

Aus der Fachrichtung 2.4, Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Interaktionspartner des Kationenkanals TRPC4

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften**

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von: **Jasmin Nicole Zimmermann**

geb. am: **29.06.1982 in Frankfurt am Main**

1	Zusammenfassung	1
1.1	Summary	2
2	Einleitung	4
2.1	Transient Receptor Potential (TRP) Proteinfamilie	5
2.2	Die TRPC Unterfamilie.....	9
2.3	Transient Receptor Potential Canonical 4	12
2.4	Hefe-zwei-Hybrid Systeme	16
2.5	CytoTrap.....	19
2.6	Zielsetzung.....	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Chemikalien	22
3.2	Puffer und Medien	22
3.2.1	Puffer für molekularbiologische Methoden	22
3.2.2	Puffer für proteinbiochemische Methoden.....	23
3.2.3	Medien für Bakterien.....	28
3.2.4	Medien für das Hefe-zwei-Hybrid System Cytotrap.....	29
3.3	Organismen.....	30
3.3.1	Bakterienstämme.....	30
3.3.2	Hefestamm	30
3.3.3	Zelllinien	30
3.4	Oligonukleotide	31
3.5	Vektoren	39
3.6	Polymerase- Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction PCR)	41
3.7	Nukleinsäuren-Analytik.....	41
3.7.1	Volllängen Klone.....	41
3.7.2	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	42
3.7.3	Gelelektrophorese von kleinen Nukleinsäuren	42
3.7.4	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>Escherichia coli</i>	42

3.7.5	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
3.7.6	Restriktion und Ligation von Nukleinsäuren Molekülen	43
3.7.7	DNS Transformationen in <i>Escherichia coli</i>	43
3.7.8	DNS Transformationen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
3.7.9	Transfektion von HEK293 Zellen	44
3.7.10	Sequenzierung von DNS	44
3.8	Antikörper	45
3.8.1	Erstantikörper	45
3.8.2	Zweitantikörper	46
3.9	Proteinbiochemische Methoden.....	46
3.9.1	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>E. coli</i>	46
3.9.2	Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Methode	47
3.9.3	Gelelektrophorese von Proteinen mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	47
3.9.4	Western Blot.....	47
3.9.5	Koimmunpräzipitation	47
3.9.6	Protokoll mit RIPA Lysat in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat.....	48
3.9.7	Protokoll mit DDM-Puffer	49
3.9.8	Pull down Experimente mit GST-Fusionsproteinen	49
3.9.9	Verdrängungsexperiment mit Tarbp2 und Calmodulin	50
3.10	Dicer Aktivitätsexperiment.....	50
3.10.1	Dicer Aktivitäts- Protokoll mit rekombinatem Dicer.....	52
3.10.2	Kalziumabhängiger Dicer Aktivitätstest.....	52
3.11	Hefe-zwei-Hybrid System	52
3.11.1	Aufreinigung der „Premade-cDNS-Bibliothek“ von ZNS von Maus.....	53
3.11.2	Klonierung der Köderkonstrukte.....	54
3.11.3	Herstellung kompetenter Hefezellen	55
3.11.4	Screening der Köderkonstrukte gegen die cDNS Bibliothek.....	55
3.12	Messung der Änderung der intrazelluläre Kalziumkonzentration	58
3.12.1	Verwendete Lösungen für die Fura-2AM Messung	59

3.12.2	Protokoll für die Messung mit der TRPC4 _{G503S} Mutante	60
3.13	Verwendete Software	60
4	Ergebnisse.....	61
4.1	Screening mit dem Hefe-zwei-Hybrid System CytoTrap	61
4.1.1	Amplifikation der Vollängen Klone.....	68
4.2	Bestätigung der Interaktion	68
4.2.1	Koimmunpräzipitation	69
4.3	Einfluss der identifizierten Interaktionspartner auf die Funktion von TRPC4	73
4.4	Tarbp2 und TRPC4	80
4.4.1	Eingrenzung der Bindedomänen durch Versuche mit TRPC4-Fragmenten und Tarbp2.....	83
4.4.2	TRPC4 α , Tarbp2 und Calmodulin	90
4.4.3	Tarbp2 und eine konstitutiv offene TRPC4 Mutante.....	91
4.4.4	TRPC4 und die Δ Tarbp2 Mutante.....	93
4.5	Mögliche Wechselwirkungen von Tarbp2, Dicer und TRPC4	94
4.5.1	Dicer Aktivität und Kalzium	98
5	Diskussion	108
5.1	Screening und Interaktion.....	108
5.2	Bestätigung der Wechselwirkung der Proteine mit TRPC4	114
5.3	Effekt der Interaktionen auf die TRPC4 Aktivität	115
5.4	Tarbp2 und seine Interaktion mit TRPC4	118
5.5	Die Bindung von Tarbp2 an eine konstitutiv offene TRPC4 Mutante....	120
5.6	Dicer, Tarbp2 und TRPC4.....	121
5.6.1	Die Dicer Aktivität	125
5.7	Ausblick	128
6	Literaturverzeichnis	130
6.1	Zitierte Veröffentlichungen	130
6.2	Eigene Veröffentlichungen	144
7	Anhang.....	145

7.1	Abbildungsverzeichnis.....	145
7.2	Tabellenverzeichnis.....	147
8	Danksagung.....	148

Abkürzungsverzeichnis

DNS-Basen und Nukleotide

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
T	Thymin
TTP	Thymidintriphosphat
C	Cytosin
CTP	Cytidintriphosphat
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat

Aminosäuren

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

Einheiten, Konstanten und Präfixe

sec	Sekunde
min	Minute
h	Stunde
l	Liter
g	Gramm
k	Kilo
D	Dalton [$1,66 \cdot 10^{-24}$ g]
c	centi- (10^{-2})
M	Molar [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]
°C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung [$9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$]
m	milli- (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
n	nano- (10^{-9})
p	piko- (10^{-12})

Proteine

BSA	Rinderserum-Albumin (Bovine Serum Albumin)
IgG	Immunglobulin G
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein

Chemikalien und Puffer

APS	Ammoniumpersulfat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
CaCl ₂	Kalziumchlorid

DDM	<i>n</i> -Dodecyl β -D-maltoside
EDTA	Ethylendiamin- <i>N, N, N', N'</i> -tetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
TBE	Tris Borsäure EDTA
TBS	“Tris buffered saline”
TBST	“Tris buffered saline” mit Tween20
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
SDS	Natriumdodecylsulfat
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Sonstige Abkürzungen

RNS	Ribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsRNS	double strand RNS
nt	Nukleotide
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle (internal ribosomal entry site)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
bzw.	beziehungsweise
<i>et al.</i>	und andere
OD	Optische Dichte
ca.	zirka
bp	Basenpaare
RT	Raumtemperatur
cfu	Colony forming units
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit soll die molekulare Zusammensetzung eines Kationenkanals, gebildet aus dem Protein Transient Receptor Potential Canonical 4 (TRPC4), untersucht werden. Es wurde mit dem Protein aus Maus gearbeitet. Über den Kanal ist bekannt, dass er ein nicht selektiver Kationenkanal ist und in der Plasmamembran lokalisiert ist. Das TRPC4-Protein hat sechs Transmembrandomänen. Der Amino-Terminus und der Carboxy-Terminus des Proteins sind im Zytosol lokalisiert. Von TRPC4 gibt es zwei Varianten, TRPC4 α von Maus umfasst 974 Aminosäurereste; TRPC4 β fehlen im Vergleich dazu die Aminosäurereste 781 bis 864, das heißt es ist um 84 Aminosäurereste verkürzt. Das TRPC4 Gen wird im ZNS und in Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert. Um die molekulare Zusammensetzung des TRPC4-Kanalkomplexes aufzuklären wurde nach Interaktionspartnern des TRPC4 Proteins gesucht. Diese Interaktionspartner könnten einen Einfluss auf die Funktion des Kanals haben oder als Hilfsuntereinheiten für die Funktionalität des Kanals benötigt werden.

Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner des TRPC4-Proteins, wurde ein Hefe-zwei-Hybrid System verwendet, wobei die Protein-Protein-Interaktion im Zytosol der Hefe detektiert wurde. Mit Hilfe des Carboxy-Terminus von TRPC4 wurde eine exprimierte cDNS Bibliothek (hergestellt aus mRNS von ZNS) auf Bindungspartner durchmustert. Es wurden fünfzehn putative Interaktionspartner gefunden. Um die Interaktion unabhängig zu bestätigen, wurden Koimmunpräzitationen durchgeführt. Hierzu mussten die Vollängen cDNS der gefunden Kandidaten kloniert, mit der cDNS des sogenannten Flag-Tags fusioniert und anschließend zusammen mit der cDNS von mTRPC4 in HEK Zellen transfiziert werden. Anschließend wurden die Proteine mit den anti-TRPC4- und anti-Flag-Antikörpern koimmunpräzipitiert.

Im nächsten Schritt wurden die verbliebenen Kandidaten mit Hilfe von Fura-2 Messungen daraufhin untersucht ob sie die TRPC4-Kanalaktivität beeinflussen. Ein Protein, Tarbp2, beeinflusste den durch TRPC4 vermittelten Kalziumeinstrom.

In einem weiteren Schritt wurde daraufhin diejenige Region von TRPC4 eingegrenzt, die Tarbp2 bindet. Um diese Bindungsstelle einzugrenzen wurden GST-TRPC4-Fusionsproteine verwendet, um das Tarbp2 Protein in sogenannten Pulldown-Versuchen zu binden. Es zeigte sich, dass Tarbp2 an zwei Stellen des TRPC4 Carboxy-Terminus bindet, wobei Tarbp2 mit Calmodulin um eine der beiden Bindestellen von TRPC4 konkurriert.

Ein bekannter Interaktionspartner von Tarbp2 ist die Endoribonuklease Dicer. Dicer ist für die Biogenese von miRNS von Bedeutung, und seine Aktivität wird durch Tarbp2 gesteigert. Es konnte gezeigt werden, dass Dicer, kalziumabhängig gespalten wird und dass das Protein durch diese Spaltung aktiver ist. In dem Tarbp2 an TRPC4 bindet, erhöht es den TRPC4 vermittelten Kalziumeinstrom wodurch mehr Dicer Ca/Calpain-abhängig gespalten wird, sodass vermehrt miRNS gebildet wird.

1.1 Summary

Interaction partners of the cation channel TRPC4

This work is concerned with the molecular make-up of a cation channel comprised of the protein Transient Receptor Potential Canonical 4 (TRPC4) from mouse. It is known, that TRPC4 is a non-selective cation channel which is residing in the plasma membrane. The TRPC4 protein comprises six trans membrane domains, the pore region is located between the fifth and the sixth trans membrane domain. The amino- and the carboxyl-termini are cytosolic. There are two major variants of TRPC4, TRPC4 α , which comprises 974 amino acid residues, and TRPC4 β which in comparison misses amino acid residues from position 781 to 864. TRPC4 is expressed mainly in the brain, but also in other tissues like endothelial cells and smooth muscle cells. To investigate the molecular make-up of the TRPC4 channel complex, proteins which interact with TRPC4 were screened for. The interaction partners of TRPC4 could have an impact on the channel function or might act as auxiliary subunits.

To identify putative interaction partners of TRPC4, a yeast-two-hybrid system was used, where the interaction takes place in the cytosol. During the screening of a mouse brain cDNA library with the C-terminus of TRPC4, fifteen putative

positive candidates were identified, none of which were known to interact with TRPC4. To verify the interaction co-immunoprecipitation were carried out. The TRPC4 cDNA and each of the Flag-tagged candidate constructs were co-transfected into HEK293 cells and co-immunoprecipitation experiments were performed using the anti-Flag and the anti-TRPC4 antibody, respectively. In most cases co-immunoprecipitation of both proteins, was obtained.

The functional effect of the positive candidates on TRPC4 activity was tested. The cDNA of the proteins were transfected into a stably TRPC4 expressing HEK cell line in order to monitor changes of TRPC4 channel function upon expression of the putative interacting partner. Almost all putative interaction partners showed no effect on the channel activity of TRPC4. Only the protein Tarbp2 potentiated the activity of TRPC4 α and TRPC4 β upon Carbachol stimulation.

The binding domain of TRPC4 for Tarbp2 was characterized by studies with GST-TRPC4 fusion proteins. Two different binding sites of TRPC4 bind Tarbp2. Further analysis showed that Calmodulin and Tarbp2 compete for one of the two binding sites.

Tarbp2 is a known interaction partner of the endoribonuclease Dicer. Dicer is known to be a key protein in the miRNA biogenesis. Further experiments showed that Dicer is activated by proteolysis through Calpain in a calcium dependent manner. As a consequence of Tarbp2 binding TRPC4, the calcium influx through TRPC4 is enhanced, so more Dicer is cleaved in a Calpain-calcium dependent manner, leading to an increase in miRNA.

2 Einleitung

Die vorgelegte Arbeit befasst sich mit dem TRPC4-Kationenkanal sowie der Suche nach Proteinen, die mit den Untereinheiten dieses Kanals wechselwirken und die über diese Wechselwirkung möglicherweise die Kanalaktivität beeinflussen. Ionenkanäle sind dynamische Strukturen; sie sind in den verschiedenen Lipidmembranen einer Zelle lokalisiert und können im geöffneten und geschlossenen Zustand vorliegen. Der Übergang zwischen beiden Zuständen wird bei sogenannten spannungsabhängigen Ionenkanälen von Änderungen des Membranpotentials bestimmt, bei Liganden-abhängigen Ionenkanälen durch Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor, der wiederum Teil des Ionenkanals ist. Typische spannungsabhängige Ionenkanäle sind spannungsabhängige Natrium- und Kalziumkanäle (Na_v , Ca_v); ein typischer Liganden-abhängiger Kanal ist der nikotinsche Acetylcholinrezeptor der neuromuskulären Endplatte. Dieser Kanal ist in der Plasmamembran von Zellen der Skelettmuskulatur lokalisiert und öffnet nach Bindung von Acetylcholin. Acetylcholin wiederum wird an der Präsynapse aus den synaptischen Endigungen von Motorneuronen freigesetzt. Nicht ganz so übersichtlich ist der Aktivierungsmechanismus von TRPC4-Kanälen beziehungsweise von TRPC-Kanälen überhaupt. Sie werden überwiegend über Signalkaskaden aktiviert, die wiederum über Stimulierung von Rezeptoren aktiviert werden, die über die Aktivierung von Guaninnukleotid-bindenden (G-) Proteinen zu Veränderung der Konzentrationen von intrazellulären Botenstoffen wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP_3), Diacylglycerol (DAG), Kalziumionen. Auf welche Weise diese Botenstoffe die Kanäle dann jeweils aktivieren, ist im Detail nach wie vor offen. Es ist jedoch wohl so, dass nicht ein Botenstoff allein für die Aktivierung, das heißt den Übergang des Kanals aus dem geschlossenen in den geöffneten Zustand verantwortlich ist; vielmehr scheint es so zu sein, dass verschiedene Botenstoffe zusammenwirken müssen, um den Kanal zu aktivieren. Zusätzlich könnten einzelne Proteine über die Wechselwirkung mit den Kanaluntereinheiten diese Übergänge von geschlossenen in den geöffneten Zustand (und wieder zurück in den geschlossenen Zustand) beeinflussen. Unabhängig von dieser physiologischen Regulation der Aktivität von TRP-Kanälen existieren körperfremde Substanzen,

die in der Lage sind einzelne TRP-Ionenkanäle direkt zu aktivieren, darunter Capsaicin, ein Inhaltsstoff der Chilischoten, oder Menthol, ein Inhaltsstoff der Pfefferminze. Einige TRP-Kanäle werden durch Änderung der Temperatur, durch Hitze oder Kälte, aktiviert. Für den TRPC4-Ionenkanal sind allerdings bisher keine körperfremden Substanzen, die den Kanal aktivieren bekannt. Auch ist der TRPC4-Kanal nicht hitze-oder kältesensitiv.

2.1 Transient Receptor Potential (TRP) Proteinfamilie

Der erste Vertreter dieser Proteinfamilie wurde in *Drosophila melanogaster* entdeckt. Ein Phänotyp, der durch eine Mutation in dem damals noch unbekanntem Gen ausgelöst und zuerst 1969 beschrieben wurde, bestand darin, dass die betroffenen Fliegen sich in hellem Licht verhielten als seien sie blind; und das Elektretinogramm zeigte deutliche Abweichungen von dem des Wildtyps (Cosens and Manning 1969). Anstelle eines lang-anhaltenden Rezeptorpotenzials der Photorezeptoren von Wildtyp-Fliegen, reagieren die Mutanten mit einem sehr kurzen Potenzial, einem „transienten“ Potential auf einen Lichtreiz (Minke *et al.* 1975). Der Name Transient Receptor Potential oder „trp“ wurde diesen *Drosophila melanogaster* Mutanten im Jahr 1975 gegeben. Das Gen, welches die Mutation trägt wurde 1989 identifiziert (Montell and Rubin 1989; Phillips *et al.* 1992) und Minke und Hardie postulierten, dass es sich bei diesem TRP-Protein um einen Ionenkanal in der Membran von Photorezeptoren handelt (Hardie and Minke 1992).

In Fliegen, die kein Mutation aufweisen, kodiert dieses trp-Gen für den „Wildtyp“ TRP-Kanal, das heißt als Name für das nicht mutierte Gen und dessen Genprodukt wurde der Phänotyp der ursprünglichen Mutation - „transient receptor potential“ oder „trp“ - gewählt.

