inkubation im Brutschrank werden die Zellüberstände zur Infektion (5.2.8) eingesetzt.

5.2.7 Stabile Transfektion von IIA1.6 durch Elektroporation

Die Transfektion durch Elektroporation wurde erstmals von Neumann et al. (1982) zur Transformation von Säugerzellen benutzt, ist aber auch bei anderen eukaryotischen Systemen und Bakterien anwendbar. Üblicherweise werden dabei intakte Zellen in Gegenwart von DNA einem oder wenigen kurzen elektrischen Impulsen von Feldstärken zwischen 1 bis 30kV/cm unterworfen. Die für die Transfektion verwendete DNA wurde linearisiert (alle Vektoren mit Ampicillinresistenz mit *Sca I*) und über eine Ionenaustauschersäule aufgereinigt (vergl. 5.1.1.2). Zur Transfektion werden 1×10^7 Zellen in logarithmischer Wachstumsphase dreimal mit serumfreiem Medium (4 °C) gewaschen, in 0,5ml serumfreiem Medium aufgenommen und 15-30µg DNA versetzt. Bei Co-Transfektion von pTETon und pSV2pac wird 40µg Gesamt-DNA und pTet-On in fünffachem molaren Überschuss eingesetzt. Nach einer Vorkühlphase von 5min auf Eis wird in einer Küvette mit 0,4cm Elektrodenabstand bei 260V und 960µF elektroporiert. Die Zellen werden in 20 ml Medium 10 % FCS 50µg/ml Gentamycinsulfat aufgenommen und nach 48h selektioniert (750µg/ml G418; 5µg/ml Puromycin).

5.2.8 Transfektion mit rekombinanten Retroviren (modifiziert nach Morita et al., 2000)

Der retrovirale Gentransfer ist eine außerordentlich effiziente Methode zur Transfektion von Zellen (McLachlin et al., 1990; Krebs et al., 1999; Morita et al., 2000). Dabei werden die funktionellen und strukturellen Eigenschaften von Retroviren, wie z.B. die stabile Integration ins Wirtsgenom, ausgenutzt. In dieser Arbeit wurde ein auf MMLV basierendes System der so genannten 3. Generation verwendet, in dem die Replikationsdefizienz des Retrovirus durch die getrennte Expression der Gene gag-pol und env in einer Helferzelllinie (z.B. PlatE) erreicht wird. Das zu transfizierende Gen wird in einen retroviralen Vektor inkloniert. Dieser Vektor enthält zum einen das Verpackungssignal ψ , das die Einbindung der viralen Transkripte in den Viruskern steuert, und zum anderen die 5'- und 3'-LTRs („long terminal repeats“), die die erforderlichen Sequenzen für die reverse Transkription, Integration und Transkription enthalten. Auf diese Weise werden in einem Zellsystem, das die viralen Gene gag-pol und env exprimiert, Viren produziert, deren RNA lediglich für das inklonierte Gen und eventuell ein Resistenzgen kodiert. In Zelllinien, die kein gag-pol und env exprimieren, findet keine Virusproduktion statt.

Env kodiert für membranständige Glykoproteine, die die Fähigkeit zur Infektion von Zellen determinieren. Während ecotrophe Hüllproteine die Infektion von murinen Zellen ermöglichen, sind Viren mit amphotropen Hüllproteinen in der Lage, eine Vielzahl von Zellen zu infizieren. Besonders infektiöse Hüllproteine enthält das Virus *Vesicular stomatitis*. Durch Co-Transfektion von retroviralem Vektor und einem für das Hüllprotein VSV-G kodierenden Konstrukt werden in eco- oder amphotropen Helferzelllinien Viren mit VSV-G-Hüllproteinen produziert (Pseudotypisierung).

Für den retroviralen Gentransfer existieren diverse Vektoren, die grundsätzlich auf Vektoren der Typen pM und pL zurückzuführen sind. Krebs et al. (1999) fanden, dass Vektoren des Typs pM zu wesentlich höheren Infektionsraten in B-Lymphozyten führen. In dieser Arbeit wurde der Vektor p5N-M-IRES-hph verwendet. Alle cDNAs wurden „blunt“ in die Klenow-behandelte NotI-Schnittstelle von p5N-M-IRES-hph kloniert. Die rekombinanten Viren wurden gemäß 5.2.6.2 produziert.

5.2.8.1 Transfektion von DT40-Zellen mit rekombinanten Retroviren

Zur Infektion von DT40 Zellen werden rekombinante Retroviren verwendet, die mit dem Hüllprotein von *Vesicula stomatitis* Virus pseudotypisiert wurden. In 2ml der PlatE-Zellüberstände zuzüglich 0,5ml frischem RPMI werden $5 \cdot 10^5$ DT40 Zellen einer logarithmischen Kultur mit 3µg/ml Polybren resuspendiert und auf einer 3cmØ Petrischale (oder 6 well Platte) ausgesät. Eine Zentrifugation der Zellen, die in manchen Publikationen zur Erhöhung der Infektionsrate empfohlen wird (Krebs et al., 1999), führte nicht zur Steigerung der Transfektionsrate. Nach 24h Inkubation im Brutschrank werden die Zellen abzentrifugiert und direkt in das Selektionsmedium (RPMI 1,5mg/ml Hygromycin; 50µg/ml Gentamycinsulfat) überführt. Die Zellen werden weitere 6d in Selektionsmedium in einer Dichte von 10^5 - $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Die weitere Kultivierung erfolgt ohne Selektion. Bei einer Kultivierung von länger als zwei Wochen wird erneut für 4d selektioniert. Jede Transduktion wird durch Infektion mit einem rekombinanten EGFP-Virus durch FACS-Analyse nach 2d und 6d kontrolliert.

5.2.8.2 Transfektion von WEHI231 Zellen mit rekombinanten Retroviren (modifiziert nach Krebs et al., 1998)

Zur transienten Transfektion von WEHI231 wird mit rekombinanten ecotrophen Retroviren infiziert. Dazu werden 10^6 WEHI231 Zellen in 2,5ml Zellüberstand (vergl.

5.2.6.2) mit 5µg/ml Polybren resuspendiert und auf einer 3cmØ Petrischale (oder 6 well Platte) ausgesät. Nach 20h werden die Zellen in frischem RPMI 50µg/ml Gentamycinsulfat aufgenommen. Nach weiteren 24h werden die Zellen für Immunfluoreszenzen oder Calciummessungen verwendet. Der Erfolg der Infektion wird durch eine Kontrollinfektion mit einem rekombinanten EGFP-Virus ermittelt.

5.2.9 Etablierung von Tetracyclin-regulierbarer Genexpression in IIA1.6-Zellen

Zur Etablierung von IIA1.6-Zellen, in denen die regulierbare Expression von transfizierter cDNA möglich ist, werden die Zellen über Elektroporation (5.2.7) mit dem Vektor pTet-On transfiziert. Nach Subklonierung werden die einzelnen Klone zunächst über transiente Transfektion auf Regulierbarkeit getestet. Dazu werden die IIA1.6Tet-On-Klone mit pBIG elektroporiert und nach 24h zur Hälfte mit 1µg/ml Tetracyclin inkubiert. Nach weiteren 24h werden die Zellen eines β -Galaktosidasetests unterzogen. Dazu werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in einer 24well Platte ($7 \cdot 10^5$ Zellen/well) ausgesät und 30min bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden 15min bei RT fixiert (0,1M NaHPO₄ (pH7,0); 1mM MgCl₂, 1% Glutardialdehyd). Nach einmaligem Waschen mit PBS werden die Zellen mit -20°C kaltem Ethanol (100%) für 5min lysiert. Für die Färbereaktion werden die Zellen für 45min mit 0,2% X-Gal; 10mM NaHPO₄ (pH7,0); 150mM NaCl; 1mM MgCl₂; 3,3mM K₄Fe(CN)₆; 3,3mM K₃Fe(CN)₆ bei 37°C inkubiert, dann mit Glycerin überschichtet und lichtmikroskopisch ausgewertet.

5.2.10 Bestimmung von Oberflächen IgM am Durchflusszytometer

Zur Analyse von Oberflächen IgM werden $5 \cdot 10^5$ Zellen bei 300xg abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Die Zellen werden in 200µl PBS resuspendiert und mit 1:100 verdünntem FITC-konjugiertem anti-IgM Antikörper für 30min bei RT und leichtem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen, werden die Zellen in 500µl PBS resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert. Für P493.6-Zellen und EREB2.5-Zellen wird FITC-markierter Ziege-anti-Mensch IgM und für DT40-Zellen FITC-markierter Ziege-anti-Maus IgM verwendet.

5.2.11 Lokalisierungsstudien an transfizierten HEK293 Zellen (Engelke et al., 2002)

Die nach 5.2.3.1 vorbereiteten Zellen werden nach Absaugen des Mediums zunächst einmal vorsichtig mit PBS gewaschen. Zur Markierung der Zellmembran wird optional mit PBS 0,25% (v/v) CM-Dil für 4min bei RT und 6min bei 4°C inkubiert. Dann werden die Zellen mit PBS 2,5% PFA für 20min bei RT fixiert. Bei den folgenden Schritten werden die Proben im Dunkeln gehalten. Zur Absättigung freier Aldehydgruppen wird für 20min mit PBS-Glycin bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS werden die Zellen mit PBS-0,2% Triton X-100 durch 2min Inkubation bei RT permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden unspezifische Antikörperbindungsstellen durch PBS 2% BSA bei RT geblockt. Anschließend wird mit dem Antikörper M2 in einer Konzentration von 3µg/ml (verdünnt in PBS 2% BSA) für 1h bei 4°C inkubiert. Bei Co-Lokalisierungsstudien mit TRPC3HA wird zusätzlich der Antikörper Ratte-anti-HA in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Nach dreimal 10min Waschen mit PBS 2% BSA wird der mit Cy5 konjugierte Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus für 45min bei 4°C in einer Verdünnung von 1:150 in PBS 2% BSA auf die Zellen gegeben und für 45min bei 4°C inkubiert (bei Co-Lokalisierungsstudien mit TRPC3HA Ziege-anti-Maus-Cy2 (1:300) und Esel-anti-Ratte-Cy3 (1:200)). Nach zweimal 10min Waschen wird optional das endoplasmatische Retikulum mit 1,5µM Bodipy TR-X (in PBS) für 3min bei RT gefärbt. Abschließend wird zweimal 10min mit PBS 2% BSA gewaschen, und die Proben werden in Mowiol 4-88 eingebettet. Die Proben werden mit konfokaler Lasermikroskopie (Pinhole 0,3µM) ausgewertet, und die Aufnahmen werden in Adobe Photoshop 6.0 exportiert. Die Anregung von EGFP erfolgt dabei über den Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488nm, CM-Dil sowie Bodipy TR-X werden mit einem GreNe-Laser bei 543nm angeregt und die Anregung von Cy5 erfolgt mit Hilfe des HeNe-Lasers bei 633nm.

5.2.12 Immunfluoreszenzmikroskopie an IIA1.6Tet-On-Zellen

Die nach 5.2.4.1 vorbereiteten Zellen werden mit PBS 4% (w/v) PFA für 20min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden überschüssige Aldehydgruppen mit PBS 100mM Glycin für 20min bei RT abgesättigt. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgt die Permeabilisierung der Zellen mit PBS 0,2% (w/v) Triton X-100 für 3min bei RT. Erneut wird zweimal mit PBS gewaschen und

unspezifische Antikörperbindungsstellen werden durch 20min Inkubation mit PBS 1,5% (w/v) BSA bei RT geblockt. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgen bei 4°C. Der anti-Flag Primärantikörper M2 wird in PBS 1,5% (w/v) BSA auf eine Endkonzentration von 3µg/ml verdünnt und für 1h auf die Proben gegeben. Nach 3x10min Waschen mit PBS 1,5% BSA wird mit dem Cy2-konjugierten Ziege-anti-Maus Antikörper (1:300 in PBS 1,5% BSA) für 45min inkubiert. Nach dreimal 10min Waschen mit PBS 1,5% BSA werden die Proben in Mowiol 4-88 eingebettet und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

5.2.13 Immunfluoreszenzmikroskopie an stabil transfizierten DT40 Zellen

Die nach 5.2.4.1 vorbereiteten Zellen werden mit PBS 4% (w/v) PFA für 20min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden überschüssige Aldehydgruppen mit PBS 100mM Gly für 20min bei RT abgesättigt. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgt eine Permeabilisierung der Zellen mit PBS 0,2% (w/v) Triton X-100 für 3min bei RT. Erneut wird zweimal mit PBS gewaschen und unspezifische Antikörperbindungsstellen werden durch 20min Inkubation mit PBS 1,5% (w/v) BSA bei RT geblockt. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgen bei 4°C. Der Primärantikörper Ratte-anti-HA wird in PBS 1,5% (w/v) BSA auf eine Endkonzentration von 667ng/ml verdünnt und für 1h auf die Proben gegeben. Nach 3x10min Waschen mit PBS 1,5% BSA wird mit dem Cy3-konjugierten Esel-anti-Ratte Antikörper (1:150 in PBS 1,5% BSA) für 45min inkubiert. Nach dreimal 10min Waschen mit PBS 1,5% BSA werden die Proben in Mowiol 4-88 eingebettet und mit konfokaler Lasermikroskopie (Pinhole 0,3µM) ausgewertet. Die Anregung erfolgt über den GreNe-Laser bei 543nm und die Emission wird im Bereich von 570nm aufgenommen. Die Aufnahmen werden in Adobe Photoshop 6.0 exportiert.

5.2.14 Immunfluoreszenzmikroskopie an transient transfizierten WEHI231-Zellen

Die nach 5.2.4.1 vorbereiteten Zellen werden mit PBS 4% (w/v) PFA für 20min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden überschüssige Aldehydgruppen mit PBS 100mM Gly für 20min bei RT abgesättigt. Zur Permeabilisierung werden die Zellen für 15min mit PBS 0,1% Triton X-100 1,5% BSA bei RT inkubiert. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgen bei 4°C und die Waschschriffe sowie Verdünnungen erfolgen mit PBS 0,1% Triton X-100 1,5% BSA.

Der Primärantikörper Ratte-anti-HA wird auf eine Endkonzentration von 667ng/ml verdünnt und für 1h auf die Proben gegeben. Nach 3x10min Waschen mit PBS 1,5% BSA wird mit dem Cy3-konjugierten Esel-anti-Ratte Antikörper (1:150 verdünnt) für 45min inkubiert. Nach dreimal 10min Waschen werden die Proben in Mowiol 4-88 eingebettet. Die Auswertung erfolgt mit Fluoreszenzmikroskop und die Aufnahmen werden mit Digitalkamera und dem Programm MetaVue digitalisiert.

5.2.15 Beladung von Zellen mit den calciumsensitiven Fluorophoren Fura2 und Fluo3

Die Beladung der Zellen erfolgt mit den Acetoxymylestern der Fluorophore, unterstützt durch das Detergenz Pluronic F-127. Die Ester der Farbstoffe sind im Gegensatz zu den Molekülen mit freien Carbonsäuregruppen membrangängig und werden im Cytosol der Zelle durch Esterasen zu den entsprechenden Carbonsäuren hydrolysiert („Dye-Trapping“). Das Pluronic F-127 unterstützt dabei nicht nur die Aufnahme des Farbstoffes, sondern unterbindet zudem eine Kompartimentierung in den Membranen der Zelle.

5.2.15.1 Beladung von HEK293 Zellen mit Fura2

Nach Absaugen des Mediums werden 200µl Beladungspuffer (vergl. 4.4) auf die Zellen gegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wird mit 1ml DMEM 10% FCS verdünnt und für weitere 10min bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen zunächst zweimal mit calciumhaltigem ECS gewaschen. Direkt vor der Messung wird mit EGTA-haltigem ECS gewaschen und 100µl EGTA-haltiges ECS auf die Zellen pipettiert.

5.2.15.2 Beladung von Suspensionszellen mit Fluo3

$7 \cdot 10^5$ Zellen werden bei 300xg pelletiert und in 700µl des entsprechenden Kulturmediums mit 5% FCS resuspendiert. Unter leichtem Vortexen wird die Farbstofflösung entsprechend den für die jeweilige Zelllinie erforderlichen Konzentrationen hinzugegeben:

Zelllinie	Pluronic F-127	Fluo3-AM
IIA1.6	0,02%	1µM
Daudi	0,02%	1µM
DT40	0,015%	1,5µM
EREB2.5	0,02%	1µM
P493.6	0,02%	1µM
WEHI231	0,02%	1µM

Nach 20min Inkubation bei 30°C bei leichtem Schütteln werden 700µl des entsprechenden Kulturmediums mit 10% FCS hinzugegeben und für 10min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Proben werden zweimal mit Krebs Ringer Lösung 1mM CaCl₂ gewaschen. Die Zellen werden bis zur Messung (maximale Zeitspanne 90min) in Krebs Ringer Lösung 1mM CaCl₂ bei exakt 20°C (Thermomixer) gehalten und direkt vor der Messung abzentrifugiert und in dem gewünschten Puffer (mit CaCl₂ oder 0,5mM EGTA) entsprechend einer Dichte von 5·10⁵-10⁶ Zellen/ml resuspendiert.

5.2.16 „Single-Cell-Ca²⁺-Imaging“ an HEK293-Zellen (Engelke, 1999; Engelke et al., 2002)

Aus den gemäß 5.2.12.1 vorbereiteten Zellen wird ein Ausschnitt ausgewählt, in dem die Zellen möglichst als konfluenter Monolayer vorliegen. Zunächst wird für 30sec eine Grundlinie aufgenommen, bevor die Stimulation der Zellen mit 200µM Carbachol, einem Agonisten des muskarinischen Rezeptors, erfolgt. 4min nach Carbacholzugabe wird die Ca²⁺-Konzentration der ECS auf 1,8mM eingestellt. Am Ende jedes Experimentes werden die Zellen 0,1% TritonX-100 Lösung ausgesetzt, um das maximale Ratio R_{max} zu bestimmen. Danach wird der Puffer auf 20mM EGTA zur Ermittlung des minimalen Ratios R_{min} eingestellt. Die cytosolische Calciumkonzentration wird mit TillVision nach folgender Formel bestimmt:

$$(3) [Ca^{2+}] = K_d \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \quad (\text{Grynkiewicz et al., 1985})$$

(R=Ratio 340/380; K_d=Dissoziationskonstante des Fura2-Ca²⁺-Komplexes)

Die Existenz nicht hydrolysierter Fura2 Ester wurde durch Mn²⁺-Quenching ausgeschlossen (Merrit et al., 1989).

5.2.17 Ca²⁺-Messungen an Suspensionszellen im Durchflusszytometer (modifiziert nach Budde et al., 1994)

Die nach 5.2.12.2 vorbereiteten Zellen werden in einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ - 10^6 Zellen/ml am FACS gemessen (bei „add back“ Protokollen in Krebs Ringer Lösung mit 0,5mM EGTA und bei anderen Messungen mit 1mM CaCl₂). Nach 20sec einer Messung erfolgt die Stimulation der Zellen entsprechend Tab. 5.2. Am Ende einer Messung wird Ionomycin (100nM) hinzugegeben, um den Beladungszustand der Zellen zu ermitteln. Die Daten werden mit FlowJo ausgewertet und in Excel exportiert. Bei vergleichenden Messungen wird auf den Beladungszustand normiert (es werden nur Messungen mit bis zu 15% Abweichung der Beladung verwendet).

Tab. 5.2 Stimulationsprotokolle für Ca²⁺-Flux Messungen

Zelllinie	Stimulation	Ca ²⁺ -Konzentration (Zugabezeitpunkt bei „add back“)
IIA1.6	anti-BCR IgG 30µg/ml	1mM (nach 4min)
DT40	M4 10µg/ml	1mM (nach 5.30min)
	Thapsigargin 1,5µM	3mM (nach 8.30min)
EREB2.5	anti-BCR F(ab) ₂ 20µg/ml	1mM (nach 5min)
	Thapsigargin 1,5µM	3mM (nach 8.30min)
P493.6	anti-BCR F(ab) ₂ 20µg/ml	1mM (nach 5min)
	Thapsigargin 1,5µM	3mM (nach 8.30min)
WEHI231	anti-BCR F(ab) ₂ 20µg/ml	1mM (nach 5min)
	Thapsigargin 1,5µM	3mM (nach 8.30min)

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Immunpräzipitation an stabil transfizierten HEK293-Zellen (Engelke et al., 2002)

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 10cm Ø Schale werden einmal mit PBS gewaschen und in 1ml RIPA 1% Triton X-100, 0,5% NP-40-Ersatz, 0,5% Deoxycholat, 0,1% SDS, Proteaseinhibitor-Mix (Roche) für 30 min bei 4°C lysiert und anschließend der Zelldebris bei 20000xg und 4°C abgetrennt. Dem Überstand werden 2µg Ziege-anti-FLAG-Ak (OctA) zugesetzt und nach 1h bei 4°C 15µl (gequollene „beads“ netto) Protein-G-Sepharose. Nach zweistündiger Inkubation bei 4°C wird fünfmal mit Lysepuffer ohne Proteaseinhibitoren gewaschen. Die Proteine werden mit 15 µl 2x Laemmli für 5 min bei 95 °C von der Protein-G-Sepharose getrennt und für SDS-PAGE und Western Blot-Analyse eingesetzt. Die Proteine werden mit einer aufgereinigten IgG-Fraktion des Antiserums gegen den CT von mTRP1β nachgewiesen. Der Western Blot wird mit OctA reinkubiert.

5.3.2 Immunpräzipitation von HA-Fusionsproteinen aus stabil exprimierenden DT40 Zellen

10⁷ Zellen werden in 1ml Ripa-Puffer 1% Triton X-100, 0,5% Deoxycholat, 0,5% NP40-Ersatz, 0,1% SDS, Proteaseinhibitor-Mix (Roche) 30min auf Eis lysiert. Danach wird für 20min bei 4°C und 20000xg pelletiert und der Überstand zunächst mit 20µl (gequollene „beads“ netto) Protein-A-Sepharose für 1h vorgeklärt und mit 3µg 12CA5 o/n bei 4°C im Roller inkubiert. Danach wird mit Fc-spezifischem Kaninchen-anti-Ratte in halbmolarem Verhältnis für 1h bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 20µl (netto) Protein-A-Sepharose wird erneut für 90min bei 4°C im Roller inkubiert. Um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen wird die Sepharose 6x mit Ripa und einmal mit 0,125M Tris gewaschen. Die Sepharose wird 5min mit 20µl 2xLaemmli (0,1M DTT) aufgekocht, und der Überstand kann direkt in der SDS-PAGE eingesetzt werden.

5.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichem Puffersystem

(Laemmli, 1970). Trenn- und Sammelgel werden entsprechend der Tabelle hergestellt. Dabei wird zunächst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten mit Gummidichtungen gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um die Ausbildung eines Meniskus zu verhindern. Nach Polymerisation des Trenngels wird das Isopropanol abgegossen und kurz mit Wasser gespült, bevor das Sammelgel gegossen wird, in das durch Einsetzen eines Teflonkamms die Probenaschen geformt werden. Die Taschen werden direkt vor dem Lauf mit Elektrophoresepuffer gespült. Die Proben werden in 2x Laemmli Probenpuffer für 5min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgt bei Stromstärken von 10mA für das Sammelgel und 20mA für das Trenngel. Als Proteingrößenstandard wird LMW verwendet.

Tab. 5.3 Zusammensetzung von SDS-PAA-Gelen

	Sammelgel	Trenngel		
	3 %	7,5 %	10 %	12,5 %
AA-Stammlösung/ml	0,25	1,88	2,5	3,13
H ₂ O/ml	0,92	2,6	1,98	1,35
1 M Tris/HCl pH 8,8/ml	---		2,81	
0,25 M Tris/HCl pH 6,8/ml	1,25		---	
10 % (w/v) SDS/ μ l	50		150	
10 % (w/v) AMPS/ μ l	30		60	
TEMED/ μ l	3		4	

5.3.4 Western Blot-Analyse

Fünf Lagen 3MM-Whatman-Papier in entsprechender Blotgröße werden in Transferpuffer getränkt und auf die Anode der Graphitblotkammer gelegt. Darüber wird die mit Methanol vorbehandelte und in Transferpuffer äquilibrierte PVDF-Membran blasenfrei aufgelegt. Das ebenfalls in Transferpuffer äquilibrierte SDS-PAA-Gel und fünf weitere Lagen getränktes Whatmanpapier werden auf die Membran gelegt und mit der Graphitkathode gleichmäßig abgeschlossen. Der Transfer erfolgt bei 175mA/pro Gel (55cm²) für 1,5h unter Eiskühlung. Die Membran wird mit Ponceau-S-Lösung gefärbt und so lange mit Wasser gewaschen, bis klare Proteinbanden sichtbar werden. Nach Entfernen des LMW-Markers wird die Membran in 0,1M NaOH entfärbt und mit PBST oder TBST gewaschen. Die

Lagerung erfolgt für bis zu 14d bei 4°C in PBS 0,02% NaN₃ oder längerfristig getrocknet bei -20°C.

5.3.4.1 Immunologischer Nachweis von Proteinen in der Western Blot-Analyse

Zur Absättigung freier Protein-Bindungsstellen der Membran wird diese o/n mit Blockpuffer inkubiert (Tab. 5.3). Danach erfolgt die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper, der gemäß Tab. 5.4 verdünnt wird, für 1,5-4h bei RT. Im Anschluß an 3x10min Waschen mit dem Inkubationspuffer des Sekundärantikörpers wird für 45min mit dem peroxidasemarkierten Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Nach weiteren zehn Waschrissen mit PBST bzw. TBST über einen Zeitraum von 1h und einmaligem Waschen in detergenezfreiem Puffer wird der Blot mit Lumi Light oder Lumi Light Plus entwickelt.

Tab. 5.4 Konzentrationen von Antikörpern und Puffer bei der Western Blot-Analyse

Primär-Ak	Endkonzentration	Inkubationsdauer	Block- und Inkubationspuffer
3F10	50ng/ml	1,5h	TBST/5% MP (blocken) TBST/1% BSA (Ak-Inkubation)
M2	4µg/ml	1,5h	PBS/10% MP
α-CT	5µg/ml	1,5h	PBS/10% MP

peroxidasemarkierte Sekundärantikörper	Konzentration	Endverdünnung	Inkubationspuffer
Ziege-anti-Kaninchen	0,8mg/ml	1:50000	PBST
Ziege-anti-Maus	0,8mg/ml	1:50000	PBST
Ziege-anti-Ratte	0,8mg/ml	1:50000	TBST

5.3.4.2 Stripping von Western Blot-Membranen

Zur Beseitigung von gebundenen Antikörpern, wird der Blot 30min in Stripping-Puffer bei 70 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach intensivem Waschen mit PBS-T oder TBS-T (min. 2h mit häufigem Pufferwechsel) kann eine erneute Immundetektion durchgeführt werden.

6 Ergebnisse

6.1 Klonierung von mTRP1 β -HA Fusionsproteinen und Deletionsmutanten

Die cDNA von mTRP1 β wurde anhand der Genbank-Accession-Nummer U95167 aus IIA1.6-Zellen, einer Maus-B-Zelllinie, mit Hilfe der RT-PCR kloniert (Friedrich, 2001). Um das exprimierte TRP-Protein von endogenem TRP unterscheiden zu können, wurde ein FLAG-Epitop über PCR an den C-Terminus des Proteins fusioniert (Engelke 1999). Wegen der besseren Eignung von Antikörpern gegen das HA-Epitop insbesondere für die Immunfluoreszenzmikroskopie, wurde zudem per PCR ein HA-Tag kloniert und über eine *BamHI* Schnittstelle vor dem Flag Tag eingefügt. Auf die gleiche Weise wurden alle TRP1 β cDNAs auch mit einem Epitop von c-myc fusioniert. Für Funktionsstudien wurde eine *in vitro*-Mutagenese durchgeführt, um bestimmte Regionen aus mTRP1 β zu deletieren (Abb 6.1). Dabei wurden die postulierten cytosolischen Domänen von mTRP1 β , die drei Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen und die Coiled-Coil Region im N-terminalen Bereich sowie die Dystrophin-ähnliche Domäne am C-Terminus deletiert (Engelke, 1999). Desweiteren wurden die über fast alle bekannten TRP-Isoformen hoch konservierte Sequenz EWKFAR (AS von 641 bis 646 für mTRP1 β) sowie die potentielle Porenregion inklusive der fünften und sechsten Transmembranregion deletiert (Friedrich 2001). Homologievergleiche innerhalb der TRPC-Familie zeigen eine über die EWKFAR Region hinausgehende hohe Konservierung bis zur Dystrophin ähnlichen Domäne (bei mTRP1 β AS 676-682) (Friedrich, 2001). Daher wurde eine weitere Deletionsmutante kloniert, in der EWKFAR und weitere 29AS deletiert wurden (mTRP1 β Δ DK¹).

¹ Die Nomenklatur erfolgte nach Dipl. Biochem. Daniel Koch, der als Blockpraktikant zur Herstellung der Mutante beigetragen hat.

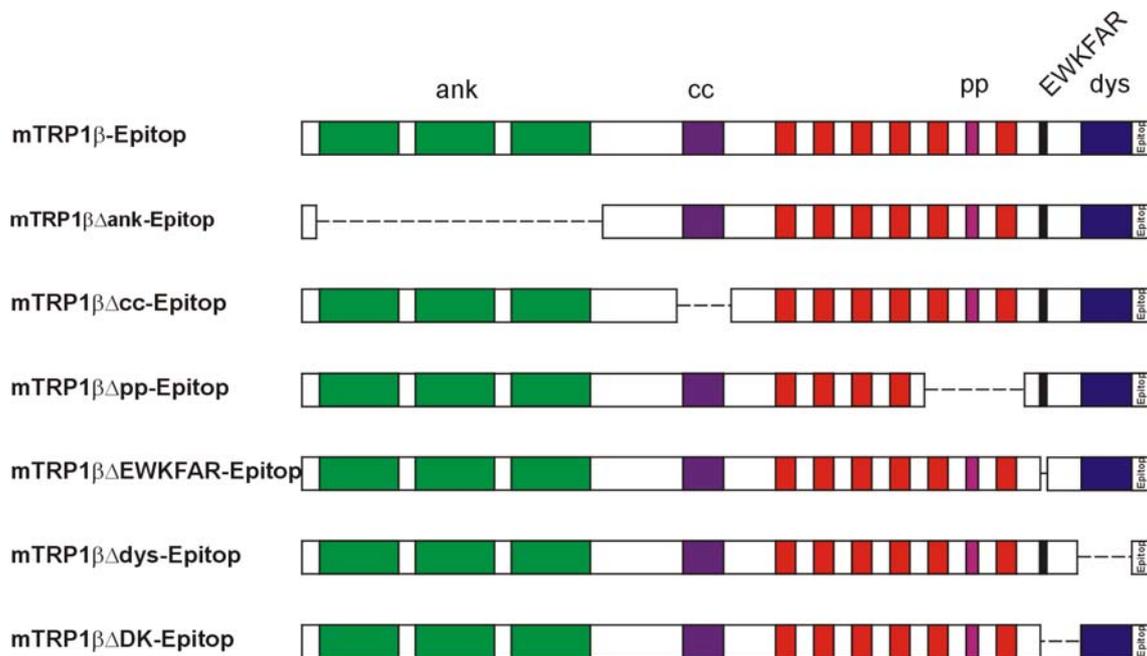


Abb. 6.1 *in vitro*-Mutagenese von mTRP1 β

Durch eine *in vitro* Mutagenese wurden Deletionsmutanten von TRP1 β generiert, denen postulierte Domänen fehlen. ank: drei Ankyrin-ähnliche Wiederholungen, cc: Coiled-Coil Region, pp: potentielle Porenregion einschließlich der 5. und 6. Transmembranregion, EWKFAR: hoch konservierte Sequenz, dys: Dystrophin-ähnliche Domäne.

6.2 Funktionelle Untersuchung von mTRP1 β und Deletionsmutanten in HEK293 Zellen

HEK293 Zellen sind ein in diversen TRP-Studien etabliertes Modellsystem. Diese Zellen lassen sich mit Carbachol über den endogen exprimierten muskarinischen Rezeptor aktivieren. HEK293 Zellen wurden stabil mit mTRP1 β und Deletionsmutanten in einem bicistronischen Vektorsystem transfiziert, das die Identifikation von positiven Klonen über EGFP ermöglicht. Als Kontrolle wurde nur pIRES2EGFP transfiziert¹.

6.2.1 Expression und Lokalisierung von TRP-Proteinen in stabil transfizierten HEK293-Zellen

In den mit mTRP1 β oder Deletionsmutanten transfizierten stabilen HEK293-Klonen konnten die Proteine sowohl durch Immunpräzipitation als auch durch

¹ Die Etablierung der stabilen Zellklone sowie die Calciummessungen des HEK293-Projektes wurden in enger Zusammenarbeit mit Dr. P. Budde und Dr. O. Friedrich durchgeführt.

Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Im Western Blot zeigt mTRP1 β -FLAG eine apparente Molmasse von etwa 80kDa, was einer deutlichen Abweichung von der berechneten Molmasse von 90kDa entspricht (Abb. 6.2). Mit Ausnahme der Mutante mTRP1 β Δ pp-Flag zeigen die Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp eine Differenz der apparenten Molmasse, die der Reduktion von AS entspricht (berechnete Werte: mTRP1 β Δ ank-Flag, 77kDa; mTRP1 β Δ cc-Flag, 83,5kDa; mTRP1 Δ pp-Flag, 76,5kDa; mTRP1 β Δ dys-Flag, 78kDa).

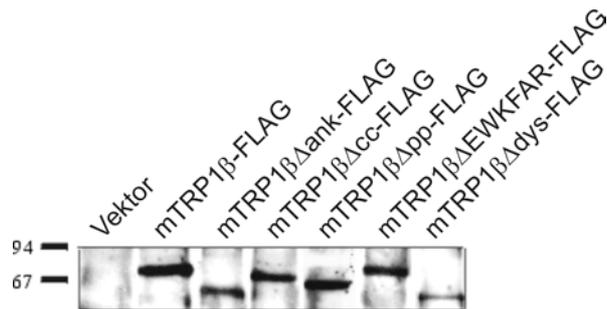


Abb. 6.2 Immunpräzitationen von mTRP1 β und Mutanten aus stabil transfizierten HEK293-Zellen

Nach Immunpräzitation mit dem polyklonalen Ziege anti-FLAG Antikörper OctA wurden die Proteine in einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die TRP-Proteine wurden mit einer gereinigten IgG-Fraktion des α CT-Antiserums sowie eines peroxidase markierten Sekundär-Ak in der ECL detektiert.

Besonders wichtig für die Aussagekraft der Deletionsmutanten ist deren korrekte Orientierung und Lokalisierung in der Plasmamembran. Dazu wurden immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, in denen als Marker für Kern und Cytosol EGFP, für das ER Bodipy TR-X Thapsigargin und für die Plasmamembran der Lipidfarbstoff CM-Dil (Andrade et al., 1996) verwendet wurden. Die cytosolische Orientierung des C-Terminus der Deletionsmutanten wurde bereits durch Immunfluoreszenzanalysen an nicht permeabilisierten Zellen bestätigt (Engelke, 1999). Die Aufnahmen der mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen zeigen, das EGFP hauptsächlich im Kern und zu etwa 25% im Cytosol lokalisiert ist (Abb. 6.3 A). Das Fluoreszenzsignal des Bodipy TR-X-konjugierten Thapsigargin ist insbesondere in einem schmalen Bereich um den Kern herum und in definierten Strukturen im Cytosol lokalisiert. Diese definierten Strukturen sind eindeutig von der diffusen cytosolischen Fluoreszenz des EGFP unterscheidbar (Abb. 6.3 A, B oben). Das CM-Dil färbt dagegen deutlich die Plasmamembran, zeigt allerdings auch zum Teil Überlappungsbereiche mit der Färbung von Bodipy TR-X (Abb. 6.3 A-C oben).

Die Fluoreszenzbilder zeigen die deckungsgleiche Übereinanderlagerung des EGFP, Bodipy TR-X oder CM-Dil Signals mit der Cy5 Fluoreszenz, die aus der Immunmarkierung der Flag-Fusionsproteine resultiert (Abb. 6.3 A-C). Es zeigt sich sehr deutlich eine vollständige Co-Lokalisation der Flag Markierung mit dem Lipidfarbstoff CM-Dil (Abb. 6.3 C). Mit Bodipy TR-X Thapsigargin ist eine teilweise Überlappung sichtbar. Diese Überlappung zeigt sich in kernnahen Bereichen und in definierten cytosolischen Strukturen (Abb. 6.3 B). Die Fluoreszenzen von Cy5 und EGFP sind dagegen scharf getrennt (Abb. 6.3 A). Demnach besteht zwischen EGFP und mTRP1 β oder Deletionsmutanten keine Co-Lokalisation. Alle Deletionsmutanten zeigen identische Färbemuster im Vergleich zu wt mTRP1 β (Abb. 6.3).

Die korrekte Lokalisation der Mutanten mTRP1 β Δ EWKFAR und mTRP1 Δ dys wurde in Zusammenarbeit mit Dr. O. Friedrich in Co-Immunfluoreszenzen an transient transfizierten HEK293 untersucht. Dazu wurden HEK293-Zellen mit mTRP1 β -myc oder Deletionsmutanten zusammen mit dem Plasmamembranprotein TRPC3HA transfiziert (Friedrich, 2001). Beide Mutanten zeigen eine zu wt mTRP1 β identische Co-Lokalisation mit TRPC3 (Abb. 6.4).

Aus den Daten der Lokalisierungsstudien geht klar hervor, dass die Deletion der cytosolischen Domänen sowie der potentiellen Porenregion keinen Einfluss auf die Lokalisation in HEK293-Zellen hat. MTRP1 β und die Deletionsmutanten sind hauptsächlich in der Plasmamembran und zum Teil im ER und vermutlich Golgi-Apparat lokalisiert.

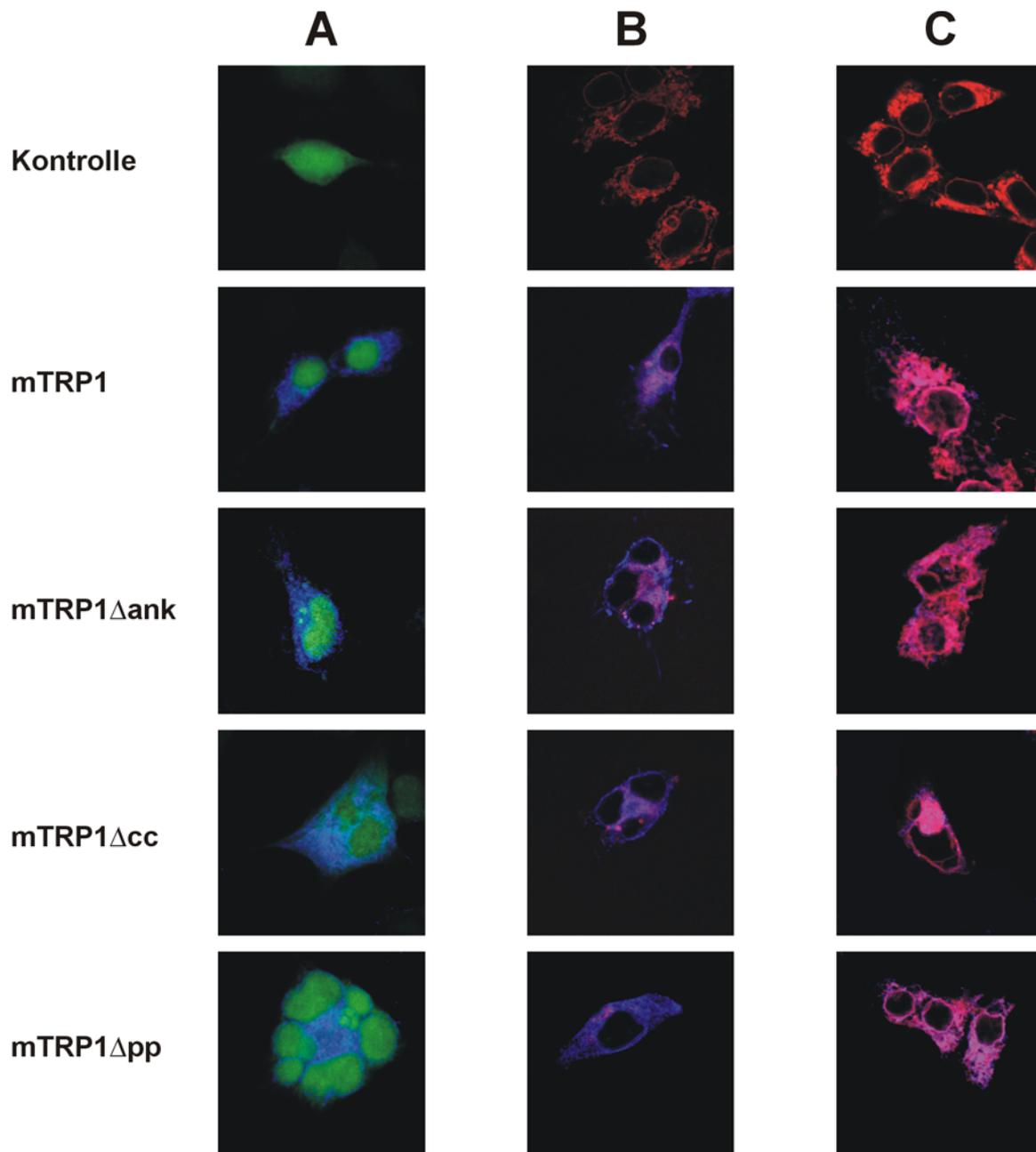


Abb. 6.3 Lokalisierungsstudien von mTRP1 β und Mutanten in stabil transfizierten HEK293-Zellen

Stabil transfizierte HEK-293 Zellen wurden mit PFA fixiert, permeabilisiert und mit M2 sowie Ziege-anti-Maus-Cy5 markiert. Optional wurde das ER mit Bodipy TR-X Thapsigargin oder CM-Dil gefärbt. Die Proben wurden mit konfokaler Lasermikroskopie gemessen. Dargestellt ist deckungsgleich übereinander projiziert die Cy5-Fluoreszenz mit EGFP(A), Bodipy TR-X-Thapsigargin (B) und CM-Dil (C).

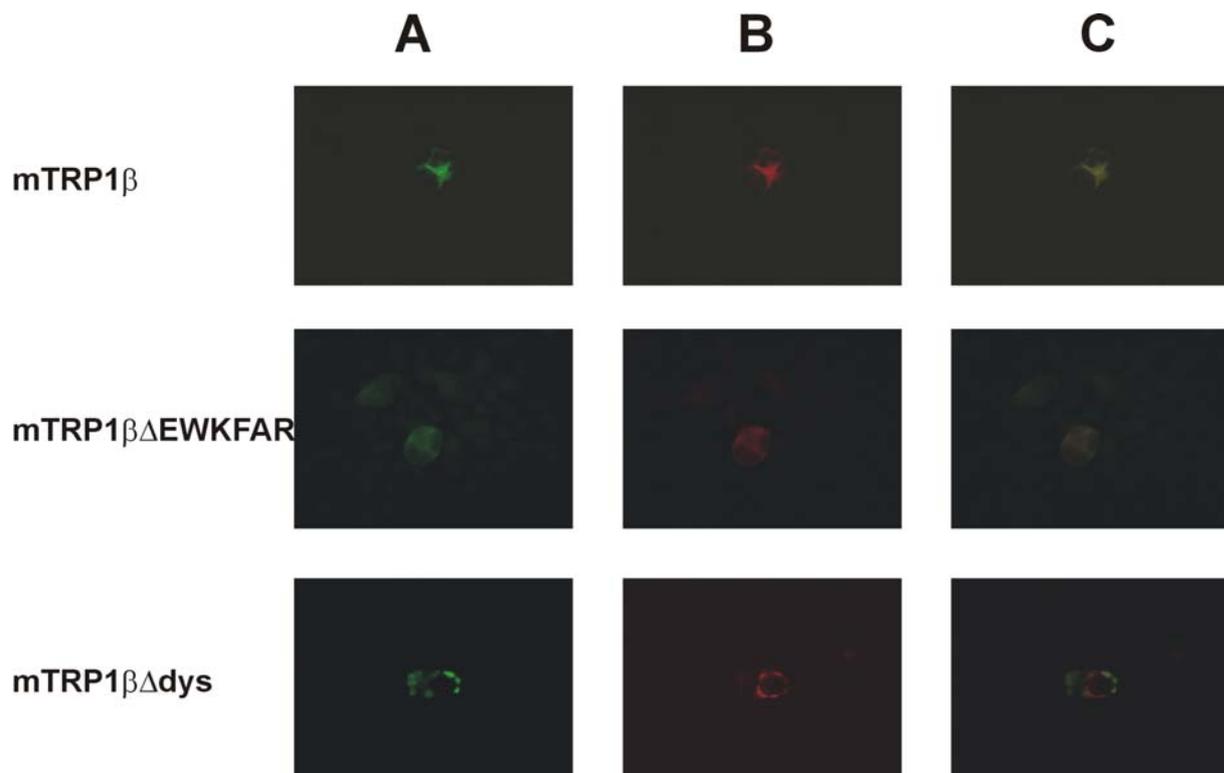


Abb. 6.4 Co-Immunfluoreszenz von mTRP1 β -myc, mTRP1 β Δ EWKFAR-myc und mTRP1 β Δ dys-myc mit TRPC3HA in HEK293-Zellen

Transient transfizierte HEK-293 Zellen wurden mit PFA fixiert, permeabilisiert und mit Maus-anti-myc, Ratte-anti-HA sowie Ziege-anti-Maus-Cy2 und Ziege-anti-Ratte-TRITC markiert. Die Proben wurden mit Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dargestellt ist in **A** das Cy2-Fluoreszenzsignal, in **B** das TRITC-Fluoreszenzsignal und in **C** die Übereinanderlagerung beider Fluoreszenzsignale (Kooperation mit Friedrich, 2001)

6.2.2 Ca²⁺-Messungen an stabil transfizierten HEK293-Zellen

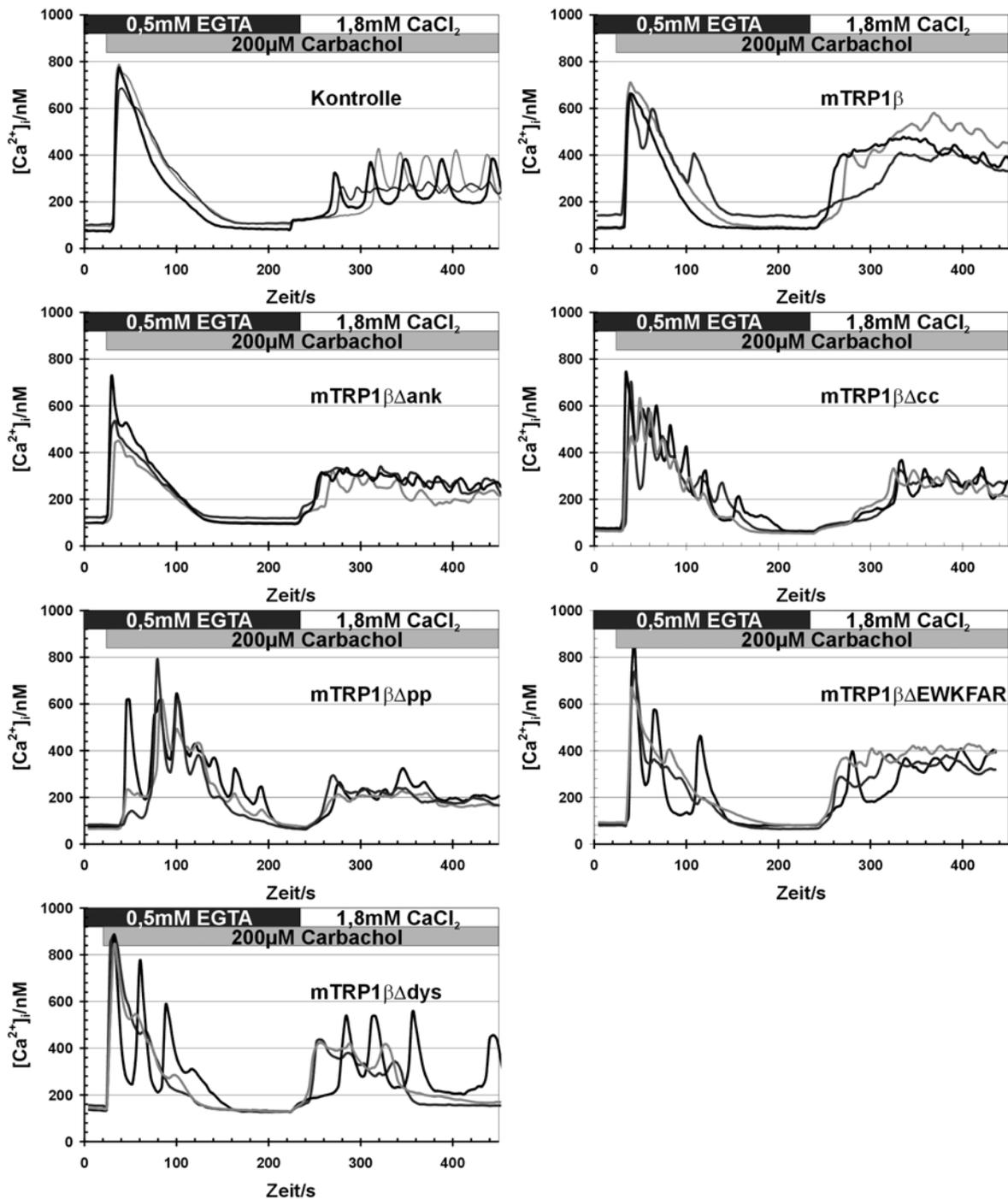
Um den Einfluss von mTRP1 β und den einzelnen Domänen dieses Proteins auf den Ca²⁺-Einstrom nach Rezeptoraktivierung zu untersuchen, wurden HEK293 Klone, die mTRP1 β Flag oder Deletionsmutanten stabil exprimieren, im „single-cell-Ca²⁺-imaging“ untersucht. Diese Methode hat zum einen den Vorteil, dass aufgrund der spektralen Eigenschaften von Fura2 der Einsatz von EGFP als Reporter unproblematisch ist und zum anderen die adhären wachsenden Zellen für die Messung nicht abgelöst werden müssen. Die Zellen wurden über den muskarinischen Acetylcholinrezeptor mit Carbachol stimuliert. Um die Phasen des Ca²⁺-Signals (Mobilisierung aus intrazellulären Speichern und Einstrom über die Plasmamembran) getrennt zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst in Ca²⁺-

freiem EGTA-haltigen Puffer stimuliert, bevor nach Abklingen auf den Basalwert die Ca^{2+} -Konzentration auf 1,8mM eingestellt wurde. Ein Einfluss des an den C-Terminus der Proteine fusionierten Epitops wurde ausgeschlossen (Engelke, 1999)

In Abb. 6.5 sind repräsentative Messungen dargestellt. Die Messungen zeigen deutlich den biphasischen Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration in HEK293-Zellen. Nach Stimulation steigt das Signal innerhalb von ca. 20s auf einen Wert von 600-800nM an. Nach ca. 200s ist bei allen Zellen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wieder auf den Basalwert abgesunken. Nach Ca^{2+} -Zugabe steigt das Signal erneut schnell an und erreicht bei Konzentrationen von 280nM bis 400nM ein Plateau. Der Signalverlauf ist teilweise oszillierend mit unterschiedlichen Frequenzen und Amplituden. Die Werte für Amplitude und Frequenz sind innerhalb einer Zellpopulation sehr unterschiedlich und nicht signifikant zu bewerten.

Abb. 6.5 Einzellmessungen des Ca^{2+} -Einstroms in mTRP1 β oder Deletionsmutanten exprimierende HEK293-Zellen (folgende Seite)

Vektor, mTRP1 β -FLAG und Deletionsmutanten exprimierende HEK293 Zellen wurden nach 30s mit 200 μM CCh in Ca^{2+} -freier ECS stimuliert. Als Kontrolle werden vektortransfizierte Zellen verwendet. Durch Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach 3:45min auf 1,8mM wurde ein Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran initiiert. Gezeigt werden je drei repräsentative Einzellmessungen.



Insgesamt wurden sieben bis zehn Messungen mit mindestens 15 Zellen pro Messung an drei bis sechs verschiedenen Klonen pro Konstrukt vorgenommen. Diese Messungen wurden statistisch ausgewertet. Dabei wurden die Ca^{2+} -Konzentration am Plateau des Sekundäreinstroms ausgewertet (Abb. 6.6). Die Werte des Primäreinstroms lagen bei allen Messungen innerhalb des Fehlerbereiches. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Einstrom über die

Plasmamembran erreicht bei den mTRP1 β exprimierenden Zellen mit 399 ± 26 nM einen signifikant höheren Wert als bei den vektortransfizierten Zellen mit 300 ± 40 nM (Abb. 6.6). Die Deletionsmutanten mTRP1 $\beta\Delta$ ank, mTRP1 $\beta\Delta$ cc, mTRP1 $\beta\Delta$ pp und mTRP1 $\beta\Delta$ dys zeigen demgegenüber kein signifikant verändertes Signal im Vergleich zur Kontrolle. Die Deletionsmutante mTRP1 $\beta\Delta$ EWKFAR ist weder zu den Kontrollmessungen noch zu den Werten der mTRP1 β exprimierenden Zellen signifikant verschieden.

Diese Daten bestätigen zum einen auf funktioneller Ebene die postulierte Porenregion von mTRP1 β und zeigen zum anderen, dass die Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen, die „coiled-coil“-Domäne und die Dystrophin-ähnliche Domäne für die Funktion von mTRP1 β in HEK293-Zellen essentiell sind.

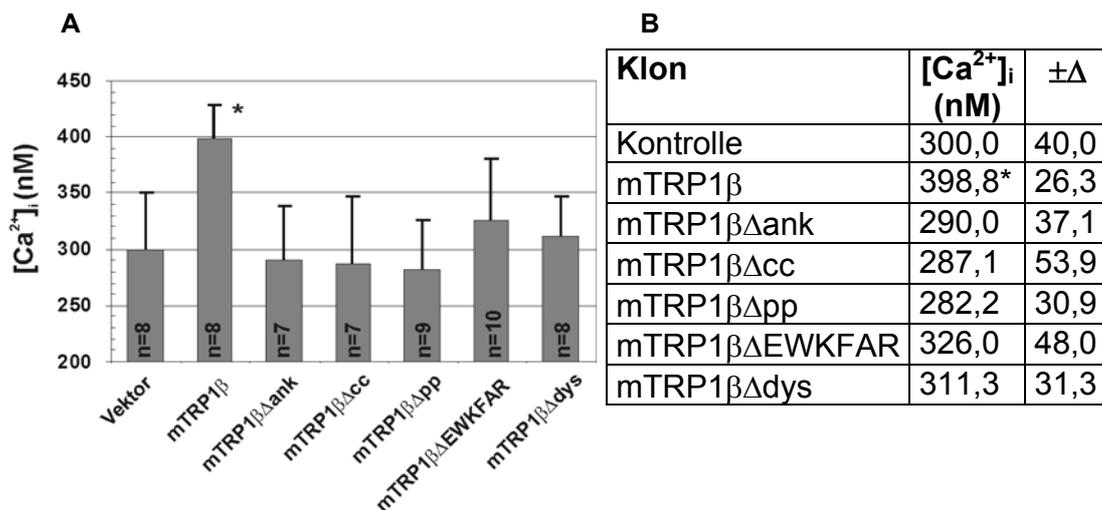


Abb. 6.6 Einfluss von mTRP1 β und Deletionsmutanten auf den Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran

Vektor, mTRP1 β -FLAG und Deletionsmutanten exprimierende HEK293 Zellen wurden mit 200 μ M CCh in Ca²⁺-freier ECS stimuliert. Durch Erhöhung der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration auf 1,8mM wurde ein Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran provoziert. Die maximale cytosolische Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺] (\pm Standardabweichung Δ .) des Sekundärsignals ist über eine Zeitspanne von 60sec gemittelt. **A** grafische **B** tabellarische Darstellung, n=Anzahl der Experimente mit mindestens 15 Zellen pro Experiment, * signifikant verschieden zur Vektorkontrolle (Students t-Test mit $p < 0,05$).

6.3 Einfluss von mTRP1 β auf den Ca²⁺-Einstrom in der Maus B-Zelllinie IIA1.6

Ein Schwerpunkt des Interesses dieser Arbeit war die Untersuchung des Zusammenhanges von TRP-Proteinen mit dem Einstrom von Ca²⁺ in B-Lymphocyten über die Plasmamembran. Dazu wurde zunächst die B-Zelllinie IIA1.6 als Modellsystem verwendet. Diese Zelllinie exprimiert endogen aus der TRPC-Familie die Proteine TRPC1, TRPC2 und TRPC3 (Friedrich, 2001). In einem ersten Ansatz, diese Zelllinie mit mTRP1 β -FLAG zu transfizieren, wurden Vektoren mit konstitutiven Promotoren (SV40, CMV) verwendet. Aus ca. 80 Klonen konnte die Expression des Proteins nur in zwei Klonen nachgewiesen werden (Friedrich, 2001). Zudem erwies sich die Vergleichbarkeit dieser Klone in Ca²⁺-Flux Messungen wegen sehr großer Klon-zu-Klon-Abweichungen als außerordentlich problematisch.

Aus diesem Grund wurde ein System etabliert, mit dem die regulierbare Expression von cDNA in IIA1.6-Zellen möglich ist. Dazu wurden IIA1.6 mit dem reversen Tetracyclintransaktivator transfiziert und subkloniert. Die Subklone wurden im β -Galaktosidasetest auf Regulierbarkeit getestet. Aus 30 getesteten Klonen zeigten sich die Klone E2 und E4 als deutlich regulierbar.

6.3.1 Regulierbare Expression von mTRP1 β in IIA1.6-Zellen

Der Klon E2 wurde für die weiteren Untersuchungen mit pBIG-mTRP1 β FLAG transfiziert. Aus 67 Subklonen wurden über RT-PCR drei Klone identifiziert, in denen über die Zugabe des Tetracyclinderivates Doxycyclin die Expression von mTRP1 β hoch reguliert werden kann. Als Normierungskontrolle diente Aktin. Aus diesen drei Klonen war bei einem (Klon 768-3) die Proteinexpression über Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisbar.

In Abb.6.7 A ist nach 24h Induktion deutlich eine Hochregulierung der mTRP1 β -Expression erkennbar. Nach 48h Induktion ist die Differenz der Signale allerdings signifikant kleiner. Nicht mit Doxycyclin behandelte Zellen zeigen eine Hintergrundexpression. Diese Hintergrundexpression wird auch auf Proteinebene deutlich, wie in Abb. 6.7 B gezeigt. Die 24h mit Doxycyclin inkubierten Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle ein schwaches aber signifikantes Fluoreszenzsignal im Bereich der Plasmamembran, die aber in der Intensität nicht von dem Signal ohne Doxycyclin kultivierter Zellen unterscheidbar ist.

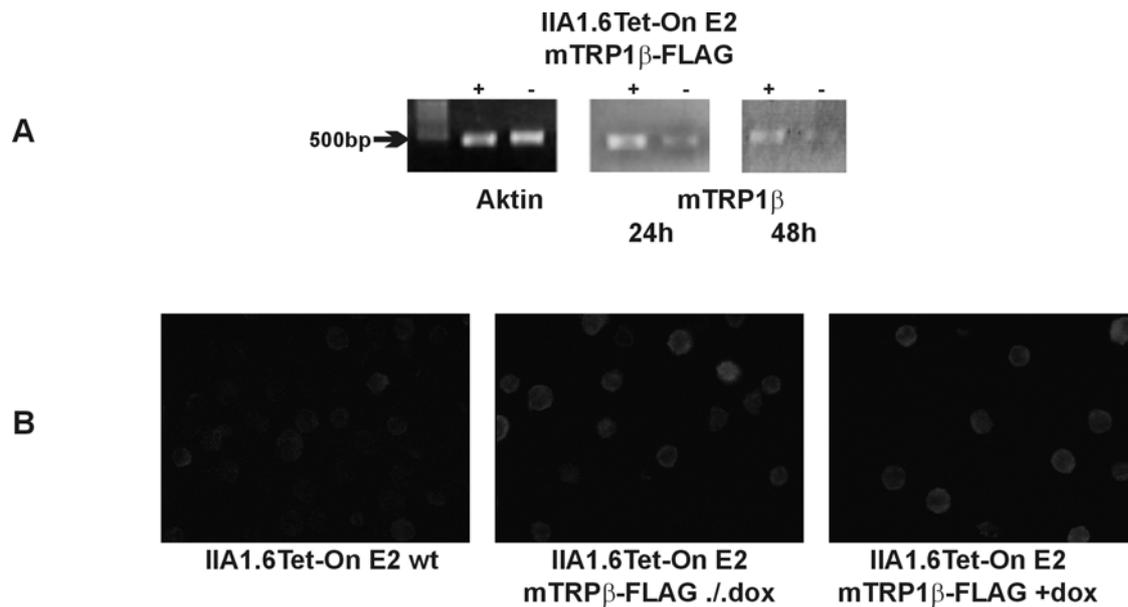


Abb. 6.7 Regulierbare Expression von mTRP1 β -FLAG in IIA1.6 Zellen

Der IIA1.6Tet-On Klon E2 wurde mit pBIG-mTRP1 β -FLAG transfiziert und subkloniert. 67 Klone wurden in der RT-PCR untersucht. Abgebildet sind die Daten des Klons 768-3 vor und nach 24h Induktion. **A** RT-PCR mit Aktin-Primern (18 Zyklen) und TRP1/FLAG-Primern (22 Zyklen) jeweils mit und ohne 1 μ g/ml Doxycyclin (24h und 48h Induktion). **B** Immunfluoreszenz mit IIA1.6Tet-On Klon E2 als Kontrolle und IIA1.6Tet-On E2 mTRP β -FLAG jeweils mit und ohne 1 μ g/ml Doxycyclin. Die Zellen wurden mit PFA fixiert, mit TritonX-100 permeabilisiert und mit dem α -FLAG-Antikörper M2 sowie mit Cy2-konjugiertem Ziege-anti-Maus markiert.

6.3.2 Ca²⁺-Messungen an regulierbar mTRP1 β exprimierenden IIA1.6-Zellen

Der Einfluss der Expression von mTRP1 β auf den Ca²⁺-Einstrom in IIA1.6-Zellen wurde durch Ca²⁺-Messungen am Durchflusszytometer untersucht. Als Kontrolle wurden rtTA-exprimierende Zellen des Klons IIA1.6Tet-On E2 verwendet. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch BCR-Quervernetzung mit Kaninchen anti Maus IgG/IgM Antikörper in Ca²⁺-freiem Puffer. Nach Absinken des Primärsignals auf den Basalwert wurde die Ca²⁺-Konzentration des Puffers auf 1mM eingestellt. IIA1.6 exprimiert keine Fc-Rezeptoren, so dass für diese Experimente kein F(ab)₂-Fragment verwendet werden muss (Budde et al., 1994). Aus den Daten der Kontrollmessung geht deutlich hervor, dass die Inkubation mit Doxycyclin allein keinen Einfluss auf den Ca²⁺-Einstrom hat (Abb. 6.8 A). Die Messung des Klons IIA1.6Tet-On E2 mTRP1 β -FLAG (768-3) zeigen bei einer Induktion von 16h und 24h einen größeren Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺ bei hochregulierter mTRP1 β Expression (Abb. 6.8 B, C). Die Differenz beträgt ca. 70 relative Einheiten. Nach 48h Induktion durch Doxycyclin sind

die Kurvenverläufe wieder identisch und die Anstiege entsprechen denen in den Kontrollzellen (Abb. 6.8 D). Nach 16h Induktion ergeben sich nach Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} Maxima von 390 Einheiten (+dox) und 320 Einheiten (./dox). Damit ist die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auch bei nicht induzierten Zellen höher als bei den Kontrollzellen. Nach 24h Induktion sind diese Werte mit 300 Einheiten (+dox) und 220 Einheiten (./dox) um ca. 25% kleiner.

Demnach führt die Hochregulierung der mTRP1 β -Expression in IIA1.6-Zellen zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom nach BCR-Quervernetzung. Der induktive Effekt in dem etablierten Tet-On-System ist dabei zeitlich begrenzt, was auf die Toxizität einer hohen TRP1 β -Expression hindeutet.

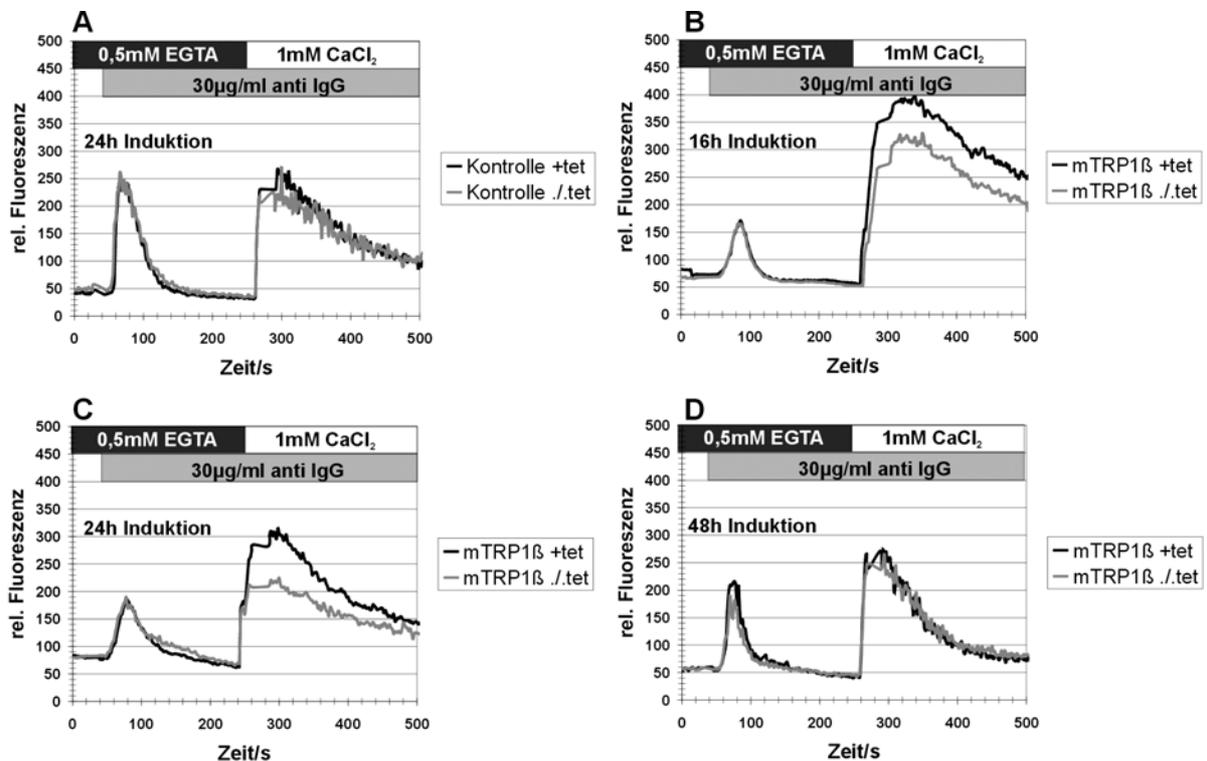


Abb. 6.8 Messungen des Ca^{2+} -Einstroms in regulierbar mTRP1 β exprimierenden IIA1.6-Zellen

Kontrollzellen und IIA1.6Tet-On mTRP1 β -FLAG transfizierte Zellen (Klon 768-3) wurden mit 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kaninchen-anti-Maus IgG in Ca^{2+} -freiem Puffer stimuliert. Nach 4min wurde die Ca^{2+} -Konzentration auf 1mM eingestellt. A Kontrollzellen mit und ohne 24h 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin. B-D mTRP1 β exprimierende Zellen mit und ohne 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin. Die Induktionsdauer beträgt 16h (B), 24h (C) und 48h (D).

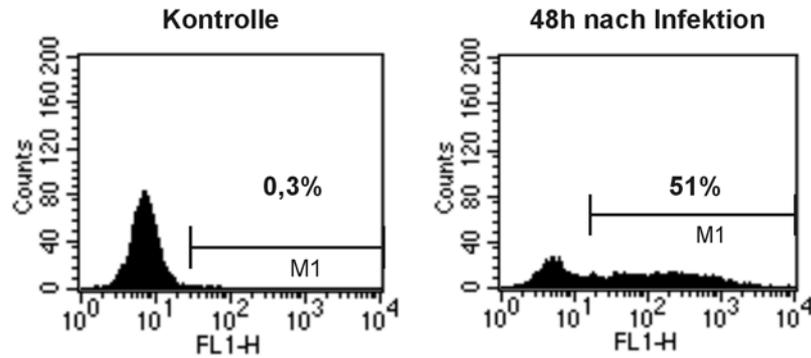
6.4 Einfluss von mTRP1 β oder Deletionsmutanten auf den Ca²⁺-Einstrom in WEHI231-Zellen

Die Untersuchung von TRP-Proteinen und insbesondere die Untersuchung von Deletionsmutanten in Modellsystemen, die endogen die zu untersuchenden TRP-Proteine exprimieren, ist problematisch, da das Verhältnis von rekombinant exprimiertem Protein zu endogen vorhandenem Protein kaum nachvollziehbar ist. Sollte etwa eine Deletionsmutante die TRP1-Funktion nicht mehr übernehmen können, so könnte diese Funktion über endogene TRP-Proteine aufrechterhalten bleiben, ohne dass sich die Ca²⁺-Einstromeigenschaften signifikant verändern.

Vor dem Hintergrund dieser Argumentation wurden Ca²⁺-Einstromuntersuchungen an der Maus-B-Zelllinie WEHI231 durchgeführt, die aus der Familie der TRPC-Proteine nur TRPC2 und TRPC3 exprimieren (unveröffentlichte Daten dieser Arbeitsgruppe).

6.4.1 Transiente Expression von mTRP1 β oder Deletionsmutanten in WEHI231-Zellen durch retroviralen Gentransfer

Zur Untersuchung des Einflusses von mTRP1 β oder Deletionsmutanten in WEHI231-Zellen wurden die Zellen durch Infektion mit rekombinanten Retroviren transient transfiziert. Zunächst wurde das Transfektionssystem mit Hilfe von rekombinanten EGFP-Viren etabliert. In Abb. 6.9 ist die Analyse einer repräsentativen Infektion dargestellt. Die Transfektionsraten der verschiedenen Experimente lagen zwischen 30% und 60%. Für jede Transfektion wurde neben einer EGFP-Kontrolle auch eine Immundetektion der HA-Fusionsproteine durchgeführt. In Abb. 6.10 wird eine gegenüber den Kontrollzellen, die mit Leervektor transfiziert wurden, signifikante Membranfluoreszenz deutlich. Innerhalb der jeweiligen Zellpopulation zeigt sich eine große Schwankung der Signalstärke.



Tab. 6.9 Retroviraler Gentransfer in WEHI231-Zellen

Rekombinante Retroviren wurden durch Transfektion von PlatE-Zellen mit p5N-M-EGFP produziert. Vor und 48h nach der Infektion wurden WEHI231-Zellen am Durchflusszytometer untersucht. Die Prozentangaben entsprechen dem Anteil EGFP-positiver Zellen an allen lebenden Zellen.