Ausgehend von der Nukleotidsequenz dieses Gens von *Drosophila* wurden – zunächst in Fliegen – dann in weiteren Organismen TRP-verwandte Gene identifiziert. Mittlerweile sind in Säugergeweben insgesamt 28 Gene indentifiziert die für TRP-Kanäle kodieren. Sie werden historisch bedingt in TRPC-Kanäle, TRPV-Kanäle, TRPM-Kanäle, TRPP-Kanäle, TRPML-Kanäle und TRPA-Kanäle eingeteilt. Die TRPA-Gruppe umfasst im Säugerorganismus

das Mitglied TRPA1; der Name kommt von den mehr als 20 sogenannten „Ankyrin-like repeats“, Proteinsequenzmodulen im Amino-Terminus des Kanalproteins. Die TRPML-Gruppe umfasst drei Mitglieder und hat ihre Bezeichnung von dem ersten identifizierten Mitglied der Gruppe, Mucolipin; Mutationen des Mucolipin-Gens führen zu einer Lipidspeicherkrankheit beim Menschen (Bargal *et al.* 2000; Sun *et al.* 2000; Altarescu *et al.* 2002). Die TRPP-Gruppe umfasst ebenfalls drei Mitglieder, wobei das erste Mitglied TRPP2 bereits lange vor allen anderen TRP-Genen identifiziert worden war. Es wurde ursprünglich als PKD2 bezeichnet, eines der Gene, die für die Krankheit polyzystische Nierenerkrankung beim Menschen verantwortlich sind (Elles *et al.* 1990). Die TRPM-Gruppe umfasst acht Mitglieder. Das erste Gen dieser Gruppe wurde als Tumorsuppressor-Gen bei Patienten mit Melanom identifiziert und Melastatin genannt. Die TRPV-Familie umfasst sechs Mitglieder. Das „V“ leitet sich vom ersten Gen dieser Kanalfamilie ab, das als „Vanilloid-Rezeptor“ identifiziert wurde. Die TRPC-Familie umfasst sieben Mitglieder. Dies waren die ersten TRP-Gene, die in Säugerorganismen identifiziert wurden, und die auch die größte Sequenzidentität mit dem TRP-Gen von *Drosophila melanogaster* aufweisen (ca. 40%). Entsprechend werden sie als die „klassischen“ (engl. „classical“) oder „kanonischen“ („canonical“) TRPs bezeichnet. Interessanterweise ist ein Mitglied dieser Familie, TRPC2, beim Menschen ein sogenanntes „Pseudogen“. Das Gen ist zwar vorhanden, doch kann aufgrund zahlreicher Stopp-Kodons kein TRPC2-Protein gebildet werden, im Gegensatz zu den meisten Säugern (Wes *et al.* 1995). Abbildung 2-1 zeigt den Stammbaum der TRP-Gene von Säugern.

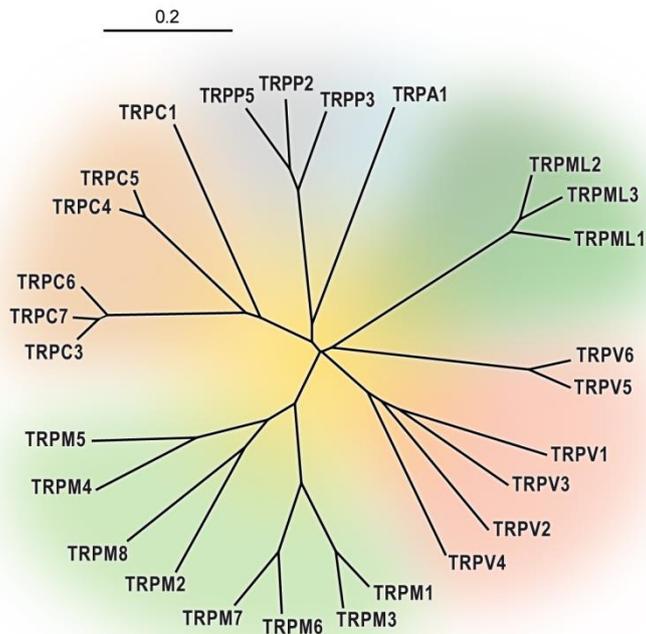


Abbildung 2-1 Stammbaum der TRP-Gene

Die sechs Unterfamilien der TRP-Gene aus Mammalia sind farbig unterlegt.

In Abbildung 2-2 sind die einzelnen Protein-Mitglieder der TRP Unterfamilien schematisch dargestellt. Bisher existieren keine Kristallstrukturen und man geht aufgrund von Hydrophatieleblots davon aus, dass alle Mitglieder sechs Transmembrandomänen aufweisen und die Schleife zwischen der fünften und der sechsten Transmembrandomäne einen Teil der Pore darstellt (Abbildung 2-2). Die zytosolischen Amino- und Carboxy-Termini der verschiedenen TRP-Proteine sind in ihrer Sequenz sehr heterogen, unterscheiden sich stark von Unterfamilie zu Unterfamilie und sind im Zytosol lokalisiert. Man geht davon aus, dass jeweils vier TRP-Proteine einen tetrameren Kanal bilden. Dabei bilden in der Regel vier identische Proteine einen bestimmten Ionenkanal also zum Beispiel vier TRPC4-Proteine den TRPC4-Kanal. Inwieweit heterotetramere Kanäle, das heißt Kanäle die aus verschiedenen TRP-Proteinen bestehen, *in vivo* existieren, ist bisher unbekannt.

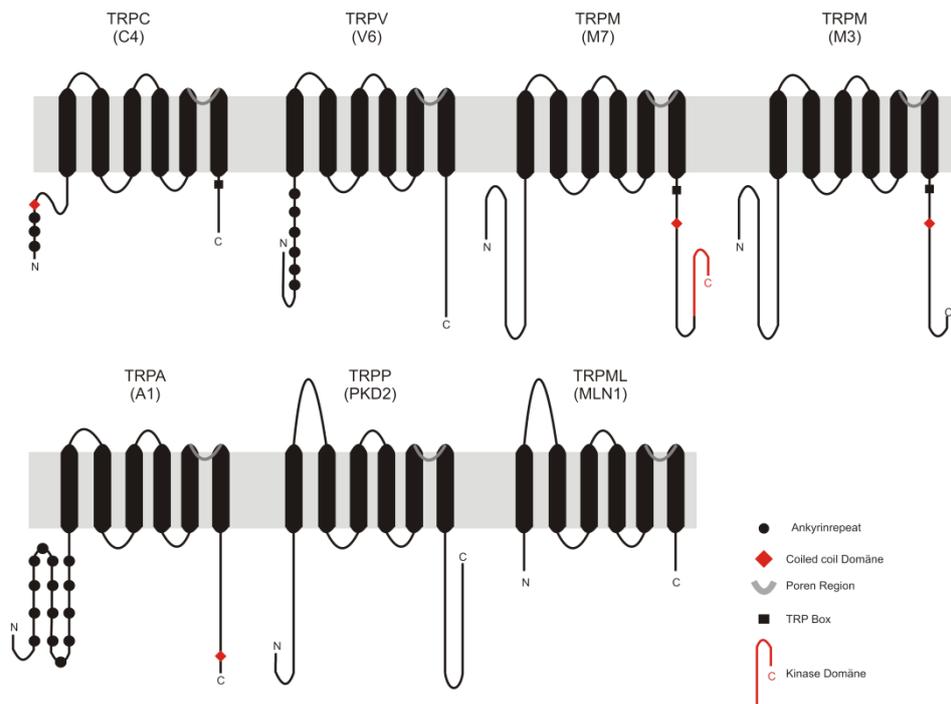


Abbildung 2-2 Die sechs TRP Unterfamilien in Mammalia

Die schematische Darstellung der TRPs zeigt die Struktur der TRP Proteine, exemplarisch von jeweils einem Vertreter der TRP Unterfamilie in den Klammern ist das jeweilige Protein angegeben, nach (Flockerzi 2007).

So konnte bisher nur *in vivo* nach Überexpression der cDNS, gezeigt werden, dass Vertreter der Unterfamilien TRPC (Strübing *et al.* 2003), TRPV (Kedei *et al.* 2001; Hoenderop *et al.* 2003) und TRPM nicht nur Homotetramere sondern auch Heterotetramere bilden können.

TRP Proteine bilden eine heterogene Gruppe von Ionenkanälen unterschiedlicher Funktionen und Eigenschaften. So ist zum Beispiel der Kanal, welcher von TRPV6-Proteinen gebildet wird hoch selektiv für Kalzium Ionen (Wissenbach *et al.* 2001). Der verwandte TRPV1 Kanal ist jedoch ein Kationenkanal der nichtselektiv für Kationen permeierbar ist (Caterina *et al.* 2000).

Einige TRP-Kanäle sind für das sensorisches Empfinden von großer Bedeutung. Schon die Mutter aller TRP-Kanäle, der TRP-Kanal von Fliege, TRP, ist für die Lichtempfindung verantwortlich. Das Empfinden von Hitze und Kälte ist ebenfalls ein Vorgang, an dem TRP Kanäle wesentlich beteiligt sind. So ist der TRPM8 Kanal ein Kältesensor der bei Temperaturen unter 24°C

öffnet, aber auch nach Applikation von Menthol (McKemy *et al.* 2002; Peier *et al.* 2002; Nealen *et al.* 2003). Der TRPV1 Kanal lässt sich nicht nur durch Capsaicin sondern auch durch Temperaturen über 43°C stimulieren (Caterina, Leffler *et al.* 2000). Auch TRPV3 kann durch Wärme (33°-39°C) aktiviert werden (Peier *et al.* 2002), TRPC5 dagegen durch schmerzhafte Kälte (Zimmermann *et al.* 2011). TRPM3 wiederum spielt eine Rolle in der Schmerzwahrnehmung (Vriens *et al.* 2011), und in Zusammenhang mit TRPA1-Kanälen hält die Diskussion an, inwieweit Hitze oder Kälte neben bestimmten chemischen Substanzen zur Aktivierung führen (Macpherson *et al.* 2006; Andersson *et al.* 2008).

Im folgenden Abschnitt wird die TRPC-Unterfamilie besprochen.

2.2 Die TRPC Unterfamilie

Die TRPC-Proteine lassen sich aufgrund von Unterschieden in ihrer Nukleotid- und Proteinsequenz in drei Untergruppen zusammenfassen. Insgesamt beträgt die Sequenzidentität aller sieben Proteine ungefähr 15% (die identischen Aminosäurereste geteilt durch den Mittelwert der Sequenzlänge), die Sequenzen von TRPC1, TRPC4 und TRPC5 sind zu 35% identisch, die Sequenzen von TRPC3, TRPC6 und TRPC7 sind zu 60% identisch. Wie bereits erwähnt existiert ein Vollängen-TRPC2-Protein zum Beispiel in Maus und Ratte, nicht aber im Menschen.

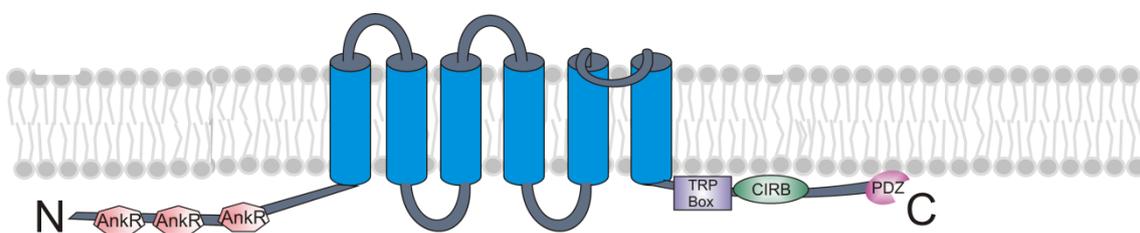


Abbildung 2-3 Die wahrscheinliche Transmembranarchitektur von TRPC-Proteinen

Die TRPC Proteine besitzen sechs Transmembrandomänen und zytosolische Amino- und Carboxy-Termini. Im Amino-Terminus finden sich Ankyrinrepeats, ein Protein-Protein-Interaktionsmotiv. Die TRP Box ist in TRPC, TRPV und TRPM Proteinen konserviert. CIRB ist eine Calmodulin/IP₃R Bindedomäne und die PDZ Domäne ist ein Protein-Interaktionsmotiv, dass nur TRPC4 und TRPC5 besitzen.

Alle sieben Proteine weisen zytosolische Amino-Termini und zytosolische Carboxy-Termini auf, mit Domänen, die für die Interaktion der TRPC-Proteine selbst oder für deren Interaktion mit anderen Proteinen von Bedeutung sein könnten (Abbildung 2-3). So könnten die Ankyrinrepeats und die Coiled-coil Domänen für die Zusammenlagerung der Amino-Termini der TRPC4 Untereinheiten verantwortlich sein (Lepage *et al.* 2009). Bei den sogenannten Ankyrinrepeats handelt es sich um 33 Aminosäurereste lange Motive, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln und in vielen verschiedenen Proteinen vorkommen (Li *et al.* 2006). Die sogenannte Coiled-coil Domäne ist eine Region von jeweils sieben Aminosäureresten die eine α -Helix ausbilden, die Domäne besteht aus mehreren dieser Helices (Lupas 1996). Ein hochkonservierter Sequenzabschnitt, der in TRPC-, TRPV- und TRPM-Proteinen zu finden ist, wird als „TRP-Box“ bezeichnet. Möglicherweise ist dieser Sequenzabschnitt in TRPC5, TRPM5 und TRPM8 für die Bindung von PIP_2 und die dadurch erfolgende Regulation der Kanäle wichtig (Rohacs *et al.* 2005). Die sogenannte CIRB Domäne (Calmodulin/IP₃ Rezeptor Bindestelle) ist *in vitro* eine Bindestelle für Calmodulin und den IP₃Rezeptor und diese Domäne ist in der TRPC-Proteinfamilie konserviert (Tang *et al.* 2001). Das Protein Calmodulin soll nach Bindung von Kalziumionen mit dem IP₃-Rezeptor um die Bindung an diesen Sequenzabschnitt konkurrieren und damit die Kanalaktivität hemmen. Inwieweit dies *in vivo* zutrifft ist unklar. Entfernt man über zielgerichtete Mutagenese diesen Sequenzabschnitt werden keine funktionellen Kanäle mehr gebildet (Wedel *et al.* 2003).

Die TRPC1-, TRPC4- und TRPC5-Gene werden vor allem im Gehirn aber auch im Herzen, und in glatten Muskelzellen exprimiert (Venkatachalam and Montell 2007). Das erste TRPC Protein in Säugern, von dem ausgegangen wurde, dass es einen Ionenkanal bildet, war TRPC1 (Wes, Chevesich *et al.* 1995; Zhu *et al.* 1995). Es wird jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert, ob das Protein TRPC1 einen funktionellen Kanal bildet und in wie weit dieser Kanal in der Plasmamembran, oder in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Im Überexpressionssystem kann TRPC1 mit TRPC4 oder TRPC5 zusammen einen funktionellen heterotetrameren Kanal bilden (Strubing *et al.* 2001). Maus-Tiermodelle, bei denen das TRPC1-Gen ausgeschaltet ist haben einen Defekt in der Adaption des Herzens auf mechanischen Stress (Seth *et al.*

2009). Allerdings gibt es bisher wenig überzeugende Hinweise, dass das TRPC1-Gen tatsächlich im Herzen exprimiert ist, so dass diese Effekte möglicherweise indirekt erfolgen. Ähnliches gilt für Hinweise darauf, dass ein Kalziumeinstrom durch TRPC1 für die Ausdauer von Muskelzellen wichtig sei, (Zanou *et al.* 2010) und dass TRPC1 einen Einfluss auf den Kalziumeinstrom in Endothelzellen und die Relaxierung der Aorta hat (Kochukov *et al.* 2013). TRPC5 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, vor allem in Amygdala und Hippocampus (Riccio *et al.* 2009). Der Kanal wird durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Schaefer *et al.* 2000) oder durch eine hohe zytosolische Kalziumkonzentration aktiviert (Gross *et al.* 2009). Eine Besonderheit von TRPC4- und TRPC5-Kanälen ist, dass Lanthan- oder Gadolinium-Ionen in mikromolekularen Konzentrationen, einen bereits aktivierten Kanal noch zusätzliche aktivieren. Dies geschieht über die Bindung an einen Aminosäurerest, der im extrazellulären gelegenen Teil der beiden Proteine lokalisiert ist (Schaefer, Plant *et al.* 2000; Strubing, Krapivinsky *et al.* 2001). TRPC5-Gen defiziente Mäuse zeigen Defekte in der Motorik und dem Gang (Puram *et al.* 2011), weniger ängstliches Verhalten (Riccio, Li *et al.* 2009) und eine verminderte Empfindung von schmerzhafter Kälte (Zimmermann, Lennerz *et al.* 2011).

Die TRPC3-, TRPC6-, TRPC7-Proteine weisen sehr ähnliche Sequenzen auf ungefähr 60%. Diese Ionenkanäle werden durch Diacylglycerol (DAG) oder dessen Analoga aktiviert (Hofmann *et al.* 1999; Okada *et al.* 1999). Allerdings ist bisher nicht geklärt, ob DAG dabei direkt an die Kanalproteine bindet. TRPC3 wird in erster Linie im Kleinhirn exprimiert. In primären pontinen Neuronen von Ratte wird TRPC3 nach Stimulation des TrkB Rezeptors mit BDNF aktiviert (Li *et al.* 1999). TRPC3-Gen defiziente Tiere weisen eine Ataxie auf, die auf das Fehlen von TRPC3 in Pyramidenzellen des Kleinhirns zurückzuführen ist (Hartmann *et al.* 2008). TRPC6 wird in glatten Muskelzellen der Gefäße und in der Lunge exprimiert. Es wurde gezeigt, dass TRPC6 den α 1-Adrenozeptor-aktivierten Kanal in Pfortadermyozyten von Kaninchen darstellt (Inoue *et al.* 2001). In Maus-Tiermodellen, welche das TRPC6-Gen als Transgen im Herzen überexprimieren wurde eine schwere Kardiomyopathie festgestellt (Kuwahara *et al.* 2006). Allerdings ist bisher nicht gezeigt, in welchen Zellen des Herzens das TRPC6-Gen normalerweise exprimiert wird

und inwieweit die Überexpression des Transgens selbst für die beobachtete Myopathie verantwortlich ist. Mutationen im TRPC6-Gen sind mit einer Nierenerkrankung, der familiären fokal segmentalen Glomerulosklerose, im Menschen assoziiert (Reiser *et al.* 2005; Winn *et al.* 2005). Dabei wurden Mutationen identifiziert, die keinen Einfluss auf die Kanalaktivität haben und Mutationen die die Kanalaktivität steigern (Reiser, Polu *et al.* 2005; Winn, Conlon *et al.* 2005). TRPC6 defiziente Mäuse weisen eine erhöhte durch Agonisten induzierte Kontraktilität von Arterien auf; dies wurde mit der kompensatorisch erhöhten Aktivität der TRPC3-Kanäle erklärt (Dietrich *et al.* 2005). Als Folge der erhöhten Kontraktilität weisen diese Mäuse einen erhöhten Blutdruck auf (Dietrich, Mederos *et al.* 2005).

Das TRPC2-Gen wird in Maus und Ratte vor allem im Geruchsepithel und in dem Vomeronasalen Organ exprimiert und spielt für die Geruchswahrnehmung eine Rolle. TRPC2-Gen defiziente Tiere zeigten eine Reduktion der elektrophysiologischen Antworten auf Geruchsstoffe (Leypold *et al.* 2002) und können dementsprechend nicht weibliche von männlichen Tieren unterscheiden (Stowers *et al.* 2002).

Die vorliegende Arbeit setzt sich vor allem mit dem TRPC4 Protein und seinen möglichen Interaktionspartnern auseinander. Im nächsten Abschnitt wird das TRPC4 Protein und der TRPC4 Kanal kurz beschrieben.

2.3 Transient Receptor Potential Canonical 4

Das TRPC4 Protein in Maus umfasst 974 Aminosäurereste. Wie beim Menschen auch existieren zwei Proteinvarianten des TRPC4-Proteins, die Volllängenvariante α (974 Aminosäurereste) und die um 84 Aminosäurereste verkürzte β -Variante. Die β -Variante entsteht *in vivo*, in dem die mRNS gespleißt wird, ihr fehlen die Aminosäurereste G781 bis S864 im Carboxy-Terminus (Mori *et al.* 1998; Mery *et al.* 2001; Schaefer *et al.* 2002). Der von TRPC4-Proteinen gebildete Kanal ist Kalziumionen permeable, gleichzeitig aber auch permeierbar für weitere Kationen. Wie alle TRP Proteine besitzt TRPC4 sechs Domänen die als α -Helices wahrscheinlich die Plasmamembran durchqueren, und zytosolische Amino- und Carboxy-Termini. Ursprünglich

wurde die TRPC4-cDNS auf Grund der Ähnlichkeit zum Drosophila TRP und TRPL-cDNS identifiziert, und aus der mRNA von Retina und Nebenniere kloniert (Philipp *et al.* 1996). Zu Beginn wurde das Protein CCE1 genannt, da es Hinweise gab, dass es mit dem Kapazitativem Kalziumstrom (capacitive Ca^{2+} entry) zusammenhing (Philipp, Cavalie *et al.* 1996). So konnte TRPC4 in Zellen der Nebennierenrinde von Rind, als Teil eines Kalziumstrom-Kanals der durch die Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern aktiviert wird, nachgewiesen werden (Philipp *et al.* 2000). In späteren Untersuchungen wurde jedoch deutlich, dass TRPC4 weniger über diesen Mechanismus als über Signalkaskaden aktiviert wird, die nach Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren ablaufen (Schaefer, Plant *et al.* 2000) und in deren Gefolge es ebenfalls zur Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern kommt (Tsvilovskyy *et al.* 2009).

Das TRPC4-Gen wird in verschiedenen Geweben und Zellen exprimiert, zum Beispiel im Gehirn, Retina, Nebenniere, Placenta, Uterus, Hoden, Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Philipp, Cavalie *et al.* 1996; Garcia and Schilling 1997; Mori, Takada *et al.* 1998; Mizuno *et al.* 1999; McKay *et al.* 2000).

Der TRPC4-Kationenkanal wird durch Aktivierung der G-Protein gekoppelten muskarinergen Rezeptoren vom Typ 2 und Typ 3 aktiviert. Beide Rezeptoren werden durch Acetylcholin und *in vitro* durch dessen Analoga, zum Beispiel durch Carbachol, stimuliert. Die Ergebnisse an glatten Muskelzellen des Dünndarms zeigen, dass für die Aktivierung von TRPC4-Kanälen beide Rezeptortypen gleichzeitig stimuliert werden müssen. So kann der Kanal in Tieren die Gen-defizient für Typ 2 des muskarinergen Rezeptors sind genauso wenig aktiviert werden wie in Tieren bei denen das Gen für Typ 3 ausgeschaltet ist. Beide Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt, aktivieren jedoch unterschiedliche G-Proteine, Typ 2 insbesondere die verschiedenen $G_{\alpha i}$ - und $G_{\alpha o}$ -Varianten, Typ 3 $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$ und möglicherweise $G_{\alpha 12}$ und $G_{\alpha 13}$. Während $G_{\alpha i}$ - oder die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des trimären G-Proteins möglicherweise direkt mit den TRPC4-Proteinen wechselwirken (Jeon *et al.* 2008; Jeon *et al.* 2012), führt die Aktivierung von $G_{\alpha q}$ zur Verminderung von PIP_2 und gleichzeitig zum Anstieg von DAG und IP_3 , was wiederum zur Freisetzung von Kalziumionen aus

intrazellulären Speichern führt. Es gibt Hinweise, dass PIP_2 den Kanal geschlossen hält (Otsuguro *et al.* 2008); nach Absinken der PIP_2 -Konzentration nimmt diese Hemmung ab und durch Bindung von $G_{\alpha i}$ (oder $G_{\beta\gamma}$) und gleichzeitiger Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration durch IP_3 wird der Kanal aktiviert (Ambudkar 2009; Tsvilovsky, Zholos *et al.* 2009). Abbildung 2-4 fasst diesen Aktivierungsmechanismus zusammen, der im Folgenden auch für die in dieser Arbeit beschriebenen funktionellen Ergebnissen eine Rolle spielt. So verfügen HEK293 Zellen zwar über endogene muskarinerge Rezeptoren, die durch Carbachol (oder Acetylcholin) aktiviert werden können und an G_q oder G_{q11} und G_{q12} oder G_{q13} koppeln, nicht aber über muskarinerge Rezeptoren, die an $G_{\alpha i}$ und $G_{\alpha 0}$ gekoppelt sind. Entsprechend lässt sich in HEK293 Zellen nach Transfektion mit TRPC4-cDNS keine Kanalaktivität nachweisen. Erst wenn gleichzeitig die cDNS eines muskarinergen Rezeptors transfiziert wird, der an in HEK Zellen vorhandene $G_{\alpha i}/G_{\alpha 0}$ -Proteine koppelt, zum Beispiel die cDNS des Typ M2-Rezeptors ist nach Applikation von Carbachol TRPC4-Kanalaktivität messbar.

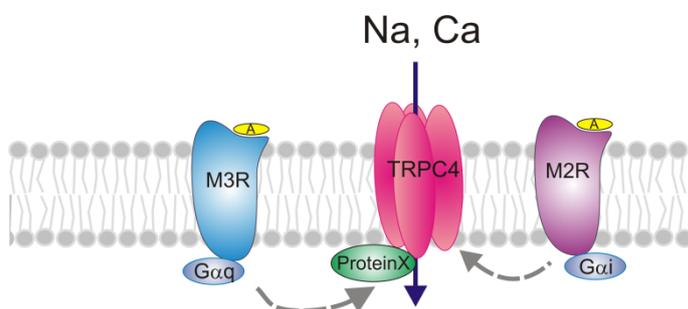


Abbildung 2-4 Aktivierung von TRPC4

Aktivierung von TRPC4 durch die Aktivierung der Muskarinergen Rezeptoren 2 (M2R) und 3 (M3R) durch ihren Agonisten. Als Protein X werden mögliche Interaktionspartner bezeichnet.

Es sind keine spezifischen Blocker für TRPC4-Kanäle bekannt und um trotzdem die Funktion von TRPC4 in Primärzellen zu untersuchen, wurde eine TRPC4-Gen defiziente Maus hergestellt. Dazu wurde der DNS-Abschnitt, welcher für die Transmembrandomänen 4 und 5 und Teile der Schleife zwischen Transmembrandomänen 5 und 6, welche die Pore kodiert, mittels Gentargeting

deletiert. Die TRPC4-Gen defizienten Mäuse sind lebensfähig, fertil und zeigten keine Auffälligkeiten. Die Gefäßendothelzellen dieser Tiere weisen jedoch einen stark reduzierten Kalziumeinstrom auf und die Acetylcholin-induzierte Relaxation der Aorta ist vermindert (Freichel *et al.* 2001).

Weiter konnte gezeigt werden, dass der TRPC4 Strom zu mehr als 80% für den mukarineren Kalziumeinstrom (ml_{cat}), der schon in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts in glatten Muskelzellen des Dünndarms nachgewiesen wurde, verantwortlich ist (Tsvilovskyy, Zholos *et al.* 2009). Der restliche Anteil von ml_{cat} wird über Aktivierung von TRPC6 Kanälen erreicht (Tsvilovskyy, Zholos *et al.* 2009). Fehlt TRPC4 ist die Kontraktilität der Dünndarmmuskulatur herabgesetzt und die Darmmotilität vermindert. Ist zusätzlich das TRPC6-Gen ausgeschaltet sind diese Effekte noch etwas ausgeprägter (Tsvilovskyy, Zholos *et al.* 2009).

Die bisherigen Ausführungen zeigen, dass es Hinweise gibt, dass einzelne TRPC4-Proteine mit sich selbst wechselwirken um homotetramere Kanäle zu bilden, und dass TRPC4-Protein möglicherweise mit Ca^{2+} Calmodulin (Trost *et al.* 2001), dem IP3-Rezeptor (Mery, Magnino *et al.* 2001; Tang, Lin *et al.* 2001) und $G_{\alpha i}$ (Jeon, Hong *et al.* 2012) oder $G_{\beta\gamma}$ wechselwirkt. Ebenso gibt es Hinweise, dass TRPC4-Proteine *in vitro* mit TRPC1 und/oder TRPC5 interagieren, um heterotetramere TRPC1/TRPC4-, TRPC1/TRPC4/TRPC5- oder TRPC4/TRPC5-Kanäle zu bilden. Auch gibt es Befunde, die für eine direkte Interaktion von TRPC4 mit Mxa (Lussier *et al.* 2005), mit einer E3 Ubiquitinligase (Wegierski *et al.* 2006) und mit NHERF (Tang *et al.* 2000) sprechen. Ein Teil dieser Befunde stammt aus Hefe-zwei-Hybrid Untersuchungen, mit denen gezielt nach Interaktionspartnern von TRPC4 gesucht wurde, zum Teil aus Untersuchungen, die gezielt mittels sogenannten „Pull-down“-Experimenten und Koimmunpräzipitationen durchgeführt wurden.

So stellte sich zum Beispiel heraus, dass eine HEK-Zelllinie, welche die TRPC3-cDNS überexprimiert, das Gen des IP3-Rezeptors im Vergleich zu HEK-Zellen, die nicht mit der TRPC3-cDNS transfiziert wurden, um mehr als das zweihundertfache exprimiert (Kiselyov *et al.* 1998). In Folge wurde dann gezeigt, dass der IP3-Rezeptor mit einem Sequenzabschnitt von TRPC3 wechselwirkt, der in allen TRPC-Proteinen – auch TRPC4 – konserviert ist.

Parallel wurde getestet inwieweit Ca^{2+} -Calmodulin von TRPC-Proteinen gebunden wird und *in vitro* konnte eine solche Bindung nachgewiesen werden (Tang, Lin et al. 2001; Trost, Bergs et al. 2001) und zwar vom gleichen Sequenzbereich der auch den IP3-Rezeptor bindet und der mittlerweile als CIRB Domäne bezeichnet wird. Inwieweit diese genannten Wechselwirkungen auch *in vivo* für die TRPC4-Kanalaktivität von Bedeutung sind, ist bisher nicht gezeigt. Erschwerend für eine detaillierte experimentelle Überprüfung ist, dass nach zielgerichteten Mutationen der sogenannten „CIRB“-Sequenz die TRPC-Kanäle nicht mehr aktiv sind.

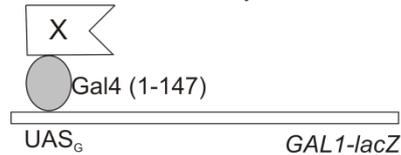
Nachdem, wie ausgeführt, bezüglich der Interaktionspartner von TRPC4 zwar Daten existieren, deren funktionelle Einordnung jedoch bisher nicht ohne weiteres möglich ist, sollte unter Verwendung eines alternativen Hefe-zwei-Hybrid Systems nach Proteinen gesucht werden, die mit den zytosolisch gelegenen Abschnitten von TRPC4 wechselwirken.

2.4 Hefe-zwei-Hybrid Systeme

Um generell die Interaktion von Proteinen zu identifizieren, gibt es verschiedene biochemische Methoden. Zum Beispiel kann das Zielprotein – hier TRPC4 – zusammen mit möglichen Interaktionspartnern mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen TRPC4 gerichtet ist, angereichert und die angereicherten Proteine anschließend mit Massenspektrometrie identifiziert werden. Man kann versuchen das Zielprotein mit Proteinen, die wechselwirken, über relativ kleine Moleküle, sogenannte Crosslinker, zu vernetzen und die Aufreinigung des Zielproteins den gebundenen Proteinpartner mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Man könnte auch direkt das Zielprotein immunpräzipitieren und hoffen, dass interagierende Proteine zusammen mit dem Zielprotein präzipitiert werden. Auch hier wäre im nächsten Schritt die Massenspektrometrie zur Identifizierung notwendig. Insbesondere wenn keine Antikörper für das Zielprotein zur Verfügung stehen, müssen andere Verfahren in Erwägung gezogen werden, um Proteininteraktionspartner zu finden. Ein solches genetisches System, um die Interaktionspartner eines Proteins zu finden und zu untersuchen, ist das Hefe-zwei-Hybrid System. Mit ihm ist es möglich nach unbekanntem Interaktionspartnern eines bekannten Proteins in einer cDNS

Bibliothek zu suchen. Ende der 1980er Jahre wurde das „klassische“ Hefe-zwei-Hybrid System von Stanley Fields und Ok-kyu Song entwickelt (Fields and Song 1989). Es handelt sich dabei um ein genetisches Screening Verfahren. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* dient dabei als Wirtsorganismus, in dem nicht nur nach Hefeproteinen gesucht werden kann sondern auch nach Proteinen aus jedem Organismus, aus dessen mRNA sich eine cDNA Bibliothek erstellen lässt. Das ursprüngliche Hefe-zwei-Hybrid System beruhte auf den Eigenschaften des Gal4p Proteins der Hefe. Dieses Gal4p Protein ist ein starker Expressionsaktivator der Gene für die Verstoffwechslung von Galaktose, *GAL1*, *GAL7* und *GAL10* kontrolliert (Hopper and Rowe 1978). Diese Gene werden nur in Anwesenheit von Galaktose und in gleichzeitiger Abwesenheit von Glukose exprimiert (Adams 1972). Gal4p bindet spezifisch mit seinem Amino-Terminus UAS_G, die sogenannte „upstream activation sequence“; diese DNA Sequenz liegt zwischen den Genen von *GAL1* und *GAL10*. Zwar bindet der Amino-Terminus von Gal4p an die UAS_G, ist aber allein nicht in der Lage, die Expression der Gene zu aktivieren (Keegan *et al.* 1986). Für die Aktivierung der Expression ist der Carboxy-Terminus von Gal4p essentiell (Ma and Ptashne 1987). Die zwei funktionellen Domänen, Amino-Terminus und Carboxy-Terminus von Gal4p, wurden nun für das zwei-Hybrid System verwendet. Der Name Hefe-zwei-Hybrid System ergab sich dadurch, dass das Ergebnis der Fusion des bekannten Zielproteins mit der DNA-bindenden Domäne von Gal4p als Hybrid 1 benannt wurde; das zweite Fusionsprotein, bestehend aus einer Proteinsequenz codiert von einer cDNA-Bibliothek und der Aktivator Domäne von Gal4p, wurde als Hybrid 2 benannt (Chien *et al.* 1991). Dies ist schematisch in Abbildung 2-5 dargestellt. Die beiden Hybride wurden von zwei Plasmiden kodiert. Um die Methode für das Durchmustern einer cDNA-Bibliothek zu nutzen und um positive Klone zu selektieren mussten noch ein Reporter gen vor die UAS_G kloniert werden, hier die cDNA von *GAL1-lacZ*.

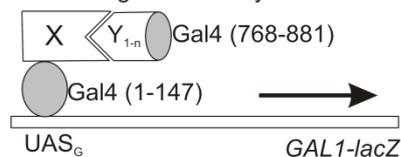
DNS-Bindedomäne Hybrid



Aktivierungsdomäne Hybrid kodiert durch cDNS-Bibliothek



Interaktion zwischen DNS-Bindedomäne Hybrid und Aktivierungsdomäne Hybrid führt zu Reporterexpression

**Abbildung 2-5 Hefe-zwei-Hybrid System**

Das klassische Hefe-zwei-Hybrid System besteht aus zwei Fusionsproteinen, auch Hybride genannt. Als erstes ist das bekannte Zielprotein (X) fusioniert an die DNS-bindende Domäne von Gal4p dargestellt. Dieses Fusionsprotein bindet an die UAS_G. Das zweite Hybrid ist ein unbekanntes Protein (Y), welches von einer cDNS-Bibliothek kodiert wird es ist an die Aktivierungsdomäne von Gal4p fusioniert. Interagieren die Proteine X und Y miteinander wird, durch die Bindung der DNS-bindende Domäne und die Aktivierung der Aktivierungsdomäne von Gal4p, das Reporter gen abgelesen, dargestellt als schwarzer Pfeil (Chien, Bartel et al. 1991).

Fields und Song konnten 1989 zeigen, dass die Interaktion der zwei Hybride ausreicht, um Gal1-lacZ in einem Ausmaß zu produzieren, dass eine Blaufärbung der Hefekolonie auf X-Gal-haltigem Medium erreicht wird. Die Blaufärbung ist daher der Nachweis, dass eine Interaktion von zwei Hybriden besteht. Dieses klassische Hefe-zwei-Hybrid System hat den Vorteil, dass systematisch cDNS-Bibliotheken auf eine Interaktion mit dem Zielprotein durchmustert werden können. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Interaktion der beiden Proteine, des Zielproteins und des potentiell wechselwirkenden Proteins, im Nukleus der Zelle geschieht. Beide Fusionsproteine müssen also zellkerngängig sein. Für Proteine, die in der Plasmamembran lokalisiert sind und deren Interaktionspartner schien diese Methode eher ungeeignet und deshalb wurde in dieser Arbeit ein alternatives Hefe-zwei-Hybrid System verwendet.

2.5 CytoTrap

Das in der Arbeit verwendete Hefe-zwei-Hybrid System (CytoTrap, Stratagene), beruht auf dem Sos recruitment System (Aronheim *et al.* 1997). Auch dieses System ist ein genetisches Screening Verfahren. Anders als bei dem klassischen Hefe-zwei-Hybrid System wird nicht nach der Transkription eines Reportergens gesucht sondern die Aufhebung eines hitzesensitiven Phänotyps wird als Marker für eine Interaktion verwendet. Die für das Screening, verwendete temperatursensitive *Saccharomyces cerevisiae* Mutante, *cdc25H* besitzt eine Punktmutation im *CDC25* Gen. Die Punktmutation führt zu einem instabilen Cdc25p Protein, welches bei 37°C nicht mehr funktionsfähig ist; durch den Ausfall des Cdc25p Proteins ist die Hefezelle nicht mehr lebensfähig. Das Protein Cdc25p ist ein Guaninnukleotid Austauschfaktor für Ras Proteine; Cdc25p tauscht GDP zu GTP an Ras Proteinen aus und aktiviert diese somit (Jones *et al.* 1991). Das humane Ortholog zu Cdc25, hSos, ist in der Lage, den temperatursensitiven Phänotyp des *cdc25H* Stammes zu heilen. Dazu muss das hSos Protein jedoch an die Plasmamembran der Hefezellen gelangen, zum Beispiel durch ein Myristylierungsmotiv oder eine Prenylierung des Proteins (Aronheim *et al.* 1994). In der Hefe ist das Cdc25p Protein auch an der Membran zu finden (Garreau *et al.* 1990). Des Weiteren war schon bekannt, dass das Hefe Cdc25p mit dem Ras Protein von Säugetieren interagieren kann (Segal *et al.* 1992) und es konnte gezeigt werden, dass das hSos Protein den hitzesensitiven Phänotyp des *cdc25H* Hefestamms aufhebt, wenn es an die Plasmamembran gebracht wird. (Aronheim, Engelberg *et al.* 1994).