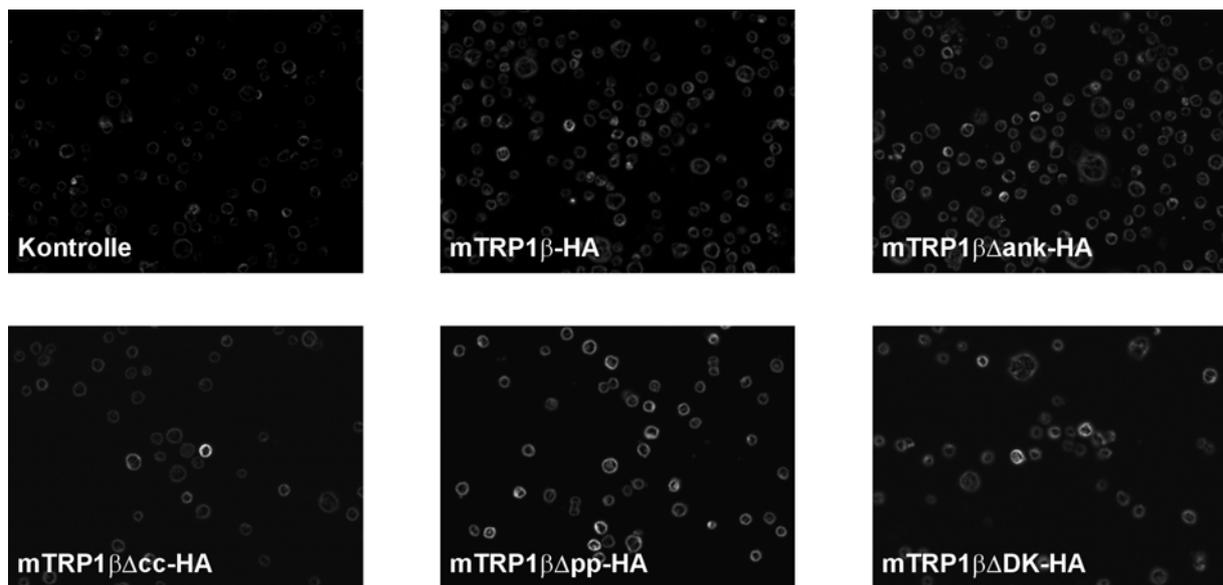


Abb. 6.10 Transiente Expression von mTRP1β und Deletionsmutanten in WEHI231-Zellen

Die Expression von mTRP1β und Deletionsmutanten in WEHI231-Zellen wurde durch Immunfluoreszenz an PFA-fixierten Zellen überprüft. Nach Permeabilisierung mit TritonX-100 wurden die HA-Fusionsproteine mit 3F10 und Cy3-markiertem Esel-anti-Ratte markiert. Die Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert, per CCD-Kamera digitalisiert und in MetaView exportiert. Bei diesen Abbildungen wurde gleichmäßig ein Hintergrundabgleich vorgenommen.

6.4.2 Ca^{2+} -Messungen an transient mTRP1 β oder Deletionsmutanten exprimierenden WEHI231-Zellen

Die Ca^{2+} -Einstrom Eigenschaften von transient mTRP1 β oder Deletionsmutanten exprimierenden Zellen nach BCR-Quervernetzung oder ER-Depletion wurde untersucht. Dazu wurden die Zellen in Ca^{2+} -freier Lösung mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ F(ab)₂ Ziegenanti-Maus IgM oder 1,5 μM Thapsigargin stimuliert. Nach Absinken des primären Ca^{2+} -Signals auf den Basalwert wurde die Ca^{2+} -Konzentration des Puffers auf 1mM (nach BCR-Quervernetzung) oder 3mM (nach ER-Depletion) eingestellt. Das Ca^{2+} -Signal aller Zellen in Abwesenheit extrazellulären Ca^{2+} war dabei im Rahmen des Messfehlers gleich. Die maximalen prozentualen Abweichungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vom Wert der Kontrollzellen nach Zugabe von Ca^{2+} wurden statistisch ausgewertet (Abb. 6.11). Wie in Abb. 6.11 C, D gezeigt, sind die Sekundärsignale nach BCR-Quervernetzung nicht von mTRP1 β oder Deletionsmutanten beeinflusst. Nach ER-Depletion zeigt sich dagegen bei mTRP1 β -exprimierenden Zellen eine Erhöhung der maximalen cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen um $21 \pm 7,5\%$ (Abb. 6.11 A, B). Auch nach Transfektion von mTRP1 $\beta\Delta\text{ank}$ ($12 \pm 2,5\%$), mTRP1 $\beta\Delta\text{acc}$ ($19 \pm 9\%$) und mTRP1 $\beta\Delta\text{DK}$ ($14 \pm 5,5\%$) ist der Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum gegenüber den Kontrollzellen signifikant erhöht (Abb. 6.11 A, B).

Diese Daten belegen, dass mTRP1 β in WEHI231-Zellen nicht am Ca^{2+} -Einstrom nach BCR-Quervernetzung beteiligt ist. Dagegen führt die Expression von mTRP1 β nach Speicherdepletion durch Thapsigargin zu einem größeren Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran. Diese Auswirkung wird durch die Deletion der postulierten Porenregion gehemmt, wohingegen die Deletion der Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen, der „coiled coil“-Domäne oder der 35AS von EWKFAR bis zur Dystrophin-ähnlichen Domäne keinen Einfluss auf den mTRP1 β -Effekt hat.

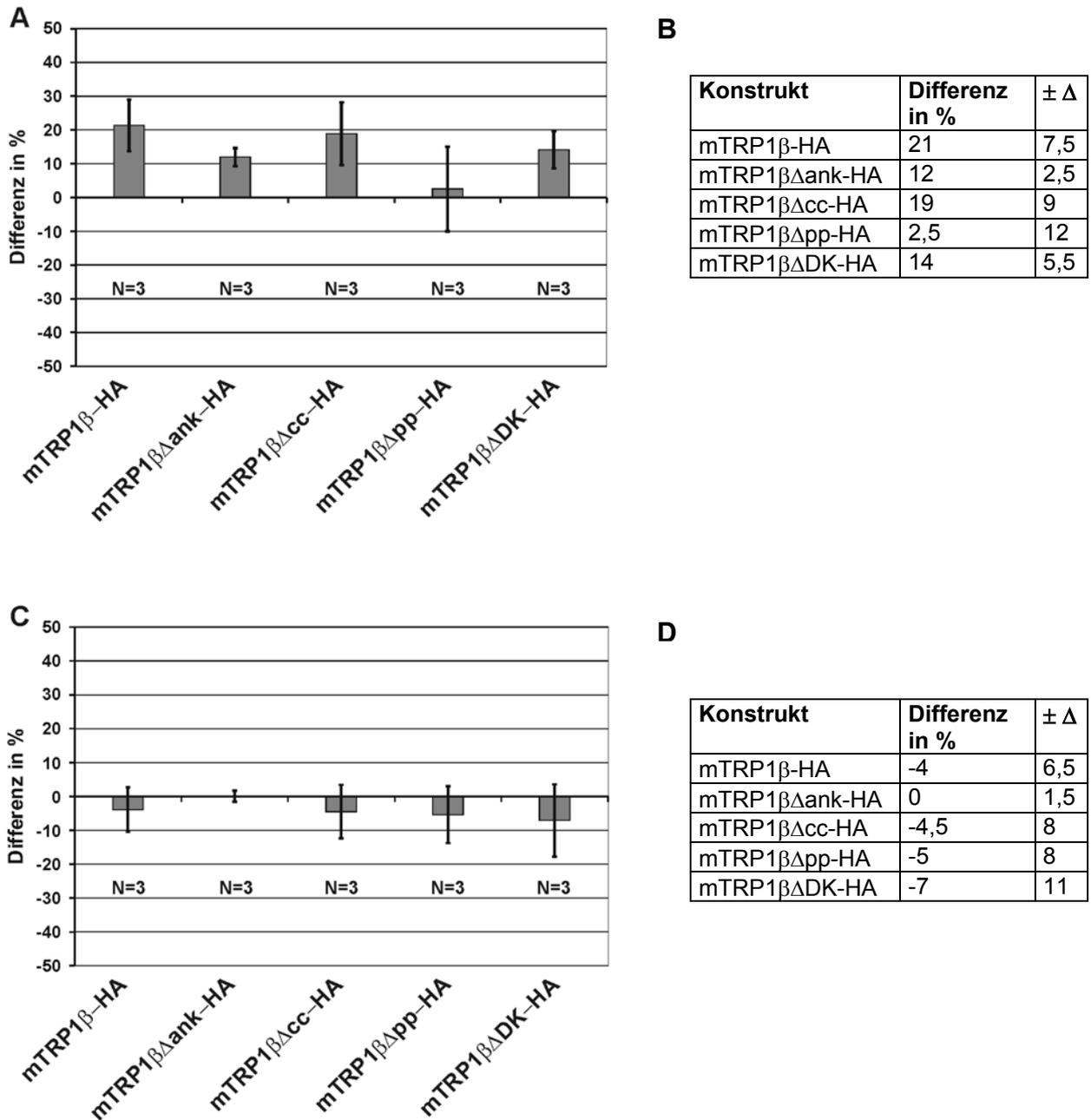


Abb. 6.11 Ca^{2+} -Flux Messungen an transient transfizierten WEHI231-Zellen

Fluo3-beladene Zellen wurden mit $20\mu\text{g/ml}$ F(ab)₂ Ziege-anti-Maus IgM oder $1,5\mu\text{M}$ Thapsigargin in Abwesenheit extrazellulären Ca^{2+} stimuliert und am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die gemittelten prozentualen Abweichungen der maximalen cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Ca^{2+} -Zugabe von den Kontrollzellen. Die angegebenen Fehler sind die mittleren Abweichungen vom Mittelwert. **A**, **C** graphische, **B**, **D** tabellarische Darstellung

6.5 Untersuchung des Ca^{2+} -Einstroms in TRPC1-defizienten DT40-Zellen

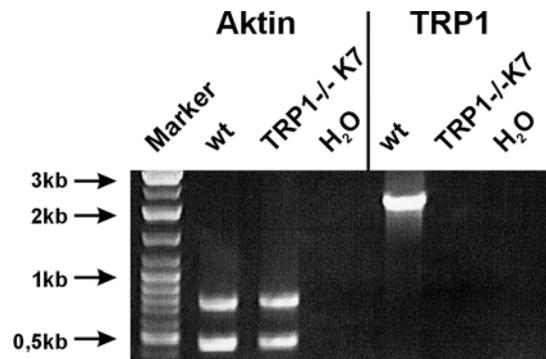
Die Regulation und Aktivierung von Kanälen, an denen TRP-Proteine beteiligt sind, ist bislang weitestgehend unverstanden (zur Übersicht Zitt et al., 2002). Derzeit ist nicht auszuschließen, dass die Funktion von TRP-Proteinen eng mit regulierenden oder aktivierenden Interaktionspartnern verknüpft ist. Für Zellsysteme, die mit einem TRP-Protein transfiziert werden, das endogen nicht exprimiert wird, könnte das bedeuten, dass die artifiziell eingebrachten Proteine nicht funktionell in den gesamten Kanalapparat der Zelle eingebunden werden können. Insbesondere für die Untersuchung von Mutanten besteht dagegen die bereits in 6.4 geschilderte Problematik bei Zellsystemen, die das zu untersuchende TRP-Protein endogen exprimieren.

Dieser Hypothese folgend, wurden Ca^{2+} -Einstromuntersuchungen an der Hühner-B-Zelllinie durchgeführt, in denen das Gen für TRPC1 durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurde. Diese Zellen wurden im Labor von Prof. Dr. T. Kurotaki etabliert (Mori et al., 2002).

6.5.1 Untersuchung des Ca^{2+} -Fluxes in wt DT40- und TRPC1-defizienten DT40-Zellen

Zunächst wurde versucht, die Daten von Mori et al. in diesem Labor zu reproduzieren. Dazu wurden Fluo3-beladene DT40- und DT40 TRPC1^{-/-}-Zellen mit anti-Huhn-IgM oder Thapsigargin stimuliert und am Durchflusszytometer analysiert. Dabei wurde deutlich, dass bei einer Stimulation von DT40^{-/-}-Zellen über den BCR nur etwa 30-60% der Zellen ein Ca^{2+} -Signal zeigen. Dieser Effekt korreliert nicht mit der Expression von Oberflächen IgM. Eine Selektion dieser Zellen mit Hygromycin oder Puromycin nach erfolgter Transfektion (z.B. EGFP) führt zu vollständig unterdrücktem Ca^{2+} -Signal nach BCR-Quervernetzung. Nach zweitägiger Kultivierung von wt DT40-Zellen unter suboptimalen Bedingungen (Dichte > $2 \cdot 10^6/\text{ml}$) werden sehr ähnlichen Eigenschaften in Bezug auf die Stimulierbarkeit erreicht. Als Konsequenz dieser Beobachtungen wurden die DT40^{-/-}-Zellen subkloniert und auf ihre Stimulierbarkeit über den BCR untersucht. Innerhalb von 50 untersuchten Subklonen zeigen sich sehr unterschiedliche Anteile stimulierbarer Zellen in den Zellpopulationen. Der Subklon 7 zeigt dagegen nach BCR-Quervernetzung ein Ca^{2+} -

Signal wie DT40-Wildtypzellen. Über genomische PCR wurde verifiziert, dass es sich bei diesem Subklon um eine TRPC1 defiziente Zelllinie handelt (Abb. 6.12).



Tab. 6.12 Genomische PCR von wt DT40- und TRPC1-defizienten DT40-Zellen

Auf genomischer Ebene wurde die Unterbrechung des TRPC1 Gens überprüft. Als Kontrolle für die Qualität der extrahierten DNA wurden Aktin-Primer verwendet. Die TRP1-PCR wurde mit den Primern K2723 und 2725 durchgeführt.

6.5.1.1 Ca^{2+} -Messungen an wt DT40- und TRPC1-defizienten DT40-Zellen nach BCR-Quervernetzung

Die Ca^{2+} -Einstrom-Eigenschaften des TRPC1-defizienten Subklons 7 wurden im Vergleich zu wt DT40- und TRPC1-/- Zellen untersucht. In Abb. 6.13 C ist eine repräsentative Messung in Gegenwart von extrazellulärem Ca^{2+} dargestellt. Der Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach BCR-Quervernetzung bei TRP1 defizienten Zellen verläuft deutlich langsamer auf ein kleineres Maximum als bei wt DT40-Zellen (Abb. 6.13 C) Dagegen wird nach Stimulation des Subklons 7 ein mit wt DT40-Zellen vergleichbares Maximum erreicht, wobei die Signalform im Bereich des Maximums breiter verläuft, als in wt-Zellen (6.13 C). Die statistische Auswertung der maximalen cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen zeigt, dass nach Stimulation der Zellen über den BCR sowohl in Gegenwart als auch ohne extrazelluläres Ca^{2+} in wt DT40-Zellen (336 ± 36 Einheiten mit $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ und 249 ± 39 Einheiten ohne $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$) und im TRPC1-defizienten DT40 Subklon 7 (301 ± 31 Einheiten mit $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ und 233 ± 35 Einheiten ohne $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$) ein signifikant höheres Maximum erreicht wird, als in DT40 TRPC1-/- Zellen (168 ± 40 Einheiten mit $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ und 112 ± 13 Einheiten ohne $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$) (Abb. 6.13 A, B, D). Die Maxima von wt DT40-Zellen und Zellen des Subklons 7 unterscheiden sich dagegen nicht signifikant. Nach Zugabe von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$

zu in Abwesenheit extrazellulärer Calciumionen stimulierten Zellen wird im Rahmen des Fehlers bei allen Zellen das gleiche Maximum erreicht (Abb. 6.13 B).

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die von Mori et al. (2002) gezeigten Effekte der TRPC1-Defizienz auf die heterogenen Eigenschaften innerhalb der gezeigten Zelllinie zurückzuführen sind. Der TRPC1-defiziente Subklon 7, der im Gegensatz zur ursprünglichen Zelllinie zu 100% über den BCR stimulierbar ist, zeigt keinen Einfluss auf den Ca^{2+} -Einstrom nach BCR-Quervernetzung. In Ergänzung der Daten von Mori et al. (2002) wurde das Ca^{2+} -Signal in den aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern gespeisten Einstrom und den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran aufgetrennt.

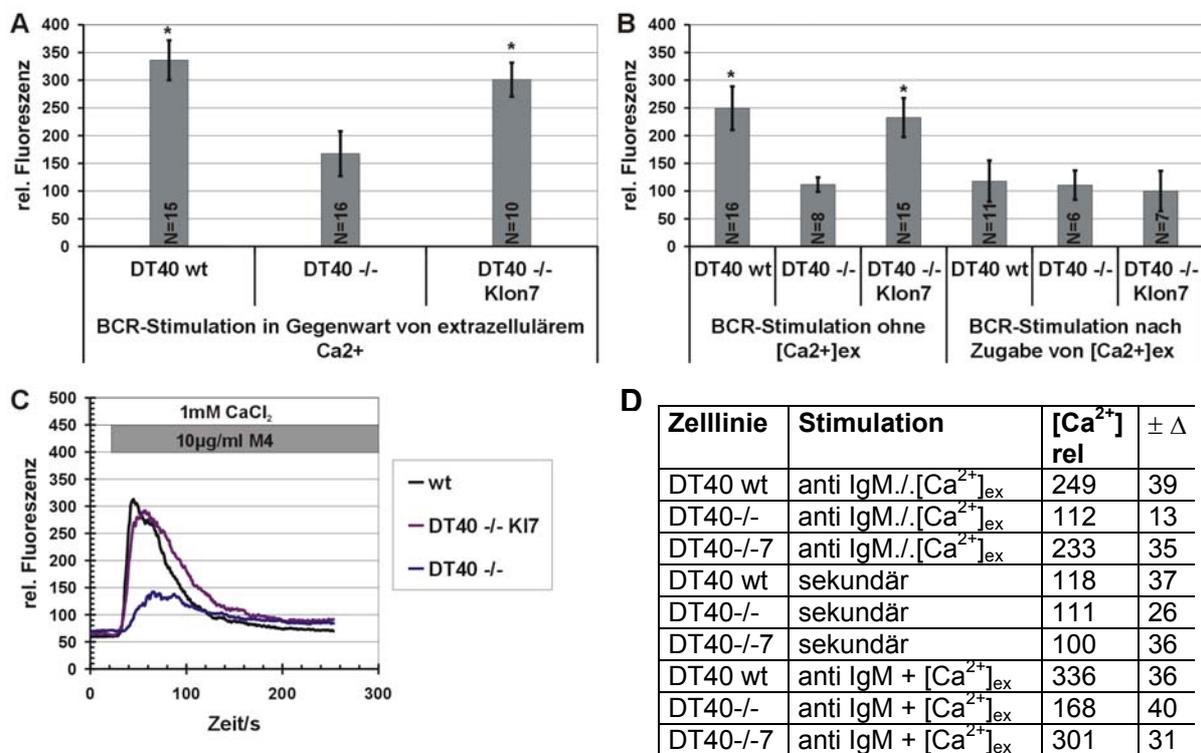


Abb. 6.13 Ca^{2+} -Flux Messungen nach Stimulation von wt DT40- und DT40 TRPC1-/-Zellen über den BCR

Fluo3-beladene Zellen wurden mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Maus-anti-Huhn IgM (M4) in Gegenwart oder Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} stimuliert und am Durchflusszytometer analysiert. Eine repräsentative Messung in Gegenwart von extrazellulärem Ca^{2+} ist in **C** dargestellt. Die Maximalwerte von n Messungen wurden statistisch ausgewertet und graphisch (**A**, **B**) sowie tabellarisch (**D**) dargestellt. Die angegebenen Fehler sind Standardabweichungen. *signifikant Verschieden zu DT40TRPC1-/- (t-Test $p < 0,01$)

6.5.1.2 Ca²⁺-Messungen an wt DT40- und TRPC1-defizienten DT40 Zellen nach ER-Depletion

Neben den Ca²⁺-Einstrom Eigenschaften nach BCR-Stimulation wurden auch der Ca²⁺-Flux nach ER-Depletion durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin in wt DT40- und TRPC1-defizienten DT40-Zellen untersucht. In Abb. 6.14 C ist eine repräsentative Messung in Gegenwart von extrazellulärem Ca²⁺ dargestellt. Nach Zugabe von 1,5µM Thapsigargin ohne [Ca²⁺]_{ex} wird bei allen Zellen das gleiche Maximum erreicht (6.14 B, C). Nachdem die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration auf 3mM eingestellt wird, steigt bei allen Zellen der cytosolische Ca²⁺-Gehalt mit einer ähnlichen Steigung an (6.14 A). Die statistische Auswertung der maximalen cytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen nach Ca²⁺-Zugabe zeigt, dass in wt DT40-Zellen mit 362 ±34 Einheiten ein signifikant höheres Maximum im Vergleich zu TRPC1-/- Zellen und dem TRPC1-defizienten Subklon 7 erreicht wird (Abb. 6.14 B, C). Die Werte des Subklons 7 sind dabei mit 293 ±35 Einheiten ebenfalls signifikant höher als bei TRPC1-/- Zellen mit 169 ±21 Einheiten (Abb. 6.14 B, C).

Die Ca²⁺-Einstrom-Daten des im Rahmen dieser Arbeit etablierten TRPC1-defizienten DT40-Subklons 7 zeigen, dass die TRPC1-Defizienz lediglich zu einer Verringerung des Ca²⁺-Einstroms nach Speicherdepletion durch Thapsigargin führt und keinen Einfluss auf den Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran nach BCR-Quervernetzung hat. Durch diese Ergebnisse werden die Daten von Mori et al. (2002) widerlegt.

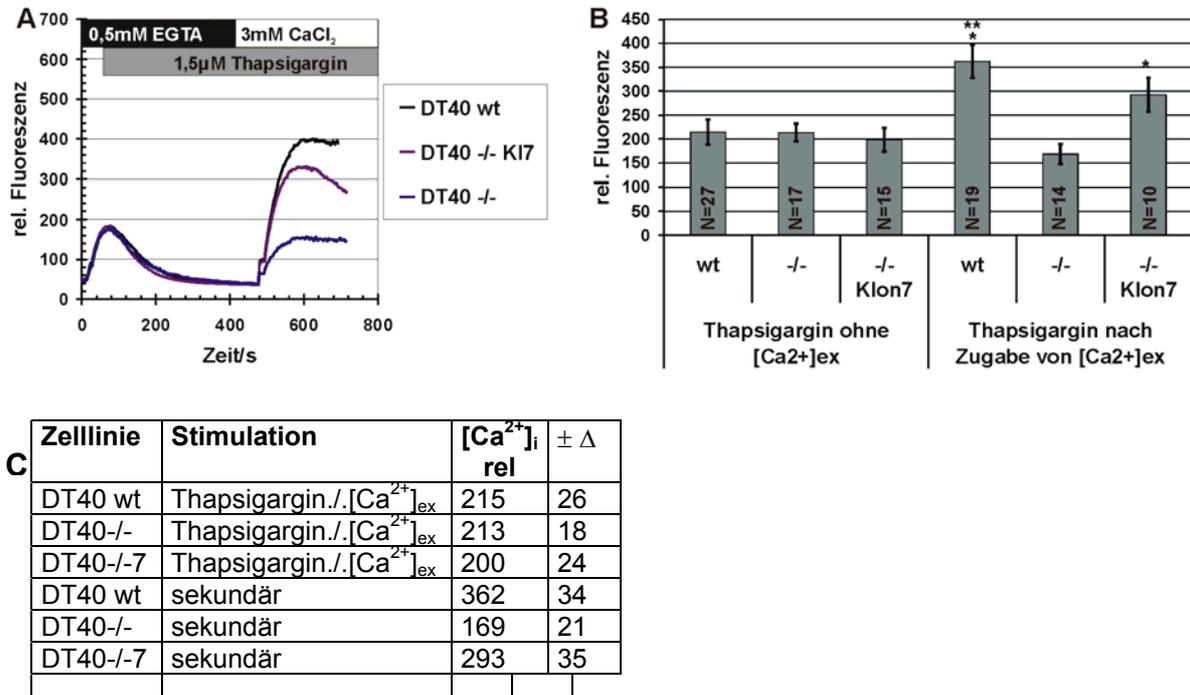


Abb. 6.14 Ca²⁺-Flux Messungen nach ER-Depletion an wt DT40- und DT40 TRPC1-defizienten DT40-Zellen

Ein Ca²⁺-Antwort wurde in Fluo3-beladenen Zellen durch 1,5µM Thapsigargin in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ induziert und am Durchflusszytometer analysiert. Eine repräsentative Messung ist in **A** dargestellt. Die Maximalwerte von n Messungen wurden statistisch ausgewertet und graphisch (**B**) sowie tabellarisch (**C**) dargestellt. Die angegebenen Fehler sind Standardabweichungen. *signifikant verschieden zu DT40 TRPC1-/- (t-Test p<0,01), ** signifikant verschieden zu DT40 TRPC1-/- Subklon 7 (t-Test p<0,01)

6.5.2 Expression von mTRP1β und Deletionsmutanten in TRPC1-defizienten DT40-Zellen

Die TRPC1-defizienten DT40-Zellen wurden zur Untersuchung von mTRP1β-Deletionsmutanten eingesetzt. Dazu wurden TRPC1-defiziente DT40-Zellen mit rekombinanten Retroviren transfiziert und für 7d mit 1,5mg/ml Hygromycin selektioniert. Die Effizienz des Transfektionsverfahrens wurde über Infektion mit einem EGFP-Virus überprüft (Abb. 6.15). Der Anteil EGFP-transfizierter Zellen nach Infektion und Selektion ist >95%. Diese Relation wurde auch bei Immunfluoreszenzen beobachtet. Die Expressionsstärke ist bei diesen Zellpopulationen allerdings sehr unterschiedlich. Daher wurden für die weiteren

Untersuchungen sowohl die Ursprungspopulationen nach Transfektion, als auch subklonierte Zellklone verwendet.

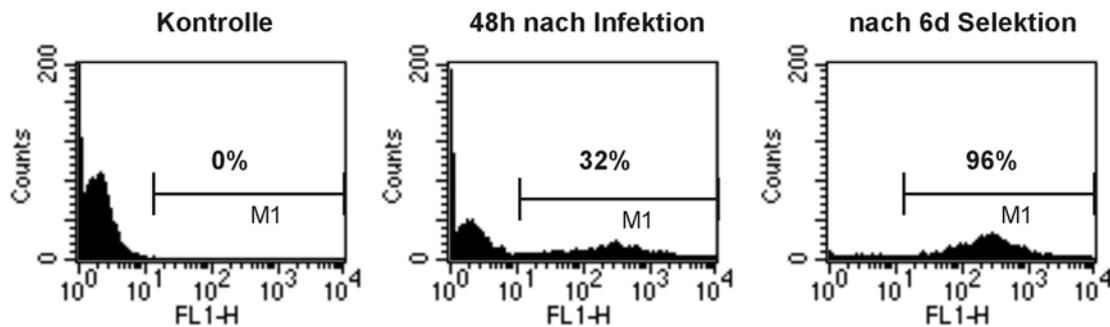


Abb. 6.15 Transfektion von DT40-Zellen durch retroviralen Gentransfer

Rekombinante Viren wurden durch Co-Transfektion von PlatE-Zellen mit p5N-M-EGFP und pHCMV-VSV-G produziert. Vor und nach Infektion sowie 6d nach Selektion mit 1,5mg/ml Hygromycin wurden die Zellen per Durchflusszytometer analysiert. Die Prozentangaben geben den Anteil EGFP-positiver Zellen an allen lebenden Zellen wieder.

Die Expression von mTRP1 β und Deletionsmutanten wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot-Analyse nachgewiesen. In Abb. 6.16 ist deutlich die Membranlokalisierung aller exprimierten Konstrukte zu erkennen. In Abb. 6.17 ist ein Western Blot nach Immunpräzipitation von HA-Fusionsproteinen aus DT40 Transfektanden abgebildet. Im Gegensatz zu den Immunfluoreszenzen, die an Zellbatches durchgeführt wurden, wurden für die Immunpräzipitationen Zellklone verwendet. Deutlich sind die starken Unterschiede in der Proteinmenge innerhalb der verschiedenen Klone. Das apparente Molekulargewicht von mTRP1 β -HA ist, wie auch bei stabil transfizierten HEK293-Zellen (Abb. 6.2), ca. 10kDa geringer als die nach der AS Zusammensetzung berechnete Größe von 90kDa. Mit Ausnahme der Mutante mTRP1 β Δ pp-HA, deren apparentes Molekulargewicht bei ca. 72kDa liegt (berechnet: 76,5kDa), entsprechen die Differenzen der apparenten Molekulargewichte der unterschiedliche Reduktion von Aminosäuren (berechnete Werte: mTRP1 β Δ ank-HA, 77kDa; mTRP1 β Δ cc-HA, 83,5kDa; mTRP1 β Δ DK-HA, 78kDa). Bei den Immunpräzipitationen aus den besonders stark exprimierenden Klonen mTRP1 β Δ ank-HA Klon 9 und mTRP1 β Δ DKHA Klon 1, aber auch bei dem Klon mTRP1 β Δ cc-HA Klon 1 sind neben dem Hauptsignal um 70kDa auch deutliche Signale in einem Bereich sichtbar, in denen Proteine mit klar größeren Molekulargewichten laufen (Abb. 6.17). Da bei diesem Blot ein LMW-Marker

verwendet wurde, kann gemäß der verwendeten PAA-Konzentration von 7,5% nur in grober Näherung ein apparentes Molekulargewicht abgeschätzt werden, das etwa dem vierfachen der Größe des jeweiligen Monomers entspricht.

Dies sind die ersten biochemischen Hinweise auf die Bildung von tetrameren TRP-Kanäle. Der Vergleich der Signale von mTRP1 β -HA und der Mutante mTRP1 $\beta\Delta$ cc-HA deutet darauf hin, dass durch die Deletion der „coiled-coil“-Domäne die Bildung von Homotetrameren begünstigt wird.

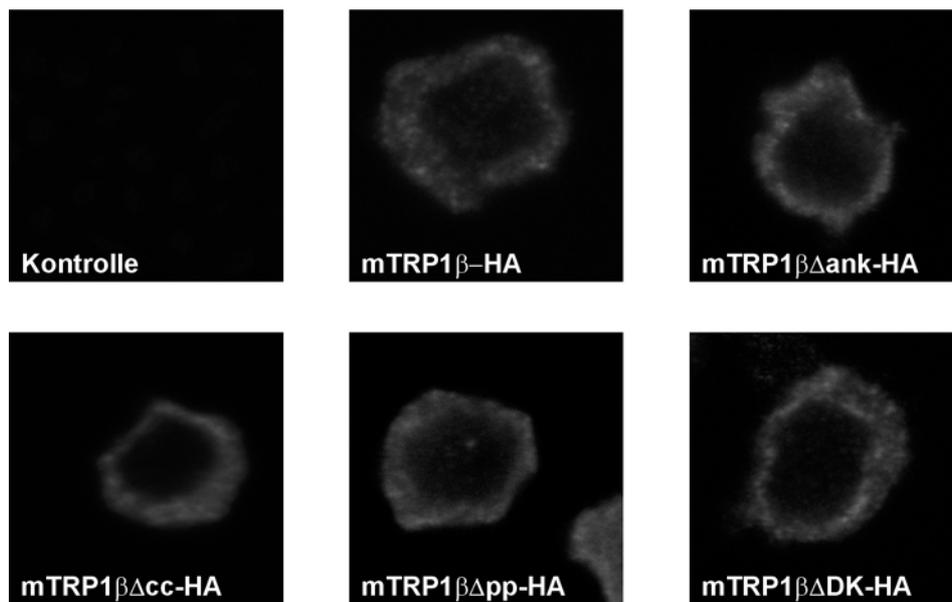


Abb. 6.16 Stabile Expression von mTRP1 β und Deletionsmutanten in TRPC1-defizienten DT40-Zellen

Die Expression von mTRP1 β und Deletionsmutanten in TRPC1-defizienten DT40-Zellen wurde durch Immunfluoreszenz an PFA-fixierten Zellen überprüft. Nach Permeabilisierung mit TritonX-100 wurden die HA-Fusionsproteinen mit 3F10 und Cy3-markiertem Esel-anti-Ratte markiert. Die Proben wurden mit einem Konfokalmikroskop analysiert.

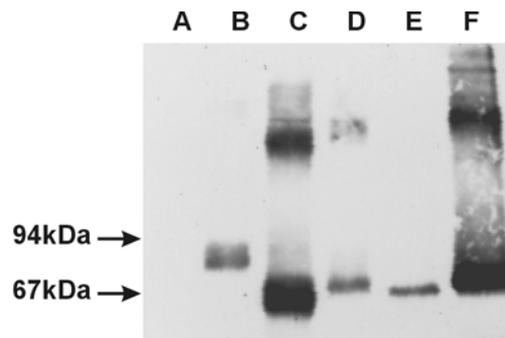


Abb. 6.17 Stabile Expression von mTRP1 β und Deletionsmutanten in TRPC1-defizienten DT40-Zellen

10^7 Zellen wurden in RIPA lysiert. Nach Immunpräzipitation mit Maus anti HA-Tag wurden die Proteine per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die HA-Fusionsproteine wurden mit Ratte-anti-HA-Tag und Peroxidase-markiertem Ziege-anti-Ratte detektiert. **A** DT40 TRPC1 $^{-/-}$, **B** DT40 TRPC1 $^{-/-}$ mTRP1 β -HA Klon 4, **C** DT40 TRPC1 $^{-/-}$ mTRP1 β Δ ank-HA Klon 9, **D** DT40 TRPC1 $^{-/-}$ mTRP1 β Δ cc-HA Klon 1, **E** DT40 TRPC1 $^{-/-}$ mTRP1 β Δ pp-HA, **F** DT40 TRPC1 $^{-/-}$ mTRP1 β Δ DK-HA Klon 1

6.5.2.1 Ca $^{2+}$ -Einstrommessungen nach ER-Depletion bei mTRP1 β und Deletionsmutanten exprimierenden DT40 TRPC1 $^{-/-}$ -Zellen

Für die Messungen des Ca $^{2+}$ -Flux in TRPC1-defizienten DT40-Zellen nach ER-Depletion durch Thapsigargin wurden sowohl Zellen des Subklons 7 als auch die Ursprungslinie verwendet. Damit wurden den Bedingungen, die den Daten von Mori et al. (2002) zugrunde liegen, die Eigenschaften des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Subklons gegenübergestellt. In Abb. 6.18 sind die statistisch ausgewerteten Maxima des Ca $^{2+}$ -Einstroms über die Plasmamembran nach ER-Depletion dargestellt. Dabei sind in Abb. 6.18 A, B die Messungen gezeigt, in denen die ursprüngliche TRPC1 $^{-/-}$ -Zelllinie für die retroviralen Transfektionen verwendet wurde. In diese Messungen gehen Daten von in der Immunfluoreszenzanalyse positiv getesteten Klonen ein. Je transfiziertes Konstrukt wurden vier bis acht Klone untersucht. In Abb. 6.18 C, D sind dagegen Messungen ausgewertet, in denen ausgehend von dem TRPC1-defizienten DT40-Subklon 7 stabile Zelllinien etabliert wurden.

TRPC1-defiziente Zellen der ursprünglichen Zelllinie zeigen nach Transfektion mit mTRP1 β HA mit 229 ± 30 Einheiten eine signifikant höhere cytosolische Ca $^{2+}$ -Konzentration aus dem Extrazellularraum nach ER-Depletion als die Ausgangszelllinie mit 168 ± 20 Einheiten. Allerdings wird der Wert der wt DT40-

Zellen, der bei 362 ± 34 Einheiten liegt, nicht erreicht (Abb. 6.18 A, B). Ebenfalls signifikant höher als bei TRPC1^{-/-}-Zellen sind die Werte für mTRP1 Δ cc-HA exprimierende Zellen (235 ± 36 Einheiten) und mTRP1 Δ DK-HA exprimierende DT40 TRPC1^{-/-}-Zellen (220 ± 36 Einheiten) (Abb. 6.18 A, B). Für alle anderen Deletionsmutanten zeigt sich kein signifikanter Unterschied zu TRPC1-defizienten DT40-Zellen (Abb. 6.18 A, B). Innerhalb der je Deletionsmutante selektionierten Subklone ergeben sich erhebliche Abweichungen, wie durch die trotz höherer Anzahl von Messungen wesentlich größeren Standardabweichungen im Vergleich zu den Messungen mit dem DT40 TRPC1^{-/-}-Subklon 7 zeigen (Abb. 6.18 B, D).

Ausgehend vom TRPC1-defizienten Subklon 7 zeigen nur mTRP1 Δ cc-HA-exprimierende Zellen einen signifikant höheren Ca²⁺-Einstrom nach ER-Depletion im Vergleich zu DT40 TRPC1^{-/-}-Zellen (Abb. 6.18 C, D). Mit 356 ± 33 Einheiten wird ein ähnliches Niveau erreicht, wie in wt DT40-Zellen (Abb. 6.18 D).

Aus diesen Daten wird deutlich, dass durch die Deletion der „coiled-coil“-Domäne der Ca²⁺-Einstrom nach Speicherdepletion durch Thapsigargin im Vergleich zu mTRP1 β erhöht wird. Zusammen mit den Daten der Western Blot-Analyse (Abb. 6.17) könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass über diese Domäne die multimere Struktur von TRP-Kanälen bestimmt wird.