Auf der Grundlage, dass das humane hSos die Funktion des Hefeproteins Cdc25p bei dessen Ausfall, kompensieren kann, beruht das CytoTrap System.

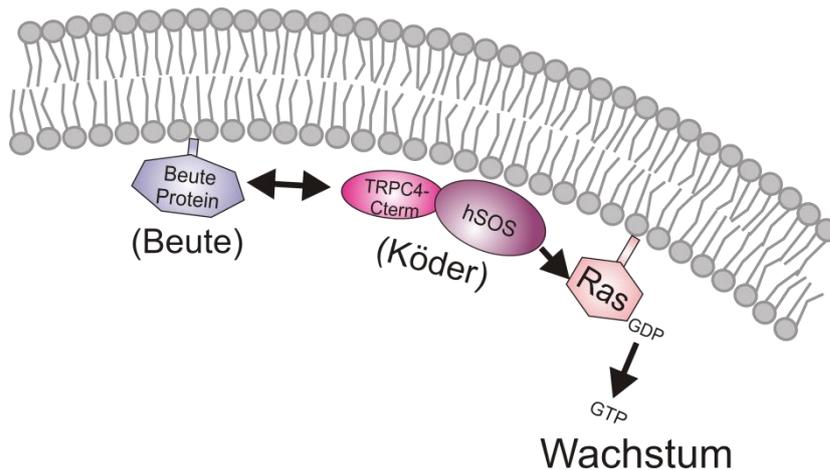


Abbildung 2-6 Schematische Übersicht über das Screening System CytoTrap

Das Beute-Protein wird durch ein Myristylierungssignal an die Plasmamembran gebracht. Die cDNS des Beute-Proteins wird von der cDNS-Bibliothek codiert. Das Köder-Protein ist ein Fusionsprotein aus TRPC4-C-Terminus und hSos. Durch die Interaktion von Beute-Protein und Köder-Protein wird hSos an die Plasmamembran gebracht und kann dort an dem Ras Protein Guanosin-5'-diphosphat zu Guanosin-5'-triphosphat austauschen. Dies führt zu einer Aktivierung des Ras Signalweges und zu Wachstum der Zelle.

Ursprünglich war es als System gedacht, mit dem man Interaktionspartner von Transkriptionsfaktoren suchen wollte, da dies in dem klassischen Hefe-zwei-Hybrid System nicht möglich war (Allen *et al.* 1995). Für das CytoTrap System wird das Köder-Protein, beziehungsweise seine cDNS, an das hSos Protein, bzw. dessen cDNS, fusioniert. Das Beute-Protein wird durch Myristoylierung an die Zellmembran gebracht. Durch die Interaktion von Beute-Protein und Köder-Protein wird das hSos-Fusionsprotein an die Zellmembran rekrutiert und kann dort seine Funktion als Guaninnukleotid Austauschfaktor wahrnehmen (Abbildung 2-6). Das Beute-Protein wird durch eine cDNS der cDNS-Bibliothek codiert und steht unter der Regulation des Galaktose-induzierbaren Promotors. Es wird also nur exprimiert wenn dem Wachstumsmedium Galaktose zugesetzt wird (Johnston and Davis 1984).

2.6 Zielsetzung

Das TRPC4-Protein ist überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert und dementsprechend war das Ziel, mithilfe des CytoTrap Hefe-zwei-Hybrid Systems Interaktionspartner von TRPC4 zu finden. Zu Beginn der Arbeit waren keine Daten publiziert, die mit dieser Vorgehensweise erzielt wurden. Als Köder sollten zytosolische Abschnitte von TRPC4 von Maus verwendet werden; mögliche Interaktionspartner sollten mithilfe einer cDNS-Bibliothek, die von mRNS von Hirn von Maus hergestellt worden war, gefunden werden. Identifizierte cDNS sollten dann kloniert werden und in Hinblick auf Interaktionsuntersuchungen mit der cDNS von TRPC4 ko-exprimiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), GE Healthcare (München), Sigma (München) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Chemikalien von anderen Anbietern wurden als solche gekennzeichnet.

3.2 Puffer und Medien

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Puffer und Medien bei 121°C, 1 bar und 20 min autoklaviert. Die Puffer und Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Alle Puffer für die Dicer Experimente wurden mit Diethyldicarbonat (DEPC) behandeltem und anschließend autoklaviertem H₂O angesetzt.

3.2.1 Puffer für molekularbiologische Methoden

STET-L-Puffer: 8% (w/v) Saccharose
 5 % (v/v) Triton-X-100
 50 mM Tris
 50 mM EDTA
 pH 8,0

vor Gebrauch Zugabe von Lysozym (100 µg/ml)

1xTBE-Puffer: 89 mM Tris
 89 mM Borsäure
 1 mM EDTA
 pH 8,0

10x DNS-Auftragspuffer: 40 % (w/v) Harnstoff
40 % (w/v) Glycerin, wasserfrei
50 mM EDTA, pH 8,0
10 mM Tris HCl, pH 7,0
0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol FF

TSS-Puffer: 10 % (w/v) PEG 3350
5 % (v/v) DMSO
1 % (w/v) Caseinhydrolysat
1 % (w/v) Natriumchlorid
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,05 M Magnesiumchlorid

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

3.2.2 Puffer für proteinbiochemische Methoden

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris HCl
0,4 % SDS
pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris HCl
0,4 % SDS
pH 6,8

2 x SDS-Probenpuffer: 120 mM Tris
20 % (v/v) Glycerin
10 % (v/v) β -Mercaptoethanol
8 % (w/v) SDS
0,01 % (w/v) Bromphenolblau
pH 6,8

10 x SDS Elektrophorese Puffer: 250 mM Tris HCl
1,92 M Glycin
1 % SDS

10 x TBS-Puffer: 0,5 M Tris HCl
1,5 M NaCl
pH 7,5

Blotting Puffer: 20 % Methanol
1 x Elektrophorese Puffer

Coomassie: 0,125 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
45 % Ethanol (v/v)
10 % Essigsäure (v/v)

Entfärbepuffer: 9 % Ethanol (v/v)

6 % Essigsäure (v/v)

SDS-Page

Tabelle 3-1 Pipettierschema für SDS-PAGE

Trenngel	Trenngelpuffer	40%Aa 29:1*	H ₂ O	10% APS	TEMED
6,50%	2,5 ml	1,63ml	5,78ml	75µl	15µl
7%	2,5 ml	1,75ml	5,66ml	75µl	15µl
8%	2,5 ml	2ml	5,41ml	75µl	15µl
8,50%	2,5 ml	2,13ml	5,28ml	75µl	15µl
10%	2,5 ml	2,5ml	4,91ml	75µl	15µl
12%	2,5 ml	3ml	4,41ml	75µl	15µl
12,50%	2,5 ml	3,13ml	4,28ml	75µl	15µl
15%	2,5 ml	3,75ml	3,66ml	75µl	15µl
15,50%	2,5 ml	3,88ml	3,53ml	75µl	15µl
17%	2,5 ml	4,25ml	3,16ml	75µl	15µl
Sammelgel					
Sammelgel	Sammelgelpuffer	40%Aa 29:1	H ₂ O	10% APS	TEMED
4%	1,25ml	0,5ml	3,21ml	37,5µl	7,5µl

*Wässrige 40 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 29:1

Puffer für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli*

Lysis Puffer: 300 mM NaCl

1 mM EDTA

50 mM Tris/HCl

pH 8,0

Puffer für Koimmunpräzipitationen

Proteaseinhibitoren: Iodacetamid, Phenanthrolin, PMSF, Leupeptin, Pepstatin, Benzamidin und Aprotinin

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl
50 mM Tris HCl pH 8
5 mM EDTA
1% Nonident P40
0,1% SDS
0,5% Na-Deoxycholat
Protease Inhibitoren

5x Basispuffer: 250 mM HEPES, pH7,5
750 mM NaCl
5 mM CaCl₂

10% (w/v) n-Dodecyl- β -maltosid-Stocklösung in H₂O, bei 4°C lagern

Extraktionspuffer: 1x Basispuffer
1,25% DDM
Protease Inhibitoren

Waschpuffer: 1x Basispuffer
0,5% DDM

Puffer für Dicer Aktivitätstest (RNase frei)

Lyse Puffer: 10 mM HEPES pH7,0
2 mM MgCl₂
6 mM β -Mercaptoethanol

10x Reaktionspuffer: 200 mM Hepes pH 7
 20 mM MgCl₂
 20 mM Dithiothreitol
 RNase inhibitor

Lade-Puffer: 95% Formamid
 18mM EDTA
 0,025% SDS (w/v)
 0,1% Xylene Cyanol (w/v)
 0,1% Bromphenolblau (w/v)

Puffer für kalziumabhängigen Dicer Aktivitätstest

Lysepuffer: 50 mM HEPES, pH7,5
 150 mM NaCl
 10 mM BAPTA

10% (w/v) n-Dodecyl-β-maltosid-Stocklösung in H₂O, bei 4°C lagern

10X Reaktionspuffer: 200 mM Tris (pH 6.5)
 250 mM NaCl
 10% Glycerin
 15 mM MgCl₂

Verdünnungspuffer: 20 mM Hepes pH 7
2 mM MgCl₂
2 mM Dithiothreitol

Puffer für Hefe-zwei-Hybrid System

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
1 mM EDTA

PEG/LiOAc Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM EDTA (pH 8.0)
100 mM Lithiumacetat (pH 7.5)
40% (w/v) PEG 3350

LiSORB: 100 mM Lithiumacetat
10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM EDTA
1 M Sorbitol

3.2.3 Medien für Bakterien

LB-Medium pro Liter: 10 g NaCl
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt

LB_{Chloramphenicol}: LB-Medium
30 µg/ml Chloramphenicol

3.3 Organismen

3.3.1 Bakterienstämme

Escherichia coli Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden:

- *E. coli* XL1-Blue von Stratagene, La Jolla, USA

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB
lacIqΔM15 Tn10 (Tetr)]

- *E. coli* BL21(DE3) von Stratagene, La Jolla, USA

B F- dcm ompT hsdS (rB- mB-) gal λ (DE3)

3.3.2 Hefestamm

Der für das Screening verwendete *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H Paarungstyp a wurde von Stratagene bezogen.

- *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H:

MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901leu2-3 112 cdc25-2
Gal+

3.3.3 Zelllinien

Tabelle 3-2 Liste der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz	Bezugsquelle
HEK293	Menschliche embryonale Fibroblasten aus der Niere	(Graham <i>et al.</i> 1977)	ATTC* CRL-1573
HEK293 TRPC4α M2R	Menschliche embryonale Fibroblasten aus der Niere, welche TRPC4α und den Muskarinergen Rezeptor 2 stabil exprimieren	(Tang, Tang <i>et al.</i> 2000)	Dr. Michael X. Zhu
HEK293 TRPC4β M2R	Menschliche embryonale Fibroblasten aus der Niere, welche TRPC4β und den Muskarinergen Rezeptor 2 stabil exprimieren	(Tang, Tang <i>et al.</i> 2000)	Dr. Michael X. Zhu
HEK293 M2R	Menschliche embryonale Fibroblasten aus der Niere, welche den Muskarinergen Rezeptor 2 stabil exprimieren		Dr. Michael X. Zhu

3.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei Eurofins MWG Operon bestellt. Sequenzierprimer wurden auf eine Konzentration von 10 pmol verdünnt, PCR Primer auf eine Konzentration von 50 pmol. Die Primer wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 3-3: Oligonukleotide mit Nukleotidsequenz und Verwendungszweck

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	Verwendung
JZ1	GTAGGATCCACCAGGAAATTGAGGATGATG	TRPC6 C-Terminus 1 <i>Bam</i> HI in pSos
JZ2	TTGGATCCCCTATCTGCGGCTTTCCTC	TRPC6 C-Terminus 2 <i>Bam</i> HI in pSos
JZ3	TAGGATCCAAATGAGCCAGAGCCCGAG	TRPC6 N-Terminus 1 <i>Bam</i> HI in pSos
JZ4	TTGGATCCCTATAAACCAGAGAGGTTCTCATAC	TRPC6 N-Terminus 2 <i>Bam</i> HI in pSos
JZ5	GTAGGATCCAAATGGCTCAGTTCTATTACAAA*	TRPC4 N-Terminus 1 <i>Bam</i> HI in pSos
JZ6	TTGGATCCCTACTTCACCGCCAGTGTCT	TRPC4 N-Terminus 2 <i>Bam</i> HI in pSos
JZ7	TAGGATCCATAATTCTTACCAACTAATTGCC	TRPC4 C-Terminus 1 <i>Bam</i> HI in pSos
JZ8	TTGGATCCTCACAATCTTGTGGTCACATAA	TRPC4 C-Terminus 2 <i>Bam</i> HI in pSos
JZ9	TAGGATCCAGAACAACCTCTACCAGCTC	TRPC5 C-Terminus 1 <i>Bam</i> HI in pSos
JZ10	TTGGATCCTTAGAGCCGAGTTGTAAGTTG	TRPC5 C-Terminus 2 <i>Bam</i> HI in pSos
JZ11	AAGCGGCCGCAATGGCCCAGCTGTACTACAA	TRPC5 N-Terminus 1 <i>Not</i> I in pSos
JZ12	TTGCGGCCGCTACTTGACTACCCAGTGTTTC	TRPC5 N-Terminus 2 <i>Not</i> I in pSos
JZ13	CCGCCGCCACCATGTCGTCCTCGTACGGC	mb4b_NM_001037099
JZ14	TCAAAGCCTATGTCTGGGAG	mb4b_NM_001037099

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	Verwendung
		1037099
JZ15	CCAAGACCAGGTACCATG	Sequenzier- primer pSos 5'
JZ16	GCCAGGGTTTTCCAGT	Sequenzier- primer pSos 3'
JZ17	ACTACTAGCAGCTGTAATAC	Sequenzier- primer pMyr 5'
JZ18	CGTGAATGTAAGCGTGACAT	Sequenzier- primer r pMyr 3'
JZ19	ACGTGAGCTACTGTGGTGC	Sequenzier- primer b4 300bp up
JZ20	AACAGACATGATGCAGAAAGCC	Sequenzier- primer b4 700 bp up
JZ21	GGCCCAGTGCCCGCCT	Sequenzier- primer b4 1100 bp up
JZ22	GTCTTCCTATCCACCAATCAT	Sequenzier- primer b4 400 bp down
JZ23	TAGGATTGTTGAGGACAGATCT	Sequenzier- primer b4 800 bp down
JZ24	GCTACTGCTCGTGTGGGTG	Sequenzier- primer b4 1200 bp down
JZ25	GCAGCAGGAGCCAAGGAAAATTAGTTATAGTAGATGGCTCAGT TCTATTACAAAAGAAAT	Gap repair TRPC4-N
JZ26	CGCGGTTAATTAATTAATTAACCGCGGCGGCCGCGAGCTCAC GCGTGCGCGCGTTCGACGTCG	Gap repair TRPC4-N
JZ27	CCAAGGAAAATTAGTTATAGTAAGTAAGTTCTTACCAACTAATT GCCGA	Gap repair TRPC4-c
JZ28	GCGCGTCGACGTCGCCCCGGCCATGGGGATCTCACAATCTTG TGGTCACATAA	Gap repair Trpc4-c
JZ29	GGAAGAACGCTTTCTAGATGC	Sequenzier- primer TRPC6 N- Terminus 300bp up
JZ30	CAGCCAGTCTGAACTTCAGC	Sequenzier- primer TRPC6 N- Terminus 600bp up
JZ31	ATGTCTATGTAGGCGATGCGC	Sequenzier- primer TRPC4 N- Terminus 300bp
JZ32	GGTCCAGGCTCAACATCTAC	Sequenzier- primer TRPC4 N- Terminus 600bp

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	Verwendung
JZ33	CAACATTGAGAAAGAGTTCAAG	Sequenzier- primer TRPC6 N- Terminus 920bp
JZ34	ATTGAGGGAATGACACTCTTC	Sequenzier- primer TRPC6 N- Terminus 350 bp rev
JZ35	GAATGATTGGGGTCACATCAT	Sequenzier- primer TRPC6 N- Terminus 650bp rev
JZ36	GGTCCAAGAGACCAACAACG	Sequenzier- primer TRPC6 N- Terminus 920bp rev
JZ37	GTTGCTCAGCCCAACTGCC	Sequenzier- primer TRPC4 N- Terminus 900
JZ38	GCCTGGGAACCTCATCGTAC	Sequenzier- primer TRPC4 N- Terminus 920 rev
JZ39	AAAGGGTCTTCGCTTGACAG	Sequenzier- primer TRPC4 N- Terminus 640 rev
JZ40	GGCTCCAACCACCTCTTTTC	Sequenzier- primer TRPC4 N- Terminus 340 rev
JZ41	TAATTGTCGACTCACAATCTTGTGGTCACATAA	TRPC4 C- Terminus (<i>Sal</i> I)
JZ42	TCGCCCGGGACATGGCTGACCAACTGACTG	rat Calmodulin (<i>Sma</i> I) in pMyr
JZ43	ATTAGTCGACTCACTTCGCTGTCATCATTG	rat Calmodulin (<i>Sa</i> II) in pMyr
JZ44	CCACTCTGATCCACCCGC	Sequenzier- primer TRPC4-C 525 bp up
JZ45	CAGTGTGTGCTAGTAGACC	Sequenzier- primer TRPC4 C- Terminus 840bp up
JZ46	CGCCATCGAGAAGTGGGTG	Rasgrf1 Mus 3300bp up

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	Verwendung
JZ47	GTGGGGAGTTTTGGTTCCG	Rasgrf1 Mus 3770bp rev
JZ48	TCGCCCGGGTCATGGCTCAGTTCTATTACAAAAG	mTRPC4 N- Terminus (<i>Sma</i>) in pMyr
JZ49	GTCGACCTTCTTCTCCTCCAGCCTGGGAAC	mTRPC4 N- Terminus (<i>Sa</i> l) in pMyr
JZ50	ACTTGTCGACTTCTTCTCCTCCAGCCTGG	mTRPC4 N- Terminus (<i>Sa</i> l) in pSos-n 3'
JZ51	CAAGTCGACTTAAACCAGAGAGGTTCTCATACC	mTRPC6 N- Terminus (<i>Sa</i> l) in pSos-n
JZ52	GACCTGCAATTATTAATCTTTTG	Sequenzier- primer pSosn
JZ53	CCCGCCACTTGGGCGCG	Sequenzier- primer pSosn rev
JZ54	GGCCAGAACCCACCAAAG	Sequenzier- primer TNXL
JZ55	AGCTTCAGAAGGCGGATCCCCATGGTTCGACGGAGCTCTAGAC CCGGGGGCACC	pSos umbau 5' mit neuer multiple cloning site
JZ56	AGCTCCGTCGACCATGGGGATCCGCCTTCTGAAGCTTGGAGT TGATTGTATGCTTGGT	pSos Umbau 3' mit neuer multiple cloning site
JZ57	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGCTCAGTTCTATTACAAAA GAAATG	TRPC4 in pBT3-N 5'
JZ58	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCACAATCTTGTGGTCACATAA TC	TRPC4 in pBT3-N 3'
JZ59	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCAATCTTGTGGTCACATAA TCTTC	TRPC4 in pBT3-STE 3'
JZ60	ATTAACAAGGCCATTACGGCCaATGGCTCAGTTCTATTACAAAA GAAATG	TRPC4 in pBT3-STE 5'
JZ61	GATGGTGCCGCTGCCATCC	Sequenzier- primer TNXL 850 rev
JZ62	CGTGACCACCTTCGGCTAC	Sequenzier- primer TNXL 1540
JZ63	CCTAAGTGGGTGTCTCCAG	Hspa8 rev 840
JZ64	TGGCATGCATGTGCTCTG	Sequenzier- primer pBT3- STE 5'
JZ65	GTAAGGTGGACTCCTTCT	Sequenzier- primer PBT3- STE 3'
JZ66	CAGAAGGAGTCCACCTTAC	Sequenzier- primer pBT3- N 5'
JZ67	AAGCGTGACATAACTAATTAC	Sequenzier- primer pBT3- N 3'

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	Verwendung
JZ68	ATTCAGGATCCAATGTATGACGACTCCTACGTGC	Beta 3b in pSos <i>Bam</i> HI
JZ69	ACTTAGTCGACCTAGTAGCTGTCCTTGGGC	Beta 3b in pSos <i>Sa</i> I
JZ70	ATAACGAATTCACATGTATGACGACTCCTACGTG	Beta3b in pMyr (<i>Eco</i> RI)
JZ71	AATAGAATTCATAATTCTTACCAACTAATTGCC	TRPC4 C-Terminus in pMyr (<i>Eco</i> RI)
JZ72	AATGAAGCTTATGGCTCAGTTCTATTACAAAAG	TRPC4 N-Terminus in pSos (<i>Hind</i> III)
JZ73	ACATTAAGCTTTCTTCTCCTCCAGCCTGGG	TRPC4 N-Terminus in pSos (<i>Hind</i> III) rev
JZ74	CCGCCGCCACCATGAACCATCTTCCAGAACAC	Stard 3 nl in pcAGGS-R-Phluorin mit kozak
JZ75	TAGTTCCAAAAGCGGTTTCTC	Stard 3 nl in pcAGGS-R-Phluorin
JZ76	CATGAACCATCTTCCAGAACAC	Stard 3n-l in 3xFlag
JZ77	CTCATAGTTCCAAAAGCGGTTTCTCAC	Stard 3n-l in 3xFlag rev
JZ78	CCGCCGCCACCATGTCTAAGGGACCTGCAG	Hspa8 in pcAGGS-R-Phluorin
JZ79	ATCCACCTCTTCAATGGTGGG	Hspa8 in pcAGGS-R-Phluorin rev
JZ80	CATGTCTAAGGGACCTGCAG	Hspa8 in 3xFlag
JZ81	TTAATCCACCTCTTCAATGGTG	Hspa8 in 3xFlag rev
JZ82	CCGCCGCCACCATGAGTGAAGAGGATCAGGG	Tarbp2 in pcAGGS-R-Phluorin
JZ83	CTTGCTACCCGCCATGATC	Tarbp2 in pcAGGS-R-Phluorin rev
JZ84	CATGAGTGAAGAGGATCAGGG	Tarbp2 in 3xFlag
JZ85	CTACTTGCTACCCGCCATG	Tarbp2 in 3xFlag rev
JZ86	CATGGGAGATTGGATGACTG	Adip in 3XFlag
JZ87	TTAAGGTAAGTCATCTCGGTCC	Adip in 3XFlag rev
JZ88	CATGCCCTTCTCCAACAGCC	ckb in 3xFlag
JZ89	TCACTTCTGGGCCGGCATG	ckb in 3xFlag rev
JZ90	CATGGCGGCGCCCAGGATG	Ataxin10 in 3xFlag
JZ91	TCAAGGCGGGGGGATGTCA	Ataxin10 in 3xFlag rev
JZ92	CATGCCGTTCCCATTGGAAG	Cab39 in 3xFlag

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	Verwendung
JZ93	CTAGGCTTCCTGCTGGGC	Cab39 in 3xFlag rev
JZ94	CATGGGACTCTTTGGAAAAACC	Vps24 in 3xFlag
JZ95	CTAGCTTCTGAGTGTGGCC	Vps24 in 3xFlag rev
JZ96	CATGGGGGATCGAGAGCAGC	14-3-3 eta in 3xFlag
JZ97	TCAGTTGCCTTCTCCTGCTTC	14-3-3 eta in 3xFlag rev
JZ98	CATGACCATGGATAAGAGTGAG	14-3-3 beta in 3XFLAG
JZ99	TTAGTTCTCTCCCTCTCCAGC	14-3-3 beta in 3XFLAG rev
JZ100	AAGCTTATGGCGGCGCCAGGATG	Ataxin10 (HindIII) in 3XFlag
JZ101	GTCGACTCAAGGCGGGGGGATGTC	Ataxin10 (SalI) in 3XFlag
JZ102	GAATTCATGCCCTTCTCCAACAGCC	ckb (EcoRI) in 3XFlag
JZ103	GTCGACTCACTTCTGGGCGGCATG	ckb (SalI) in 3XFlag
JZ104	GCGAATTCAATGACCATGACTGCCAACAAG	st5 (EcoRI) in p3XFlag
JZ105	CGTGTCGACTTAATTCTTCTTGTGGAGGAACTTC	st5 (SalI) in p3XFlag
JZ106	CCCGCCGCCACCATGGCTCAGTTCTATTACAAAAG	mTRPC4 mit Kozak für pcDNA3mCh erry
JZ107	CAATCTTGTGGTCACATAATC	mTRPC4 rev für pcDNA3mCh erry
JZ108	CGAATTCATGGACCATTCTAATAGGGAAAAGG	Casein Kinase 1g1 (EcoRI) in p3XFlag
JZ109	GAGTCGACTCACTTGTGTCGCTGGGC	Casein Kinase 1g1 (SalI) in p3XFlag
JZ110	GAGTTGAATGCTGACCTG	Hspa8 seq
JZ111	CCAGCTTGGCATCTCGAAGG	Hspa8 seq rev
JZ112	CCGCCGCCACCATGACCATGGATAAGAGTGAG	14-3-3beta pcAGGS IRES GFP
JZ113	CCGCCGCCACCATGCCGTTCCCATTTGGCAAG	Cab39 pcAGGS IRES GFP
JZ114	CCGCCGCCACCATGAGTGAAGAGGATCAGGG	Tarbp2 pcAGGS IRES GFP
JZ115	CCGCCGCCACCATGGGACTCTTTGGAAAAACCC	Vps24 pcAGGS IRES GFP

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	Verwendung
JZ116	CCGCCGCCACCATGGCGGGCGCCAGGATGCCAC	Ataxin 10 pcAGGS IRES GFP
JZ117	CCGCCGCCACCATGTCTGACAAACGGCAGTC	Stomatin pcAGGS IRES GFP
JZ118	TCAGTGATTAGAACCCATGATGCC	Stomatin rev pcAGGS IRES GFP
JZ119	CTGCAAGTGTAAGCCCCAGC	Sequenzier- primer st5
JZ120	GCTGAAGCGAGCGCCAGC	Sequenzier- primer st5
JZ121	CTGTCCAGCTGCTCTCACGC	Sequenzier- primer st5
JZ122	CTTCTCATGAAGGGGTAGAC	Sequenzier- primer st5
JZ123	CTCCTTGGGAAGCCCTCCC	Sequenzier- primer st5
JZ124	CACTCGTCCCAGGGCCCTC	Sequenzier- primer st5
JZ125	CCGCCGCCACCATGTCTAAGGGACCTGCAGTTG	Hspa8 in pcAGGS IRES GFP
JZ126	ATGCTCGACTCGAGAATGAGTGAAGAGGATCAGGG	Tarbp2 in pET19b (<i>Xho</i> I)
JZ127	GCAGCCGGGATCCCTACTTGCTACCCGCCATG	Tarbp2 in pET19b (<i>Bam</i> HI) rev
JZ128	CGGAGCCCTGATCCTCTTCACTCATTGGATCC	Tarbp2 in pET 19b (<i>Bam</i> HI) falsch
JZ129	AATTCTTACCAACTAATTGCCGAC	TRPC4 C- Terminus in pGEX 4T-2 (<i>Sma</i> I) PHO
JZ130	CAATCTTGTGGTCACATAATCTTC	TRPC4 C- Terminus in pGEX 4T-2 (<i>Sma</i> I) rev PHO
JZ131	TTTCATAGACGGTCAAACAAAATG	TRPC4 C- Terminus (2530- 2922bp) in pGEX 4T-2 (<i>Sma</i> I)
JZ132	CAATCTTGTGGTCACATAATCTTCG	TRPC4 C- Terminus (2530- 2922bp) in pGEX 4T-2 (<i>Sma</i> I) rev
JZ133	GGATCCAATGAGTGAAGAGGATCAGGGCTCCG	Tarbp2 in pET 19b (<i>Bam</i> HI)
JZ134	CCGCCGCCACCATGGACCATTCTAATAGGGAAAAG	Casein Kinase 1g1 in

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	Verwendung
		pcAGGS IRES GFP
JZ135	TCACTTGTGTCGCTGGGCTGTC	Casein Kinase 1g1 rev in pcAGGS IRES GFP
JZ136	AAGCTTATGGTGTCTAAGGGCGAAGAG	Tag RFpT <i>HindIII</i>
JZ137	GGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATG	Tag RFpT <i>BamHI</i>
JZ138	TACAAGGGATCCGGTGGTAGTGGTGGTAGTGGTGGTGCTCAG TTCTATTACAAAAGAAATG	Linker TRPC4 (<i>BamHI</i>)
JZ139	ACTAGTGGATCCTCACAATCTTGTGGTCACATAATC	TRPC4 (<i>BamHI</i>) rev
JZ140	GGATCCAATAATTCTTACCAACTAATTGC	TRPC4 C Terminus (<i>BamHI</i>) in pGEX 4T2)
JZ141	GTCGACTCACAATCTTGTGGTCACAT	TRPC4 C- terminus <i>SaI</i> rev in pGEX 4-T2
JZ142	CAAGGAGGCCGACAAAGAGAC	PJZ53 for
JZ143	GTGCTGGGCTTTGACATTGG	Sequenzier- primer TRPC4 1750 rev
JZ144	CGCGTTTGTAAAGTACAGTG	Sequenzier- primer TRPC4 1360
JZ145	GGATCCATGGCTCAGTTCTATTACAAAAG	TRPC4 (<i>BamHI</i>)
JZ146	GGATCCTTACCACCACTACCACCACTACCACCCAATCTTGTG GTCACATAATC	TRPC4 mit Linker (<i>BamHI</i>) rev ohne Stopp
JZ147	GGTGGTAGTGGTGGTAGTGGTGGTATGGCTCAGTTCTATTACA AAAG	TRPC4 mit Linker
JZ148	TCACAATCTTGTGGTCACATAATC	TRPC4 Stopp
JZ149	ATGGCTCAGTTCTATTACAAAAG	TRPC4 Start
JZ150	ACCACCACTACCACCACTACCACCCAATCTTGTGGTCACATAA TC	TRPC4 mit linker ohne Stopp
JZ151	CAGTCCGCCCTGAGCAAAG	Sequenzier- primer Amaya
JZ152	GTAACTTGTTTATTGCAGC	Sequenzier- primer Amaya rev
JZ153	GGAAGTGCCACTGCCAATCTCAATG	Tarbp2 rev Deletion von AA 209- aa234
JZ154	AATGAGGCAGAGCCTGATGACGATC	Tarbp2 for
JZ155	tacgaAAGCTTATGAGTGAAGAGGATCAGGGCTCC	Tarbp2 in pcDNA3 tagRFpT tsien

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	Verwendung
JZ156	ACCATCGGATCCTTCTTGCTACCCGCCATGATC	(HindIII) Tarbp2 in pcDNA3 tagRFPT tsien (BamHI)
JZ157	CCTCGTAGGGCTTGCCTTCGC	Sequenzier- primer pcDNA3 tagRFPT tsien rev
JZ158	CCGCCGCCACCATGTACCCTTATGACGTGCCCCG	kozak-atg-HA für Dicer in IRES GFP
JZ159	CTACTTCCACAGTGACTCTG	Dicer rev

Tabelle 3-4 RNS Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz 5'>3'	Verwendung
37a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGAAAGUUCACGAUU	Dicer Substrat
37b	UCGUGAACUUUCAACUAUACAACCUACUACCUCAUU	Dicer Substrat
15a	UGA GGU AGU AGG UUG	Größenstandard
22a	UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U	Größenstandard

3.5 Vektoren

Tabelle 3-5: Ausgangsvektoren und deren Quelle

Name	Beschreibung	Quelle
pSos	Hefeexpressionsvektor mit hSos	Stratagene
pMyr	Hefeexpressionsvektor mit Myristylierungssignal	Stratagene
pBT3-N		
pcAGGS-R-Phluorin	Eukaryotischer Expressionsvektor mit ratiometrischem pH sensitivem Luorin	U. Wissenbach, Homburg
pcAGGS IRES GFP	Eukaryotischer Expressionsvektor mit eGFP	U. Wissenbach, Homburg
pcAGGS IRES RFP	Eukaryotischer Expressionsvektor mit mRFP	U. Wissenbach, Homburg
pGEX-4T-2	Prokaryotischer Expressionsvektor mit N-terminalem GST-Fusions-Tag	GE Healthcare, München
p3xFlag	Eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminalem dreifachen Flag-Tag	Sigma Aldrich, St Louis
pcDNA3	Eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3 TagRFPT	Eukaryotischer Expressionsvektor mit	Roger Tsien, La Jolla

Name	Beschreibung	Quelle
pBluescript II SK-	TagRFPT (Shaner <i>et al.</i> 2008) Klonierungsvektor mit der Möglichkeit für ein Blau-Weiß-Screening	Fermentas, St. Leon-Rot

Tabelle 3-6: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Name	Beschreibung
pJZ1	pSos mit mTRPC6-N-C <i>Bam</i> HI
pJZ2	pSos mit mTRPC6-C-Terminus <i>Bam</i> HI
pJZ3	pSos mit mTRPC4-N-Terminus <i>Bam</i> HI
pJZ4	pSos mit mTRPC4-C-Terminus <i>Bam</i> HI
pJZ5	pSos mit mTRPC5-N-Terminus <i>Not</i> I
pJZ6	pSos mit mTRPC5-C-Terminus <i>Bam</i> HI
pJZ7	pSos mit YVC1-c(PCR von pEG-YVC1-c 425bp) <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I
pJZ8	pSos mit YVC1-n(PCR von pGS1751 686bp) <i>Nco</i> I/ <i>Sal</i> I
pJZ9	pMyr mit YVC1-n von (PGS1751) <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I
pJZ10	pMyr mit NF11 von (pGS1781) <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I
pJZ11	pMyr mit UBC9 von (pGS1897) <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I
pJZ12	pMyr mit YVC1-c PCR von pGS1753 <i>Xma</i> I/ <i>Sal</i> I
pJZ13	pMyr mit Calmodulin (yeast) aus pGS1749
pJZ14	pMyr mit Calmodulin (Ratte) <i>Sma</i> I/ <i>Sal</i> I
pJZ15	pGS236+YC3.60 (<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III)
pJZ16	pMyr mit TRPC4-N-Terminus (<i>Sma</i> I/ <i>Sal</i> I)
pJZ17	PGS237+TNXL (<i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I)
pJZ18	pSosn+TRPC4 N-Terminus
pJZ19	pSosn+TRPC6 N-Terminus
pJZ20	pBT3-N +TRPC4 (<i>Sfi</i> I)
pJZ21	pBT3-STE +TRPC4 (<i>Sfi</i> I)
pJZ22	pSos +Beta 3b (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I)
pJZ23	pMyr+Beta 3b (<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I)
pJZ24	pMyr+TRPC4 C-Terminus (<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I)
pJZ25	pcAGGS-R-Lurin(<i>Eco</i> RV)+Stard3n-I
pJZ26	p3XFlag (<i>Eco</i> RV)+Stard3n-I
pJZ27	pcAGGS-R-Phluorin(<i>Eco</i> RV)+Hspa8
pJZ28	p3XFlag (<i>Eco</i> RV)+Hspa8
pJZ29	pcAGGSr-Phluorin (<i>Eco</i> RV)+Tarbp2
pJZ30	p3XFlag (<i>Eco</i> RV) +Tarbp2
pJZ31	pSos(<i>Hind</i> III)+TRPC4-N (<i>Hind</i> III)
pJZ32	p3XFlag (<i>Eco</i> RV)+ckb
pJZ33	p3XFlag (<i>Eco</i> RV)+Vps24
pJZ34	p3XFlag (<i>Eco</i> RV)+Ataxin 10
pJZ35	p3XFlag (<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I) +St5 (<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I)
pJZ36	p3XFlag (<i>Eco</i> RV)+14-3-3beta
pJZ37	p3XFlag (<i>Eco</i> RV)+14-3-3 eta
pJZ38	p3XFlag (<i>Eco</i> RV)+Cab39
pJZ39	p3XFlag (<i>Eco</i> RV)+Adip
pJZ40	pcDNA3 +mTRPC4-mCherry-HAT-SBP
pJZ41	p3XFlag (<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I)+Casein Kinas2 1(<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I)
pJZ42	14-3-3 beta+pCAGGS IRES GFP (<i>Eco</i> RV)
pJZ43	Ataxin 10+ pCAGGS IRES GFP (<i>Eco</i> RV)
pJZ44	Cab39+ pCAGGS IRES GFP (<i>Eco</i> RV)
pJZ45	Tarbp2+ pCAGGS IRES GFP (<i>Eco</i> RV)
pJZ46	Vps24+ pCAGGS IRES GFP (<i>Eco</i> RV)
pJZ47	Stomatin+ pCAGGS IRES GFP (<i>Eco</i> RV)
pJZ48	Hspa8+pCAGGS IRES GFP m(<i>Eco</i> RV)
pJZ49	Tarbp2+ pET19b (<i>Bam</i> HI/ <i>Bam</i> HI)
pJZ50	TRPC4 C-Term+ pGEX-4T-2 (<i>Sma</i> I)
pJZ51	TRPC4 C-Term (844-981AA)+ pGEX-4T-2 (<i>Sma</i> I)

Name	Beschreibung
pJZ52	Caseinkinase 1g1 +pCAGGS IRES GFP (<i>EcoRV</i>)
pJZ53	TRPC4+linker in pcDNA3 TagRFt (<i>BamHI</i>)
pJZ54	TRPC4 C-Term+ pGEX-4T-2(<i>BamHI/SalI</i>)
pJZ55	TRPC4+linker in pCDNA3-TagRFpt (<i>BamHI</i>) TagRFpt c-terminal fusioniert
pJZ56	TRPC4+linker im pAMAXA-eGFP-N-term fus (<i>EcoRV</i>)
pJZ57	TRPC4+linker im pAMAXA-eGFP-C-term fus (<i>EcoRV</i>)
pJZ58	p3XFlag+Tarbp2-209_234
pJZ59	pcDNA3 tagRFpt-Tsein +Tarbp2 (<i>HindIII/BamHI</i>)
pJZ60	pcAGGS IRES GFP + Tarbp2-209_234 (<i>EcoRV</i>)
pJZ61	pcAGGS IRES GFP+ HA-Dicer (<i>EcoRV</i>)
pJZ62	Tarbp2+pcAGGS IRES RFP (<i>EcoRV</i>)

Der Vektor pIRES-neo2-Dicer wurde uns von Prof. Dr. Gunter Meister aus Regensburg zur Verfügung gestellt und diente als Template für pJZ61.