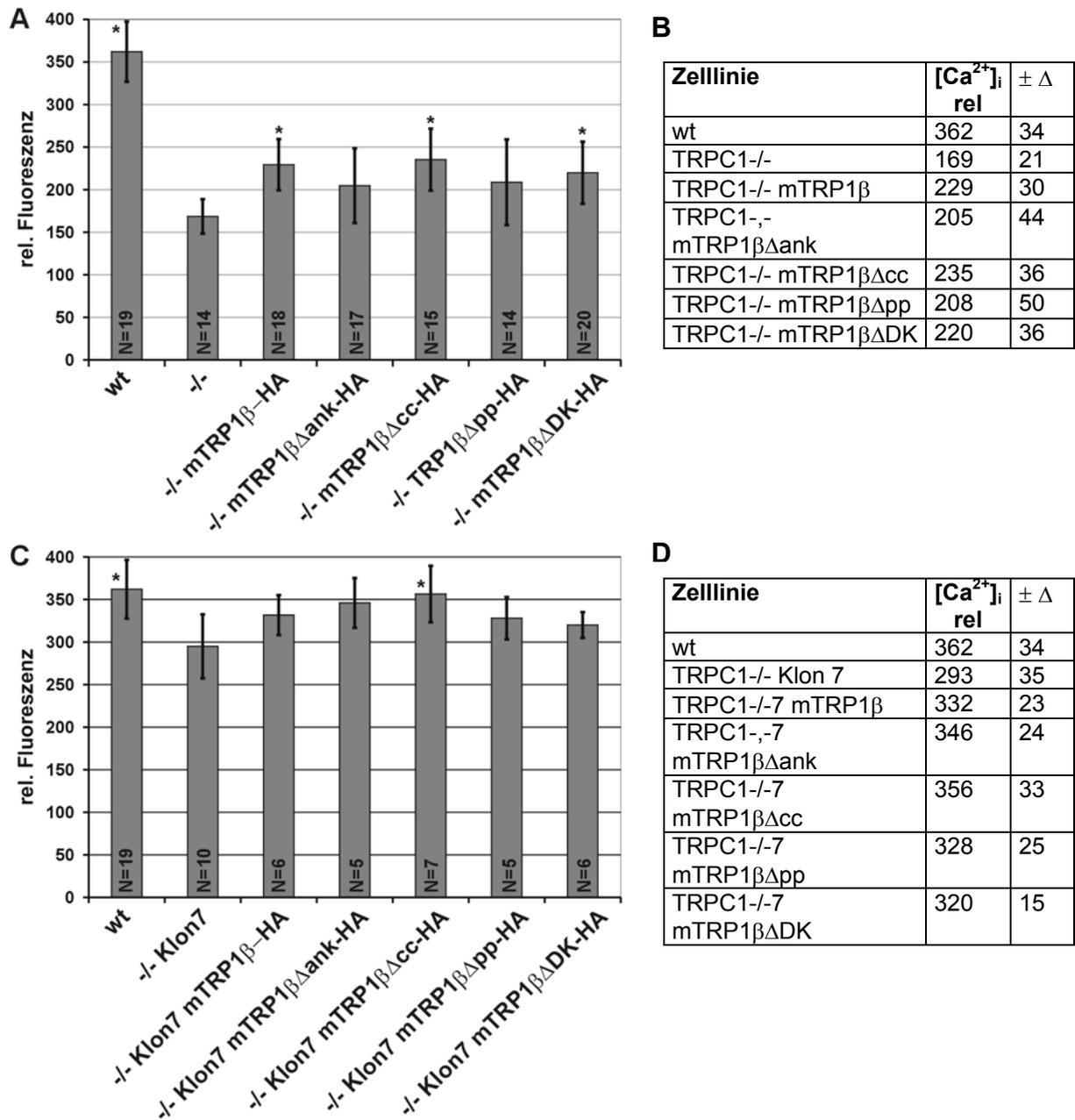


Abb. 6.18 Ca²⁺-Flux Messungen nach ER-Depletion an mTRP1 β und Deletionsmutanten exprimierenden TRPC1-defizienten DT40-Zellen

In mTRP1 β -HA oder Deletionsmutanten exprimierenden DT40 TRPC1^{-/-} Zellen des Ursprungsklons (**A, B**) und des Subklons 7 (**C, D**) wurde eine Ca²⁺-Antwort durch Zugabe von 1,5 μ M Thapsigargin in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ induziert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Maximalwerte der cytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen nach Einstrom über die Plasmamembran von n Messungen wurden statistisch ausgewertet und graphisch (**A, C**) sowie tabellarisch (**B, D**) dargestellt. Die angegebenen Fehler sind Standardabweichungen. *signifikant verschieden zu DT40 TRPC1^{-/-} oder DT40 TRPC1^{-/-} Subklon 7 (t-Test p<0,01)

6.5.2.2 Ca²⁺-Einstrommessungen nach BCR-Quervernetzung bei mTRP1 β und Deletionsmutanten exprimierenden DT40 TRPC1^{-/-}-Zellen

Für die Untersuchung des Einflusses von mTRP1 β oder Deletionsmutanten auf den Ca²⁺-Einstrom nach BCR-Quervernetzung in TRPC1 defizienten DT40-Zellen wurde vom Subklon 7 ausgegangen, da die Ursprungszelllinie, wie in 6.5.1 beschrieben, eine inhomogene oder gar keine Stimulierbarkeit über den BCR zeigt. Zunächst wurde untersucht, ob die etablierten Transfektanten einen vergleichbaren Expressionslevel an Oberflächen IgM zeigen. In Abb. 6.19 sind FACS Analysen von DT40-Zellen dargestellt, die mit FITC-konjugierten Ziege-anti-Huhn IgM markiert wurden. Alle untersuchten Transfektanten zeigen ein vergleichbares Signal und exprimieren zu etwa 100% IgM an der Zelloberfläche.

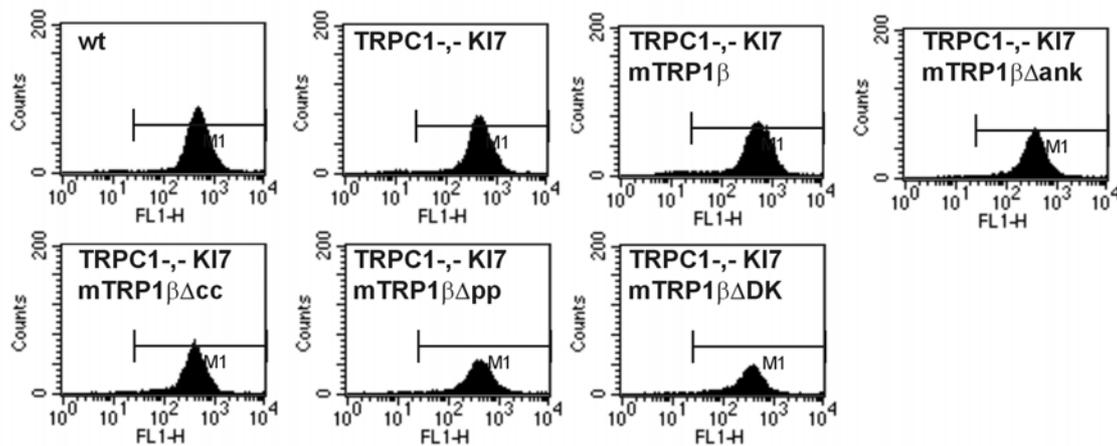


Abb. 6.19 IgM-Expression auf transfizierten DT40 TRPC1^{-/-}-Zellen des Subklons 7

Nach Markierung mit FITC-konjugiertem Ziege-anti-Huhn IgM wurden wt DT40- und TRPC1-defiziente DT40-Zellen des Subklons 7 sowie mit mTRP1 β oder Deletionsmutanten transfizierte Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

Der Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellulärraum nach BCR-Quervernetzung wurde bei mTRP1 β und Deletionsmutanten exprimierenden DT40 TRPC1^{-/-}-Zellen analysiert. Dazu wurden DT40-Zellen in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ mit 10 μ g/ml Maus-anti-Huhn IgM stimuliert und die maximalen cytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen nach Ca²⁺-Zugabe statistisch ausgewertet (Abb. 6.20). Nur für TRPC1-defiziente DT40-Zellen des Subklons 7, die mTRP1 β Δ ank-HA exprimieren mit 183 \pm 27 Einheiten und mTRP1 β Δ DK-HA exprimierende Zellen mit 165 \pm 10

Einheiten, zeigt sich ein signifikant höheres Maximum im Vergleich zu wt DT40-Zellen (118 ± 37 Einheiten) und dem DT40 TRPC1^{-/-}-Subklon 7 (100 ± 36 Einheiten). Im Vergleich zu den Ca²⁺-Einstrom-Daten nach Speicherdepletion durch Thapsigargin, hat mTRP1 $\beta\Delta$ cc keinen Einfluss auf den rezeptoraktivierten Ca²⁺-Einstrom in TRPC1-defizienten DT40-Zellen. Dagegen führt die Expression von mTRP1 $\beta\Delta$ ank und mTRP1 $\beta\Delta$ DK zu einer Erhöhung des Ca²⁺-Einstroms über die Plasmamembran nach BCR-Quervernetzung. Damit wird gezeigt, dass die Speicherdepletion durch Thapsigargin im Hinblick auf die Funktion von TRP-Proteinen nicht mit der Speicherdepletion nach Rezeptoraktivierung gleichzusetzen ist. Die Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen am cytosolischen N-Terminus von mTRP1 β haben offensichtlich eine Bedeutung für die Organisation von mTRP1 β im Signalkomplex von DT40-Zellen. Die 35AS von EWKFAR bis zur Dystrophin-ähnlichen Domäne könnten eine negativ regulierende Funktion vermitteln.

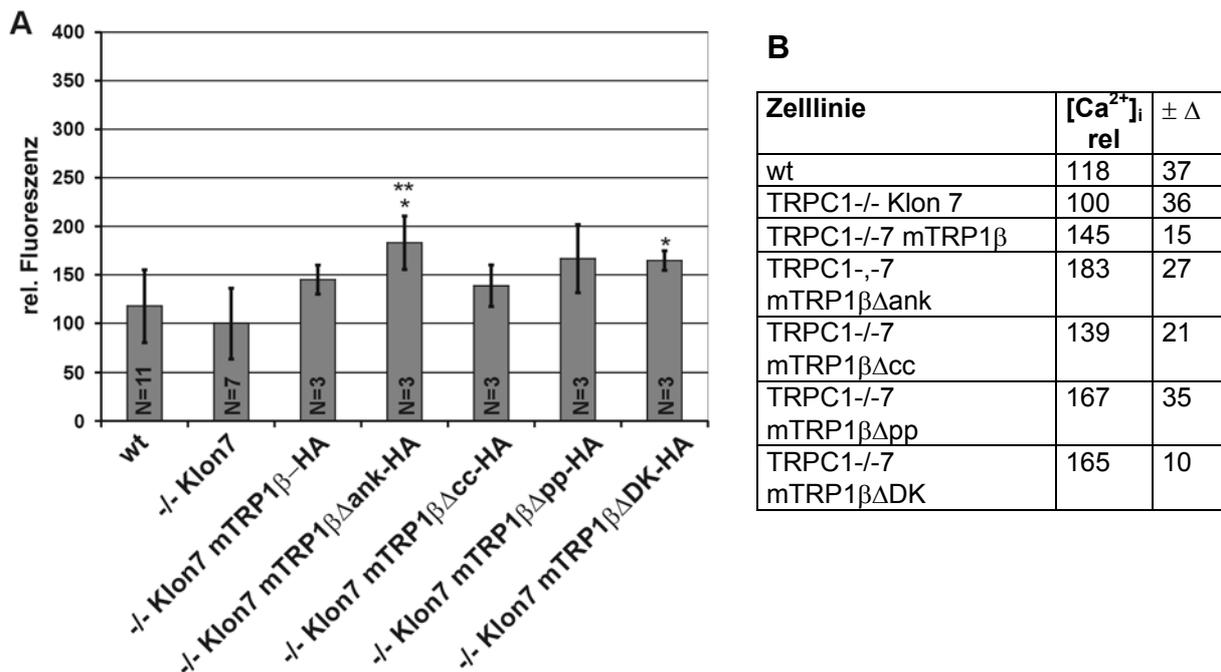


Abb. 6.20 Ca²⁺-Flux Messungen nach Stimulation von mTRP1 β und Deletionsmutanten exprimierenden DT40 TRPC1^{-/-}-Zellen über den BCR

Fluo3-beladene Zellen wurden mit 10 μ g/ml Maus-anti-Huhn IgM (M4) in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ stimuliert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Maximalwerte nach Zugabe von Ca²⁺ von n Messungen wurden statistisch ausgewertet und graphisch (**A**) sowie tabellarisch (**B**) dargestellt. Die angegebenen Fehler sind Standardabweichungen. *signifikant verschieden zu DT40 TRPC1^{-/-} Klon 7 (t-Test $p < 0,01$), ** signifikant Verschieden zu wt DT40 (t-Test $p < 0,01$)

6.6 Ca²⁺-Flux Studien an den B-Zelllinien EREB2.5 und P493.6

Viele Hypothesen über Funktion und Regulation von TRP-Proteinen gehen davon aus, dass entweder das Zusammenspiel unterschiedlicher TRP-Kanäle, die Bildung von TRP-Heteromeren oder auch die Interaktion von TRP-Proteinen mit bislang unbekannt Proteinen wichtig für die Ca²⁺-Einstromeigenschaften einer Zelle sind (zur Übersicht Zitt et al., 2002). Zudem ist derzeit noch absolut unverstanden, in welcher Weise wie viele Kanäle in die Aufgaben des Ca²⁺-Einstroms einer Zelle involviert sind.

Ein großes Problem von Calciumfluxuntersuchungen an Zellen, die TRP-Proteine unter der Kontrolle von konstitutiven viralen Promotoren exprimieren ist die Tatsache, dass die Expressionsstärke in diesen Fällen nicht steuerbar ist. Dies könnte zur Folge haben, dass transfizierte TRP-Konstrukte, die unabhängig vom Zellcyclus und endogenen TRP-Proteinen transkribiert werden, die Eigenschaften in Bezug auf den Ca²⁺-Einstrom unkontrollierbar verändern. Dadurch wird der Einfluss eines TRP-Proteins nicht im Kontext der insgesamt vorhandenen Kanalproteine und möglicher Interaktionspartner untersucht. Die Informationen, die sich aus solchen Daten für die Situation *in vivo* ergeben, sind somit kritisch zu beurteilen.

Mit den humanen B-Zelllinien EREB2.5 und P493.6 stehen Modelle zur Verfügung, in denen über die Östrogen-regulierbare Expression des EBV Transkriptionsfaktors EBNA2 (EREB2.5) oder die Tetracyclin regulierbare Expression von c-myc (P493.6) der Proliferationsstatus gesteuert werden kann (Kempkes et al., 1995; Pajic et al., 2000). In EREB2.5-Zellen wird EBNA2 als Fusionsprotein mit dem Östrogenrezeptor exprimiert. Erst bei Zugabe von 1mM Östrogen wird das Fusionsprotein in den Kern transportiert, EBNA2 ist aktiv und die Zellen proliferieren. P493.6 wurden aus EREB2.5-Zellen durch Transfektion mit c-myc unter der Kontrolle des tTA etabliert. Bei Zugabe von 0,1µg/ml Tetracyclin wird c-myc herunterreguliert und die Zellen proliferieren nicht weiter. Unterliegen TRP-Proteine einer Regulation durch EBNA2 oder c-myc, so lassen sich TRP-Expressionsmuster und Ca²⁺-Flux Eigenschaften der Zellen miteinander korrelieren.

6.6.1 Expression von TRP-Proteinen in Abhängigkeit von EBNA2 oder c-myc in EREB2.5- und P493.6-Zellen

Derzeit sind aus der Subfamilie der „kurzen“ TRP-Proteine (TRPC) sieben Mitglieder charakterisiert, wobei TRPC2 und TRPC7 nur in Mäusen detektiert wurde (Zitt et al., 2002; Montell et al., 2002). Die Subfamilie der Vanilloidrezeptor ähnlichen TRP-Proteine (TRPV) umfasst fünf Proteine, während aus der Subfamilie der „langen“ TRP-Kanäle acht Proteine bekannt sind. Aufgrund der bekannten Gewebeverteilung von TRPV1, TRPM1 und TRPM8 (zur Übersicht Montell et al., 2002), sowie deren Aktivierungsmechanismen (Hitze bei TRPV1, Menthol und Kälte bei TRPM8), wurde die Expression dieser Proteine in EREB2.5 und P493.6-Zellen (proliferierend und nicht proliferierend) nicht untersucht.

Die Expression aller anderen derzeit bekannten TRP-Proteine wurde mit Hilfe von RT-PCR analysiert. Als Positivkontrolle wurde RNA aus HEK293-Zellen verwendet, in denen bis auf TRPM2, TRPM3 und TRPM4 alle TRP-Proteine exprimiert werden, wobei TRPV5 zu einem sehr schwachen Signal führt (Daten nicht gezeigt). Wie in Tabelle 6.1 gezeigt, werden in EREB2.5- und P493.6-Zellen TRPC1, TRPV2 und TRPM2 exprimiert. TRPC5 und TRPM7 zeigen nach 30 Zyklen ein im Vergleich zur Positivkontrolle extrem schwaches, schwer reproduzierbares Signal und wurden für die weitere Analyse nicht berücksichtigt.

Transkript	EREB2.5		P493.6		HEK 293
	+est	./est	./tet	+tet	
TRPC1	+	+	+	+	+
TRPC3	-	-	-	-	+
TRPC4	-	-	-	-	+
TRPC5	(-)	(-)	(-)	(-)	+
TRPC6	-	-	-	-	+
TRPV2	+	+	+	+	+
TRPV4	-	-	-	-	+
TRPV5	-	-	-	-	+
TRPV6	-	-	-	-	+
TRPM2	+	+	+	+	-
TRPM3	-	-	-	-	-
TRPM4	-	-	-	-	(-)
TRPM5	-	-	-	-	+
TRPM6	-	-	-	-	+
TRPM7	(-)	(-)	(-)	(-)	+

Tab. 6.1 Expression von TRP-Proteinen in EREB2.5- und P493.6-Zellen

Die Expressionen verschiedener TRP-Proteine in EREB2.5-Zellen mit und ohne Östrogen (+est, ./est) und P493.6 mit und ohne Tetracyclin (+tet, ./tet) wurde mit RT-PCR untersucht. Als Kontrolle wurde RNA aus HEK293 eingesetzt. Die PCR wurde mit 30 Zyklen durchgeführt. + positiv, - negativ, (-) nicht eindeutig

Weiterhin wurde untersucht, ob und in welcher Form die exprimierten Proteine über EBNA2 (bei EREB2.5) oder c-myc (bei P493.6) reguliert werden. Dazu wurde eine „Real-Time-PCR“ mit Hilfe eines „Light Cycler“-Systems durchgeführt. Als Normierungsfaktor wurde die Aktinexpression in den entsprechenden Zellen berücksichtigt. Detektiert wurde die Intensität der „SYBR Green“ Fluoreszenz, und zur Auswertung wurden die Schnittpunkte der Signalkurve im logarithmischen Bereich mit einer Parallelen zur x-Achse herangezogen („crossing point“). Diese Parallele ist so gewählt, dass sich hier alle analysierten Kurven in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. In Abb. 6.21 A sind die „crossing points“ der TRPC1 PCRs normiert auf das Aktinsignal dargestellt. Unter Berücksichtigung des Fehlers sind die Expressionslevel von TRPC1 bei P493.6-Zellen durch c-myc auf einem Niveau von etwa 18,5 Zyklen nicht beeinflusst. Dagegen wird die TRPC1 Expression bei Aktivierung von EBNA2 in EREB2.5-Zellen herunterreguliert. Die auf Aktin normierten „crossing-points“ differieren um 1 Einheit (Abb. 6.21 A). Daraus resultiert bei Annahme eines vollständigen PCR-Umsatzes eine Regulation um den Faktor $0,5 \pm 0,03$ (Abb. 6.21 D). Die Expression von TRPV2 ist auf einem Niveau von ca. 14,5 Zyklen von EBNA2 und c-myc unbeeinflusst (Abb. 6.21 B). Die Expression von TRPM2 wird dagegen bei Aktivierung von EBNA2 oder c-myc hochreguliert (Abb. 6.21 C). Die Expression von TRPM2 steigt in EREB2.5-Zellen um den Faktor $2,2 \pm 0,4$ und in P493.6-Zellen um den Faktor $3 \pm 0,5$ (Abb. 6.21 D). Für beide Zellsysteme wurde die Regulation von c-myc überprüft. Proliferierende EREB2.5 zeigen eine um den Faktor $6,6 \pm 2,5$ höhere c-myc Expression im Vergleich zu EREB2.5, die 60h ohne Östrogen kultiviert wurden. In P493.6 Zellen übersteigt die Expression von c-myc bei Zellen, die ohne Tetracyclin kultiviert wurden den Wert nach Zugabe von Tetracyclin um den Faktor $33,4 \pm 10,6$. Alle Daten wurden qualitativ über densitometrische Auswertung von Agarosegelen verifiziert.

Damit wurden erstmalig TRP-Proteine als Targets von c-myc oder EBNA2 identifiziert.

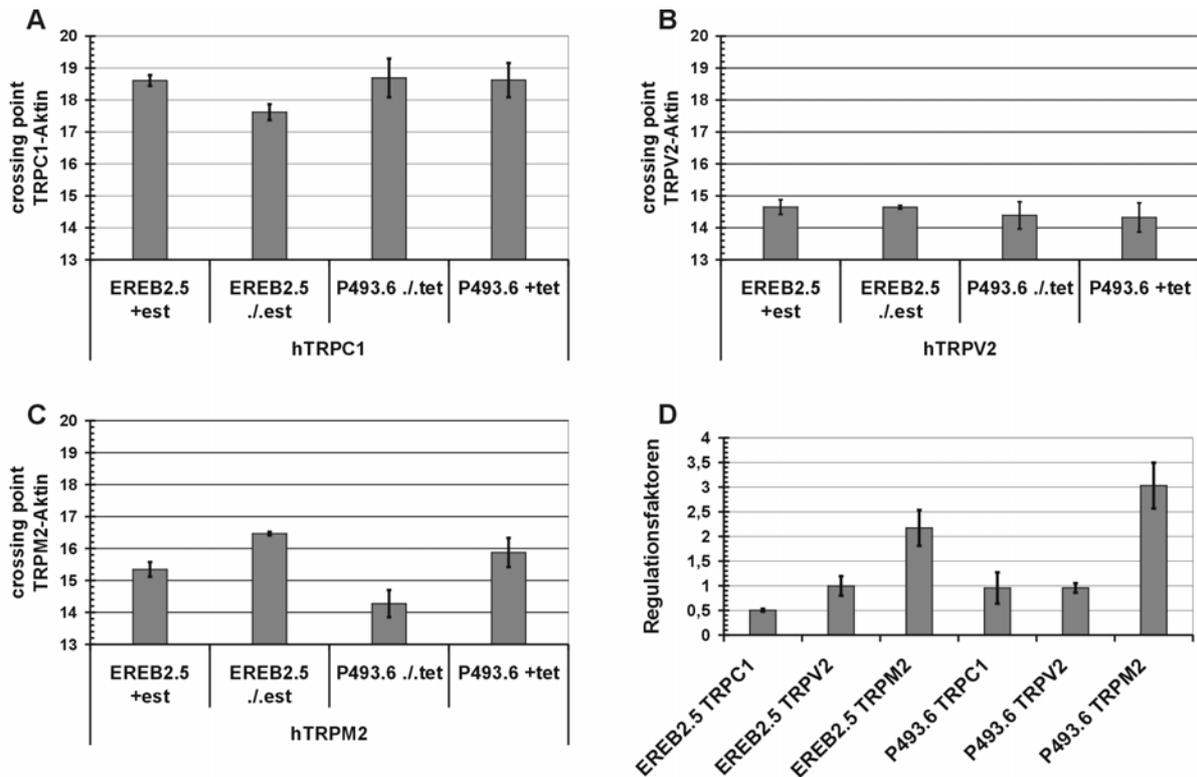


Abb. 6.21 Regulation der Expression von TRP-Proteinen in EREB2.5- und P493.6-Zellen

Gesamt-RNA wurde aus EREB2.5- und P493.6-Zellen, die jeweils mit und ohne Östrogen oder Tetracyclin kultiviert wurden, isoliert und in einer „Real-Time-PCR“ mit RT eingesetzt. Als Normierungsfaktor wurde die Expression von Aktin berücksichtigt. Die Detektion der Amplifikate erfolgte über die Intensität der „SYBR Green“ Fluoreszenz. Zur Auswertung wurde der Schnittpunkt der Zeit-Fluoreszenzintensität-Kurve mit einer Abszissenparallelen in der logarithmischen Phase herangezogen. Gezeigt werden die Daten aus zwei vollständig unabhängigen Ansätzen. Dargestellt sind die auf das Aktinsignal normierten „crossing points“ für hTRPC1 (**A**), hTRPV2 (**B**) und hTRPM2 (**C**). Aus den unterschiedlichen „crossing points“ ergeben sich die in **D** dargestellten Multiplikationsfaktoren für die Expressionsveränderung (als PCR-Effizienz wurde der Faktor 2 verwendet). Die angegebenen Fehler sind die gemittelten Abweichungen vom Mittelwert.

6.6.2 Einfluss von EBNA2 oder c-myc auf die IgM-Expression

Um die Vergleichbarkeit der Ca^{2+} -Antworten zwischen aktivierten und nicht aktivierten Zellen zu gewährleisten, müssen auch die Level an IgM an der Oberfläche der Zellen gleich sein. Dazu wurden die Zellen mit FITC-markiertem Ziege anti Mensch IgM inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert. Aus Abb. 6.22 A, B wird deutlich, dass bei EBNA2-Aktivierung die Expression von Oberflächen IgM nahezu vollständig herunterreguliert wird (11% im Vergleich zu 80% bei EREB2.5 ohne Östrogen). Der Anteil viabler Zellen geht bei Östrogenentzug nach 60h auf 18% zurück (80% bei aktiviertem EBNA2). Bei P493.6-Zellen ist die

Oberflächenexpression von IgM unabhängig von c-myc (Abb. 6.22 C, D; 93% positive Zellen). Bei Tetracyclin Zugabe geht der Anteil lebender Zellen nach 60h auf 49% zurück (90% bei proliferierenden Zellen).

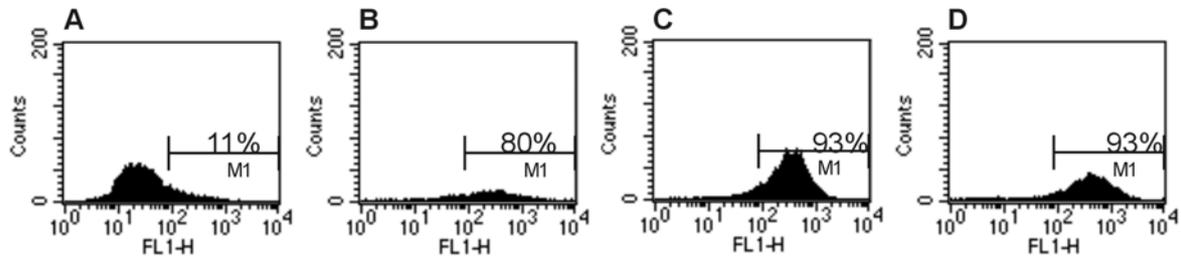


Abb. 6.22 IgM Oberflächenexpression auf EREB2.5- und P493.6-Zellen

EREB2.5 mit Östrogen (A) und 60h ohne Östrogen kultiviert (B) sowie P493.6-Zellen Ohne (C) und 60h mit (D) Tetracyclin kultiviert wurden mit FITC-markierten anti IgM Antikörpern (1:100) gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht (Prozentangaben entsprechen dem Anteil der positiven Zellen an allen lebenden Zellen).

6.6.3 Ca²⁺-Messungen an EREB2.5 und P493.6-Zellen

Der Einfluss der unterschiedlichen TRP-Expressionsmuster auf die Ca²⁺-Flux Eigenschaften von EREB2.5 und P493.6 wurde untersucht. Der Ca²⁺-Einstrom wurde über BCR-Quervernetzung durch Ziege anti Mensch IgM (20µg/ml F(ab)₂), durch Thapsigargin (1,5µM) oder das DAG Analogon OAG (100µM) angeregt. Aufgrund der Herunterregulation von IgM wurde bei EREB2.5 nur Thapsigargin und OAG zur Stimulation verwendet.

6.6.3.1 Die Expression von c-myc verändert die Ca²⁺-Flux Eigenschaften von P493.6-Zellen

In Abb. 6.23 A ist eine repräsentative Messung von P493.6-Zellen (mit 60h Tetracyclin, permanent ohne Tetracyclin und 48h ohne Tetracyclin) mit BCR-Stimulation dargestellt. Bei 24h Kultivierung ohne Tetracyclin entsprechen die Signale denen nicht proliferierender Zellen und werden daher nicht dargestellt. Während die Primärsignale in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ sehr ähnlich verlaufen (407±27 Einheiten bei -Tetracyclin und 371 ±6 Einheiten bei + Tetracyclin (Abb. 6.23 A, 6.24 A)), sind die Sekundärsignale von P493.6-Zellen mit angeschaltetem c-myc und nicht proliferierenden Zellen stark unterschiedlich. Bei den Zellen, die 60h mit Tetracyclin kultiviert wurden, zeigt sich innerhalb von 20s ein

Anstieg auf 467 ± 34 Einheiten (Abb. 6.24 A, B). Das Niveau sinkt in etwa 60s auf ein langsam abfallendes Plateau bei etwa 280 Einheiten (Abb. 6.23 A). Bei P493.6-Zellen, die permanent ohne Tetracyclin kultiviert wurden, wird das Maximum des Sekundäreinstroms nach etwa 80s bei 203 ± 34 Einheiten erreicht (Abb. 6.23 A; 6.24 A, B). Das Absinken dieser maximalen cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erfolgt gleichmäßig mit einer Rate von etwa 50 Einheiten pro Minute. Die Zellen, die für 48h tetracyclinfrei kultiviert wurden, erreichen das Maximum ähnlich schnell wie permanent tetracyclinfrei kultivierte Zellen (Abb. 6.23 A). Dieses Maximum liegt allerdings um etwa 150 Einheiten niedriger und auch das ausgebildete langsam abfallende Plateau liegt mit 180 Einheiten auf einem kleineren Niveau (Abb. 6.23 A; 6.24 A,B).

Der Sekundäreinstrom bei den unterschiedlich kultivierten P493.6-Zellen nach ER-Depletion durch Thapsigargin zeigt in der Tendenz einen sehr ähnlichen Verlauf (Abb. 6.23 B). Erneut ist das maximale Signal bei den nicht proliferierenden Zellen mit 483 ± 46 Einheiten deutlich höher als bei proliferierenden Zellen mit 247 ± 26 Einheiten (Abb. 6.24 B, C). Nach etwa 200s erreicht die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration bei allen Zellen das gleiche Niveau (Abb. 6.23 B). Der Signalverlauf der Zellen, die 48h ohne Tetracyclin kultiviert wurden, gleicht im Bereich des Sekundäreinstroms dem der permanent proliferierenden P493.6-Zellen (Abb. 6.23 B). Das Primärsignal nach Thapsigarginstimulation in Ca^{2+} -freiem Puffer korreliert integriert mit dem Beladungszustand des ER in Bezug auf freie Ca^{2+} -Ionen. In c-myc exprimierenden P493.6-Zellen liegt das Maximum dieses Primäreinstroms mit 185 ± 19 Einheiten signifikant höher, als bei nicht proliferierenden Zellen mit 147 ± 5 Einheiten (Abb. 6.24 B).

Im Gegensatz zu der Tendenz, dass nicht proliferierende P493.6-Zellen eine höhere cytosolische Ca^{2+} -Konzentration nach Sekundäreinstrom erreichen, ist der Einfluss der c-myc Expression auf den Ca^{2+} -Einstrom nach OAG-Stimulation reziprok. Proliferierende Zellen erreichen mit 420 Einheiten ein wesentlich höheres Maximum als nicht proliferierende Zellen mit 200 Einheiten (Abb. 6.23 D). 80s nach dem Maximum sinkt die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration auf das Niveau der nicht proliferierenden Zellen (Abb. 6.23 D).

Aus diesen Daten wird deutlich das durch die Erhöhung der TRPM2-Expression Ionenkanäle mit völlig anderen Eigenschaften gebildet werden. P493.6 ist die erste Zelllinie, die nach Erhöhung der Expression eines TRP-Proteins einen verringerten

Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran zeigt. Zudem sind weder TRPC1 noch TRPV2 oder TRPM2 bislang als DAG-sensitiv beschrieben worden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es nicht möglich ist, einzelne TRP-Proteine isoliert von anderen Kanalproteinen und möglicherweise regulierenden Proteinen zu untersuchen. P493.6-Zellen sind ein geeignetes Modellsystem, um die Funktion und Organisation von TRP-Proteinen zu studieren.

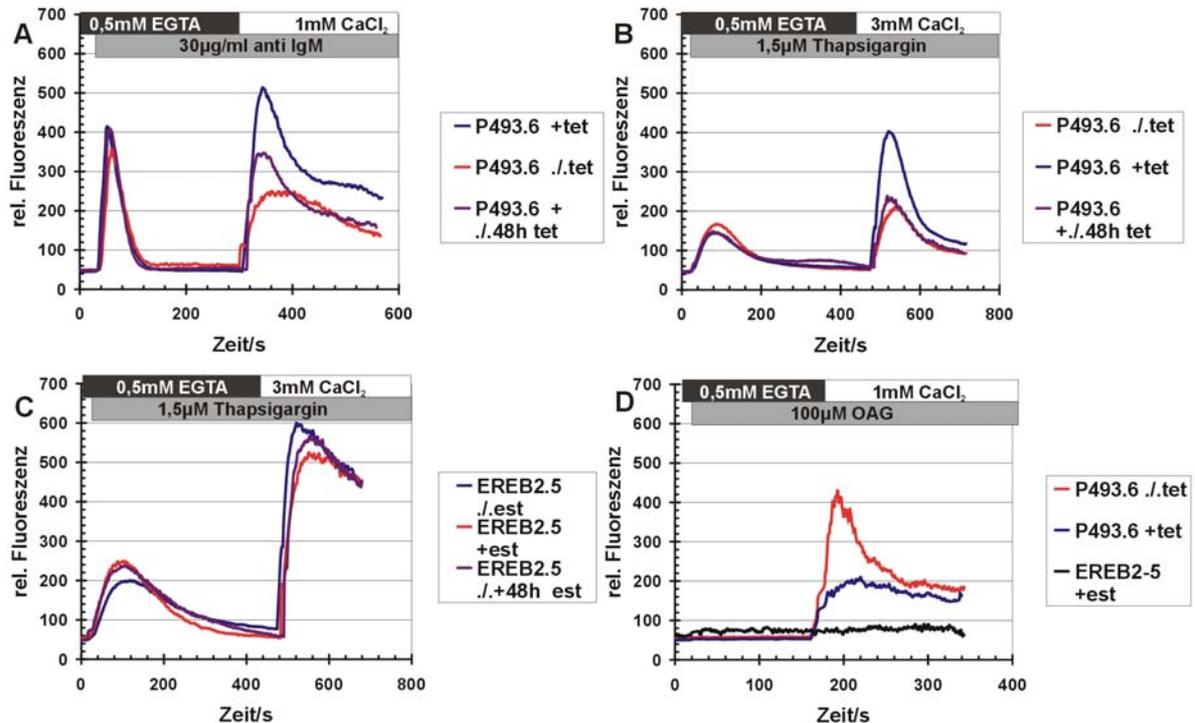


Abb. 6.23 Messungen des Ca^{2+} -Einstroms in EREB2.5- und P493.6-Zellen

EREB2.5 Zellen mit (permanent und 48h) bzw. 60h ohne Östrogen kultiviert (C, D) und P493.6 Zellen mit (permanent und 48h) bzw. 60h ohne Tetracyclin kultiviert, wurden mit Fluo3 beladen und am Durchflusszytometer untersucht. Die Stimulation der Zellen erfolgte in Ca^{2+} -freiem Puffer mit 20µg/ml Ziege anti human IgM (A), mit 1,5µM Thapsigargin (B, C) oder 100µM OAG (D). Nach Erreichen des Basalwertes wurde die Ca^{2+} -Konzentration des Puffers auf 1mM (A, D) oder 3mM (B, C) eingestellt. Dargestellt sind repräsentative Messungen, die mindestens zwei Mal reproduziert wurden.