3.6 Polymerase- Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde nach der Methode von K.B. Mullis (Saiki *et al.* 1988) durchgeführt. Die verwendete DNS Polymerase war die Phusion™ High-Fidelity DNS Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach). In Tabelle 3-7 ist das Zeitschema für die Standard PCR zu sehen.

Tabelle 3-7 Protokoll für die Standard PCR

1x	
98°C	Denaturierung 2 Minuten
30-60x	
98 °C	Denaturierung 10 Sekunden
55°C-60°C	Annealing 10 Sekunden
72 °C	Elongation 20 Sekunden pro 1000 Basen
1x	
72 °C	Elongation 7 Minuten

3.7 Nukleinsäuren-Analytik

3.7.1 Vollängen Klone

Einige, der in dieser Arbeit verwendeten Klone wurden von imaGenes bezogen, die cDNS stammte aus verschiedenen Geweben aus der Maus. Die Sequenz der Vollängen Klone war korrekt und vollständig.

Tabelle 3-8 Liste der käuflich erworbenen Vollängen Klone

Klone Name	Gen Name	Accession Nummer
IRCLp5011H0613D	14-3-3β	BC132121
IRAVp968G0593D	Vps24	BC049964
IRAVp968G0830D	Creatin Kinase Brain	BC015271
IRAVp968F0421D	Ataxin 10	BC016410
IRAVp968E024D	Tarbp2	BC002028

3.7.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden über ein Agarosegel aufgetrennt. Agarose wurde in 1xTBE Puffer aufgekocht und es wurde 5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Agarose dazugegeben. Der Prozentsatz der Agarose war von der Größe der Nukleinsäuren Fragmenten abhängig.

3.7.3 Gelelektrophorese von kleinen Nukleinsäuren

Für die Auftrennung von kleinen RNSs über 15% denaturierendes Polyacrylamide Gel mit 7 M Harnstoff:

4,2 g Harnstoff

0,5 ml 10 x TBE

3,75 ml 40% (w/v) 29:1 Acrylamide: bis- Acrylamide

2,5 ml H₂O

70 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 3,5 µl TEMED

0,5xTBE als Laufpuffer verwendet.

3.7.4 Isolierung von Plasmid-DNS aus *Escherichia coli*

Die Aufreinigung von Plasmiden für analytische Zwecke erfolgte mit der Methode nach (Holmes and Quigley 1981). Dazu wurden *E. coli* Zellen mit STET-L-Puffer aufgekocht und die DNS mit Isopropanol gefällt.

Die Isolierung im kleinen Maßstab (Minipräparation) von Plasmiden für die Sequenzierung wurde mit einem Kit von Invitrogen durchgeführt. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf der alkalischen Lyse (Bimboim and Doly 1979).

Für die Aufreinigung von Plasmiden im großen Maßstab („Maxipräparation“) wurden die Plasmide aus 200 ml einer Übernachtskultur isoliert. Dazu wurde das Kit Pure Link™ HiPure Plasmid Maxipräp Kit von Invitrogen verwendet. Auch diese Kit benutzt die alkalische Lyse (Bimboim and Doly 1979).

3.7.5 Isolierung von Plasmid-DNS aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolierung von Plasmid DNS aus Hefe erfolgte nach der Methode von Robzyk und Kassir (Robzyk and Kassir 1992).

3.7.6 Restriktion und Ligation von Nukleinsäuren Molekülen

Die Restriktion und Ligation von DNA Molekülen wurde durchgeführt wie bei (Sambrook 1989) beschrieben. Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden von New England Biolabs bezogen.

3.7.7 DNS Transformationen in *Escherichia coli*

Die Transformation von *E. coli* wurde nach der Methode von Chung *et al.* von 1989 durchgeführt (Chung *et al.* 1989).

3.7.8 DNS Transformationen in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von DNS in *Saccharomyces cerevisiae* wurde mit der Lithiumacetat-Methode durchgeführt (Schiestl and Gietz 1989). Eine ausführliche Beschreibung ist in Absatz 3.11.4 gegeben. Die Herstellung von kompetenten Hefezellen wird in Absatz 3.11.3 beschrieben.

3.7.9 Transfektion von HEK293 Zellen

Bei höheren eukaryotischen Zellen wird das Einbringen von fremder DNS als Transfektion bezeichnet.

In dieser Arbeit wurden die Zellen mit einer Methode transfiziert, die sich an die Lipofektion (Felgner *et al.* 1987) anlehnt. Dazu wurden die Zellen 24 h vor Transfektion in frischen Kulturgefäßen, für spätere Fura-2 Messungen wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin überzogene Glasplättchen, ausgesät. Die Transfektionsansatz setzt sich aus Optimem-Medium (Invitrogen, Karlsruhe), der gewünschten DNS und Fugene HD (Roche, Mannheim) zusammen. Der Ansatz wurde gemischt und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Vor der Zugabe des Transfektionsansatzes wurde das Medium der Zellen gewechselt, so dass kein Antibiotikum mehr im Medium war. Der komplette Ansatz wurde zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 24 h bis 48 h nach der Transfektion kultiviert und dann wurde mit ihnen weitergearbeitet.

Ansatz für ein Zellkulturschälchen 3,1 cm Durchmesser

100 µl Optimem

2 µg DNS

5 µl Fugen HD

Ansatz für eine Zellkulturflasche 75 cm³

800 µl Optimem

12,6 µg DNS

30 µl Fugene HD

3.7.10 Sequenzierung von DNS

Die Sequenzierung von DNS Molekülen wurde nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt (Sanger *et al.* 1992). Die Sequenzierung wurde von der Firma SEQ-IT GmbH & Co. KG vorgenommen.

3.8 Antikörper

3.8.1 Erstantikörper

Die folgenden Antikörper wurden in dieser Arbeit für Western Blots verwendet.

- Anti-Flag
M2 (Sigma), monoklonaler Antikörper von Maus, eingesetzte Verdünnung 1:500
- Anti-TRPC4 (eigene Herstellung)
PK2D2-A2 von Ratte, eingesetzte Verdünnung 1:500
- Anti-GST (GE Healthcare Biosciences)
Polyklonaler Antikörper von Ziege, eingesetzte Verdünnung 1:1000
- Anti-Tarbp2 (Abnova)
Polyklonaler Antikörper von Maus, eingesetzte Verdünnung 1:500.
- Anti-Calmodulin (Zymed)
Antikörper von Kaninchen, eingesetzte Verdünnung 1:1000
- Anti-HA (Roche)
Klon 3F10 monoklonaler Antikörper von Ratte, eingesetzte Verdünnung 1:1000.
- Anti-Dicer (D38E7) (Cell Signalling)
Polyklonaler Antikörper von Kaninchen, eingesetzte Verdünnung 1:1000
- Anti-Dicer (H-212): sc-30226 (Santa Cruz)
Polyklonaler Antikörper von Kaninchen, eingesetzte Verdünnung 1:500

Die folgenden Antikörper wurden für Koimmunpräzipitationen verwendet.

- Anti-Flag
M2 (Sigma), monoklonaler Antikörper von Maus, eingesetzt 4 µg
- Anti-TRPC4 (eigene Herstellung)
ab869 und ab1056 polyklonale Antikörper von Kaninchen, 10 µg eingesetzt.
- Anti-Tarbp2 (Abnova)
Polyklonaler Antikörper von Maus, 10 µg
- Anti-HA (12CA5) (Abcam)
Monoklonaler Antikörper von Maus; 1,25 µg
- Anti-Dicer (H-212): sc-30226 (Santa Cruz)

Polyklonaler Antikörper von Kaninchen, 2 µg

3.8.2 Zweitantikörper

Alle verwendeten Antikörper sind mit Meerrettichperoxidase konjugiert.

- Zur Detektion von Immunglobulinen von Maus:
Anti-Maus IgG von Ziege (Sigma, Saint Louis): Verdünnung: 1:10.000
- Zur Detektion von Immunglobulinen von Ratte:
Anti-Ratte IgG von Kaninchen (Sigma, Saint Louis): Verdünnung
1:80.000
- Zur Detektion von Immunglobulinen von Ziege:
Anti Ziege IgG von Esel (Santa Cruz Biotechnology): Verdünnung 1:5000
- Zur Detektion von Immunglobulinen von Kaninchen:
ECLTM Anti-Kaninchen IgG von Esel (GE Healthcare, München):
Verdünnung: 1:30 000

3.9 Proteinbiochemische Methoden

3.9.1 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli*

Der Zellaufschluss erfolgte aus 200 ml Flüssigkultur. Um die Zellen aufzuschließen, wurden die geernteten Zellen 15 min bei 6000 rpm zentrifugiert, das Sediment in 10 ml Lysis-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert. Zu den gefrorenen Zellen wurde 1 ml 10% Triton X-100 gegeben und das Ganze wurde dreimal hintereinander schnell aufgetaut (Wasserbad 37°C) und wieder eingefroren (flüssiger Stickstoff). Dann wurden 110 µl Lysozym (100 mg/ml) und 110 µl PMSF (100 mM) zugefügt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 µg/ml RNaseA, 5 µg/ml DNaseI und 10 mM MgCl₂ zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde bei 4°C für 30 min mit 15.000 g zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

Für die Aufreinigung wurden 2 ml Affinitäts-Gelmatrix (GSH Sepharose) in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Gelmatrix wurde dreimal mit 15 ml TBS 4 min bei 3000 rpm gewaschen und der Überstand abgenommen. Das Zellysate wurde auf die Sepharose gegeben und 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Die Suspension wurde danach 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen. Die sedimentierte Sepharose wurde fünfmal mit 15 ml Waschpuffer

(TBS) gewaschen, 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Elution der Proteine erfolgte zweimal mit je 2 ml Elutionspuffer.

3.9.2 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Methode

Die Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde mit der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode bestimmt (Smith *et al.* 1985). Die Reagenzien wurden von der Firma Pierce bezogen.

3.9.3 Gelelektrophorese von Proteinen mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zur Trennung von komplexen Proteingemischen oder zur Analyse von Proteinaufreinigungen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970) genutzt. Aus Tabelle 3-1 lässt sich die Zusammensetzung der Gele entnehmen. Die Gele wurden, falls nicht für einen Western Blot vorgesehen, mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (Chrambach *et al.* 1967).

3.9.4 Western Blot

Alle Western Blots wurden wie in (Wightman *et al.* 1993) beschrieben durchgeführt. Verwendete Puffer sind in Abschnitt 3.2.2 aufgeführt. Die Membran wurde mit Luminol und Oxidationsreagenz (Western Lightning Chemilumineszenz Plus, Perkin Elmer, Boston, USA) behandelt. Die durch die Meerrettichperoxidase entstandene Lumineszenz wurde mit dem Dokumentationssystem Lumineszenz Image Analyzer LAS3000 (Fuji) über einen Zeitraum von maximal 1 h detektiert.

3.9.5 Koimmunpräzipitation

Hierzu wurden Zelllysate von HEK293 Zellen hergestellt, die die cDNS von TRPC4 und von einem Kandidaten-Protein koexprimierten. Für die Koimmunpräzipitationen wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet, die sich vor allem durch die verwendeten Detergenzien unterschieden.

3.9.6 Protokoll mit RIPA Lysat in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat

Hierzu wurde das Zellpellet aus einer 75 cm² Kulturflasche in 1 ml RIPA-Puffer aufgenommen und mit einer Spritze und einer dünnen Kanüle (0,4 mm/0,5 mm) mindestens 10-mal geschert. Die gescherte Suspension wurde in der Tischzentrifuge 15 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugieren.

Präabsorption:

80 µl ProteinG-Sepharose wurden mit RIPA-Puffer äquilibriert. Das Lysat wurde zu dem Säulenmaterial pipettiert und 2 h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Suspension mit 800 g für 3 min bei 4°C zentrifugiert.

Immunpräzipitation:

Es wurden jeweils 500 µl des Überstands nach der Präabsorption mit den entsprechenden Antikörpern versetzt. Für die Immunpräzipitation von TRPC4 wurden die Antikörper 869 oder 1056 von Kaninchen verwendet. Es wurden pro Ansatz 10 µg Antikörper eingesetzt. Für die Immunpräzipitation der Flag-Fusionsproteine wurden 4 µl des anti-Flag Antikörpers (ANTI-FLAG[®] monoklonal von Maus) verwendet. Das Zelllysat-Antikörper Gemisch wurde bei 4°C für mindestens 2 h schüttelnd inkubiert.

Pro Ansatz wurden 80 µl der ProteinG-Sepharose verwendet. Die Sepharose wurde mit 1 ml des RIPA-Puffers äquilibriert. Zu der Sepharose wurde dann das Zelllysat-Antikörper Gemisch pipettiert und die Suspension für mindestens 2 h bei 4°C schüttelnd inkubiert.

Die Sepharose wurde sedimentiert (800 g, 3 min bei 4°C), der Überstand verworfen, und die Sepharose 4-mal mit RIPA-Puffer gewaschen (800 g, 3 min bei 4°C). Anschließend wurden die Proteine mit 60 µl 2x SDS-Probenpuffer bei 95°C für 5 min denaturiert und eluiert.

3.9.7 Protokoll mit DDM-Puffer

Hierzu wurde das Zellpellet aus einer 75 cm² Kulturflasche in 1 ml Extraktionspuffer aufgenommen und mit einer Spritze und einer dünnen Kanüle (0,4 mm/0,5 mm) mindestens 10-mal geschert. Die gescherte Suspension wurde dann für 45 min bei 100.000 g (Ultrazentrifuge Optima MAX-E von Beckman, Rotor TLA55) zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Koimmunpräzipitationen eingesetzt.

Immunpräzipitation:

Jeweils 200 µl des Überstands wurden mit den entsprechenden Antikörpern versetzt. Für die Immunpräzipitation von TRPC4 wurden die Antikörper 869 oder 1056 von Kaninchen verwendet. Es wurden pro Ansatz 10 µg Antikörper eingesetzt. Für die Immunpräzipitation der Flag-Fusionsproteine wurden 4 µl des anti-Flag Antikörpers (monoklonal von Maus) verwendet. Für die Kontrolle wurden 10 µg unspezifische Antikörper von Maus oder von Kaninchen verwendet. Das Zelllysate-Antikörper Gemisch wurde bei 4°C für mindestens 2 h schüttelnd inkubiert.

Pro Ansatz wurden 30 µl der ProteinG-Sepharose verwendet. Die Sepharose wurde mit 1 ml des Extraktionspuffers äquilibriert. Zu der Sepharose wurde dann die Zelllysate-Antikörper Lösung pipettiert und die Suspension für mindestens 2 h bei 4°C schüttelnd inkubiert.

Die Sepharose wurde sedimentiert (800 g, 3 min bei 4°C), der Überstand verworfen, und die Sepharose 4-mal mit Waschpuffer gewaschen (800 g, 3 min bei 4°C). Anschließend wurden die Proteine mit 60 µl 2x SDS-Probenpuffer bei 65°C für 20 min denaturiert und eluiert.

3.9.8 Pull down Experimente mit GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt (Abschnitt 3.9.1) (Tuschl 2001). Der TRPC4 Carboxy-Terminus wurde in sechs Fragmente aufgeteilt. Die GST-TRPC4 Fragmente mCCEKO, LB3/4a, LB3/4b, LB5/6a, und LB5/6b wurden von Dr. Claudia Fecher-Trost bereitgestellt (Trost, Bergs et al.

2001), das Fragment JZ51 wurde in dieser Arbeit hergestellt. Je 12 µg GST-Fusionsprotein gebunden an GSH-Sepharose wurden mit HEK293 Lysat, in Extraktionspuffer mit DDM, für 2 h bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Sepharose gewaschen und mit Lämmli-Puffer eluiert. Die Eluate wurden auf ein SDS PAGE Gel aufgetragen, die Proteine geblottet und mit einem Western Blot untersucht.

3.9.9 Verdrängungsexperiment mit Tarbp2 und Calmodulin

12 µg der GST-Sepharose LB5/6b wurde mit einer steigenden Menge Calmodulin (0,595 µg, 2,97 µg, 5,95 µg, 11,9 µg) und gleichbleibendem Volumen an HEK293-Tarbp2 Lysat für 2 h bei 4°C rollend inkubiert.

Dazu wurden 1 ml Lysat von 1 Kulturflasche 75 cm² HEK293 Zellen, die mit der Flag-Tarbp2 cDNS transfiziert waren, hergestellt. Mit den Proben wurde verfahren wie in Abschnitt 3.9.8 dargestellt.

3.10 Dicer Aktivitätsexperiment

RNS Präparation

Um das 37a RNS Fragment (Ma *et al.* 2008) radioaktiv zu markieren wurde es mit T4 Polynukleotid Kinase und (γ -³²P)ATP in Kinase Puffer bei 37°C für 30 min inkubiert.

50 pmol RNS

1x T4 Kinase Puffer

50 pmol (γ -³²P) ATP

20 U T4 Kinase

ad 50 µl mit H₂O

Das radioaktiv markierte RNS Fragment wurde auf eine illustra MicroSpin G-25 Säule (GE Healthcare) gegeben; um nicht eingebautes ³²P-ATP abzutrennen. Die Elution der phosphorylierten RNS erfolgte durch

Zentrifugation bei 700 g und 2 min. 1 µl des Eluates wurde im Liquid Scintillation Counter (Wallace 1409) gemessen. Dabei ergaben sich ungefähr 200.000 cpm bis 350.000 cpm.

Das markierte 37a Fragment wurde mit dem nicht markierten 37b Fragment zusammengegeben, die Mischung auf 80°C erhitzt und für 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde die RNS auf 600 cpm/µl verdünnt.

Lysat

Transfizierte und untransfizierte HEK Zellen (ein Schälchen zu jeweils 10⁶ Zellen) wurden in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und lysiert. Das Lysat wurde 30 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert, mit dem Überstand wurde weitergearbeitet.

Ansatz

1X Reaktion: 10 µg HEK Zelllysat
 1 µl 10X Reaktionspuffer
 1 µl RNase Inhibitor
 ad mit H₂O 10 µl
 +5 µl dsRNS 37ab

Zeitverlauf bei 37°C: 30 sec; 1 min, 5 min; 10 min; 30 min und 60 min.

Die Reaktion wurde mit 1,2 Volumen Lade-Puffer (Abschnitt 3.2.2) gestoppt, 10 min bei 75°C erhitzt und die Proben über ein 15% Polyacrylamid-7M Harnstoff-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend bei 40°C unter Vakuum getrocknet. Eine Fujifilm Imaging Plate wurde über Nacht auf das getrocknete Gel gelegt. Am nächsten Tag wurde die Imaging Plate im Fujifilm BAS 2500 Phosphoimage Scanner ausgewertet. Parallel wurde die ³²P-Strahlung mit Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

3.10.1 Dicer Aktivitäts- Protokoll mit rekombinantem Dicer

Das Protokoll wurde wie vom Hersteller empfohlen verwendet (Recombinant Dicer Enzyme Kit, Genlantis). Als Substrat diente das 37ab dsRNS Oligo.

3.10.2 Kalziumabhängiger Dicer Aktivitätstest

1X Reaktion:	1 µl HEK Zelllysat
	1 µl 10X Reaktionspuffer
	0,8 µl Verdünnungspuffer
	+1 µl 30 mM CaCl ₂
	1 µl RNase inhibitor
	Ad mit H ₂ O 5µl
	+5 µl dsRNS 37ab

Transfizierte oder untransfizierte HEK293 Zellen (zwei Schälchen ungefähr 2×10^6 Zellen) wurden in 100 µl Lysepuffer (+10µM BAPTA) aufgenommen und mit einer Spritze und einer dünnen Kanüle (0,4 mm/0,5 mm) mindestens 10-mal geschert. Das Lysat wurde 30 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und je 1 µl des Überstandes wurde mit einer Lösung mit oder ohne Kalzium versetzt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die RNS wurde wie in Abschnitt 3.10 beschrieben vorbereitet, und anschließend zu dem Ansatz gegeben; nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben genommen, mit denen wie in Abschnitt 3.10 weiterverfahren wurde.

3.11 Hefe-zwei-Hybrid System

In dieser Arbeit wurde das Hefe-zwei-Hybrid System, CytoTrap, von Stratagene verwendet. Bei diesem Hefe-zwei-Hybrid System findet die Interaktion der Köder- und Beute-Proteine im Zytosol statt. Anstatt eines Reportergens wurde

hier nach der Aufhebung eines temperatursensitiven Phänotyps gescreent. Der Hintergrund des Screening Verfahrens ist in Abschnitt 2.5 beschrieben.

Das Screening wurde der Anleitung (Stratagene) folgend durchgeführt.

3.11.1 Aufreinigung der „Premade-cDNS-Bibliothek“ von ZNS von Maus

Hier die Angaben des Herstellers Stratagene zu der cDNS Bibliothek: Gehirn von 200 BALB/c, 8 - 12 Wochen alten männlichen Tieren, primäre Größe der cDNS-Bibliothek: $5,9 \cdot 10^6$ cfu, Primer: UdT, durchschnittliche Insert-Größe: 1,9 kb.

Zuerst wurde der Titer der cDNS-Bibliothek bestimmt, indem Verdünnungen $1:10^3$, $1:10^4$ und $1:10^6$ auf LB-Chloramphenicol Platten ausgestrichen wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die chloramphenicolresistenten Kolonien ausgezählt. Es ergab sich ein Titer von $5,65 \cdot 10^8$ cfu/ml.

Für die Aufreinigung der Plasmid-DNS wurden ungefähr 20.000 bis 30.000 Kolonien auf eine 15 cm LB_{Chloramphenicol} Platte ausplattiert. Dazu wurden 25 µl der cDNS Bibliothek Stammkultur in 25 ml LB-Medium verdünnt; diese Verdünnung wurde nochmal fünffach in LB-Medium verdünnt. Es wurden jeweils 500 µl Zellsuspension auf eine Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Insgesamt wurden 200 Platten ausplattiert.

Um die Bakterienkolonien von den Platten zu lösen wurde zu jeder Platte 6 ml LB-Medium pipettiert und vorsichtig mit einem Glasspatel die Kolonien abgekratzt. Die Suspension wurde aufgefangen. Jede Platte wurde noch einmal mit 2 ml LB-Medium gespült um noch zurückgebliebene Bakterien aufzunehmen.

Die Zellsuspension wurde bei 6000 rpm 15 min zentrifugiert (Beckman). Jeweils 1,5 g Bakterien, Nassgewicht, wurden für eine Plasmid-Präparation mit dem QIAGEN Plasmid Mega Kit verwendet. Es wurden achtzehn Mega-Präparationen gemacht. Insgesamt wurde die Plasmid-DNS von $1,13 \cdot 10^7$ Klonen präpariert, damit ergab sich eine DNS Menge von fast 48 mg. Die

Plasmid- DNS wurde für das Screening verwendet, jeweils 40 µg Plasmid-DNS wurden für ein Screening eingesetzt.

3.11.2 Klonierung der Köderkonstrukte

Als Köder für das Hefe-zwei-Hybrid System wurden die zytosolischen Carboxy- und Amino-Termini von mTRPC4, mTPRC5 und mTRPC6 in den pSos Vektor (Abbildung 3-1) kloniert.

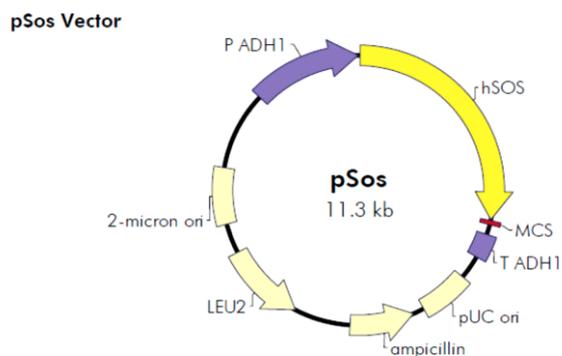


Abbildung 3-1 Screening Vektor pSos

Der Vektor besitzt einen ADH1 Promotor, ein Ampicillinresistens Gen (β -Lactamase), das LEU2 Gen für die Selektionierung in Hefe und die Klonierungsstelle (multiple cloning site MCS).

Die cDNS Bibliothek befand sich in dem pMyr Vektor (Abbildung 3-2).

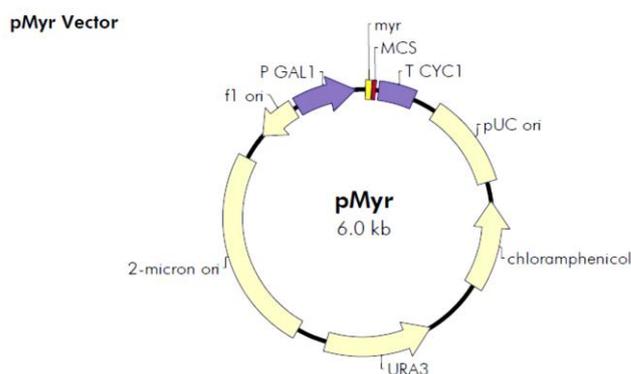


Abbildung 3-2 Vektor pMyr

Die cDNS-Bibliothek von Hirn von Maus befand sich in dem pMyr Vektor. Die DNS, die in die Multiple Cloning Site kloniert wurde, befindet sich unter Kontrolle des GAL1 Promoters. Das exprimierte Protein wurde durch Myristoylierung (myr) posttranskriptonal modifiziert. Das Plasmid verfügt über eine Chloramphenicolresistenz und das URA3 Gen für die Selektion in Hefe.

3.11.3 Herstellung kompetenter Hefezellen

Für das Screening mit den Köderkonstrukten gegen die cDNS Bibliothek mussten zuerst kompetente Hefezellen des Stammes cdc25H hergestellt werden. Für jede Transformation wurden frische kompetente Zellen verwendet. Die Zellen wurden von einer YPAD-Platte in 50 ml flüssiges YPAD-Medium angeimpft und bei 22°C-25°C für 16 bis 19 Stunden inkubiert. Die optische Dichte bei 600nm (OD_{600}) sollte über 1 sein. Nun wurde die Zellsuspension auf eine Enddichte von 0,2 OD_{600} und auf ein Endvolumen von 300 ml mit frischem YPAD-Medium verdünnt. Unter Schütteln wurden die Zellen weitere 3 Stunden bei 25°C inkubiert. Die Kultur musste eine OD_{600} von $>0,7$ aufweisen. Für eine Kontrolle der Revertanten wurden nun 75 μ l der Kultur abgenommen (entspricht ungefähr $1 \cdot 10^6$ Zellen) und auf eine YPAD Platte ausgestrichen. Die Platte wurde für 6 Tage bei 37°C inkubiert, wenn sich auf der Platte nach 6 Tagen mehr als 30 Kolonien zeigten, waren alle Transformanten die aus dieser Präparation hervorgingen als unzuverlässig anzusehen und das Screening wurde abgebrochen. Die restliche Hefekultur wurde durch Zentrifugation pelletiert, 5 min bei 1000 g. Danach wurde das Pellet in 50 ml Wasser resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert, 10 min bei 1000 g. Das Sediment wurde in 50 ml LiSORB resuspendiert und die Zellsuspension für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen noch einmal für 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 300 μ l LiSORB resuspendiert und mit 600 μ l DNS von Spermien von Lachs vermischt. Zu der Zellsuspension wurden 5,4 ml PEG/LiOAc Puffer und 530 μ l DMSO gegeben und nach gründlicher Mischung konnte die Zellsuspension für Transformationen genutzt werden.

3.11.4 Screening der Köderkonstrukte gegen die cDNS Bibliothek

Ko-Transformation

Für das Screening mit den Köderkonstrukten und der cDNS Bibliothek wurden Ko-Transformationen durchgeführt. Dafür wurden jeweils 40 μ g des Köderkonstrukts (zum Beispiel pJZ3 und pJZ4 siehe Tabelle 3-6) und 40 μ g der cDNS Bibliothek (pMyr XR cDNA plasmid library) zu 10 ml frischen kompetenten Hefezellen pipettiert. Die Suspension wurde nun auf 20 separate

Reaktionsgefäße pipettiert. Als Negativkontrolle wurden 500 µl kompetente Hefezellen mit 2 µg pSos Plasmid und 2 µg cDNS Bibliothek verwendet. Die Transformationsansätze wurden 30 min bei 25°C rotierend inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 5 min. Die Transformationsansätze wurden auf Eis für 3 min gekühlt und dann in der Zentrifuge für 30 sec bei 12.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden mit 500 µl 0,5 M Sorbitol resuspendiert. Die Zellen wurden auf 15 cm Platten SD/Glukose(-UL) ausplattiert und bei 25°C inkubiert

Screening

Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 25°C wurden die Platten auf SD/Galaktose(-UL) Platten als „Replica“ plattiert. Die SD/Galaktose(-UL) Platten wurden dann bei 37°C für 10 Tage inkubiert. Die Kolonien wurden auf SD/Glukose Platten ausgestrichen und für 48 Stunden bei 25°C inkubiert. Danach wurden die Platten auf zwei frischen Platten SD/Galaktose(-UL) und zwei SD/Glukose(-UL) Platten als „Replica“ plattiert. Jeweils eine der Platten wurde bei 37°C inkubiert die anderen beiden bei 25°C. Dies diente als erster Test für eine mögliche Interaktion.

Die Klone, die bei 37°C auf Galaktose wuchsen, wurden weiter getestet; hierzu wurden die entsprechenden Klone von der 25°C Glukose Platte gepickt und in 200 µl Wasser in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Klone wurden dann wieder auf Platten mit Glukose- und Galaktose-haltigem Medium überimpft und bei 25°C oder 37°C inkubiert. Die Klone, die auch bei diesem Test ein Wachstum bei 37°C auf Galaktose aber nicht Glukose zeigten, wurden als putativ positive Kandidaten eingestuft.

Plasmidpräparation

Die positiven Kandidaten wurden in 5 ml SD-Glukose (-L) Medium angeimpft und über Nacht bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plasmide aus der Hefekultur präpariert wie in Abschnitt 3.7.5 beschrieben. Aus Hefe lassen sich Plasmide in geringen Mengen und auch nicht rein isolieren, so dass diese Plasmide nur zum Transformieren von *E. coli* genutzt wurden, nicht aber zur direkten Sequenzierung. Deshalb wurden mit den Plasmiden anschließend *E. coli* transformiert, wie in Abschnitt 3.7.7

beschrieben. Nach Isolierung wurde die Plasmide DNS mit dem Primer JZ17 sequenziert.

Retransformation

Die Plasmide der putativ positiven Klone wurden weiterhin mit dem Köderkonstrukt oder pSos in den Hefestamm cdc25H transformiert, siehe Tabelle 3-9. Von den Klonen wurden jeweils sechs gepickt und auf SD/Glukose oder Galaktose Platten aufgeimpft und bei 25°C und 37°C inkubiert.

Tabelle 3-9 Beispiel für die Retransformation des Screenings D

Transformation	Kandidat	Vektor
1	D1	pJZ4
2	D1	pSos
3	D2	pJZ4
4	D2	pSos
5	D13	pJZ4
6	D13	pSos
7	D15	pJZ4
8	D15	pSos
9	D21	pJZ4
10	D21	pSos
11	D51	pJZ4
12	D51	pSos
13	D57	pJZ4
14	D57	pSos
15	D58	pJZ4
16	D58	pSos
17	D71	pJZ4
18	D71	pSos
19	D79	pJZ4
20	D79	pSos
21	D83	pJZ4
22	D83	pSos
23	D89	pJZ4
24	D89	pSos
25	D90	pJZ4
26	D90	pSos
27	D94	pJZ4
28	D94	pSos
29	D95	pJZ4
30	D95	pSos

Zeigten die Kandidaten bei 37°C auf Galaktose auch bei der Retransformation Wachstum mit dem Köder, nicht aber mit pSos, wurden sie als positive Kandidaten eingestuft. Mit diesen positiven Kandidaten wurde weitergearbeitet.

3.12 Messung der Änderung der intrazelluläre Kalziumkonzentration

Um die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu messen wurde Fura-2-AM verwendet, ein ratiometrischer kalziumbindender Farbstoff (Grynkiewicz *et al.* 1985). Der Farbstoff Fura-2 ändert sein Absorptionsverhalten wenn er Kalziumionen bindet: das Absorptionsmaximum verschiebt sich in Richtung kürzere Anregungswellenlänge, 335 nm; kalziumfreies Fura hat dagegen eine Absorptionsmaximum von 362 nm (Abbildung 3-3). Das Emissionsmaximum bleibt bei 510 nm gleich. Fura-2 wird mit zwei Wellenlängen angeregt, 340 nm und 380 nm, und mit dem Verhältnis von F340/F380 kann die freie Kalziumkonzentration bestimmt werden. Wird mehr Kalzium gebunden steigt die Fluoreszenzintensität bei 340 nm an und nimmt gleichzeitig bei 380 nm ab. In Form des Acetoxymethylester (AM) ist Fura-2 lipophil und kann die Plasmamembran passieren; der Acetoxymethylester wird von zytosolischen Esterasen abgespalten, dadurch ist Fura-2 hydrophil und kann die Zellen nicht mehr verlassen.

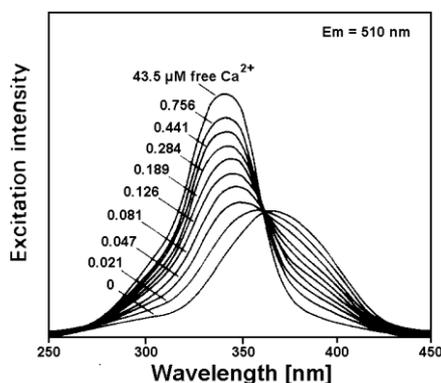


Abbildung 3-3 Eigenschaften des Kalzium-bindenden Farbstoffes Fura-2

Das Absorptionsmaximum des kalziumfreien FURA-2 Farbstoffes liegt bei 362 nm. Ist Fura-2 kalziumgesättigt verschiebt sich das Absorptionsmaximums auf 335 nm. Für die Messung der Kalziumkonzentration wird das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm bei einem Emissionsmaximum von 510 nm gemessen.

Die HEK293 Zellen, transfiziert oder untransfiziert, wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden mit 5 μM Fura-2-AM in ihrem Medium bei 37°C für 30 min im Inkubator inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen zweimal mit der Badlösung, welche für die Experimente verwendet wurde, gewaschen um nicht aufgenommenen Farbstoff zu entfernen.

Die Messung erfolgte in einer offenen Messkammer, die Lösungen wurden dazu pipettiert.

Die Messungen wurden mit folgenden Geräten durchgeführt: Mikroskop von Zeiss Axiovert 200M, Kamera von Andor iXon, Polychrome V einer 150 W Xenon Lampe und dem Programm Tillvision von Till Photonics.

3.12.1 Verwendete Lösungen für die Fura-2AM Messung

Protokoll 1

Badlösung: 140 mM NaCl
2,8 mM KCl
2 mM MgCl₂
1 mM Hepes pH 7,2
1 mM CaCl₂
10 mM Glukose

Für die Messung wurden die Zellen in dem kalziumhaltigen Puffer für 100 sec inkubiert, dann wurde 100 µM Carbachol dazugegeben.

Protokoll 2

Badlösung: 115 mM NaCl
2 mM MgCl₂
5 mM KCl
10 mM HEPES pH 7,4

3 µM Thapsigargin in Badlösung

4 mM CaCl₂, 1 µM Thapsigargin in Badlösung

300 µM Carbachol, 1 µM Thapsigargin, 2 mM CaCl₂ in Badlösung

Die Messung erfolgte zunächst in einer kalziumfreien Badlösung. 1,6 Min nach Beginn der Messung wurde 1µM Thapsigargin zu den Zellen gegeben. 10 Min nach Beginn der Messung wurde 2 mM CaCl₂ zu den Zellen pipettiert. Nach 21,6 Min wurde 100 µM Carbachol zu den Zellen gegeben.