6.6.3.2 Die EBNA2-Aktivierung hat keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Flux Eigenschaften von EREB2.5-Zellen nach ER-Depletion

Die Aktivierung von EBNA2 in EREB2.5-Zellen durch Östrogenzugabe beeinflusst den Sekundäreinstrom von Ca^{2+} nach ER-Depletion nicht signifikant (Abb. 6.23 C). Die erreichten Maxima liegen mit 565 ± 49 Einheiten bei nicht proliferierenden Zellen

und 544 ± 37 Einheiten bei proliferierenden Zellen im Fehlerbereich (Abb. 6.24 B, D). Die Zugabe von OAG löst bei EREB2.5-Zellen unabhängig von der EBNA2-Expression keinen Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum aus (Abb. 6.23 D). Obgleich sich die TRP-Expressionsmuster in EREB2.5- und P493.6-Zellen nur geringfügig unterscheiden, zeigen diese Zelllinien völlig unterschiedliche Ca^{2+} -Einstromeigenschaften. Dies könnte bedeuten, dass für die Steuerung von TRP-Kanälen noch weitere, bislang unbekannte Komponenten erforderlich sind, die in EREB2.5-Zellen nicht exprimiert werden. Allerdings ist beim Vergleich beider Zelllinien zu berücksichtigen, dass aufgrund eines unterschiedlichen Status des Proteasoms in EREB2.5- und P493.6-Zellen die Expressionsdaten möglicherweise nicht mit den TRP-Proteinmengen korrelieren (Polack et al., 1996; Pajic et al., 2001; Gavioli et al., 2001).

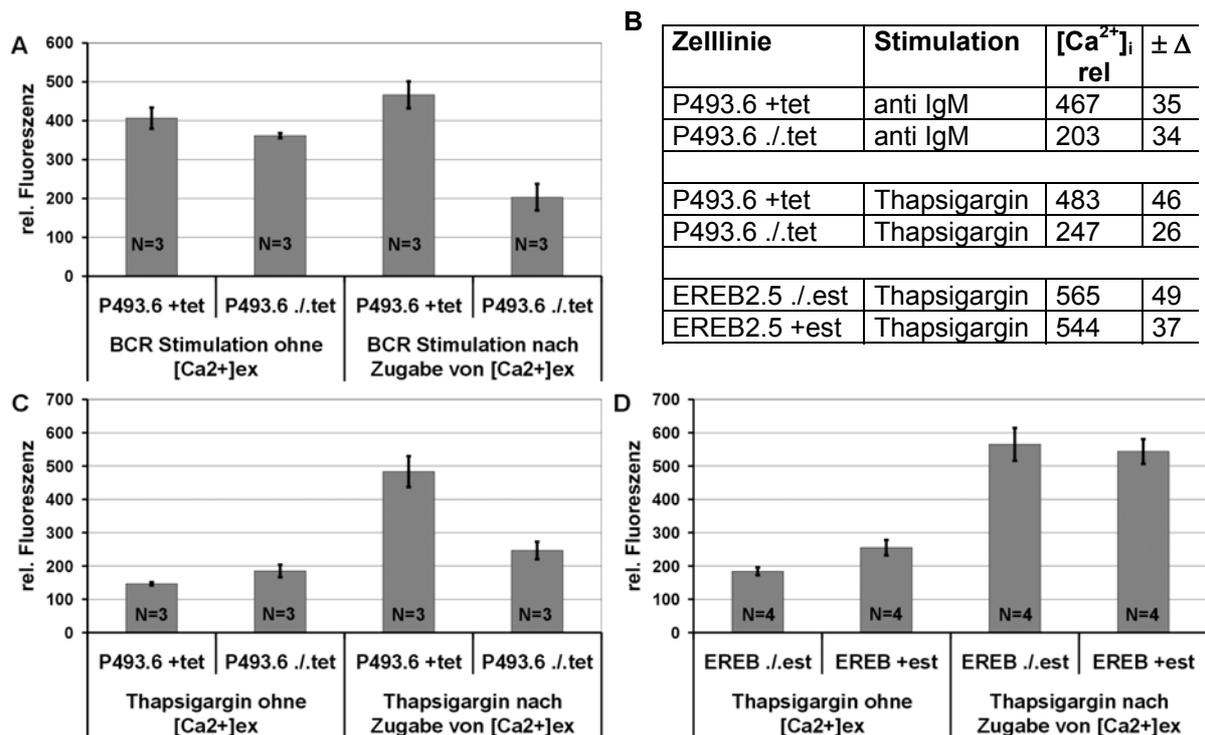


Abb. 6.24 Veränderung des Ca^{2+} -Einstroms in EREB2.5- und P493.6-Zellen durch EBNA2 oder c-myc

EREB2.5 Zellen mit bzw. 60h ohne Östrogen kultiviert (**D**) sowie P493.6 Zellen mit bzw. 60h ohne Tetracyclin kultiviert (**A**, **C**), wurden in Ca^{2+} -freiem Puffer mit $20\mu\text{g/ml}$ Zige anti human IgM (**A**) oder mit $1,5\mu\text{M}$ Thapsigargin (**C**, **D**) stimuliert. Die maximale cytosolische Ca^{2+} -Konzentration des Primär- und Sekundärsignals wurden statistisch ausgewertet. Die absoluten Werte der Sekundärsignale sind tabellarisch in **B** aufgeführt. Die angegebenen Fehler sind Standardabweichungen.

6.6.3.3 Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms in P493.6-Zellen durch Gd^{3+} -Ionen

Zur weiteren Charakterisierung des Ca^{2+} -Einstroms in P493.6-Zellen wurden Inhibitionsstudien mit GdCl_3 durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in Ca^{2+} -freiem Puffer mit Ziege anti Mensch IgM stimuliert und nach Absinken des Ca^{2+} -Spiegels auf den Basalwert mit 1mM CaCl_2 und optional zusätzlich mit 100nM oder 1 μM GdCl_3 versetzt. Aus Abb. 6.25 A, B wird der inhibitorische Effekt von Gd^{3+} auf den Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum deutlich. Das Sekundärsignal bei P493.6-Zellen, die 60h mit Tetracyclin kultiviert wurden, sinkt von max. 500 relativen Einheiten (ohne Gd^{3+}) auf max. 200 relative Einheiten bei Zugabe von 100nM oder 1 μM GdCl_3 . Bei P493.6-Zellen, die c-myc exprimieren, sinkt das Sekundärsignal von 240 Einheiten auf 120 Einheiten durch die Zugabe von Gd^{3+} . Auch hier ist der maximale Effekt bei einer GdCl_3 -Konzentration von 100nM erreicht.

Eine derart hohe Sensitivität für dreiwertige Kationen wurde bislang nur für den Ca^{2+} -Ionen-selektiven Strom I_{CRAC} beschrieben (vergl. 1.2.2). Offenbar sind mindestens zwei unterschiedliche Ionenkanäle am Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran beteiligt, wobei ein Teil des Einstroms durch Gd^{3+} -Ionen hemmbar und ein anderer Teil des Ca^{2+} -Einstroms Gd^{3+} -insensitiv ist. Der Gd^{3+} -sensitive Anteil des Ca^{2+} -Einstroms ist bei ruhenden P493.6-Zellen wesentlich ausgeprägter, was bedeuten könnte, dass eine Beteiligung von TRPM2 an solchen Kanälen zur Herabsetzung der Ionenselektivität führt.

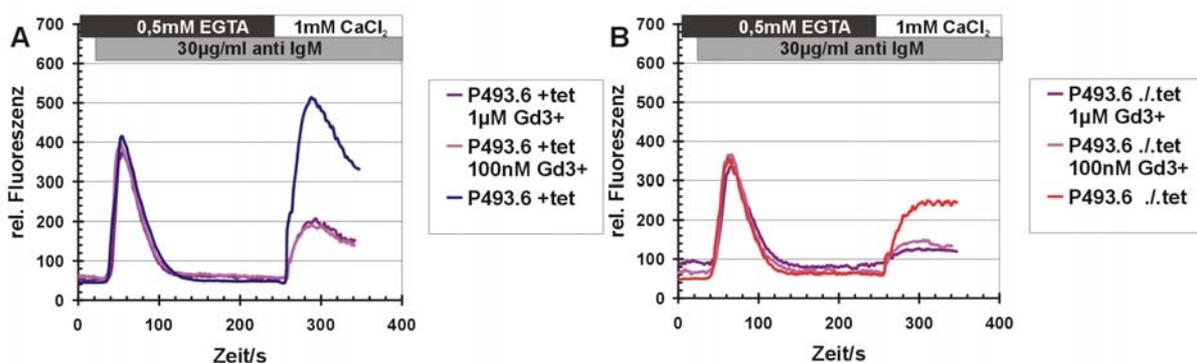


Abb. 6.25 Inhibierung des Ca^{2+} -Einstroms in P493.6-Zellen durch Gd^{3+} -Ionen

Fluo3-beladene P493.6 Zellen mit (A) bzw. 60h ohne Tetracyclin (B) kultiviert, wurden in Ca^{2+} -freiem Puffer mit 20µg/ml Zige anti human IgM stimuliert. Nach Erreichen des Basalwertes wurde der Puffer mit 1mM CaCl_2 , 1mM CaCl_2 und 100nM GdCl_3 oder 1mM CaCl_2 und 1 μM GdCl_3 versetzt.

7 Diskussion

Die Aktivierung von Lymphocyten ist ein zentrales Ereignis bei der adaptiven Immunantwort. Eine wichtige Komponente dieser Aktivierung ist die Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Eine Ressource für Ca^{2+} sind intrazelluläre Speicher, wie das endoplasmatische Retikulum. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER in das Cytosol erfolgt durch IP_3 -Rezeptoren, die durch ihren Liganden IP_3 aktiviert werden. Durch Stimulation über ihre Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptoren in Verbindung mit co-stimulierenden Signalen (z. B. CD28 bei T-Zellen und CD19 bei B-Zellen) wird ein Signalkomplex organisiert, der zur Aktivierung von PLC- γ führt. PLC- γ katalysiert die Bildung von IP_3 aus PIP_2 und führt so zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (zur Übersicht Campbell, 1999, Qian und Weiss; 1997, Frauwirth und Thompson, 2002).

Zur vollständigen Aktivierung von B- und T-Zellen ist eine lang anhaltend erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Konzentration notwendig (Choquet et al., 1993; Budde et al., 1994; Iezzi et al., 1998). Über die Form des Ca^{2+} -Einstroms werden Transkriptionsfaktoren differentiell aktiviert. So werden in B-Zellen NF- κ B und JNK durch einen großen transienten Ca^{2+} -Einstrom ins Cytosol aktiviert und NFAT durch ein niedriges aber lang anhaltendes Plateau (Dolmetsch et al. 1997). Zudem ist die Differenzierung dieses Signals in Raum und Zeit ein wichtiger Parameter. Untersuchungen in T-Lymphocyten ergaben, dass NFAT effektiv durch repetitive Ca^{2+} -Spitzen aktiviert wird, wohingegen bei Oszillationen mit niedriger Frequenz nur NF- κ B aktiviert wird (Dolmetsch et al. 1998).

Da durch PMCAs in der Plasmamembran ständig Ca^{2+} aus der Zelle transportiert wird, ist zur Aufrechterhaltung dieses anhaltenden Ca^{2+} -Signals ein Einstrom aus dem Extrazellularraum über die Plasmamembran erforderlich. Die molekulare Struktur sowie Aktivierungs- und Regulationsmechanismen von Kanälen, die einen solchen Einstrom ermöglichen sind derzeit ungeklärt. Als mögliche Aktivierungsmechanismen werden die Rezeptor- und Speichersteuerung diskutiert (zur Übersicht Parekh und Penner, 1997; Zitt et al., 2002). Potentielle Kandidaten für Ca^{2+} -Kanalbildende Proteine stammen aus der TRP-Proteinfamilie (Clapham et al., 2001; Zitt et al., 2002; Vennekens et al., 2002).

Erste signifikante Hinweise auf die Beteiligung von TRP-Proteinen am Ca^{2+} -Einstrom in B-Zellen wurden durch Arbeiten an der Hühner-B-Zelllinie DT40 erhalten, in der das Gen für TRPC1 durch homologe Rekombination unterbrochen wurde (Mori et al., 2002). In dieser Studie wurde gezeigt, dass der Ca^{2+} -Einstrom nach Speicherdepletion in TRPC1-defizienten Zellen deutlich geringer ist als in wt-Zellen. Zudem ist das Ca^{2+} -Signal nach BCR-Quervernetzung in TRPC1-defizienten DT40-Zellen abgeschwächt. TRPC1 wird z.B. in den B-Zelllinien IIA1.6, Raji und Ramos exprimiert (unveröffentlichte Daten dieser Arbeitsgruppe). In heterologen Zellsystemen und in „antisense“-Experimenten wurden unterschiedliche, teilweise widersprüchliche Charakteristika für TRPC1 gefunden. Während in SF9-Zellen die Expression zu einem konstitutiv geöffneten Ionenkanal führte (Sinkins et al. 1998) und in *Xenopus Oocyten* TRPC1 nicht speicherreguliert ist, wurde in CHO-Zellen (Zitt et al., 1996), HSG-Zellen (Liu et al., 2000) und A549 sowie Endothelzellen (Brough et al., 2001) eine Speicherabhängigkeit von TRPC1 festgestellt. Die Co-Expression von TRPC1 mit TRPC3 (Lintschinger et al., 2000; Wu et al., 2000) und TRPC1 mit TRPC5 (Strübing et al., 2001) führt zu vollständig veränderten Kanaleigenschaften, was auf die Bildung von Heteromeren hindeutet. Die Möglichkeit der Bildung von heterooligomeren TRPC-Kanälen wurde durch O. Friedrich (2001) untermauert, der in einem COS-Zellsystem die Interaktion von mTRP1 β (Maus TRPC1 β) mit TRPC2 und TRPC3 feststellte. Zudem konnte O. Friedrich in diesem System TRPC1 und das Adapterprotein LAT co-präzipitieren. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Organisation von TRPC1 in dem Signalkomplex von T- und B-Zellen (Leo et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von mTRP1 β auf den rezeptoraktivierten Ca^{2+} -Einstrom und den Ca^{2+} -Einstrom nach Speicherdepletion durch Untersuchungen an fünf unterschiedlichen B-Zelllinien charakterisiert. Aufgrund der offensichtlichen Abhängigkeit der Eigenschaften des TRPC1-enthaltenden Ca^{2+} -Kanals von dem untersuchten Zellsystem (zur Übersicht Zitt et al., 2002) wurden B-Zellsysteme gewählt, die endogen TRPC1 exprimieren (IIA1.6), die TRPC1 endogen nicht exprimieren (WEHI231) und in denen die endogene TRPC1-Expression durch homologe Rekombination unterbunden wurde (DT40 TRP1 β -,- (Mori et al., 2002)). Zudem wurde in dieser Arbeit erstmals humane B-Zellen analysiert, in dem die Expression von TRP-Proteinen nicht durch heterologe Expression oder „antisense“-Konstrukte manipuliert wird, sondern eine endogene Steuerung der TRP-

Expressionsmuster über den EBV-Transkriptionsfaktor EBNA2 (ERE2.5-Zellen) oder c-myc (P493.6-Zellen) erfolgt (Kempkes et al., 1995; Pajic et al., 2000). In diesen konditionalen Modellsystemen für lymphoblastoide Zelllinien (ERE2.5) oder Burkitt Lymphome (P493.6) wird offenbar die Expression von TRP-Proteinen an neue Anforderungen bezüglich der Ca^{2+} -Einstrom-Eigenschaften angepasst.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung der cytosolischen Domänen von mTRP1 β . Dazu wurden Deletionen der Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen (mTRP1 $\beta\Delta$ ank), der N-terminalen „coiled-coil“-Domäne (mTRP1 $\beta\Delta$ cc) und der Dystrophin-ähnlichen Domäne am C-Terminus (mTRP1 $\beta\Delta$ dys) von mTRP1 β eingeführt (Engelke, 1999). Außerdem wurde die postulierte Porenregion im Bereich der 5. und 6. Transmembranregion (mTRP1 $\beta\Delta$ pp) und die über alle TRPC-Proteine stark konservierte EWKFAR-Region (mTRP1 $\beta\Delta$ EWKFAR) deletiert (Friedrich, 2001). Über die EWKFAR-Region hinaus sind die folgenden 29AS, die einen Bereich von 10AS umfassen, der 50% Prolin enthält (AS 661-670), in der TRPC-Subfamilie konserviert. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Deletionsmutante hergestellt, die diese 35AS nicht mehr enthält (mTRP1 $\beta\Delta$ DK). Der funktionelle Einfluss dieser Deletionen wurde in HEK293-Zellen¹ und in den B-Zelllinien WEHI231 und DT40 TRP1-, - untersucht.

7.1 Expression und Lokalisierung von mTRP1 β und Deletionsmutanten

Eine wichtige Voraussetzung bei der Untersuchung von mTRP1 β und Deletionsmutanten in heterologen Expressionssystemen ist die Lokalisation der Proteine in der Plasmamembran. Dazu wurden immunfluoreszenzmikroskopische Analysen in den verwendeten Zellsystemen vorgenommen.

Die umfangreichsten Lokalisationsstudien erfolgten an stabil mTRP1 β -FLAG oder Deletionsmutanten exprimierenden HEK293-Zellen. Hier sollte insbesondere gezeigt werden, dass die Deletion von Domänen keinen Einfluss auf die Lokalisation in den Zellen hat. In dieser Arbeit wurden fluoreszierende Marker für Kern, Cytosol, ER und Plasmamembran verwendet, um die Co-Lokalisierung der FLAG-Fusionsproteine in bestimmten Bereichen der Zellen zu überprüfen. Aufgrund des verwendeten Expressionsvektors pIRES-EGFP wurden die mTRP1 β -Konstrukte gemeinsam mit EGFP exprimiert, das grundsätzlich ein cytosolisches Protein ist, aber aufgrund eines

¹ Die Ca^{2+} -Messungen an HEK293-Zellen wurden in Kooperation mit Dr. Olaf Friedrich durchgeführt

NLS („nuclear localisation sequence“) -ähnlichen Bereichs zum großen Teil im Zellkern lokalisiert ist. Zur Markierung der Plasmamembran wurde der Lipidfarbstoff CM-Dil verwendet, der in zellulären Membranen angereichert wird. In anderen Studien wird CM-Dil als Farbstoff beschrieben, der hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert ist (Andrade et al., 1996). Zur Markierung des endoplasmatischen Retikulums wurde mit Thapsigargin inkubiert, das mit dem Fluorophor Bodipy TR-X konjugiert ist. Thapsigargin bindet spezifisch an SERCA im ER (Thastrup et al., 1989; Thastrup et al., 1990). Mit konfokaler Lasermikroskopie wurde jeweils die Zellkernebene analysiert. Aus den Messungen an Kontrollzellen (Abb. 6.3 A-C) wird deutlich, dass HEK293-Zellen in der z-Ebene eine sehr heterogene Struktur aufweisen, woraus eine ungleichmäßige Verteilung der CM-Dil-Signale folgt. Der Vergleich des Bodipy TR-X-Thapsigargin-Signals mit dem CM-Dil-Signal zeigt, dass CM-Dil neben der Plasmamembran auch im ER lokalisiert ist (Abb. 6.3 B, C). Die teilweise Co-Lokalisation von Bodipy TR-X-Thapsigargin und CM-Dil impliziert, dass CM-Dil außerdem in den Membranen anderer Organellen, wie dem Golgi-Apparat lokalisiert ist.

Aus Abb. 6.3 A wird deutlich, dass die Signale für EGFP und das mit Cy5-konjugiertem Antikörper markierte Flag-Fusionsprotein in keiner Weise überlappen und mTRP1 β weder cytosolisch, noch im Nucleus lokalisiert ist. In Abb. 6.3 C zeigt die nahezu vollständige Überlagerung der Fluoreszenzsignale von Cy5 und CM-Dil, dass mTRP1 β und die Deletionsmutanten hauptsächlich in der Plasmamembran von HEK293-Zellen lokalisiert ist (Abb. 6.3 C). In diesem heterologen Zellsystem erfolgt die Expression unter der Kontrolle des „immediate early“-Promotors von CMV. Aufgrund der hohen Expressionslevel ist zu erwarten, dass ein Teil des Proteins noch nicht an die Plasmamembran transportiert wurde und demnach in ER und Golgi lokalisiert ist. In Abb. 6.3 B wird diese Annahme bestätigt, da das Cy5-Signal teilweise mit dem Bodipy TR-X-Signal überlappt und demnach die FLAG-Fusionsproteine auch im ER lokalisiert sind. In einem weiteren Experiment wurde über Immunfluoreszenzmikroskopie die Co-Lokalisation von mTRP1 β und TRPC3 gezeigt (Abb. 6.4 A-C)¹. TRPC3 wurde in diversen Studien als Plasmamembranständig beschrieben (Vannier, et al., 1998; Wang et al., 1999)

Diese Daten bestätigen eindeutig die Lokalisation von mTRP1 β in der Plasmamembran von HEK293-Zellen. Sie stimmen mit Untersuchungen von Wang et al.

¹ Diese Experimente wurden in enger Zusammenarbeit mit Dr. Olaf Friedrich durchgeführt

(1999) überein, die in einer einfachen Immunfluoreszenzanalyse eine Lokalisation von TRPC1 und TRPC3 in der Plasmamembran von HEK293-Zellen zeigten. Zudem belegen die Daten dieser Lokalisierungsstudie, dass die Deletion der cytosolischen Domänen (vergl. Abb. 6.1) keinen Einfluss auf die korrekte Lokalisation der Proteine hat. Die richtige Orientierung des cytosolischen C-Terminus wurde bereits gezeigt (Engelke (1999); Friedrich (2001)).

In den B-Zellsystemen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurde die Expression von mTRP1 β oder Deletionsmutanten über Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft. In allen B-Zelllinien zeigen die immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen eine überwiegende Lokalisierung von mTRP1 β oder Deletionsmutanten in der Plasmamembran (Abb. 6.7; 6.10; 6.16).

Besonders problematisch ist die Expression von mTRP1 β in der B-Zelllinie IIA1.6. Diverse Versuche, mTRP1 β stabil unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors zu exprimieren blieben erfolglos. Auch zwei zunächst als positiv getestete Klone verloren nach einigen Passagen die Expression von mTRP1 β (Friedrich 2001). Der Annahme folgend, eine hohe mTRP1 β -Expression könnte toxisch für IIA1.6-Zellen sein, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Tetracyclin-regulierbares System etabliert. Aus 67 Subklonen wurden über RT-PCR drei regulierbar mTRP1 β exprimierende Klone identifiziert, wobei ein Proteinnachweis lediglich beim Klon IIA1.6Tet-On E2 768-3 möglich war. In Abb. 6.7 A zeigt sich deutlich die Anhebung des Expressionslevels von mTRP1 β -Flag nach 24h Induktion. Die Tatsache, dass dieser Induktionseffekt nach 48h Inkubation mit Doxycyclin deutlich schwächer ausgeprägt ist, bedeutet einen weiteren Hinweis für die Toxizität einer hohen mTRP1 β -Expression in IIA1.6-Zellen. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 6.7 B zeigen ein signifikantes aber außerordentlich schwaches Fluoreszenzsignal, wodurch eine Bewertung der Induktion durch Doxycyclin nicht möglich ist. Nach mehrwöchiger Passagierung der Zellen und nach Auftauen von Einfrierproben konnte weder die Induktion der mTRP1 β -Expression noch ein messbares Fluoreszenzsignal reproduziert werden. Parallel durchgeführte, in dieser Arbeit nicht dokumentierte Experimente an der humanen B-Zelllinie Daudi führten ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine auf Proteinebene messbare Expression von mTRP1 β (konstitutiv und Tetracyclin-regulierbar) nicht möglich ist. Beispiele für die Problematik der Manipulation der TRP-Protein-Expression gibt es auch für TRPC3

und TRPM7. Laut persönlicher Mitteilung von Prof. Lückhoff (RWTH Aachen, Institut für Physiologie) ist es nicht möglich, stabil TRPC3-exprimierende CHO Zellen zu etablieren, und die Unterbrechung des TRPM7-Gens in DT40 durch homologe Rekombination ist letal (Nadler et al., 2001). Die Expressionslevel in WEHI231-Zellen nach transienter Transfektion von mTRP1 β oder Deletionsmutanten sind ebenfalls sehr gering. Hier wurden bei immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen Fluoreszenzsignale gemessen, die nur geringfügig über den Signalen der Kontrollzellen lagen (Abb. 6.10). Eine Ausnahme sind dabei die Fluoreszenzsignale von mTRP1 β Δ pp-HA-exprimierenden WEHI231-Zellen. Die Intensität dieser Signale liegt deutlich über den Signalen der übrigen untersuchten Zellen. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Erkenntnissen von O. Friedrich (2001), der in IIA1.6-Zellen nur diese Deletionsmutante stabil und hoch exprimieren konnte. Warum aber ist eine heterologe Expression von mTRP1 β in dieser Zelllinie so problematisch? In den Zellsystemen SF9 (Sinkins et al. 1998), CHO (Zitt et al., 1996) und HEK293 (Engelke et al., 2002) führte eine TRPC1-Expression zu nicht selektiven konstitutiv geöffneten Kanälen, die im Fall von CHO- und HEK293 Zellen zusätzlich speicherabhängig sind. Die Co-Expression von TRPC1 und TRPC3 oder TRPC5 führt dagegen zu völlig anderen Kanalcharakteristika (Lintschinger et al., 2000; Strübing et al., 2001). Eine mögliche Interpretation für die Expressionseffekte in IIA1.6-, Daudi- und WEHI231-Zellen ist demnach, dass ab einer bestimmten Anzahl von mTRP1 β -Proteinen Kanäle gebildet werden, die, möglicherweise aufgrund einer konstitutiven Aktivität, die Ca²⁺-Homöostase und/oder das Membranpotential derart stören, dass solche Zellen *in vitro* einen Selektionsnachteil gegenüber Zellen haben, die weniger mTRP1 β exprimieren. Insbesondere die Daten der Tetracyclin-regulierbaren Expression von mTRP1 β in IIA1.6-Zellen passen sehr gut zu dieser Hypothese. Die mTRP1 Δ pp-Deletionsmutante zeigt in HEK293-Zellen keine konstitutive Aktivität (Engelke et al., 2002) und würde demnach auch in anderen Expressionssystemen nicht die nachteilige Wirkung von wt mTRP1 β haben. Diese Hypothese hätte zudem die Konsequenz, dass endogen exprimierte TRP-Proteine (zumindest der Subfamilie TRPC) eine entscheidende Rolle für die Eigenschaften nach heterologer Expression ausüben. Auf diese Weise könnten die vielen widersprüchlichen Veröffentlichungen in Bezug auf die Charakteristika von TRP-Proteinen (zur Übersicht Zitt et al., 2002) begründet werden.

An mTRP1 β oder Deletionsmutanten exprimierenden HEK293- und DT40 TRP1-,-- Zellen wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Aus Abb. 6.2 wird deutlich, dass alle FLAG-Fusionsproteine apparente Molmassen aufweisen, die ca. 15% unterhalb der aus der AS-Zusammensetzung errechneten Werte liegen. Diese Differenz ist bei der Deletionsmutante mTRP1 $\beta\Delta$ pp kleiner und liegt bei ca. 5%. Offenbar wird durch die hohe Anzahl an hydrophoben Domänen in mTRP1 β das Laufverhalten in Relation zum LMW-Marker verändert. Da in der Deletionsmutante mTRP1 $\beta\Delta$ pp mit der potentiellen Porenregion ein großer hydrophober Bereich fehlt, ist der Effekt hier geringer. Ähnliche Beobachtungen bezüglich des Laufverhaltens von TRPC1 wurden in anderen Studien gemacht (Sinkins et al., 1998; Bobanović et al., 1999). Die apparenten Molmassen der HA-Fusionsproteine nach Western Blot-Analyse von DT40-Immunpräzipitationen sind vergleichbar mit den Daten aus HEK293-Zellen. Allerdings existiert für die Deletionsmutanten mTRP1 $\beta\Delta$ ank, mTRP1 $\beta\Delta$ cc und mTRP1 $\beta\Delta$ DK neben dem Signal im Bereich einer apparenten Molmasse von 70 bis 80kDa ein weiteres Signal in einer Höhe, in der Proteine mit der etwa vierfachen Molmasse erwartet werden. Dies sind erste biochemische Hinweise für die Bildung von TRPC1-Tetrameren, die in Analogie zu CNG- und spannungsabhängigen K⁺-Kanälen postuliert wurde (Birnbaumer et al., 1996; Kaupp und Seiffert, 2002). Interessanterweise bildet wt mTRP1 β -HA in diesem Experiment keine Tetramere. Während im Vergleich mit mTRP1 $\beta\Delta$ ank-HA und mTRP1 $\beta\Delta$ DK-HA die wesentlich kleinere Menge an immunpräzipitiertem Protein als Begründung dafür herangezogen werden könnte, ist die Signalintensität von mTRP1 $\beta\Delta$ cc-HA vergleichbar mit der von mTRP1-HA. Daraus ergeben sich zwei Interpretationsansätze. Zum einen könnte die Deletion der „coiled coil“-Domäne zu einer größeren Bindungskonstante der Wechselwirkung führen, und zum anderen könnte die Deletion die Bildung von Heteromeren mit endogenen TRP-Proteinen unterbinden und somit mehr Homotetramere bilden. Grundsätzlich muss in dieser Überlegung die Tatsache berücksichtigt werden, dass die Proben vor Durchführung der PAGE in SDS- und DTT-haltigem Laemmli-puffer aufgekocht wurden. Unter diesen Bedingungen sollten ionische Wechselwirkungen und auch Disulfidbrücken, die O. Friedrich (2001) postulierte, nicht möglich sein. Vorstellbar ist, dass hydrophobe Wechselwirkungen durch 2% SDS nicht vollständig gelöst wurden. Dies würde begründen, dass die Deletionsmutante mTRP1 $\beta\Delta$ pp keine Tetramere bildet. Die Wechselwirkung von TRPC1 mit PKD2 (Tsiokas et al., 1999) ist offenbar auch über

Interaktionen von hydrophoben Transmembranbereichen vermittelt. Laufende Studien von C. Schäfer (2002) zeigen, dass Co-Immunpräzipitationen des cytosolischen N-Terminus mit mTRP1 β , mTRP1 $\beta\Delta$ ank und mTRP1 $\beta\Delta$ acc möglich sind. Besonders effektiv sind diese Präzipitationen, wenn die Deletionsmutante mTRP1 $\beta\Delta$ acc verwendet wird. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die „coiled-coil“-Domäne eine Interaktion von mTRP1 β mit anderen Proteinen vermittelt und dadurch die Co-Präzipitation mit dem mTRP1 β -N-Terminus erschwert. Solche Interaktionspartner könnten regulatorische Proteine oder Adapterproteine sein. Denkbar, und in der Zusammenfassung der vorgestellten Daten wahrscheinlich, ist die Wechselwirkung mit anderen TRP-Proteinen. Xu et al. (1997) konnten im Hefe „Two-Hybrid-System“ und in einem „pull-down-assay“ mit GST-Fusionsproteinen die homo- und heteromere Interaktion der N-Termini von TRP und TRPL aus *Drosophila Melanogaster* nachweisen. Ebenfalls in einem Hefe „Two-Hybrid-System“ fand O.Friedrich (2001) eine von der „coiled-coil“-Domäne abhängige Interaktion des cytosolischen N-Terminus von mTRP1 β mit den cytosolischen N-Termini von mTRP1 β selbst sowie TRPC2 und TRPC3. Demnach ist möglicherweise eine Interaktion der N-Termini, vermittelt über die „coiled-coil“-Domänen, zumindest innerhalb der TRPC-Subfamilie ubiquitär. Über die Menge an entsprechenden TRPC-Proteinen sowie die Stärke der Wechselwirkung wird gesteuert, ob und welche Homo- oder Heteromere gebildet werden. Für mTRP1 β kann dies bedeuten, dass die Wechselwirkung mit den N-Termini anderer endogen exprimierter TRP-Proteine über die „coiled-coil“-Domänen stärker ist, so dass in den untersuchten mTRP1 β -exprimierenden DT40-Zellen eine Heteromerisierung und den mTRP1 $\beta\Delta$ acc-exprimierenden DT40-Zellen eine Homomerisierung bevorzugt wird.

Diese Daten der Western Blot-Analyse liefern somit erste biochemische Hinweise für die strukturbildende Bedeutung der N-terminalen „coiled coil“-Domäne und erhärten die Möglichkeit der Bildung von Heterotetrameren, deren Zusammensetzung durch die Eigenschaften der „coiled coil“-Domäne des jeweiligen TRPC-Proteins gesteuert werden könnte.

7.2 Einfluss der mTRP1 β -Expression auf den Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran

HEK293-Zellen sind ein etabliertes Modellsystem für die Untersuchung von Ca²⁺-Einstromeigenschaften, da die Stimulation über endogen exprimierte muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren mit Carbachol zu einem biphasischen Ca²⁺-Signal führt (Nakai et al., 1988). Aus diesem Grund wurde zunächst der Einfluss von mTRP1 β auf den Ca²⁺-Einstrom in diesen Zellen untersucht.

Aus den Ca²⁺-Einstrom-Messungen an Fura2-beladenen HEK293-Zellen geht hervor, dass die mTRP1 β -FLAG-exprimierenden Zellen einen um etwa 30% erhöhten Einstrom aus dem Extrazellularraum nach Rezeptoraktivierung im Vergleich zu vektortransfizierten Kontrollzellen aufweisen. Elektrophysiologische Messungen an diesen Zellen, die im Labor von Prof. A. Lückhoff (RWTH Aachen, Institut für Physiologie) durchgeführt wurden, zeigen, dass die Expression von mTRP1 β -FLAG zu einem konstitutiven Ionenstrom über die Plasmamembran führt, der hauptsächlich durch Na⁺ getragen wird (Engelke et al., 2002). Im Gegensatz zu elektrophysiologischen Daten TRPC1-exprimierender CHO-Zellen (Zitt et al., 1996) ist dieser Strom nicht durch Speicherdepletion aktivierbar und ist daher in seiner Charakteristik mit dem Ionenstrom in TRPC1-exprimierenden SF9-Zellen vergleichbar (Sinkins et al., 1998). Es besteht demnach ein scheinbarer Widerspruch zwischen den elektrophysiologischen Daten und den Fura2-[Ca²⁺]-Messungen. Wichtig für die Interpretation dieser Ergebnisse ist die Tatsache, dass in HEK293-Zellen durch RT-PCR die endogene Expression diverser TRP-Proteine nachgewiesen wurde. Während Wu et al. (2000) die Expression von TRPC1, TRPC3, TRPC4 und TRPC6 belegt, wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich die Expression von TRPC5, TRPV2, TRPV4, TRPV5, TRPV6, TRPM5, TRPM6 und TRPM7 mit unterschiedlicher Intensität nachgewiesen (Tab. 6.1). Berücksichtigt man weiterhin die Daten von Strübing et al. (2001), die nach Co-Expression von TRPC1 und TRPC5 in HEK293-Zellen völlig veränderte Kanaleigenschaften zeigten sowie von Lintschiger et al., (2000), die veränderte Charakteristika nach Co-Expression von TRPC1 und TRPC3 fanden, so wird deutlich, dass die Expression von mTRP1 β zu einer Vielzahl unterschiedlicher Kanäle mit wahrscheinlich heterogenen Kanaleigenschaften führen kann. Eine Konsequenz daraus könnte die von Babnigg et al. (2000) beschriebene große Zell-zu-Zell-Variation bei Ca²⁺-Messungen an stabil transfizierten HEK293-

Zellen sein. Während in den Fura2-[Ca²⁺]-Messungen der Effekt der mTRP1 β -Expression auf den Ca²⁺-Einstrom in seiner Gesamtheit gemessen wird, werden in elektrophysiologischen Untersuchungen nur die Eigenschaften abgegrenzter Patches gemessen. Dabei ist völlig unklar, welche TRP-Kanäle in diesen Patches vorliegen und wie die Eigenschaften dieser isolierten Bereiche auf die Gesamtzelle zu übertragen ist.

Demnach ist es zumindest fraglich, dass der in dieser Arbeit gefundene Einfluss einer mTRP1 β -Expression auf den Ca²⁺-Einstrom nach Rezeptoraktivierung auf die Bildung von homomeren mTRP1 β -Kanälen zurückzuführen ist. Eher wahrscheinlich ist die Veränderung endogen vorhandener Ionenkanäle. Aufgrund des sehr komplexen Expressionsmusters von TRP-Proteinen in HEK293-Zellen ist die Eignung dieser Zelllinie als heterologes Expressionssystem für die Untersuchung einzelner TRP-Proteine kritisch zu beurteilen.

Zur Untersuchung des Einflusses von mTRP1 β auf den Ca²⁺-Einstrom in B-Zellen wurden drei heterologe Expressionssysteme verwendet. In der B-Zelllinie IIA1.6 werden endogen die TRPC-Proteine 1, 2 und 3 exprimiert (unveröffentlichte Daten dieser Arbeitsgruppe). Die B-Zelllinie WEHI231 exprimiert endogen nur die TRPC-Proteine 2 und 3 (unveröffentlichte Daten dieser Arbeitsgruppe). Dazu wurde eine Hühner-B-Zelllinie verwendet, in der das Gen für TRPC1 durch homologe Rekombination unterbrochen wurde (DT40 TRP1-, -). An weiteren endogen exprimiertem TRP-Proteinen in DT40 ist lediglich TRPM7 bekannt (Nadler et al., 2001). Mit diesen drei Zelllinien wurden bewusst Zelllinien verwendet, die in Bezug auf die endogene TRPC1-Expression alle denkbaren Voraussetzungen aufweisen. Damit wurden im Rahmen dieser Arbeit umfangreiche Daten für den Einfluss von TRPC1 in B-Zellen erarbeitet.

Bei dem Versuch, die Daten von Mori et al. (2002), die die TRPC1-defizienten DT40-Zellen etablierten, zu reproduzieren, wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass jeweils bis zu ca. 60% der Zellen keine Ca²⁺-Antwort nach BCR-Quervernetzung zeigten. Da dieser Effekt auch bei wt-DT40-Zellen durch zweitägige Kultivierung bei suboptimal hoher Zelldichte erreicht wurde, ist es unwahrscheinlich, dass diese Eigenschaft allein auf die Defizienz für TRPC1 zurückzuführen ist. Dies wird weiter untermauert durch die Tatsache, dass sich der Anteil stimulierbarer Zellen, nach Transfektion und Selektion von TRPC1-defizienten DT40-Zellen auf 0% reduzierte. Aus diesem Grund wurde die ursprüngliche Zelllinie subkloniert. Mit dem

Subklon 7 wurde so eine Zelllinie etabliert, die vollständig über den BCR stimulierbar sind. Die in Abb. 6.13 dargestellten Daten zeigen eindeutig, dass die Ca^{2+} -Eigenschaften des TRPC1-defizienten Subklons 7 nicht signifikant von den Eigenschaften der wt-Zellen abweichen. Ein vollkommen neuer Aspekt der Daten von Mori et al. (2002) ist, dass in der TRPC1-defizienten Zelllinie die IP_3 -abhängige Mobilisierung von Ca^{2+} aus dem ER um mehr als 50% reduziert ist. Diese Werte der ursprünglichen DT40 TRPC1-defizienten Zelllinie konnten hier reproduziert werden (Abb. 6.13). Durch Untersuchungen an dem Subklon 7 wurde allerdings dieser mit bisherigen Erkenntnissen über TRP-Proteine kaum zu vereinbarende Effekt widerlegt (Abb. 6.13). Die Möglichkeit eines Artefaktes wird durch Daten in der Publikation selbst eingeräumt, da elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, dass lediglich 20% der TRPC1-defizienten Zelllinie nach Perfusion mit IP_3 in der Lage sind, einen Ionenstrom über die Plasmamembran aufzubauen (90% bei wt-DT40). Vor dem Hintergrund der Erkenntnisse dieser Arbeit ist dieses Ergebnis mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf TRPC1 zurückzuführen. Der durch Mori et al. (2002) gezeigte Einfluss von TRPC1 auf den Ca^{2+} -Einstrom nach Speicherdepletion durch Thapsigargin ist auch in dem TRPC1-defizienten Subklon 7 signifikant, wenn auch die Reduktion des Ca^{2+} -Einstroms mit etwa 20% deutlich geringer ist als in der ursprünglichen Zelllinie mit etwa 60% (Abb. 6.14). In den ursprünglichen TRPC1-defizienten DT40-Zellen konnte durch Transfektion von mTRP1 β das beim wt gemessene Signal nicht wieder hergestellt werden. Obgleich signifikant höher, als nicht transfizierte Zellen, lag das erreichte Maximum um ca. 30% niedriger als bei wt-DT40-Zellen. Diese Daten stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Mori et al. (2002), wobei nicht klar ist, ob hier ein oder mehrere Klone für die Messungen verwendet wurden. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen, die in Abb. 6.13 A und B zusammengefasst sind, wurden vier Klone verwendet, und es wurde eine große Klon-zu-Klon Abweichung festgestellt. Auch nach Transfektion des TRP1-defizienten Subklons 7 mit mTRP1 β wurde ein etwas kleineres Maximum als bei wt-DT40 erreicht, wobei die beiden Werte im Bereich des Messfehlers gleich sind. Demnach könnte die große Differenz bei den Messungen mit der ursprünglichen Zelllinie auf die stark heterogenen Eigenschaften innerhalb dieser Zellen zurückzuführen sein.

Die Berichtigung der Ergebnisse von Mori et al. (2002) durch die im Rahmen dieser Studie erarbeiteten Daten ist für die Ausrichtung der weiteren Forschung an TRP-

Proteinen sowie das Verständnis des Ca^{2+} -Einstroms in B-Lymphocyten von großer Bedeutung. Die TRPC1-Defizienz führt in DT40-Zellen lediglich zur Reduktion des Ca^{2+} -Einstroms nach Speicherdepletion durch Thapsigargin und hat keinen signifikanten Einfluss auf das Ca^{2+} -Signal nach BCR-Quervernetzung.

Während mTRP1 β in WEHI231-Zellen keinen Einfluss auf den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran hat (Abb. 6.11 C, D), steigt die maximale cytosolische Ca^{2+} -Konzentration nach Induktion mit Doxycyclin auf einen um etwa 25% höheren Wert an. Die Tatsache, dass dieser Effekt nach 48h Induktion nicht mehr zu beobachten ist, korreliert mit den RT-PCR-Daten (Abb. 6.7 A) und ist wahrscheinlich auf toxische Effekte einer hohen mTRP1 β -Expression zurückzuführen (vergl. 7.1). In WEHI231-Zellen führt die mTRP1 β -Expression lediglich zu einer Erhöhung des Thapsigargin-induzierten Ca^{2+} -Einstroms um $21 \pm 7,5\%$. Diese Daten sind übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den Messungen an TRP1-defizienten DT40-Zellen. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, wie in den Zelllinien WEHI und DT40 zwischen der Speicherdepletion durch Thapsigargin und der Speicherdepletion durch IP_3 in Bezug auf die Aktivierung von Ionenkanälen in der Plasmamembran unterschieden wird. Eine Interpretationsmöglichkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass das Ca^{2+} -Signal in diesen Zelllinien nach BCR-Quervernetzung deutlich kürzer andauert als in IIA1.6-Zellen (für WEHI231 nicht gezeigt, für IIA1.6- sowie DT40-Zellen Abb. 6.8 und Abb. 6.13). Die Maxima des Anteils dieses Signals, der durch Ionenkanäle in der Plasmamembran einströmt, beträgt für DT40- und WEHI231-Zellen nur etwa 40% der Maxima, die nach Speicherdepletion durch Thapsigargin erreicht werden (Abb. 6.13; 6.14). Dies könnte dazu führen, dass eine Differenz im Bereich von 20% mit der angewendeten Methode nicht mehr aufzulösen ist, da sie im Rahmen des Messfehlers liegt. Eine andere Möglichkeit, die vorliegenden Daten zu interpretieren, folgt aus Erkenntnissen, dass die Aktivierung von TRP-Proteinen von der Organisation im Signalkomplex und von einer Umstrukturierung des Cytoskeletts abhängig sein könnte (Rosado und Sage, 2000, 2001; Rosado et al., 2000a, 2000b; 2002; Lockwich et al., 2000, 2001). Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Rosado in Thrombocyten ergaben eine Interaktion von endogenem TRPC1 mit IP_3 -R in Abhängigkeit von der Depletion des ER (Rosado und Sage, 2000). Zudem wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms über die Plasmamembran mit einer Reorganisation des Cytoskeletts einhergeht (Rosado et al., 2000a, 2000b) und dass TRPC1 in diesen Prozess involviert ist (Rosado und Sage, 2001; Rosado et al.,

2002). Die Arbeitsgruppe um Lockwich fand in HSG-Zellen eine Assoziation von TRPC1 mit Caveolin1 und $G\alpha_{q/11}$ in „lipid rafts“ (Lockwich et al., 2000) sowie eine durch Stabilisierung des kortikalen Aktins hervorgerufene Internalisierung von TRPC3 in einem Komplex mit IP_3 -R, Caveolin1, PLC β , $G\alpha_{q/11}$, SERCA und dem Cytoskelett-Protein Ezrin (Lockwich et al., 2001). Möglicherweise ist also die Ansteuerung und Organisation von TRP-Proteinen in solchen Signalkomplexen von spezifischen Interaktionspartnern abhängig. In Zelllinien wie WEHI231, die TRPC1 endogen nicht exprimieren, könnten entsprechende Interaktionspartner für heterolog exprimiertes TRPC1 fehlen und somit die Beteiligung dieses Kanalproteins am Ca^{2+} -Einstrom nach BCR-Quervernetzung verhindern. Möglich ist auch, dass eine für die Aktivierung von TRPC1-enthaltenden Kanälen erforderliche Organisation des Signalkomplexes in WEHI231 nicht stattfindet, da auch der BCR in diesem Modellsystem für unreife B-Zellen nach Aktivierung im Gegensatz zu reifen B-Zellen nicht in „lipid rafts“ rekrutiert wird (Sproul et al., 2000). Die Rolle von TRPC1 in DT40-Zellen zu bewerten, ist dadurch erschwert, dass die Stärke der endogenen TRPC1-Expression unklar ist. Durch Mori et al. (2002) wurde endogenes TRPC1 durch Northern Blot-Analyse nachgewiesen ohne eine Relation der Signalstärke anzugeben. Die Validität der Immunfluoreszenzanalysen in dieser Publikation ist fraglich, da Ong et al. (2002) zeigten, dass der verwendete polyklonale Antikörper (Alamone Labs) nicht spezifisch für TRPC1 ist. Demnach kann unter Berücksichtigung des derzeitigen Datenstands nicht abschließend beurteilt werden, ob mTRP1 β keine Auswirkung auf den Ca^{2+} -Einstrom in DT40-Zellen nach BCR-Quervernetzung hat, oder der Effekt zu klein ist, um signifikant mit dieser Messmethode aufgelöst zu werden. Die Untersuchung des Einflusses der Deletionsmutanten in diesen Zellen implizieren, dass TRPC1 in den Ca^{2+} -Einstrom nach Rezeptoraktivierung eingebunden sein könnte (vergl. 7.3).

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen an den verschiedenen Zellsystemen, dass mTRP1 β den Ca^{2+} -Einstrom in B-Zellen nach Rezeptoraktivierung erhöhen kann. Dieser Effekt ist abhängig von der verwendeten Zelllinie. Möglicherweise hat die heterologe Expression von mTRP1 β nur in Zellen einen Einfluss, die TRPC1 endogen exprimieren. Dies impliziert, dass weitere spezifische Komponenten für die Einbindung von mTRP1 β in den Signalkomplex erforderlich sind. In Zelllinien, in denen diese Komponenten fehlen, wird nur der Ca^{2+} -Einstrom durch mTRP1 β erhöht, der nach Speicherdepletion durch Thapsigargin erfolgt. Nach den Erkenntnissen der

vorliegenden Arbeit ist zu bezweifeln, dass für B-Zellen ein Mechanismus der Aktivierung von Ca^{2+} -permeablen Kanälen in der Plasmamembran besteht, der isoliert vom Signalkomplex nur auf Speicherdepletion basiert. Demnach ist fraglich, ob ein Thapsigargin-induzierter Ca^{2+} -Einstrom Rückschlüsse für die Situation *in vivo* zulässt.

7.3 Einfluss der cytosolischen Domänen von mTRP1 β auf den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran

Um den funktionellen Einfluss von cytosolischen Domänen zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten (Abb. 6.1) in den Zelllinien HEK293, WEHI231 und DT40 TRP1-, -exprimiert.

Die Mutante mTRP1 β Δ pp, in der mit der 5. und 6. Transmembranregion die potentiell porenbildende Region deletiert wurde, führte in keiner der verwendeten Zelllinien zu einer Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms über die Plasmamembran nach Speicherdepletion oder Rezeptoraktivierung. Eine Verringerung dieses Einstroms, der durch Störung endogener Kanäle hervorgerufen werden könnte, wurde nicht beobachtet. Dennoch ergibt sich aus dem Vergleich der Effekte von mTRP1 β und der Deletionsmutante mTRP1 β Δ pp eine experimentelle Bestätigung der postulierten Porenregion.

Die Deletionsmutanten mTRP1 β Δ EWKFAR und mTRP1 β Δ dys wurden in HEK293-Zellen untersucht. Während die Daten für mTRP1 β mit Deletion der in TRPC-Proteinen hoch konservierten EWKFAR-Region aufgrund des großen Fehlers nicht bewertbar sind, ist die Mutante mTRP1 β Δ dys ($311 \pm 30\text{nM}$) im Gegensatz zu wt-mTRP1 β (399 ± 26) nicht in der Lage, den Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum im Vergleich zu den vektortransfizierten Kontrollzellen ($300 \pm 40\text{nM}$) zu erhöhen (Abb. 6.5, 6.6). Im Bereich der Dystrophin-ähnlichen Domäne befindet sich die Aminosäuresequenz, die in einer *in vitro* Studie als Bindungsregion für Calmodulin und IP₃-R identifiziert wurde (Tang et al., 2001). Demnach könnte der unterschiedliche Einfluss von mTRP1 β Δ dys im Vergleich zu mTRP1 β auf die fehlende Eigenschaft der IP₃-R-Bindung zurückzuführen sein, die für TRPC1 und auch für TRPC3 als essentiell beurteilt wird (Rosado und Sage, 2001; Rosado et al., 2002; Boulay et al. 1999; Kiselyov et al., 1998; Kiselyov et al., 1999; Lockwich et al., 2001; Ma et al., 2000; Ma et al., 2001). Im Gegensatz dazu zeigen Daten von Singh

et al. (2000) eine vom cytosolischen C-Terminus unabhängige Wechselwirkung sowohl mit Caveolin 1 als auch mit IP₃-R. Die in der betreffenden Arbeit untersuchte Mutante, in der der cytosolische C-Terminus inklusive der EWKFAR-Sequenz deletiert ist, führte in HSG-Zellen zu einer Erhöhung des Ca²⁺-Einstroms über die Plasmamembran nach Speicherdepletion, die sogar größer war als nach TRPC1-Expression. Unter der Voraussetzung, dass dieser Effekt nicht ausschließlich für HSG-Zellen besteht, könnten diese Daten bedeuten, dass die Interaktion von TRPC1 mit IP₃-R nicht direkt erfolgt, sondern mittelbar über andere Proteine. Möglicherweise führt die Deletion des cytosolischen C-Terminus dazu, dass TRPC1-enthaltende Kanäle nicht mehr negativ regulierbar sind (eventuell durch Calmodulin wie von Tang et al. postuliert). Im Vergleich mit den Daten der Ca²⁺-Messungen nach Expression von mTRP1βΔdys in HEK-Zellen würde dies bedeuten, dass der Bereich der 35AS von EWKFAR bis zur Dystrophin-ähnlichen Domäne eine negativ regulierende Funktion vermittelt. Dieser Sequenzbereich ist in Proteinen der TRPC-Subfamilie stark konserviert (Friedrich, 2001) und enthält ein Prolin-reiches Motiv AS641-675, das in TRPC- und TRPM-Proteinen vorhanden ist (Vennekens et al., 2002). Dieser Hypothese folgend wurde eine Mutante generiert, in der dieser Sequenzbereich deletiert wurde (mTRP1βΔDK). Tatsächlich führte die Expression dieser Mutante in WEHI231-Zellen (Abb. 6.11 A, B) und DT40 TRP₁-Zellen (Abb. 6.18 A, B) zu einer Erhöhung des Ca²⁺-Einstroms im Vergleich zu Kontrollzellen nach Speicherdepletion durch Thapsigargin. In TRPC1-defizienten DT40-Zellen des Subklons 7 ist dieser Effekt nicht signifikant. Dagegen führt in diesen Zellen die Expression von mTRP1βΔDK zu einer signifikanten Erhöhung nach BCR-Quervernetzung. In WEHI231-Zellen führte das gleiche Experiment zu keiner Erhöhung des Ca²⁺-Einstroms (Abb. 6.11), so dass diese Daten zum einen implizieren, dass TRPC1 in DT40-Zellen am rezeptoraktivierten Ca²⁺-Einstrom beteiligt sein könnte. Außerdem wird die Hypothese, mTRP1β könne in WEHI231-Zellen, die endogen kein TRPC1 exprimieren, nicht im Signalkomplex organisiert werden (vergl. 7.2), bestätigt. Während die Effekte von mTRP1βΔDK nach Speicherdepletion etwa denen entsprechen, die nach Expression von mTRP1β gemessen wurden, erreicht das Ca²⁺-Signal in DT40-Zellen nach BCR-Quervernetzung ein höheres Maximum als wt-DT40-Zellen. Obgleich eine exakte Bewertung aufgrund der ermittelten Messfehler schwierig ist, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass der regulierende Einfluss nur nach Rezeptoraktivierung ermöglicht wird.

Aus diesen Daten ergeben sich deutliche Hinweise auf die Existenz eines negativ-regulierenden Peptid-Motivs in mTRP1 β , das innerhalb der 35AS ab EWKFAR lokalisiert ist und möglicherweise auf einer Prolin-reichen Sequenz basiert.

Die Expression der Deletionsmutante mTRP1 $\beta\Delta$ ank führte nach Expression in TRP1-defizienten DT40-Zellen nicht zu einer signifikanten Erhöhung des Ca²⁺-Einstroms über die Plasmamembran nach Speicherdepletion durch Thapsigargin (Abb. 6.18). In mTRP1 $\beta\Delta$ ank-exprimierenden WEHI231-Zellen wurde, ebenfalls nach Speicherdepletion durch Thapsigargin, eine Erhöhung des maximalen Ca²⁺-Signals beobachtet, die mit 12 \pm 2,5% signifikant kleiner ist, als in mTRP1 β -exprimierenden Zellen (21 \pm 7%) (Abb. 6.11). Entsprechend diesen Daten führt also die Deletion der Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen zu einer Minderung des Ca²⁺-erhöhenden Effektes von mTRP1 β . Während der Einfluss einer mTRP1 $\beta\Delta$ ank-Expression nach Speicherdepletion durch Thapsigargin in den untersuchten Zelllinien schlüssig ist, führt die Expression dieser Mutante in HEK293- und DT40 TRPC1-,--Zellen nach Rezeptoraktivierung zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen (Abb. 6.5, 6.6, 6.20). In mTRP1 $\beta\Delta$ ank-exprimierenden HEK293-Zellen wird mit 290 \pm 37nM eine deutlich geringere, mit den Kontrollzellen vergleichbare maximale cytosolische Ca²⁺-Konzentration erreicht als in mTRP1 β -exprimierenden Zellen (399 \pm 26nM). Dagegen ist der Ca²⁺-Einstrom nach BCR-Quervernetzung in TRPC1-defizienten DT40-Zellen (Subklon 7), die diese Mutante exprimieren, signifikant größer als bei untransfizierten DT40 TRP1-,--Zellen und wt-DT40-Zellen. Ankyrin-Wiederholungen enthalten ein repetitives 33AS-Motiv und wurden in über 400 Proteinen, darunter Cytoskelett-Proteine, Regulatoren von Transkriptionsfaktoren, und Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinase, identifiziert (Sedgwick, S. G. und Smerdon, S. J., 1999). In Ankyrin sind 24 solcher AS-Motive tandemartig angeordnet und bilden die membranbindende Domäne, indem jeweils 6 Ankyrin-Wiederholungen eine globuläre Struktur bilden (Michaely und Bennett, 1993). Ankyrine fungieren als Adaptoren zwischen dem Spektrin-basierten Membranskelett und Membranproteinen, wie Ionenkanälen und Zell-Adhäsionsproteinen (Bennett, 1992; Bennett und Gilligan, 1993), wobei die Bindungsregion für Membranproteine von Ankyrin-Wiederholungen ausgebildet wird (Michaely und Bennett, 1993). In Ankyrin B-defizienten Mäusen ist die Bildung von T-Lymphocyten reduziert und die Lokalisation der IP₃-Rezeptoren ist abnormal, was eine Funktion von Ankyrin B in der Organisation von an der Ca²⁺-

Homöostase beteiligten Proteinen impliziert (Tuvia et al., 1999). DAG-Kinasen der Subgruppe IV, wie die DAG-Kinase ζ , enthalten am C-Terminus vier Ankyrin-ähnliche Wiederholungen. DAG-Kinasen regulieren die „second-messenger“-Funktion von DAG (zur Übersicht Topham und Prescott, 1999; van Blitterswijk und Houssa, 2000). RgdA kodiert für eine DAG-Kinase in *Drosophila melanogaster*, die ebenfalls Ankyrin-ähnliche Wiederholungen enthält. In der *rgda*-defizienten *Drosophila*-Mutante sind TRP und TRPL konstitutiv aktiv (Raghu et al., 2000). Im Zusammenhang mit der Aktivierung verschiedener TRP-Kanäle durch DAG (siehe Abschnitt 1.3) könnten DAG-Kinasen eine wichtige regulative Funktion ausüben. In B-Zellen wurden zwei Adapterproteine, BCAP und BANK, identifiziert, die ebenfalls eine Ankyrin-ähnliche Wiederholung enthalten (Okada et al., 2000; Yamazaki et al., 2002; Yokoyama et al., 2002). BCAP rekrutiert die PI3-Kinase in „Lipid-Rafts“ und verbindet so möglicherweise die Rezeptor-assoziierten Kinasen mit dem PI3-Kinase-Signalweg (Okada et al., 2000; Yamazaki et al., 2002). Die Unterbrechung des BCAP-Gens durch homologe Rekombination führte sowohl in DT40-Zellen als auch in B-Zellen aus „knock out“-Mäusen zu deutlich reduzierten Ca^{2+} -Signalen (Okada et al., 2000; Yamazaki et al., 2002). BANK reguliert ebenfalls den Ca^{2+} -Einstrom, offenbar über eine direkte Interaktion mit dem IP_3 -R, die allerdings nicht durch die Ankyrin-ähnliche Sequenz vermittelt wird (Yokoyama et al., 2002). Möglicherweise sind Ankyrin-ähnliche Wiederholungen für die Organisation des Signalkomplexes in B-Zellen essentiell, indem sie durch Interaktion mit dem Cytoskelett wichtige Komponenten in bestimmten Bereichen der Zelle verankern. Eine Interaktion von TRPC3 mit dem Cytoskelettprotein Ezrin wurde durch Lockwich et al. (2001) gezeigt. Diese Interaktion ist möglicherweise auf die Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen zurückzuführen. Da BCAP und BANK hauptsächlich in B-Zellen exprimiert werden (Okada et al., 2000; Yamazaki et al., 2002; Yokoyama et al., 2002), könnte die Organisation des Signalkomplexes in diesen Zellen in spezieller Weise auf Ankyrin-ähnlichen Sequenzen basieren. Dies würde den unterschiedlichen Einfluss von $\text{mTRP1}\beta\Delta\text{ank}$ in HEK293-Zellen, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden, und der B-Zelllinie DT40 begründen. Für TRPV1 wurde die Spleißvariante VR.5' identifiziert, in der die Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen fast vollständig fehlen (Schumacher et al., 2000). Diese TRPV1-Form ist insensitiv gegenüber Vanilloiden, was ein weiterer Hinweis für die Wichtigkeit dieser Dömanen in TRP-Proteinen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden somit erste Hinweise für die Wichtigkeit der Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen für die Funktion von TRPC-Proteinen erarbeitet. Diese Daten implizieren auch einen grundsätzlichen Unterschied der Einbindung von mTRP1 β in den Signalkomplex von HEK293- und DT40-Zellen.

Die mTRP1 β -Mutante, in der die im cytosolischen N-Terminus enthaltende „coiled-coil“-Domäne deletiert wurde, führte nach Expression in den untersuchten Zelllinien ebenfalls zu unterschiedlichen Effekten nach Speicherdepletion durch Thapsigargin oder Rezeptoraktivierung. In HEK293-Zellen führt die Expression von mTRP1 $\beta\Delta$ cc nicht zu der bei mTRP1 β -Expression beobachteten Erhöhung des Ca²⁺-Einstroms über die Plasmamembran (Abb. 6.5, 6.6). In WEHI231 und TRPC1-defizienten DT40-Zellen hat diese Mutante ebenfalls keinen Einfluss auf das Ca²⁺-Signal nach BCR-Quervernetzung (Abb. 6.11, 6.20). Interessanterweise führt die Expression von mTRP1 $\beta\Delta$ cc in TRPC1-defizienten DT40- und WEHI231-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der maximalen cytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Speicherdepletion durch Thapsigargin (Abb. 6.11, 6.18). Das α -helikale „coiled-coil“-Strukturmotiv vermittelt die Oligomerisierung von Untereinheiten der unterschiedlichsten Proteine (zur Übersicht Burkhard et al., 2001). So wird z.B. der tetramere Komplex SNARE, der eine Funktion in diversen Membranfusionsprozessen hat, über die Interaktion der „coiled-coil“-Domänen von Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin gebildet, wobei die Spezifität dieser Bindung über AS-Reste determiniert ist, die tangential aus der „coiled-coil“-Struktur herausragen (Lin und Scheller, 1997; Sutton et al., 1998). Arbeiten von O. Friedrich (2001) und C. Schäfer (2002) zeigen die Bedeutung der „coiled-coil“-Domäne für die Interaktion der cytosolischen N-Termini. Diese Domäne hat also möglicherweise eine strukturbildende Funktion, die in Abschnitt 7.1 im Zusammenhang mit den Daten der Western Blot-Analyse von DT40-Zellen ausführlich diskutiert wurde. Auch die Ergebnisse der Ca²⁺-Einstrom-Untersuchungen bestätigen die Hypothese, dass die Zusammensetzung von TRP-Heteromeren durch die „coiled-coil“-Domäne determiniert werden könnte. Offenbar bildet die Deletionsmutante mTRP1 $\beta\Delta$ cc Ionenkanäle, die nicht in den Signalkomplex von HEK293-, WEHI231- oder DT40.-Zellen eingebunden sind. Der erhöhte Einstrom von Ca²⁺-Ionen über die Plasmamembran nach Speicherdepletion durch Thapsigargin in mTRP1 $\beta\Delta$ cc-exprimierenden WEHI231- und TRPC1-defizienten DT40-Zellen ist ähnlich dem Effekt von mTRP1 β (vergl. 7.2). Bei DT40-Zellen ist dieser

Effekt bei mTRP1 β Δ acc-Expression sogar stärker ausgeprägt als bei mTRP1 β -Expression, was nach der in Abschnitt 7.1 aufgestellten Hypothese darauf zurückzuführen ist, dass vermehrt homomere Kanäle gebildet werden.

Die funktionellen Untersuchungen von mTRP1 β -Deletionsmutanten liefern demnach Hinweise, dass die „coiled-coil“-Domäne im cytosolischen N-Terminus von mTRP1 β eine strukturbestimmende Funktion hat, die möglicherweise in allen TRPC-Proteinen zu beobachten ist.

7.4 Ein neues Modellsystem für die Untersuchung von TRP-Proteinen: Ca²⁺-Einstrom-Untersuchungen an den konditionalen B-Zelllinien P493.6 und EREB2.5

Die bisherige Forschung an TRP-Proteinen ist geprägt durch die Untersuchung des Effektes einer heterologen Expression oder von „antisense“-RNA (zur Übersicht Zitt et al., 2002). Bereits in Abschnitt 7.2 wurde ausführlich diskutiert, dass solche Strategien nur dann zu sinnvollen Informationen führen, wenn die Zusammensetzung der gebildeten Kanäle bekannt wäre und die Aktivierungs- und Regulationsmechanismen auf ubiquitär vorhandenen Komponenten basierte. Sowohl die widersprüchlichen Erkenntnisse über TRP-Proteine in unterschiedlichen heterologen Expressionssystemen als auch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse weisen aber darauf hin, dass die Struktur und Regulationsmechanismen von TRP-enthaltenden Ionenkanälen sehr komplex sein muss, wobei über die Art und Weise, in der solche Kanäle nach Rezeptoraktivierung angesteuert werden, kaum Daten zur Verfügung stehen. Ein grundsätzliches Problem von Untersuchungen, bei denen die Expression von RP-Proteinen entweder durch „antisense“-RNA oder durch Transfektion manipuliert wird, ist, dass keine Kontrolle über die exakte Expressionsstärke besteht. So ist in solchen Experimenten weder das Verhältnis der TRP-Proteine untereinander noch das Verhältnis von TRP-Proteinen zu Komponenten, die in Regulation und Aktivierung eingebunden sind, bekannt.

Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit nach Zellsystemen gesucht, in denen endogen die Expression von Komponenten, die einen Einfluss auf den Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran haben, konditional angepasst werden. Die Zelllinie EREB2.5 (Kempkes et al., 1995) ist eine konditionales Modell für lymphoblastoide Zellen, in denen die Expression des EBV-Transkriptionsfaktors

EBNA2 über Östrogen angeschaltet werden kann. Aus EREB2.5 wurde die Zelllinie P493.6 etabliert, die die Teracyclin-regulierbare Expression von c-myc ermöglicht und somit ein konditionales Modell für Burkitt-Lymphome darstellt (Pajic et al., 2000). Aus Tab. 6.1 geht hervor, dass in diesen beiden Zelllinien die TRP-Proteine TRPC1, TRPV2 und TRPM2 endogen exprimiert werden. In EREB2A wird durch EBNA2 die Expression von TRPC1 halbiert und die Expression von TRPM2 um den Faktor $2,2 \pm 0,4$ erhöht, wohingegen die Expression von TRPV2 nicht durch EBNA2 beeinflusst wird (Abb. 6.21). In P493.6-Zellen wird durch c-myc die Expression von TRPM2 um den Faktor $3 \pm 0,5$ erhöht und sowohl die TRPC1- als auch TRPV2-Expression bleibt gleich (Abb. 6.21). Somit wurden erstmals TRP-Proteine als Targets von c-myc (TRPM2) und EBNA2 (TRPC1) identifiziert.

Weiterhin wurde untersucht, wie die Ca^{2+} -Einstromeigenschaften dieser Zellen mit der Veränderung der TRP-Expression korrelieren. Dabei konnte in EREB2.5 der Ca^{2+} -Einstrom nur nach Speicherdepletion durch Thapsigargin untersucht werden, da diese Zellen nach EBNA2-Induktion den Level an Oberflächen-IgM deutlich herunterregulieren (Abb. 6.22) und somit nicht mehr durch BCR-Quervernetzung stimulierbar sind. Aus Abb. 6.23 C und Abb. 6.24 D geht hervor, dass sich der Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran nach Speicherdepletion mit Thapsigargin durch die EBNA2-Induktion nicht signifikant verändert. Dagegen führt die Erhöhung der c-myc-Expression zu einer Reduktion der maximalen cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration um ca. 50% nach Speicherdepletion durch Thapsigargin (Abb. 6.23 B, Abb. 6.24 C). Diese Reduktion wird auch beim Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran nach BCR-Quervernetzung beobachtet. P493.6 ist damit die erste beschriebene Zelllinie, in der die Erhöhung der Expression von TRP-Proteinen zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Einstroms über die Plasmamembran führt. Die Expressionsmuster von TRP-Proteinen sind in EREB2.5 und P493.6 identisch. Die Unterschiede bestehen in der Expressionstärke von TRPC1, dessen Expression durch EBNA2 gehemmt wird, und TRPM2, dessen Expression in P493.6 Zellen verdreifacht und durch EBNA2 ca. verdoppelt wird. Bei der Bewertung der unterschiedlichen Ca^{2+} -Einstrom-Daten ist zu berücksichtigen, dass P493.6-Zellen einen anderen Proteasom-Status haben, was dazu führen könnte, dass eine hochregulierte Expression nicht zu erhöhten Proteinmengen führt (Polack et al., 1996; Pajic et al., 2001; Gavioli et al., 2001). Daher ist nicht ausgeschlossen, dass sich die Menge an TRP-Proteinen nach EBNA2-Induktion nicht signifikant erhöht. Der direkte Vergleich der Zelllinien

EREB2.5 und P493.6 wäre somit erst dann sinnvoll, wenn der Vergleich der TRP-Expression auf Proteinebene erfolgte, was dadurch erschwert wird, dass derzeit keine kommerziellen Antikörper für TRPV2 und TRPM2 verfügbar sind. Warum aber führt in P493.6-Zellen die Erhöhung der TRPM2-Expression zu einer Verringerung des Ca^{2+} -Einstroms über die Plasmamembran? TRPM2 enthält am cytosolischen C-Terminus eine NUDT9-homologe Domäne, die eine ADP-Pyrophosphatase-Aktivität hat (Perraud et al., 2001). Hara et al. (2002) konnten zudem eine Aktivierung durch H_2O_2 und damit eine Sensitivität gegenüber einer Veränderung des Redox-Status der Zelle nachweisen (vergl. Abschnitt 1.3.2). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die c-myc-Expression in P493.6-Zellen zu einer Hochregulierung von antioxidativen Enzymen, wie z.B. Thioredoxin, führt (Schumacher et al., 2001; Guo et al., 2000). Dies könnte zu einem Redox-Status der Zelle führen, der die Aktivierung von TRPM2-enthaltenden Ionenkanälen erschwert.

Aus den in den Abb. 6.23 und 6.24 zusammengestellten Daten lassen sich weitere Rückschlüsse auf die Aktivierung und Regulierung der beteiligten Ionenkanäle ziehen. Die in P493.6-Zellen am Ca^{2+} -Einstrom beteiligten Ionenkanäle sind durch das DAG-Analogon OAG aktivierbar. Im Gegensatz dazu erfolgt in EREB2.5-Zellen kein messbarer Ca^{2+} -Einstrom nach OAG-Stimulation. Für TRPC3 und TRPC6 wurde eine PKC-unabhängige Aktivierbarkeit durch OAG gezeigt (Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999). Dagegen ist keines der in diesen Zelllinien identifizierten TRP-Proteine bislang als DAG-sensitiv beschrieben worden. „Antisense“-Experimente von Wu et al. (2002) und auch die Co-Expression von TRPC1 und TRPC3 in HEK293-Zellen zeigen, dass durch die Veränderung der TRP-Zusammensetzung in der Zelle auch die Sensitivität gegenüber OAG beeinflusst ist. Demnach besteht die Möglichkeit, dass TRPC1, TRPV2 und TRPM2 in Kombination einen DAG-aktivierbaren Kanal bilden. Dabei könnte TRPM2 eine entscheidende Funktion ausüben, da nach Erhöhung der TRPM2-Expression der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen nach OAG-Stimulation um mehr als 50% ansteigt (Abb. 6.23 D). Aus der Tatsache, dass EREB2.5 keinen Ca^{2+} -Strom über die Plasmamembran nach OAG-Stimulation ausbilden, lässt sich schließen, dass entweder weitere Komponenten für die OAG-Sensitivität erforderlich sind oder dieses Ergebnis auf die Unterschiede im Proteasom-Mechanismus zurückzuführen ist. Wie schon in Abschnitt 7.3 diskutiert, könnten DAG-Kinasen in diesem Zusammenhang eine entscheidende Funktion haben (Raghu et al., 2000). Aus Abb. 6.23 A, B wird deutlich, dass der Ca^{2+} -Einstrom

über die Plasmamembran sein Maximum nur über einen Zeitraum von etwa 20s aufrechterhalten kann bevor die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration schnell auf ein Plateau sinkt. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass der oder die beteiligten Ionenkanäle durch eine hohe Ca^{2+} -Konzentration negativ reguliert werden. Eine solche „feed-back“-Hemmung wurde z.B. für TRPC3-enthaltende Kanäle gezeigt (Zitt et al., 1997; Halaszovich et al., 2000). Für TRPC-Proteine wurde eine Hemmung durch einen Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex postuliert (Tang et al., 2001).

Zudem wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass ein Grossteil des Ca^{2+} -Einstroms über die Plasmamembran nach BCR-Quervernetzung in P493.6-Zellen vor c-myc-Induktion bereits durch 100nM GdCl_3 hemmbar ist (Abb. 6.25). Eine derart sensitive Hemmbarkeit durch dreiwertige Kationen wurde bislang nur bei I_{CRAC} beschrieben (Parekh und Penner 1997). Diese Daten zeigen auch, dass der Ca^{2+} -Einstrom aus einer Gd^{3+} -sensitiven und einer nicht- Gd^{3+} -sensitiven Komponente besteht, wobei in den ruhenden P493.6-Zellen mit niedriger TRPM2-Expression der Gd^{3+} -sensitive Anteil wesentlich ausgeprägter ist als bei proliferierenden Zellen. Dies könnte bedeuten, dass mindestens zwei Ionenkanäle mit unterschiedlichen Eigenschaften an dem Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran beteiligt sind. Eine andere denkbare Interpretation dieser Daten wäre, dass durch einen höheren Anteil von TRPM2 an einem heteromeren Ionenkanal die Ionenselektivität vermindert wird. Zur genauen Klärung dieser Frage sind elektrophysiologische Messungen notwendig, um den Ionenstrom exakt zu charakterisieren.

Die Untersuchungen an den konditionalen B-Zelllinien P493.6 und EREB2.5 bestätigen deutlich die bereits in den vorangegangenen Kapiteln aufgestellte Hypothese, dass für die Ca^{2+} -Einstrom-Eigenschaften von B-Zellen, einzelne TRP-Proteine nicht isoliert zu betrachten sind, sondern in Kombination mit weiteren Kanalproteinen und anderen, bislang unzureichend identifizierten Komponenten im Signalkomplex einer Zelle organisiert sind. P493.6 könnte ein geeignetes System für die Auflösung des offenbar komplizierten Aktivierungs- und Regulationsmechanismus von TRP-Proteinen sein, da hier über die vollständige Veränderung des Zell-Phänotyps alle für den Ca^{2+} -Einstrom erforderlichen Komponenten auf die neue physiologische Situation angepasst werden und nicht wie bei heterologer Expression oder „antisense“-Experimenten einzelne Teile dieses Systems manipuliert werden. Die Etablierung vergleichbarer Systeme ist für ein Verständnis des Ca^{2+} -Einstroms über die Plasmamembran von nicht spannungsabhängigen Zellen unabdingbar.

8 Literaturverzeichnis

Acharya, J. K., Jalink, K., Hardy, R. W., Hartenstein, V., Zuker, C. S. (1997)

InsP₃-receptor is essential for growth and differentiation but not for vision in *Drosophila*.

Neuron **18**, 881-887.

Albritton, L. M. (1997).

Efficient transfection of fibroblast and epithelial cells using an activated-dendrimer reagent.

J. NIH Res. **9**, 52.

Aman, M. J., Ravichandran, K. S. (2000)

A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca²⁺ flux.

Curr. Biol. **10**, 393-396.

Andrade, W., Seabroock, T. J., Johnston, M. G., Hay, J. B. (1996)

The use of the lipophilic fluorochrome CM-Dil for tracking the migration of lymphocytes.

J. Immunol. Methods **194**, 181-189.

Aoki, Y., Kim, Y.-T., Stillwell, R., Kim, T. J., Pillai, S. (1995)

The SH2 domains of Src family kinases associate with Syk.

J. Biol. Chem. **270**, 15658-15663.

Asada, H., Ishii, N., Sasaki, Y., Endo, K., Kasai, H., Tanaka, N., Takeshita, T., Tsuchiya, S., Konno, T., Sugamura, K (1999)

Grf40 a novel Grb2 family member is involved in T cell signaling through interactions with SLP-76 and LAT.

J. Exp. Med. **190**, 1093-1102.

Babnigg G., Heller, B., Villereal, M. L. (2000)

Cell-to-cell variation in store-operated calcium entry in HEK-293 cells and its impact on the interpretation of data from stable clones expressing exogenous calcium channels.

Cell Calcium **27**(2), 61-73

Barritt, G. J. (1999)

Receptor-activated Ca²⁺ inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca²⁺ signaling requirements.

Biochem. J. **337**, 153-169.

Bennett, V. (1992)

Ankyrins: Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm.
J. Biol. Chem. **267**, 8703-8706.

Bennett, V., Gilligan, D. M. (1993)

The spectrin-based membrane-skeleton and micron-scale organization of the Plasma membrane.
Annu. Rev. Cell Biol. **9**, 27-66.

Berridge, M. J. (1993)

Inositol trisphosphate and calcium signaling.
Nature **361**, 315-325.

Berridge, M. J. (1995)

Capacitative calcium entry.
Biochem. J. **312**, 1-11.

Berridge, M. J. (1997)

Elementary and global aspects of calcium signaling.
J. Exp. Biol. **200**, 315-319.

Berridge, M. J., Irvine, R. F. (1989)

Inositolphosphates and cell signaling.
Nature **341**, 197-205.

Berridge, M. J., Lipp, P., Bootmann, M. D. (2000)

The versatility and universality of calcium signaling.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **1**, 11-21.

Berven, L., Hughes, B. P., Barrit, G. J. (1994)

A slowly ADP-ribosylated pertussis-toxin-sensitive GTP-binding regulatory protein is required for vasopressin-stimulated Ca²⁺ inflow in hepatocytes.
Biochem. J. **299**, 399-407.

Bird, G. S., Bian, X., Putney, Jr., J. W. (1995)

Calcium entry signal?
Nature **373**, 481-482.

Birnbaumer, L, Zhu, X., Jiang, M., Boulay, G., Peyton, M., Vannier, B., Brown, D., Platano, D., Sadeghi, H., Stefani, E., Birnbaumer, M. (1996)

On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 15195-15202.

- Bobanović, L. K., Laine, M., Petersen, C. C. H., Bennet, D., L., Berridge, M. J., Lipp, P., Ripley, S. J., Bootman, M. D. (1999)**
Molecular cloning and immunolocalization of a novel vertebrate *trp* homologue from *Xenopus*.
Biochem. J. **340**, 593-599.
- Bolen, J. B., Brugge, J. S. (1997)**
Leukocyte protein tyrosine kinases: potential targets for drug discovery.
Annu. Rev. Immunol. **15**, 371-404.
- Bootmann, M. D., Berridge, M. J. (1995)**
The elemental principles of calcium signaling.
Cell **83**, 675-678.
- Boulay, G., Brown, D. M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M. X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K., Birnbaumer, L. (1999)**
Modulation of Ca^{2+} entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP) : Evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca^{2+} entry.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 14955-14960.
- Boulay, G., Zhu, X., Peyton, M., Jiang, M., Hurst, R., Stefani, E., Birnbaumer, L. (1997)**
Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila Transient Receptor Potential* (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the G_q class of G protein.
J. Biol. Chem. **272**, 29672-29680.
- Brereton, H. M., Harland, M. L., Auld, A. M., Barrit, G. J. (2000)**
Evidence that the TRP-1 protein is unlikely to account for store-operated Ca^{2+} -inflow in *Xenopus laevis* oocytes.
Mol. Cell Biochem. **214**, 63-74
- Brough, G. H., Wu, S., Cioffi, D., Moore, T. M., Li, M., Dean, N., Stevens, T. (2001)**
Contribution of endogenously expressed Trp1 to a Ca^{2+} -selective, store-operated Ca^{2+} entry pathway.
FASEB J. **15**, 1727-1738
- Budde, P., Bewarder, N., Weinrich, V., Schulzeck, O., Frey, J. (1994)**
Tyrosine-containing sequence motifs of the human immunoglobulin G receptors FcRIIb1 and FcRIIb2 essential for endocytosis and regulation of calcium flux.
J. Biol. Chem. **269**, 30636-30644.

- Bunnell, S. C., Diehn, M., Yaffe, M. B., Findell, P. R., Cantley, L. C., Berg, L. J. (2000)**
Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade.
J. Biol. Chem. **275**, 2219-2230.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., Strelkov, S. V. (2001)**
Coiled coils: a highly versatile protein folding motif.
Trends Cell Biol. **11**, 82-88.
- Calakos, N., Scheller, R. H. (1996)**
Synaptic vesicle biogenesis, docking and fusion: a molecular description.
Physiol. Rev. **76**, 1-29.
- Cambier, J.C. (1995)**
Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM).
J. Immunol. **155**, 3281-3285.
- Campbell, K.S. (1999)**
Signal transduction from the B cell antigen-receptor.
Curr. Opin. Immunol. **11**, 256-264.
- Carafoli, E. (2002)**
Calcium signaling: A tale for all seasons.
Proc. Natl. Acad. Sci. **99**, 1115-1122.
- Carafoli, E., Klee, C. (1999)**
Calcium as a Cellular Regulator. 1st edition, Oxford University Press.
- Casteels, R., Droogmans, G. (1981)**
Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery.
J. Physiol. (London) **317**, 263-279.
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J. (2000)**
Impaired nociceptor and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.
Science **288**, 306-313.
- 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.

Caterina, M. J., Julius, D. (2001)

THE VANILLOID RECEPTOR: A Molecular Gateway to the Pain Pathway.

Annu. Rev. Neurosci. **24**, 487-517.

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.

Catterall, W. A. (2000)

Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca²⁺ channels.

Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **16**, 521-555.

Chevisch, J., Zreunz, A. J., Montell, C. (1997)

Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex.

Neuron **18**, 95-105.

Choquet, D., Partiseti, M., Amigorena, S. Bonnerot, C., Fridmann, W. H., Korn, H. (1993)

Cross-linking of IgG receptors inhibits membrane immunoglobulin-stimulated calcium influx in B lymphocytes.

J. Cell Biol. **121**, 355-363.

Chyb, S., Raghu, P., Hardie, R. C. (1999)

Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL.

Nature **397**, 255-259.

Clapham, D. E. (1995-a)

Calcium signaling.

Cell **80**, 259-268.

Clapham, D. E. (1995-b)

Intracellular calcium. Replenishing the stores.

Nature **375**, 634-635.

Clapham, D. E., Runnels, L. W., Srübing C. (2001)

THE TRP ION CHANNEL FAMILY.

Nat. Rev. Neurosci. **2**, 387-396

Clontech (2002-a)

Website: www.clontech.com

BD Tet-On™ & BD Tet-Off™ Gene Expression Systems, Katalog Nummer K1621-A und 6150-1.

<http://www.clontech.com/techinfo/manuals/PDF/PT3001-1.pdf>

Clontech (2002-b)

Website: www.clontech.com

pIRES2-EGFP-Vektor Katalog Nummer 6029-1.

<http://www.clontech.com/techinfo/vectors/pIRES2-EGFP.html>

Csutora, P., Su, Z., Kim, H. Y., Bugrim, A., Cunningham, K. W., Nuccitelli, R., Keizer, J. E., Hanley, M. R., Blalock, J. E., Marchase, R. B. (1999)

Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores.

Proc. Natl. Acad. Sci. **96**, 121-126.

Dekker, L. V., Parker, P. J. (1994)

Protein kinase C-a question of specificity.

Trends Biochem.Sci. **19**, 73-77.

Delles, C., Haller, T., Dietl, P. (1995)

A highly calcium-selective cation current activated by intracellular calcium release in MDCK cells.

J. Physiol. **486**, 557-569.

Del Sal, G., Manfioletti, G., Schneider, C. (1988).

A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing.

Nuc. Acids Res. **16**, 9878.

Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., Healy, J. I. (1997)

Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration.

Nature **386**, 855-858.

Dolmetsch, R. E., Xu, K., Lewis, R. S. (1998)

Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression.

Nature **392**, 933-936.

Eigen, M. (1960)

Exchange of water around cations.

Z. Electrochem. **64**, 115-130.

Engelke, M. (1999)

Gezielte Mutagenese des Maus-trp1 β -Gens zur Charakterisierung funktioneller Domänen.

Diplomarbeit, Universität Bielefeld.

Engelke, M., Friedrich, O., Budde, P., Schäfer, C., Niemann, U., Zitt, C., Jüngling, E., Rocks, O., Lückhoff, A., Frey, J. (2002)

Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1 β .

FEBS Lett. **523**, 193-199.

Engels, N., Wollscheid, B., Wienands, J. (2001)

Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig- α .

Eur. J. Immunol. **31**, 2126-2134.

Fanning, A. S., Anderson, J. M. (1999)

Protein modules as organizers of membrane structure.

Curr. Opin. Cell Biol. **11**, 432-439.

Fasolato, C., Nilius, B. (1998)

Store depletion triggers the calcium release-activated calcium current (I_{CRAC}) in macrovascular endothelial cells: a comparison with Jurkat and embryonic kidney cell lines.

Pflugers Arch. **436**, 69-74.

Fasolato, C., Hoth, M., Penner, R. (1993)

A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx.

J. Biol. Chem. **268**, 20737-20740.

Fasolato, C., Innocenti, B., Pozzan, T. (1994)

Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels?

Trends Pharmacol. Sci. **15**, 77-83.

Ferris, C. D., Snyder, S. H. (1992)

Inositol 1,4,5-Trisphosphate activated calcium channel.

Ann. Rev. Physiol. **54**, 469-488.

Fill, M., Coronado, R. (1988)

Ryanodine receptor channels of sarcoplasmic reticulum.

Trends Neurosci. **11**, 453-457.

Finn, J. T., Grunwald, M. E., Yau, K.-W. (1996)

Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions.
Annu. Rev. Physiol. **58**, 395-426.

Flaswinkel, H., Reth, M. (1994)

Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig- α protein during signal transduction via the B cell antigen receptor.
EMBO J. **13**, 83-89.

Fluckiger, A.-C., Li, Z., Kato, R. M., Wahl, M. I., Ochs, H. D., Longnecker, R., Kinet, J. P., Witte, O. N., Scharenberg, A. M., Rawlings, D. J. (1998)

Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca^{2+} following B-cell receptor activation.
EMBO J. **17**, 1973-1985.

Foley K. P., (1993)

Quantification of RNA using the Polymerase Chain Reaction.
Trends Genet. **9**, 380-385.

Frauwirth, K. A., Thompson, C. B. (2002)

Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation.
J. Clin. Invest. **109**, 295-299.

Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weißgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V., Nilius, B. (2001)

Lack of endothelial store-operated Ca^{2+} -current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice.
Nat. Cell Biol. **3**, 121-127

Friedrich O. (2001)

Biochemische und funktionelle Charakterisierung des potentiellen Calciumionenkanalproteins Maus Transient Receptor Potential β (mTRP1 β).
Dissertation, Universität Bielefeld.

Friel, D. D. (1996)

TRP: It's Role in Phototransduction and Store-Operated Ca^{2+} Entry.
Cell **85**, 617-619.

Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T., Chan, A. C. (1998)

BLNK: A central linker protein in B cell activation.
Immunity **9**, 93-103.

Fuchs, R., Blakesley, R. (1983).

Guide to the use of type II restriction endocucleases.

Meth. Enzymol. **100**, 3-38.

Fütterer, K., Wong, J., Grucza, R.A., Chan, A.C., Waksman, G. (1998)

Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide.

J. Mol. Biol. **281**, 525-537.

Gamberucci, A., Giurisato, E., Pizzo, P., Tassi, M., Giunti, R., McIntosh, D. P., Benedetti, A. (2002)

Diacylglycerol activates the influx of extracellular cations in T-lymphocytes independently of intracellular calcium-store depletion and possibly involving endogenous *TRP6* products.

Biochem. J. **364**, 245-254

Garcia, R. L., Schilling, W. P. (1997)

Differential Expression of Mammalian *TRP* Homologues across Tissues and Cell Lines.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **239**, 279-283.

Garcia-Martinez C., Morenilla-Palao, C., Planells-Casa R., Merino, J. M., Ferrer-Montiel, A. (2000)

Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties.

J. Biol. Chem. **275**, 32552-32558.

Gavioli, R., Frisan, T., Vertani, S., Bornkamm, G. W., Masucci M. G. (2001)

c-myc overexpression activates alternative pathways for intracellular proteolysis in lymphoma cells.

Nat. Cell Biol. **3** (3), 283-288

Gilon, P., Bird, G. J., Bian, X., Yakel, J. L., Putney, Jr., J. W. (1995)

The Ca²⁺-mobilizing actions of a Jurkat cell extract on mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes.

J. Biol. Chem. **270**, 8050-8055.

Groschner, K., Hingel, S., Lintschinger, B., Balzer, M., Romanin, C., Zhu, X., Schreibmayer, W. (1998)

Trp proteins form store-operated cation channels in human vascular endothelial cells.

FEBS Lett. **437**, 101-106.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985)

A New Generation of Ca^{2+} Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties.

J. Biol. Chem. **260**, 3440-3450.

Gunter, K. K., Gunter, T. E. (1994)

Transport of calcium by mitochondria.

J. Bioenerg. Biomembr. **26**, 471-485.

Gunthorpe, M. J., Benham, C. D., Randall, A., Davis, J. B. (2002)

The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels.

TIPS **23**, 183-191.

Guo, Q. M., Malek, R. L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffly, M., Sanka, K., Lee, N. H., Dang, C. V., Liu, E. T. (2000)

Identification of c-Myc Responsive Genes Using Rat cDNA Microarray.

Cancer Res. **60**, 5922-5928.

Halaszovich, C. R., Zitt, C., Jüngling, E., Lückhoff, A. (2000)

Inhibition of TRP3 channels by lanthanides: block from the cytosolic side of the plasma membrane.

J. Biol. Chem. **275**, 37423-37428.

Hanahan, D. (1985)

DNA-cloning. A practical approach. edited by D. M. Glover, *IRL Press*, Vol. 1, 109-135.

Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K., Mori, Y. (2002)

LTRPC2 Ca^{2+} -Permeable Channel Activated by Changes in Redox Status Confers Susceptibility to Cell Death.

Mol. Cell **9**, 163-173.

Hardie, R. C., Minke, B. (1992)

The trp gene essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors.

Neuron **8**, 643-651.

Hardie, R. C., Minke, B. (1993)

Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization.

Trends Neurosci. **16**, 371-376.

Hardie, R. C., Minke, B. (1995)

Phosphoinositide-mediated phototransduction in Drosophila photoreceptors: the role of Ca²⁺ and trp.

Cell Calcium **18**, 256-274.

Hardie, R. C., Raghu, P. (2001)

Visual transduction in Drosophila.

Nature **413**, 186-193

Hardie, R. C., Raghu, P., Moore, S., Juusola, M., Baines, R. A., Sweeney, S. T. (2001)

Calcium influx via TRP channels is required to maintain PIP₂ levels in Drosophila photoreceptors.

Neuron **30**, 149-159.

Harteneck, C., Plant, T. D., Schultz, G. (2000)

From worm to man: Three subfamilies of TRP channels.

Trends Neurosci. **23**, 159-166.

Hassock, S. R., Zhu, M. X., Trost, C., Flockerzi, V., Authi, K. (2002)

Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel.

Blood **15**, 2801-2811.

Haynes, L., Yau, K. W. (1985)

Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones.

Nature **317**, 61-64.

Hempel, W.M., Schatzman, R.C., DeFranco, A.L. (1992)

Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 upon cross-linking of membrane Ig on murine B lymphocytes.

J. Immunol. **148**, 3021-3027.

Hermosura, M. C., Monteilh-Zoller, M. K., Scharenberg, A. M., Penner, R., Fleig, A. (2002)

Dissociation of the store-operated calcium current I(CRAC) and the Mg-nucleotide-regulated metal ion current MagNuM.

J. Physiol. **539**, 445-458.

Hoenderop, J. G., Hartog, A., Stuiver, M., Doucet, A., Willems, P. H., Bindels, R. J. (2000)

Localization of the epithelial Ca²⁺ channel in rabbit kidney and intestine.

J. Am. Soc. Nephrol. **11**, 1171-1178.

Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T. (2000)

Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2.

Biochem. J. **351**, 115-122.

Hoth, M., Penner, R. (1992)

Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells

Nature **355**, 353-356.

Hoth, M., Penner, R. (1993)

Calcium release-activated calcium current in rat mast cells.

J. Physiol. (London) **465**, 359-386.

Iezzi, G., Karjalainen, K., Lanzavecchia (1998)

The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T-cells.

Immunity **8**, 89-95.

Ikura M. (1996)

Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins.

Trends Biochem. Sci. **21**, 14-17.

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)-adrenoreceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel.

Circ. Res. **88**, 325-332.

Irvin, B. J., Williams, L., Nilson, A. E., Maynor, H. O., Abraham, R. T. (2000)

Pleiotropic contributions of phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) to T-cell antigen receptor mediated signaling: reconstitution studies of a PLC-gamma1-deficient Jurkat T-cell line.

Mol. Cell Biol. **20**, 9149-9161.

Irvine, R. F. (1990)

“Quanta” Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates: a possible mechanism.

FEBS Lett. **263**, 5-9.

Irvine, R. F. (1992)

Inositol phosphates and Ca^{2+} entry: toward a proliferation or a simplification?

FASEB J. **6**, 3085-3091.

Iwasawa, K., Nakajima, T., Hazama, H., Goto, A., Shin, W. S., Toyo-oka, T., Omata, M. (1997)

Effects of extracellular pH on receptor-mediated Ca^{2+} influx in A7r5 rat smooth muscle cells: Involvement of two different types of channel.

J. Physiol. (London) **503**, 237-251.

Jones, B., Tite, J.P., Janeway, C.A. (1986)

Different phenotypic variants of the mouse B cell tumor A20/2J are selected by antigen- and mitogen-triggered cytotoxicity of L3T4-positive, I-A-restricted T cell clones.

J. Immuno. **136**, 348-356.

Jordt, S. E., Julius, D. (2002)

Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chilli peppers.

Cell **108**, 421-430.

Jungnickel, M. K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J. R., Flormann, H. M. (2001)

Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3.

Nat. Cell Biol. **3**, 499-502.

Kanzaki, M., Zhang, Y. Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H., Kojima, I. (1999)

Translocation of calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I.

Nat. Cell Biol. **1**, 165-170.

Kaupp, U. B., Seifert, R. (2002)

Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels.

Physiol. Rev. **82**, 769-824.

Kim, H. Y., Thomas, D., Hanley, M. R. (1995)

Chromatographic resolution of an intracellular calcium influx factor from thapsigargin-activated Jurkat cells. Evidence for multiple activities influencing calcium elevation in *Xenopus* oocytes.

J. Biol. Chem. **270**, 9706-9708.

Kiselyov, K., Mignery, G. A., Zhu, M. X., Muallem, S. (1999)

The N-Terminal Domain of the IP₃ Receptor Gates Store-Operated hTrp3 Channels.

Mol. Cell **4**, 423-429.

Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G. A., Zhu, M. X., Muallem, S. (1998)

Functional interaction between InsP₃ receptors and store-operated Htrp3 channels.

Nature **396**, 478-482.

Krause, E., Pfeiffer, F., Schmid, A., Schulz, I. (1996)

Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells.

J. Biol. Chem. **271**, 32523-32528.

Krause, E., Schmid, A., Gonzalez, A., Schulz, I. (1999)

Low cytoplasmic [Ca²⁺] activates I_{CRAC} independently of global store depletion in RBL-1 cells.

J. Biol. Chem. **274**, 36957-36962.

Krautwurst, D., Seifert, R., Hescheler, J., Schultz, G. (1992)

Formyl peptides and ATP stimulated Ca²⁺ and Na⁺ inward currents through non-selective cation channels via G-proteins in dibutyl cyclic AMP-differentiated HL60-cells. Involvement of Ca²⁺ and Na⁺ in the activation of β-glucuronidase release and superoxid production.

Biochem. J. **288**, 1025-1035.

Krebs, D. L., Yang, Y., Dang, M., Haussmann, J., Gold, M. R. (1998)

Rapid and efficient retrovirus-mediated gene transfer into B cell lines.

Met. Cell Sci. **21**, 57-68.

- Kurosaki, T., Johnson, S.A., Pao, L., Sada, K., Yamamura, H., Cambier, J.C. (1995)**
Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling.
J. Exp. Med. **182**, 1815-1823.
- Kurosaki, T. (1999)**
Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling.
Annu. Rev. Immunol. **17**, 555-592.
- Laemmli, U. K. (1970)**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-685.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A.-L., Scharenberg, A. M., Penner, R., Kinet, J.-P. (2002)**
TRPM4 Is a Ca²⁺-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarisation.
Cell **109**, 397-407.
- Law, C. L., Ewings, M. K., Chaudhary, P. M., Solow, S. A., Yun, T. J., Marshall, A. J., Hood, L., Clark, E. A. (1999)**
GrpL, a Grb2-related adaptor protein, interacts with SLP-76 to regulate nuclear factor of activated T cell activation.
J. Exp. Med. **189**, 1243-1253.
- Lechleiter, J., Peralta, E., Clapham, D. (1989)**
Diverse functions of muscarinic acetylcholine receptor subtypes.
TIPS Suppl., 34-38.
- Leeuwen, J. E. und Samelson, L. E. (1999)**
T cell antigen-receptor signal transduction.
Curr. Opin. Immunol. **11**, 242-248.
- Leo, A., Wienands, J., Baier, G., Horejsi, V., Schraven, B. (2002)**
Adapters in lymphocyte signaling.
J. Clin. Invest. **109**, 301-309.
- Lepple-Wienhues, A., Cahalan, M. D. (1996)**
Conductance and permeation of monovalent cations through depletion-activated Ca²⁺ channels (I_{CRAC}) in Jurkat T cells.
Biophys. J. **71**, 787-794.

Lepple-Wienhues, A., Cahalan, M. D. (1997)

A Mysterious Channel: Properties of the Capacitive Ca^{2+} Channel in Lymphocytes.
Cell. Physiol. Biochem. **7**, 219-228.

Lewis, R. S., Cahalan, M. D. (1989)

Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T cells.
Cell. Regul. **1**, 99-112.

Liedke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedmann, J. M., Heller, S. (2000)

Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor.
Cell **103**, 525-535.

Liman, E. R., Corey, D. P., Dulac, C. (1999)

TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling.
Proc. Natl. Acad. Sci. **96**, 5791-5796.

Lin, R. C., Scheller, R. H. (1997)

Structural organization of the synaptic exocytosis core complex.
Neuron **19**, 1087-1094.

Lintschinger, B., Balzer-Geldsetzer, M., Baskaran, T., Graier, W. F., Romanin, C., Zhu, M., X., Groschner, K. (2000)

Coassembly of Trp1 and Trp3 Proteins Generates Diacylglycerol- and Ca^{2+} -sensitive Cation Channels.
J. Biol. Chem. **275**, 27799-27805.

Liu, S. K., Fang, N., Koretzky, G. A., McGlade, C. J. (1999)

The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors.
Curr. Biol. **9**, 67-75.

Liu, X., Wang, W., Singh, B. B., Lockwich, T., Jadlowiec, J., O'Connell, B., Wellner R., Zhu, M. X., Ambudkar, I. S. (2000)

Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca^{2+} influx mechanism in salivary gland cells.
J. Biol. Chem. **275**, 3403-3411.

Lockwich, T. P., Liu, X., Singh, B. B., Jadowiec, J., Weiland, S., Ambudkar, I. S. (2000)

Assembly of Trp1 in a signaling Complex Associated with Caveolin-Scaffolding Lipid Raft Domains.

J. Biol. Chem. **275**, 11934-11942.

Lockwich, T., Singh, B. B., Liu, X., Ambudkar, I. S. (2001)

Stabilisation of Cortical Actin Induces Internalization of Transient Receptor Potential 3 (Trp3)-associated Caveolar Ca^{2+} Signaling Complex and Loss of Ca^{2+} Influx without Disruption of TRP3-Inositol Trisphosphate Receptor Association.

J. Biol. Chem. **276**, 42401-42408.

Ma, H.-T., Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K., Gill, D. L. (2000)

Requirement of the Inositol Trisphosphate Receptor for Activation of Store-Operated Ca^{2+} Channels.

Science **287**, 1647-1651.

Ma, H.-T., Venkatachalam, K., Li, H. S., Montell, C., Kurosaki, T., Patterson, R. L., Gill, D. L. (2001)

Assessment of the role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the activation of transient receptor potential channels and store-operated Ca^{2+} -entry channels.

J. Biol. Chem. **276**, 18888-18896.

Mackrill, J. J. (1999)

Protein-protein interactions in intracellular Ca^{2+} -release channel function.

Biochem. J. **337**, 345-361.

Macrez-Leprêtre, N, Kalkbrenner, F., Schultz, G., Mironneau, J. (1997)

Distinct Functions of G_q and G_{11} Proteins in Coupling α_1 -Adrenoreceptors to Ca^{2+} Release and Ca^{2+} Entry in Rat Portal Vein Myocytes.

J. Biol. Chem. **272**, 5261-5268.

Mahajan, S., Fagnoli, J., Burkhardt, A. L., Kut, S. A. (1995)

Src family protein tyrosine kinases induce autoactivation of Bruton's tyrosine kinase.

Mol. Cell Biol. **5**: 5304-5311.

Malayev, A., Nelson, D. J. (1995)

Extracellular pH modulates the Ca^{2+} current activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores in human macrophages.

J. Membr. Biol. **146**, 101-111.

McDonald, T. V., Premack, B. A., Gardner, P. (1993)

Flash photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate activates plasma membrane calcium current in human T cells.

J. Biol. Chem. **268**, 3889-3896.

McDonell, M. W., Simon, M. N., Stuider, F. W. (1977)

Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoreses in neutral and alkaline gels.

J. Mol Biol **110**, 119-146

McKay, R. R., Szymeczek-Seay, C. L., Lievremont, J.-P., Bird, G. St. J., Zitt, C., Jüngling, E., Lückhoff, A., Putney, J. W., Jr. (2000)

Cloning and expression of the human transient receptor potential 4 (TRP4) gene: localization and functional expression of human TRP4 and TRP3.

Biochem. J. **351**, 735-746.

McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., Julius, D. (2002)

Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation.

Nature **416**, 52-58.

McLachlin, J. R., Cornetta, K., Eglitis, M. A., Anderson, W.F. (1990)

Retroviral Mediated Gene Transfer.

Prog. Nuc. Acid Res. **38**, 91-136.

Merrit, J. E., Jakob, L., Hallman, T. J. (1989)

Use of manganese to discriminate between calcium influx and mobilization from internal stores in stimulated human neutrophils.

J. Biol. Chem. **264**, 1522-1527.

Mery, L., Straß, B., Dufour, J. F., Krause, K. H., Hoth, M. (2002)

The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface expression in HEK293 cells.

J. Cell Sci. **115**, 3497-3508.

Michaely P. and Bennett, V. (1993)

The membrane-binding of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin repeats.

J. Biol. Chem. **268**, 22703-22709.

Minke, B., Selinger, Z. (1996)

The roles of *trp* and calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila*.

Curr. Opin. Neurobiol. **6**, 459-466.

Montell, C. (1997)

New light on TRP and TRPL
Mol. Pharmacol. **52**, 755-763.

Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V. (2002)

The TRP Channels, a Remarkably Functional Family.
Cell **108**, 595-598.

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.

Mori, Y., Wakamori, M., Miyakawa, T., Hermosura, M., Hara, Y., Nishida, M., Hirose, K., Mizushima, A., Kurosaki, M., Mori, E., Gotoh, K., Okada, T., Fleig, A., Penner, R., Iino, M., Kurosaki, T. (2002)

Transient Receptor Potential 1 Regulates Capacitative Ca^{2+} Entry and Ca^{2+} Release from Endoplasmic Reticulum in B Lymphocytes.
J. Exp. Med. **195**, 673-681.

Morita, S., Kojima, T., Kitamura, T. (2000)

Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses.
Gene Therapy **7**, 1063-1066.

Morris A. J., Scarlata, S. (1997)

Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes.
Biochem. Pharmacol. **54**, 429-435.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986)

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **51 Pt 1**, 263-273.

Mustelin, T., Pessa-Morikawa, T., Autero, M., Gassmann, M., Andersson, L.C., Gahmberg, C.G., Burn, P. (1992)

Regulation of the p59fyn protein tyrosine kinase by the CD45 phosphotyrosine phosphatase.
Eur. J. Immunol. **22**: 1173-1178.

Nadler, M. J. S., Hermosura, M. C., Inabe, K., Perraud, A.-L., Zhu, Q., Stokes, A. J., Kurosaki, T., Kinet, J.-P., Penner, R., Scharenberg, A. M., Fleig, A. (2001)

LTRPC7 is a Mg-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability.
Nature **411**, 590-595.

Nagai, K., Takata, M., Yamamura, H., Kurosaki, T. (1995)

Tyrosine phosphorylation of Shc is mediated through Lyn and Syk in B-cell receptor signaling.

J. Biol. Chem. **270**, 6824-6829.

Nagamine, K., Kudoh, J., Minoshima, S., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito, F., Shimizu, N. (1998)

Molecular Cloning of a Novel Putative Ca^{2+} Channel Protein (TRPC7) Highly Expressed in Brain.

Genomics **54**, 124-131.

Nakai, B. H., Kubo, T., Fukuda, K., Akiba, I., Maeda, A., Mishina, M., Numa, S. (1988)

Different sensitivities to agonist of muscarinic acetylcholine receptor subtypes.

FEBS Lett. **240**, 95-100.

Nakemura, T. und Gold, G. H., (1987)

A cyclic-nucleotide gated conductance in olfactory receptor cilia.

Nature **325**, 442-444.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. (1982)

Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields.

EMBO J. **1**, 841-854.

Newton, A. C. (1997)

Regulation of protein kinase C.

Curr. Opin. Cell Biol. **9**, 161-167.

Nilius, B., Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J., Droogmanns, G. (2000)

Whole-cell and single channel monovalent cation currents through the novel rabbit epithelial Ca^{2+} channel ECaC.

J. Physiol. **527**, 239-248.

Nilius, B., Prenen, J., Vennekens, R., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J., Droogmanns, G. (2001)

Modulation of the epithelial Ca^{2+} channel ECaC by intracellular Ca^{2+} .

Cell Calcium **29**, 417-428.

Nowycky, M. C., Thomas, A. P. (2002)

Intracellular calcium signaling.

J. Cell Sci. **115**, 3715-3716.

Oancea, E., Meyer, T. (1998)

Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals.

Cell **95**, 307-318.

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. Ca²⁺-PERMEABLE CATION CHANNEL THAT IS CONSTITUTIVELY ACTIVATED AND ENHANCED BY STIMULATION OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR:

J. Biol. Chem. **274**, 27359-27370.

Okada, T., Maeda, A., Iwamatsu, A., Gotoh, K., Kurosaki, T. (2000)

BCAP: The Tyrosine Kinase Substrate that Connects B Cell Receptor to Phosphoinositide 3-Kinase Activation.

Immunity **13**, 817-827.

Okada, T., Shimizu, S., Wakamori, M., Maeda, A., Kurosaki, T., Takada, N., Imoto, K., Mori, Y. (1998)

Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Receptor Activated TRP Ca²⁺ Channel from Mouse Brain.

J. Biol. Chem. **273**, 10279-10287.

Ong H. L., Chen, J., Chataway, T., Brereton, H., Zhang, L., Downs, T., Tsiokas, L., Barritt, G. (2002)

Specific detection of the endogenous transient receptor potential (TRP)-1 protein in liver and airway smooth muscle cells using immunoprecipitation and Western-blot analysis.

Biochem. J. **364**, 641-648.

Pajic, A., Spitkovsky, D., Kempkes, C. B., Schumacher, M., Staeger, M. S., Brielmeier, M., Ellwart, J., Bornkamm, G. W., Polack, A., Eick, D. (2000)

Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line.

Int. J. Cancer **87**, 787-793.

Pajic, A., Staeger, M. S., Dudziak, D., Schumacher, M., Spitkovsky, D., Eissner, G., Brielmeier, M., Polack, A., Bornkamm, G. W. (2001)

Antagonistic effects of c-myc and Epstein-Barr virus latent genes on the phenotype of human B cells.

Int. J. Cancer **93**, 810-816.

Pak, W. L., Grossfield, J., Arnold, K. S. (1970)

Mutants of the visual pathway of *Drosophila melanogaster*.

Nature **227**, 518-520.

Parekh, A. B., Penner, R. (1997)

Store depletion and calcium influx.

Physiol. Rev. **77**, 901-930.

Parekh, A. B., Terlau, H., Stühmer, W. (1993)

Depletion of Ins_3 stores activates a Ca^{2+} and K^+ current by means of a phosphatase and a diffusible messenger.

Nature **364**, 814-818.

Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Gill, D. L. (1999)

Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for secretion-like coupling model.

Cell **98**, 487-499.

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.

Perraud, A. L., Fleig, A., Dunn, C. A., Bagley, L. A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A. J., Zhu, Q., Bessmann, M. J., Penner, R., Kinet, J-P., Scharenberg, A. M. (2001)

ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology.

Nature **411**, 595-598.

Phillips, A. M., Bull, A., Kelly, L. E. (1992)

Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene.

Neuron **8**, 631-642.

Poenie, M., Alderton, J., Tsien, R. Y., Steinhardt, R. A. (1985)

Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle.

Nature **315**, 147-149.

Polack, A., Hörtnagel, K., Baier, B., Falk, M., Mautner, J., Geltinger, C., Bornkamm, G. W., Kempkes, B. (1996)

c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1.

Proc. Natl. Acad. Sci. **93**, 10411-10416.

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., Meldolesi, J. (1994)

Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores.
Physiol. Rev. **74**, 595-636.

Prekeris, R., Mayhew, M. W., Cooper, J. B., Terrian, D. M. (1996)

Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function.
J. Cell. Biol. **132**, 77-90.

Premkumar, L. S., Ahern, G. P. (2000)

Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C.
Nature **408**, 985-990.

Preuss, K. D., Noller, J. K., Krause, E., Gobel, A., Schulz, I. (1997)

Expression and characterisation of a trpl homolog from rat.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **240**, 167-172.

Putney, Jr., J. W. (1976a)

Biphasic modulation of potassium release in rat parotid gland by carbachol and phenylephrine.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **198**, 375-384.

Putney, Jr., J. W. (1976b)

Stimulation of ⁴⁵Ca influx in rat parotid gland by carbachol.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **199**, 526-537.

Putney, Jr., J. W. (1986)

A model for receptor-regulated calcium entry.
Cell Calcium **7**, 1-12.

Putney, Jr., J. W. (1990)

Capacitative calcium entry revisited.
Cell Calcium **11**, 611-624.

Putney, Jr., J. W. and Bird, G. St. J. (1993)

The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells.
Endocr. Rev. **14**, 610-631.

Qian D., Weiss, A. (1997)

T cell antigen signal transduction.
Curr. Opin. Cell Biol. **9**, 205-212.

Raghu, P., Colley, N. J., Webel, R., James, T., Hasan, G., Danin, M., Selinger, Z., Hardie, R. C. (2000)

Normal Phototransduction in *Drosophila* Photoreceptors Lacking an InsP₃ Receptor Gene.

Mol. Cel. Neurosci. **15**, 429-445.

Raghu, P., Usher, K., Jonas, S., Chyb, S., Polyanovsky, A., Hardie, R. C. (2000)

Constitutive Activity of the Light –Sensitive Channels TRP and TRPL in the *Drosophila* Diacylglycerol Kinase Mutant, *rdgA*.

Neuron **26**, 169-179.

Randriamampita, C., Tsien, R. Y. (1993)

Emptying of intracellular calcium stores release a novel small messenger that stimulates calcium influx.

Nature **364**, 809-814.

Randriamampita, C., Tsien, R. Y. (1995)

Degradation of a calcium influx factor (CIF) can be blocked by phosphatase inhibitors or chelation of Ca²⁺.

J. Biol. Chem. **270**, 29-32.

Rawlings, D. J., Scharenberg, A. M., Park, H., Wahl, M. I., Lin, S., Kato, R. M., Fluckiger, A.-C., Witte, O.N., Kinet, J.-P. (1996)

Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases.

Science **271**, 822-825.

Rebecchi, M. J., Pentylala, S. N. (2000)

Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C.

Physiol. Rev. **80**, 1291-1335.

Reth, M. (1989)

Antigen receptor tail clue.

Nature **338**, 383-384.

Reth, M., Wienands, J. (1997)

Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor.

Annu. Rev. Immunol. **15**, 453-479.

Rhee, S. G. (2001)

Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C.

Annu. Rev. Biochem. **70**, 281-312.

Rosado, J. A., Brownlow, S. L., Sage, S. O. (2002)

Endogenously Expressed TRP1 Is Involved in Store-mediated Ca^{2+} Entry by Conformational Coupling in Human Platelets.

J. Biol. Chem. **277**, 42157-42163.

Rosado, J. A., Jenner, S., Sage, S. O. (2000a)

A Role for the Actin Cytoskeleton in the Initiation and Maintenance of Store-mediated Calcium Entry in Human Platelets.

EVIDENCE FOR CONFORMATIONAL COUPLING.

J. Biol. Chem. **275**, 7527-7533.

Rosado, J. A., Graves, D., Sage, S. O. (2000b)

Tyrosine kinases activate store-mediated Ca^{2+} entry in human platelets through the reorganization of the actin cytoskeleton.

Biochem. J. **351**, 429-437.

Rosado, J. A., Porras, T., Conde, M., Sage, S. O. (2001)

Cyclic Nucleotides Modulate Store-mediated Calcium Entry through the Activation of Protein-tyrosine Phosphatases and Altered Actin Polymerization in Human Platelets.

J. Biol. Chem. **276**, 15666-15675.

Rosado, J. A., Sage, S. O. (2000)

Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca^{2+} stores are depleted.

Biochem. J. **350**, 631-635.

Rosado, J. A., Sage, S. O. (2001)

Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II and human transient receptor potential (hTrp1) channels in human platelets.

Biochem. J. **356**, 191-198.

Runnels, L. W., Yue, L., Clapham, D. E. (2001)

TRP-PLIK, a Bifunctional Protein with Kinase and Ion Channel Activities.

Science **291**, 1043-1047.

Runnels, L. W., Yue, L., Clapham, D. E. (2002)

The TRPM7 channel is inactivated by PIP_2 hydrolysis.

Nat. Cell Biol. **4**, 329-336.

Sakura, H., Ashcroft, F. M. (1997)

Identification of four trp1 gene variants murine pancreatic beta-cells.

Diabetologia **40**, 528-532.

Salim, K., Bottomley, M. J., Querfurth, E., Zvelebil, M. J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R. L., Gigg, R., Smith, C. I. E., Driscoll, P. C., Waterfield, M. D., Panayotou, G. (1996)

Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase.

EMBO J. **15**, 6241-6250

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989)

Molecular Cloning. A laboratory manual 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schäfer, C. (1998)

Klonierung und Expression verschiedener Varianten der aminoterminalen cytoplasmatischen Domäne eines potentiellen Calciumkanals aus Maus B-Zellen zur Gewinnung spezifischer polyklonaler Antikörper.

Diplomarbeit, Universität Bielefeld.

Schäfer, C. (2002)

Dissertation in Vorbereitung, Universität Bielefeld.

Schaefer, M., Plant, T. D., Obdukhov, A. G., Hofmann, T., Gudermann, T., Schultz, G. (2000)

Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5.

J. Biol. Chem. **275**, 17517-17526.

Scharenberg, A. M., El-Hillal, O., Fruman, D. A., Beitz, L.O., Li, Z., Lin, S., Gout, I., Cantley, L. C., Rawlings, D. J., Kinet, J.-P. (1998)

Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P₃)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals.

EMBO J. **17**, 1961-1972.

Scharenberg, A. M., Kinet, J.-P. (1998)

PtdIns-3,4,5-P₃: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals.

Cell **94**: 5-8.

Schumacher, M. A., Moff, I., Sudanagunta, S. P., Levine, J. D. (1999)

Molecular cloning of an N-terminal splice variant of the capsaicin receptor.

J. Biol. Chem. **275**, 2756-2762.

- Schumacher, M., Kohlhuber, F., Hölzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G. W., Laux, G., Polack, A., Weide, U. H., Eick, D. (2001)**
The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc.
Nucleic Acid Res. **29**(2), 397-406.
- Sedgwick, S. G., Smerdon, S. J. (1999)**
The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework.
TIBS **24**, 311-316.
- Shieh, B.-H., Zhu, M.-Y. (1996)**
Regulation of the TRP Ca²⁺ channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors.
Neuron **16**, 991-998.
- Simons, K., Ikonen, E. (1997)**
Functional rafts in cell membranes.
Nature **387**, 569-572.
- Singh, B. B., Liu, X., Ambudkar, I. (2000)**
Expression of Truncated Transient Receptor Potential Protein (Trp1 α): EVIDENCE THAT THE TRP1 C-TERMINUS MODULATES STORE-OPERATED CA²⁺ ENTRY.
J. Biol. Chem. **275**, 36483-36486.
- Sinkins, W. G., Estacion, M., Schilling, W. G. (1998)**
Functional expression of TrpC1: a human homologue of the *Drosophila* Trp channel.
Biochem. J. **331**, 331-339.
- Sinkins, W. G., Vaca, L., Hu, Y., Kunze, D. L., Schilling, W. P. (1996)**
The COOH-terminal domain of *Drosophila* TRP channels confers thapsigargin sensitivity.
J. Biol. Chem. **271**, 2955-2960.
- Somasundaram, B., Norman, J. C., Mahaut-Smith, M. P. (1995)**
Primaquine, an inhibitor of vesicular transport, blocks the calcium-release-activated current in rat megakaryocytes.
Biochem. J. **309**, 725-729.
- Sproul, T. W., Malapati, S., Kim, J., Pierce, S. K. (2000)**
Cutting edge: B cell antigen receptor signaling occurs outside lipid rafts in immature B-cells.
J. Immunol. **165**, 6020-6023.
- Sternweis, P. C., Smrcka, A. V. (1992)**
Regulation of phospholipase C by G proteins.
TIBS **17**, 502-506.

Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D., Dixon, R. A. F. (1994)

Structure and function of G-protein coupled receptors.

Ann. Rev. Biochem. **63**, 101-132.

Stratagene (2001-a)

Webseite: <http://www.stratagene.com>

Bakterienstamm SCS110 Katalog-Nr. 200275

<http://www.stratagene.com/manuals/200275.pdf>

Stratagene (2001-b)

Webseite: <http://www.stratagene.com>

Bakterienstamm XL1blue

<http://www.nature.com/display/stratagene/cell.htm>

Stratagene (2001-c)

Webseite: <http://www.stratagene.com>

Vektor pBlueskriptII KS

<http://www.stratagene.com/vectors/selection/plasmid1.htm>

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.

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.

Su, Y.-W., Zhang, Y., Schweikert, J., Koretzky, G. A., Reth, M., Wienands, J. (1999)

Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases.

Eur. J. Immunol. **29**, 3702-3711.

Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A. T. (1998)

Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4Å resolution.

Nature **395**, 347-353.

Takata, M., Homma, Y., Kurosaki, T. (1995)

Requirement of phospholipase C- γ 2 activation in surface immunoglobulin M-induced B cell apoptosis.

J. Exp. Med. **182**, 907-914.

Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., Kurosaki, T. (1994)

Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways.

Embo J. **13**, 1341-1349.

Takemura, H., Hughes, A. R., Thastrup, O., Putney, J. W. Jr. (1989)

Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane.

J. Biol. Chem. **264**, 12266-12271.

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., Numa, S. (1987)

Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle.

Nature **328**, 313-318.

Tang, J., Lin, Y., Zhang, Z., Tikunova, S., Birnbaumer, L., Zhu, M. X. (2001)

Identification of Common Binding Sites for Calmodulin and IP₃ receptors on the Carboxyl-Termini of Trp Channels.

J. Biol. Chem. **276**, 21303-21310.

Tang M. X., Redemann, C.T., Szoka, Jr, F. C. (1996)

In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers.

Bioconjugate Chem. **7**, 703.

Tang, Y., Tang, J., Chen, Z., Trost, C., Flockerzi, V., Li, M., Ramesh, V., Zhu, M. X. (2000)

Association of Mammalian Trp4 and Phospholipase C Isozymes with a PDZ-Domain containing Protein, NHERF.

J. Biol. Chem. **275**, 37559-37564.

Taylor, W. (1990)

The role of G proteins in transmembrane signaling.

Biochem. J. **272**, 1-13.

Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R., Dawson, A. P. (1990)

Thapsigargin, a tumor promotor, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 2466-2470.

Thastrup, O., Dawson, A. P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Bjerrum, P. J., Christensen, S. B., Hanley, M. R. (1989)

Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage.

Agents Actions **27**, 17-23.

Thomas, D., Hanley, M. R. (1995)

Evaluation of calcium influx factors from stimulated Jurkat T-lymphocytes by microinjection into *Xenopus* oocytes.

J. Biol. Chem. **270**, 6429-6432.

Toker, A., Cantley, L.C. (1997)

Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase.

Nature **387**, 673-676.

Tomita, Y., Kaneko, S., Funayama, M., Kondo, H., Satoh, M., Akaike, A. (1998)

Intracellular Ca²⁺ store-operated influx of Ca²⁺ through TRP-R, a rat homologue of TRP, expressed in *Xenopus* oocytes.

Neurosci. Lett. **248**, 195-198.

Topham, M. K., Prescott, S. M. (1999)

Mammalian Diacylglycerol Kinases a Family of Lipid Kinases with Signaling Functions.

J. Biol. Chem. **274**, 11447-11450.

Tsien, R. Y., Rink, R. Y., Poenie, M. (1985)

Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths.

Cell Calcium **6**, 145-157.

Tsiokas, L., Arnould, T., Zhu, C., Kim, E., Walz, G., Sukhatme, V. P. (1999)

Specific association of the gene product of *PKD2* with the TRPC1 channel.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 3934-3939.

Tsunoda, S., Zuker, C. S. (1999)

The organization of INAD-signaling complexes by a multivalent PDZ-domain protein in *Drosophila* photoreceptor cells ensures sensitivity and speed of signaling.

Cell Calcium **26**, 165-171.

Tuvia, S., Buhusi, M., Davis, L., Reedy, M., Bennett, V. (1999)

Ankyrin-B Is Required for Intracellular Sorting of Structurally Diverse Ca²⁺ Homeostasis Proteins.

J. Cell Biol. **147**, 995-1007.

van Blitterswijk, W. J., Houssa, B. (2000)

Properties and functions of diacylglycerol kinases.

Cellular Signaling **12**, 595-605.

Vancompernelle, K., Goethals, M., Huet, C., Louvard, D., Vandekerckhove, J. (1992)

G- to F-actin modulation by a single amino acid substitution in the actin binding site of actobindin and thymosin beta 4.

EMBO J. **11**, 4739-4746.

Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Bubb, M. R., Korn, E. D. (1991)

The interfaces of actin and Acanthamoeba actomindin Identification of a new actin-binding motif.

J. Biol. Chem. **266**, 15427-15431.

Van Den Herik-Oudijk, I. E., Westerdal, N. A., Henriquez, N. V., Capel, P. J., van de Winkel, J. G. (1994)

Functional analysis of human Fc γ RII (CD23) isoforms expressed in B lymphocytes.

J. Immunol. **152**, 574-585.

Vannier, B., Peyton, M., Boulay, G., Brown, D., Qin, N., Jiang, M., Zhu, X., Birnbaumer, L. (1999)

Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca²⁺ entry channel.

Proc. Natl. Acad. Sci. **96**, 2060-2064.

Vara J. A., Portela A., Ortin, J., Jiminez, A. (1986)

Expression in mammalian cells of a gene from *Streptomyces alboniger* conferring puromycin.

Nucleic Acid Res. **14**, 4617-4624.

Vazques, G., Lievremont, J. P., Bird, G. S. J., Putney, J. W. (2001)

Human Trp3 forms both inositol trisphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B-lymphocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. **98**, 11777-11782.

Venkatachalam, K., Ma, H. T., Ford, D. L., Gill, D. L. (2001)

Expression of functional receptor-coupled TRPC3 channels in DT40 triple receptor InsP3 knockout cells.

J. Biol. Chem. **276**, 33980-33985.

- Vennekens, R., Voets, T., Bindels, R. J. M., Droogmans, Nilius, B. (2002)**
Current understanding of mammalian TRP homologues.
Cell Calcium **31**, 253-264.
- von zur Mühlen, F., Eckstein, F., Penner, R. (1991)**
Guanosine 5'-[β -Thio]Triphosphate Selectively Activates Calcium Signaling in Mast Cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 926-930.
- Wang, D., Feng, J., Wen, R., Marine, J. C., Sangster, M. Y., Parganas, E., Hoffmeyer, A., Jackson, C. W., Cleveland, J. L., Murray, P. J., Ihle, J. N. (2000)**
Phospholipase C γ 2 is essential in the functions of B-cell and several Fc-receptors.
Immunity **13**, 25-35.
- Wang, W., O'Connell, B., Dykeman, R., Sakai, T., Delporte, C., Swaim, W., Zhu, X., Birnbaumer, L., Ambudkar, I. S. (1999)**
Cloning of Trp1 β isoform from rat brain: immunodetection and localization of the endogenous Trp1 protein.
Cell Physiol. **45**, C969-C979.
- 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. (2002)**
Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives.
J. Biol. Chem. **277**, 13569-13577.
- Weinstein, H., Mehler, E. L. (1994)**
Ca(2+)-binding and structural dynamics in the functions of calmodulin.
Annu. Rev. Physiol. **56**, 213-236.
- Wes, P., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., Montell, C. (1995)**
TRPC1, a Human Homologue of a *Drosophila* Store-Operated Channel.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 9652-9656.
- White, S. P., Scott, D. L., Otwinowski, Z., Gelb, M. H., Sigler, P. B. (1990)**
Crystal structure of Cobra phospholipase A₂ in a complex with a transition state analogue.
Science **250**, 1560-1566.
- White, T. J., Arnheim, N., Erlich, H. A. (1989)**
The polymerase chain reaction.
Trends Genet. **5**, 185-189.

Wienands, J., Freuler, F., Baumann, G. (1995)

Tyrosine-phosphorylated forms of Ig- β , CD22, TCR- ζ and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of Syk.

Internatl. Immunol. **7**, 1701-1708.

Wienands, J., Schweikert, J., Wollscheid, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J., Reth, M. (1998)

SLP-65: A new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation.

J. Exp. Med. **188**, 791-795.

Wissenbach, U., Bödding, M., Freichel, M., Flockerzi, V. (2000)

Trp12, a novel Trp related protein from kidney.

FEBS Lett. **485**, 127-134.

Wissenbach, U., Schroth, G., Philipp, S., Flockerzi, V. (1998)

Structure and mRNA expression of a bovine trp homologue related to mammalian trp2 transcripts.

FEBS Lett. **429**, 61-66.

Wu, X., Babnigg, G., Villereal, M. L. (2000)

Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca²⁺ entry in HEK-293 cells.

Am. J. Physiol. Cell Physiol. **278**, C526-536.

Wu, X., Babnigg, G., Zagranichnaya, Villereal, M. L. (2002)

The Role of Endogenous Human TRP4 in Regulating Carbachol Induced Calcium Oscillations in HEK-293 Cells.

J. Biol. Chem. **277**, 13597-13608.

Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., Seed, B. (1998)

Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation.

Immunity **8**, 723-732.

Xu, S. Z., Beech, D. J. (2001)

TrpC1 Is a Membrane-Spanning Subunit of Store-Operated Ca²⁺ Channels in Native Vascular Smooth Muscle Cells.

Circ. Res. **88**, 84-87.

Xu, X., Star, R. A., Tortorici, G., Muallem, S. (1994)

Depletion of intracellular Ca²⁺ stores activates nitric-oxide synthase to generate cGMP and regulate Ca²⁺ influx.

J. Biol. Chem. **269**, 12645-12653.

Xu, X. Z., Li, H. S., Guggino, W. B., Montell, C. (1997)

Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance.
Cell **89**, 1155-1164.

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. **98**, 10692-10697.

Yablonski, D., Kadlecsek, T., Weiss, A. (2001)

Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT.
Mol. Cell Bio. **21**, 4208-4218.

Yablonski, D., Weiss, A. (2001)

Mechanisms of Signaling by the Hematopoietic-Specific Adaptor Proteins, SLP-76 and LAT and Their B Cell Counterpart, BLNK/SLP-65.
Adv. Immunol. **79**, 93-128.

Yamazaki, T., Takeda, K., Gotoh, K., Takeshima, H., Akira, S., Kurosaki, T. (2002)

Essential Immunoregulatory Role for BCAP in B Cell Development and Function.
J. Exp. Med. **195**, 535-545.

Yang, S.-N., Larsson, O., Bränström, R., Bertorello, A. M., Leibiger, B., Leibiger, I. B., Moede, T., Köhler, M., Meister, B., Berggren, P.-O. (1999)

Syntaxin 1 interacts with the L_D subtype of voltage-gated Ca²⁺ channels in pancreatic β cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. **96**, 10164-10169.

Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1984)

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene **33**, 103-119.

Yao, Y., Ferrer-Montiel, A. V., Mantal, M., Tsien, R. Y. (1999)

Activation of store-operated Ca²⁺ current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger.
Cell **98**, 475-485.

Yokoyama, K., Su, I., Tezuka, T., Yasuda, T., Mikoshiba, K., Tarakhovsky, A., Yamamoto, T. (2002)

BANK regulates BCR-induced calcium mobilization by promoting tyrosine phosphorylation of IP₃ receptor.

EMBO J. **21**, 83-92.

Yue, L., Peng, J-B., Hediger, M. A., Clapham, D. E. (2001)

CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel.

Nature **410**, 705-709.

Zhang, W., Triple, R. P., Zhu, M., Liu, S. K., McGlade, C. J., Samelson, L. E. (2000)

Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling.

J. Biol. Chem. **275**, 23355-23361.

Zhang, L., McCloskey, M. A. (1995)

Immunglobulin E receptor-activated calcium conductance in rat mast cells.

J. Physiol. **483**, 59-66.

Zhang, W., Triple, R. P., Samelson, L. E. (1998)

LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation.

Immunity **9**, 239-246.

Zhang, Z., Tang, J., Tikunova, S., Johnson, J. D., Chen, Z., Qin, N., Dietrich, A., Stefani, E., Birnbaumer, L., Zhu, M. X. (2001)

Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain.

Proc. Natl. Acad. Sci. **98**, 3168-3173.

Zhu, X., Chu, P. B., Peyton, M., Birnbaumer, L. (1995)

Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene.

FEBS Lett. **373**, 193-198.

Zhu, X., Jiang, M., Birnbaumer, L. (1998)

Receptor-activated Ca²⁺ Influx via Human Trp3 Stably Expressed in Human Embryonic Kidney (HEK)293 Cells. EVIDENCE FOR A NON-CAPACITATIVE CA²⁺ ENTRY.

J. Biol. Chem. **273**, 133-142.

Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., Birnbaumer, L. (1996)

Trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry.

Cell **85**, 661-671.

Zimmermann, B. (1998)

Calcium store depletion activates two distinct calcium entry pathways in secretory cells of the blowfly salivary gland.

Cell Calcium **23**, 53-63.

Zitt, C., Halaszovich, C. R., Lückhoff, A. (2002)

The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry.

Progress in Neurobiology **66**, 243-264.

Zitt, C., Obukhov, A. G., Strübing, C., Zobel, A., Kalkbrenner, F., Lückhoff, A., Schultz, G. (1997)

Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion.

J. Cell Biol. **138**, 1333-1341.

Zitt, C., Zobel, A., Obukhov, A. G., Harteneck, C., Kalkbrenner, F., Lückhoff, A., Schultz, G. (1996)

Cloning and Functional Expression of a Human Ca^{2+} -Permeable Cation Channel Activated by Calcium Store Depletion.

Neuron **16**, 1189-1196.

Zweifach, A., Lewis, R. S. (1993)

Mitogen-Regulated Ca^{2+} Current of T Lymphocytes is Activated by Depletion of Intracellular Ca^{2+} Stores.

Proc. Natl. Acad. Sci. **90**, 6295-6299.

Zweifach, A., Lewis, R. S. (1995)

Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (I_{CRAC}) due to local calcium feedback.

J. Gen. Physiol. **105**, 209-226.

9 Anhang

9.1 Klonierungsschema der Deletionsmutante mTRP1 β Δ DK-Epitop

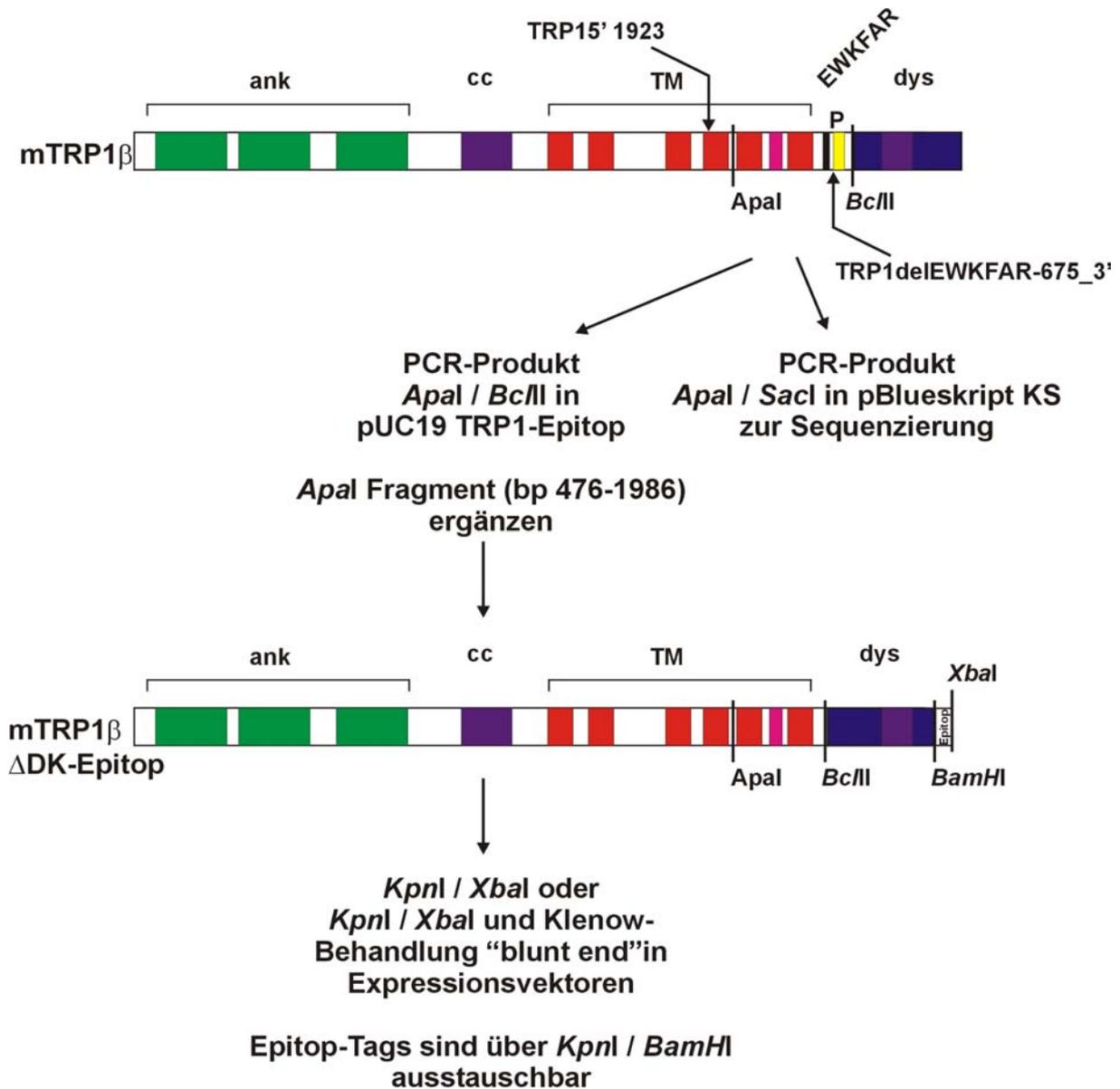


Abb. 9.2 Klonierungsstrategie für mTRP1 β Δ DK-Epitop

Die Deletionsmutante mTRP1 β Δ DK-Epitop wurde durch *in vitro*-Mutagenese mit den angegebenen Primern hergestellt. Alle Klonierungsschritte erfolgten über die angegebenen Restriktionsschnittstellen. Die potentielle Porenregion ist in magenta dargestellt.

ank: Ankyrin-ähnliche Wiederholungen; cc: „coiled-coil“-Domäne; TM: Transmembranregion; P: Prolinreiche Region; dys: Dystrophin-ähnliche Region

9.2 Aminosäuresequenz von mTRP1 β

1 MGAPPPSPGLPPSWAAMMAALYPSTDLSGVSSSSLPSSPSSSSPNEVMALKDVREVKEEN
 61 TLNEKLFLLACDKGDYIMVKKILEENSSGDLNINCVDVLRNAVTTITTIENESLDILQLLL
 121 DYGCQQLMERIQNPEYSTTMDVAPVILAAHRNNYEILTMLLKQDVSLPKPHAVGCECTLC
 181 SAKNKKDSLRSRFRDLIYRCLASPALIMLTEEDPILRAFELSADLKELSLVEVEFRNDY
 241 EELARQCKMFAKDLLAQARNSRELEVILNHTSSDEPLDKRGLLEERMNLSRLKLAIKYNQ
 301 KEFVSQSNCCQFLNNTVWFGQMSGYRRKPTCKKIMTVLTVGIFWPVLSLCYLIAPKSQFGR
 361 IIHTPFMKFIIHGASYFTFLLLLNLVYVYNEDKKNMTMGPALERIDYLLILWIIGMIWSD
 421 IKRLWYEGLEDFLEESRNQLSFVMNSLYLATFALKVVAHNKFHDFADRKDWDADFHP TLVA
 481 EGLFAFANVLSYLRLFFMYTTSSILGPLQISMGMQLQDFGKFLGMFLLVLSFTIGLTQL
 541 YDKGYTSKEQKDCVGFCEQQSNDTFHSGFIGTCFALFWYIFSLAHVAIFVTRFSYGEELQ
 601 SFVGAIVIGTYNVVVVIVLTKLLVAMLHKSFQLIANHEDKEWKFARAKLWLSYFDDKCTL
 661 PPPFNIIPSPKTICYMISSLSKWICSHTSKGKVKRQNSLKEWRNLKQKRDENYQKVMCCL
 721 VHRYLTSMRQMQSTDQATVENLNELRQDLSKFRNEIRDLLGFRTSKYAMFYPRN

Abb. 9.2 Aminosäuresequenz von mTRP1 β

Die postulierten Domänen sind farbig hervorgehoben. Die Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen sind in grün, die „coiled-coil“-Domäne ist in violett, die Transmembrandomänen sind in rot, die potentielle Porenregionen in magenta, die Prolin-reiche Region ist gelb hinterlegt und die Dystrophindomäne ist in blau dargestellt.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Proteinfamilie	14
Abb. 1.2	Domänenstruktur von mTRP1	22
Abb. 6.1	in vitro-Mutagenese von mTRP1 β	67
Abb. 6.2	Immunpräzipitationen von mTRP1 β und Mutanten aus stabil transfizierten HEK293-Zellen	68
Abb. 6.3	Lokalisierungsstudien von mTRP1 β und Mutanten in stabil transfizierten HEK293-Zellen	70
Abb. 6.4	Co-Immunfluoreszenz von mTRP1 β -myc, mTRP1 β Δ EWKFAR-myc und mTRP1 β Δ dys-myc mit TRPC3HA in HEK293-Zellen	71
Abb. 6.5	Einzellzellmessungen des Ca ²⁺ -Einstroms in mTRP1 β oder Deletionsmutanten exprimierende HEK293-Zellen	73
Abb. 6.6	Einfluss von mTRP1 β und Deletionsmutanten auf den Ca ²⁺ -Einstrom über die Plasmamembran	74
Abb. 6.7	Regulierbare Expression von mTRP1 β -FLAG in IIA1.6 Zellen	76
Abb. 6.8	Messungen des Ca ²⁺ -Einstroms in regulierbar mTRP1 β exprimierenden IIA1.6-Zellen	77
Abb. 6.9	Retroviraler Gentransfer in WEHI231-Zellen	79
Abb. 6.10	Transiente Expression von mTRP1 β und Deletionsmutanten in WEHI231-Zellen	79
Abb. 6.11	Ca ²⁺ -Flux Messungen an transient transfizierten WEHI231-Zellen	81
Abb. 6.12	Genomische PCR von wt DT40- und TRPC1-defizienten DT40-Zellen	83
Abb. 6.13	Ca ²⁺ -Flux Messungen nach Stimulation von wt DT40- und DT40 TRPC1-/- Zellen über den BCR	84
Abb. 6.14	Ca ²⁺ -Flux Messungen nach ER-Depletion an wt DT40- und DT40 TRPC1-defizienten DT40-Zellen	86
Abb. 6.15	Transfektion von DT40-Zellen durch retroviralen Gentransfer	87
Abb. 6.16	Stabile Expression von mTRP1 β und Deletionsmutanten in TRPC1-defizienten DT40-Zellen	88
Abb. 6.17	Stabile Expression von mTRP1 β und Deletionsmutanten in TRPC1-defizienten DT40-Zellen	89
Abb. 6.18	Ca ²⁺ -Flux Messungen nach ER-Depletion an mTRP1 β und Deletionsmutanten exprimierenden TRPC1-defizienten DT40-Zellen	91
Abb. 6.19	IgM-Expression auf transfizierten DT40 TRPC1-/- Zellen des Subklons 7	92
Abb. 6.20	Ca ²⁺ -Flux Messungen nach Stimulation von mTRP1 β und Deletionsmutanten exprimierenden DT40 TRPC1-/- Zellen über den BCR	93
Abb. 6.21	Regulation der Expression von TRP-Proteinen in EREB2.5- und P493.6-Zellen	97

Abb. 6.22	IgM Oberflächenexpression auf EREB2.5- und P493.6-Zellen	98
Abb. 6.23	Messungen des Ca²⁺-Einstroms in EREB2.5- und P493.6-Zellen	100
Abb. 6.24	Veränderung des Ca²⁺-Einstroms in EREB2.5- und P493.6-Zellen durch EBNA2 oder c-myc	101
Abb. 6.25	Inhibierung des Ca²⁺-Einstroms in P493.6-Zellen durch Gd³⁺-Ionen	102
Abb. 9.1	Klonierungsstrategie für mTRP1$\beta$$\Delta$DK-Epitop	161
Abb. 9.2	Aminosäuresequenz von mTRP1β	162

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Funktionale Eigenschaften von Kanalproteinen der TRPV-Subfamilie	16
Tab. 1.2	Funktionale Eigenschaften von Kanalproteinen der TRPM-Subfamilie	17
Tab. 1.3	Funktionale Eigenschaften von Kanalproteinen der TRPC-Subfamilie	19
Tab. 5.1	PCR-Bedingungen	48
Tab. 5.2	Stimulationsprotokolle für Ca²⁺-Flux Messungen	62
Tab. 5.3	Zusammensetzung von SDS-PAA-Gelen	64
Tab. 5.4	Konzentrationen von Antikörpern und Puffer bei der Western Blot-Analyse	65
Tab. 6.1	Expression von TRP-Proteinen in EREB2.5- und P493.6-Zellen	95

Lebenslauf

Michael Engelke

14. März 1968 **Geburtsdatum**

Hannover **Geburtsort**

ledig **Familienstand**

Ausbildung

Universität Bielefeld

Studium der Biochemie 10.1994-09.1999

Diplom 16.09.1999

Diplomarbeit: „Gezielte Mutagenese des Maus trp- β -Gens zur Charakterisierung funktioneller Domänen.“

Weizmann Institute of Science, Rehovot (Israel)

Praktikum am “Department of Immunology” in der Arbeitsgruppe Prof. I. Pecht 05.1998-07.1998 und 11.1998

Weserkolleg Minden

Abitur 02.1991-12.1993

Volksbank Bad Oeynhausen eG

Ausbildung zum Bankkaufmann 08.1984-07.1987

Berufspraxis

Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie

Wissenschaftlicher Angestellter in der Arbeitsgruppe seit 01.2000

Prof. Dr. J. Frey

Wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe 10.1999-12.1999

Prof. Dr. J. Frey

Volksbank Bad Oeynhausen eG

Kundenberater 01.1994-06.1994

10.1990-01.1991

08.1987-04.1989

Weserklinik Bad Oeynhausen

Zivildienst 05.1989-09.1990

Bielefeld, den 03. Dezember 2002