3.12.2 Protokoll für die Messung mit der TRPC4_{G503S} Mutante

Badlösung: 115 mM NaCl

2 mM MgCl₂

5 mM KCl

10 mM HEPES pH 7,4

4 mM CaCl₂ in Badlösung

Um die Aktivität des konstitutiv offenen TRPC4_{G503S} Kanals zu messen, wurden die Zellen in kalziumfreier Badlösung inkubiert. Nach 100 sec wurden 2 mM CaCl₂ zu den Zellen gegeben.

3.13 Verwendete Software

Accelrys Gene 2.5 für Klonierungsarbeiten; WEBMAXC STANDARD 12/31/03 [CMC1203.TCM] für die Berechnung von freien Ionenkonzentrationen; und Microsoft Excel 2010 für die Auswertung und Statistik.

4 Ergebnisse

4.1 Screening mit dem Hefe-zwei-Hybrid System CytoTrap

Zunächst wurden Kontrollversuche mit der cDNS Bibliothek von Hirn von Maus durchgeführt. Laut Herstellerangaben sollte die Insertgröße 1,9 kb betragen. Die Restriktionsanalyse von 22 zufällig ausgewählten Klonen mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* ergab im Durchschnitt eine ungefähre Insertgröße von 1,8 kb. In Abbildung 4-1 ist das Agarosegel mit den Fragmenten von 22 Klonen zu sehen. Damit entsprachen die Insertgrößen der cDNS der Bibliothek den Herstellerangaben; die Bibliothek wurde für ein Screening eingesetzt.

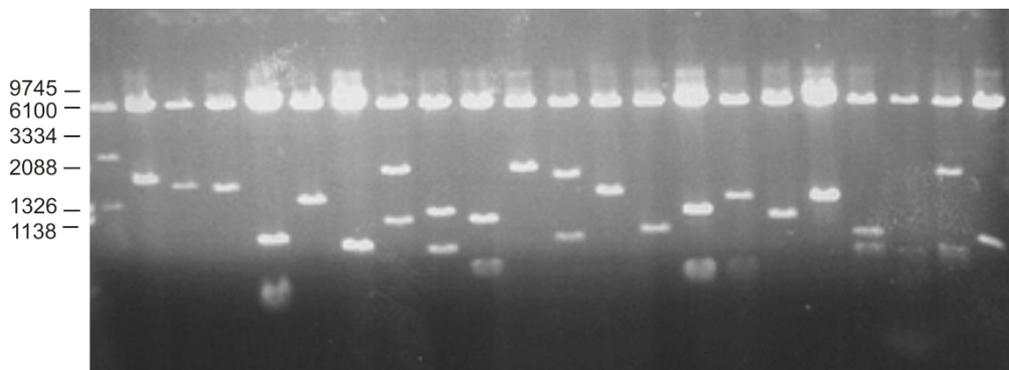


Abbildung 4-1 Restriktionsanalyse der cDNS Bibliothek

Von 22 Klonen der cDNS Bibliothek wurden die Plasmide isoliert und mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* hydrolysiert. Die DNS wurde über ein 0,7%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Auf der Höhe von 6100 bp läuft der linearisierte Vektor pMyr die anderen Banden sind die Fragmente der cDNS-Bibliothek.

Im nächsten Schritt wurde die Expression des Fusionsproteins hSos-TRPC4-C-Terminus überprüft. Von *S. cerevisiae* Zellen welche hSos oder hSos-TRPC4-C-Terminus exprimierten, wurde ein Western Blot angefertigt. In Abbildung 4-2 ist zu sehen, dass hSos und auch das Fusionsprotein hSos-TRPC4-C-Terminus gebildet wurden. Nachdem die Expression des Fusionsproteins hSos-TRPC4-C-Terminus in dem Hefestamm *cdc25H* sichergestellt war, wurde nun der Effekt des Fusionsproteins auf die Temperatursensitivität des *cdc25H* Stammes getestet. Denn nur wenn hSos-TRPC4-C-Terminus keinen Einfluss auf die Temperatursensitivität des *cdc25H* Hefestammes hat, kann das Konstrukt in einem Screening eingesetzt werden. Der Hefestamm *cdc25H* wurde mit dem Konstrukt transformiert und das Wachstum bei der restriktiven Temperatur 37°C

beobachtet. Das Konstrukt hatte keinen Effekt auf das Wachstum bei 37°C. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Konstrukt nicht von alleine an der Plasmamembran lokalisiert ist. Nur durch die Interaktion mit einem Beuteprotein kann das Fusionsprotein hSos-TRPC4-C-Terminus an die Plasmamembran rekrutiert werden. Das Fusionsprotein hSos-TRPC4-C-Terminus konnte nun als Köder in dem Hefe-zwei-Hybrid System eingesetzt werden.

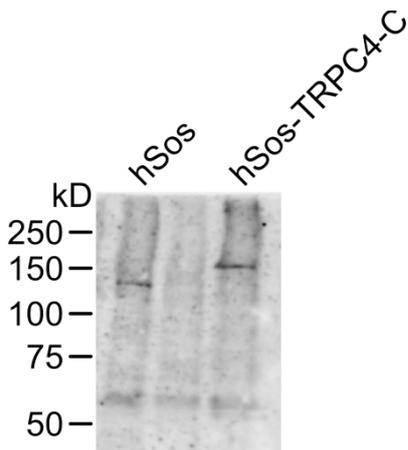


Abbildung 4-2 Expression von hSos und dem Fusionsprotein hSos-TRPC4-C-Terminus

cdc25H Hefezellen die hSos oder das Fusionsprotein hSos-TRPC4-C-Terminus exprimieren, wurden geerntet und in Lämmli-Puffer aufgekocht und über ein 7% SDS Gel elektrophoretisch aufgetrennt und ein Western Blot angefertigt. Die Proteine wurden mit dem anti-hSos- Antikörper nachgewiesen. Die Proteine hSos und hSos-TRPC4-C-Terminus wurden von den Hefen exprimiert.

Nachdem die Expression des Fusionsproteins hSos-TRPC4-C-Terminus bestätigt war, und gezeigt werden konnte, dass das Fusionsprotein alleine keinen Effekt auf die Temperatursensitivität von cdc25H hatte, wurde nun mit den Durchmusterungs-Experimenten begonnen. Es wurden insgesamt drei Versuche mit dem TRPC4-C-Terminus und der cDNS-Bibliothek von Hirn durchgeführt. Die Vorgehensweise ist in Abschnitt 3.10.1 beschrieben. Eine Interaktion zwischen dem Beute-Protein, codiert von der cDNS Bibliothek, und dem Köder-Protein, hSos-TRPC4-C-Terminus, führt zu einer Kompensation der Temperatursensitivität von cdc25H; cdc25H ist im Falle einer Interaktion der beiden Proteine in der Lage bei der restriktiven Temperatur zu wachsen. Eine weitere Kontrolle ist über den Galaktose Promotor gewährleistet: Das Beute-Protein kann nur auf Galaktose-haltigem Medium exprimiert werden, auf Glukose-haltigem Medium ist es reprimiert. Eine Kompensation der Temperatursensitivität durch die Interaktion des Beute-Proteins und hSos-

TRPC4-C-Terminus konnte also nur bei 37°C auf Galaktose-Medium beobachtet werden. Um eine Interaktion zwischen den Proteinen sicherzustellen, wurden solche Klone von den Screening-Platten, welche den temperatursensitiven Phänotypen des Hefestamms aufhoben, weiter getestet. Dies geschah dadurch, dass diese Klone noch einmal auf Selektionsmedium ausgestrichen und auf ihre Fähigkeit, auf Glukose oder Galaktose bei restriktiver Temperatur zu wachsen, untersucht wurden. Die Klone die ein Wachstum bei 37°C auf Galaktose, nicht aber auf Glukose zeigten, wurden als putativ positive Klone eingestuft. Von diesen Klonen wurde die Plasmid DNS isoliert und *E. coli* damit transformiert, da die aus dem Hefeklonen isolierte DNS an Menge und Reinheit nicht für eine Sequenzierung ausreichte. Die Plasmide wurden ansequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) abgeglichen. Nur diejenigen Klone, bei denen das Myristylierungssignal in einem Leseraster mit der Sequenz des Beute-Proteins war, wurden untersucht. In Abbildung 4-3 ist eine Teil-Sequenz des Klons D7 gezeigt, das rot markierte Myristylierungssignal ist in demselben Leseraster wie die (blau markierte) Sequenz des Hspa8 Proteins, das von diesem Klon kodiert wird.

```

G G N * L L E L T S M G S S K S K P K D P S Q
* * * 20 * * * 40 * * * 60 * * *
CTGGGGGCAATTAGCTTCTAGAGCTTACTAGTATGGGGAGTAGCAAGAGCAAGCCTAAGGACCCAGCCA

R R S R E F G T R S C R A F V W S R R Q R S W
* 80 * * * 100 * * * 120 * * * 140
GCGCCGGTCTAGAGAATTCCGCACGAGGAGCTGCCGGGCATTTCGTGTGTCTCGTCGTCAGCGCAGCTGG

A Y T Q A T M S K G P A V G I D L G T T Y S C
* * * 160 * * * 180 * * * 200 * * *
GCCTACACACAAGCAACCATGTCTAAGGGACCTGCAGTTGGCATTGATCTCGGCACCACCTACTCCTGTG

V G V F Q H G K V E I I A N D Q G N R T T P S Y
* 220 * * * 240 * * * 260 * * * 280
TGGGTGTCTTCCAGCATGAAAAGGTGGAAATTATTGCCAATGACCAGGTAACCGCACCAACCAAGCTA

V A F T D T E R L I G D A A K N Q V A M N P T
* * * 300 * * * 320 * * * 340 * * *
TGTTGCTTTTCACGGACACAGAGATTAATTGGGGATGCGGCCAAGAATCAGGTTGCAATGAACCCACC

N T V F D A K R L I G R R F D D A V V Q S D M
* 360 * * * 380 * * * 400 * * * 420
AACACAGTTTTTGATGCCAACGCTGATCGGGCGTAGGTTTGATGATGCTGTGTTGTTTCAGTCTGATATGA

```

Abbildung 4-3 Teil- Sequenz des Klons D7

Teil-Sequenz des Klons D7 Hspa8. In rot ist das Sequenzmotiv hinterlegt, das myristyliert wird und in blau der Beginn des Hspa8 Proteins; die nicht farbig unterlegten Aminosäurereste werden von Vektorenssequenzen kodiert. Das Myristylierungssignal und Hspa8 sind im selben Leseraster.

Klone, bei denen das Leseraster von Myristylierungssignal und Beute-Protein nicht übereinstimmten, wurden verworfen. Um die Interaktion der putativ-positiven Kandidaten mit dem hSos-TRPC4-C-Terminus noch einmal unabhängig zu testen, wurden Retransformationen durchgeführt. Dazu wurde der *S. cerevisiae* Stamm cdc25H mit den putativ-positiven Kandidaten Plasmiden und hSos-TRPC4-C-Terminus transformiert. In den Abbildung 4-4 und Abbildung 4-5 sind exemplarisch Retransformationsplatten solcher Kontrollen gezeigt.

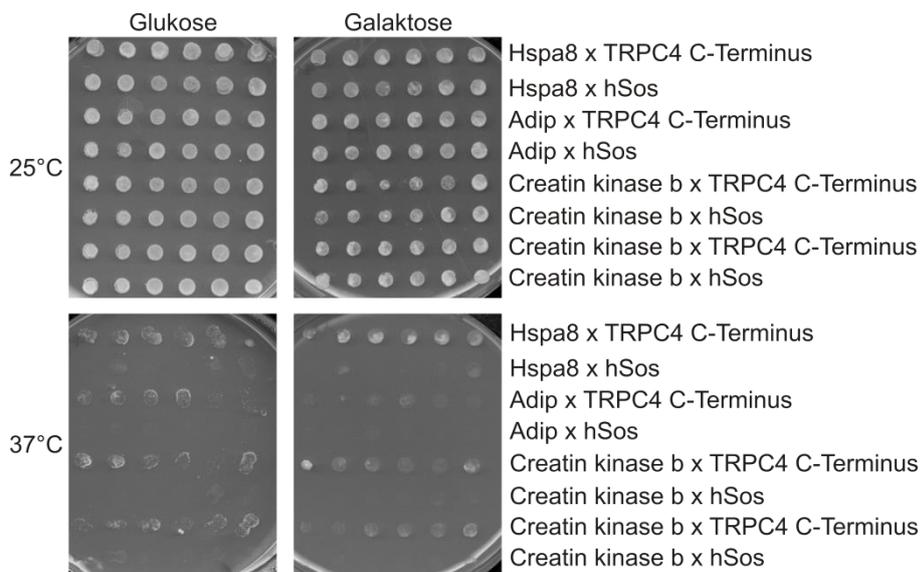


Abbildung 4-4 Retransformationsplatten des Screenings D

Retransformationsplatten des Screenings mit TRPC4-C-Terminus. Der Hefestamm cdc25H wurde jeweils mit dem Kandidaten- Plasmid und dem Plasmid hSos-TRPC4-C-Terminus (pJZ4) oder zur Kontrolle mit pSos transformiert. Es wurden von jeder Transformation sechs Klone auf Glukose oder Galaktose haltiges Medium angeimpft und bei 25°C oder restriktiven 37°C inkubiert. Alle Klone konnten bei 25°C auf beiden Zuckerarten wachsen. Bei 37°C zeigte sich nur bei den Klonen, die die Proteine hSos-TRPC4-C-Terminus und das Kandidaten Protein exprimierten, Wachstum. Das Gleiche konnte auf Galaktose beobachtet werden. Die Transformanten, welche das Kandidaten-Protein und hSos exprimierten, konnten dagegen nicht bei 37°C wachsen.

Als positive Kandidaten galten solche Proteine, die zusammen mit hSos-TRPC4-C-Terminus für Wachstum auf Galaktose bei 37°C sorgten. In Abbildung 4-4 sind alle Beute-Proteine positiv. Die Expression der Proteine oder Proteinfragmente Hspa8, Adip und Creatin Kinase b mit hSos-TRPC4-C-Terminus ermöglichen ein Wachstum auf Galaktose bei 37°C.

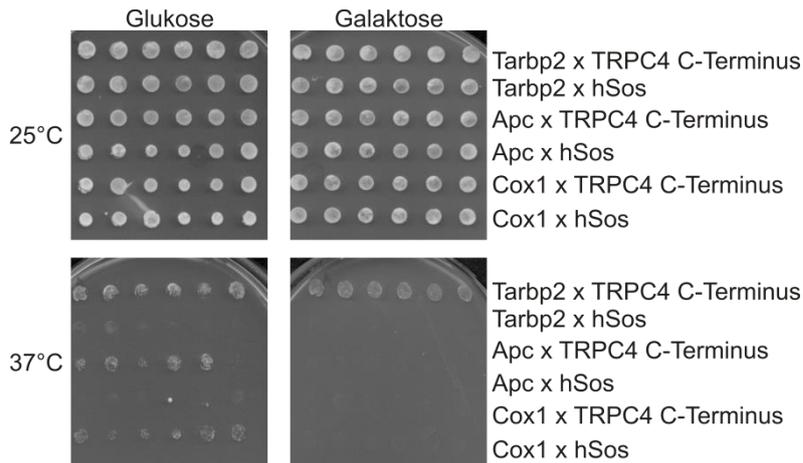


Abbildung 4-5 Screening D mit Tarbp2

Retransformationsplatten des Screenings mit TRPC4-C-Terminus. Der Hefestamm *cdc25H* wurde jeweils mit dem Kandidaten- Plasmid und dem Plasmid hSos-TRPC4-C-Terminus (pJZ4) oder zur Kontrolle mit pSos transformiert. Es wurden von jeder Transformation sechs Klone auf Glukose oder Galaktose haltiges Medium angeimpft und bei 25°C oder restriktiven 37°C inkubiert. Alle Klone konnten bei 25°C auf den beiden Zuckerarten wachsen. Bei 37°C zeigte sich, bei den Klone die die Proteine hSos-TRPC4-C-Terminus und das Kandidaten Protein exprimierten, Wachstum. Die Transformanten, welche das Kandidaten-Protein und hSos exprimierten konnten nicht bei 37°C wachsen. Nur Tarbp2 war in der Lage den temperatursensitiven Phänotypen zu kompensieren.

Ein Großteil der positiven Klone war falsch-positiv. Der Retransformationstest zeigte, dass die Klone mit dem TRPC4-C-Terminus nicht auf Galaktose bei 37°C wachsen konnten. In Abbildung 4-5 ist dies zu sehen; die Klone Apc und Cox1 interagieren nicht mit TRPC4-C-Terminus. Die hohe Rate an falsch positiven Klone liegt an der Punktmutation in dem *cdc25* Gen. Die lange Wachstumszeit und der Umstand, dass es sich um eine Punktmutation handelt, sorgten für vermehrte Revertanten. In diesen Zellen mutiert das *cdc25* wieder in seine Wildtyp Form. Dadurch sind die Hefen in der Lage auch bei restriktiver Temperatur zu wachsen. Wenn nun das Plasmid der putativ-positiven Kandidaten neu transformiert wurde, ist die Hefe noch nicht revertiert und zeigt so ihren temperatursensitiven Phänotypen. Deshalb war der Test durch die Retransformation ein wichtiger Schritt, um falsch positive Kandidaten auszusortieren.

Die Kandidaten Proteine aus allen drei Screening Durchgängen, welche im selben Leseraster wie das Myristilierungssignals und in der Retransformation positiv getestet worden waren, sind in Tabelle 4-1 aufgeführt. Bei den meisten Proteinen handelt es sich um zytosolische Proteine; es wurden aber auch

Membranproteine oder mit der Membran assoziierte Proteine gefunden wie Vps24, Stard 3 N-terminal like und GDP dissociation inhibitor 2. Die putativen Interaktionspartner von TRPC4 haben ganz unterschiedliche Funktionen in der Zelle; unter den Proteinen waren Chaperone, Kinasen, Phosphoproteine und RNS bindende Proteine. Die Funktionen der Proteine waren demnach sehr heterogen. Alle gefundenen Kandidaten waren als mögliche Interaktionspartner von TRPC4 bisher nicht bekannt. Es wurde keines derjenigen Proteine gefunden, die als potenzielle Interaktionspartner von TRPC4 bereits beschrieben sind, z.B. TRPC1, TRPC5, der IP₃-Rezeptor oder Calmodulin.

Tabelle 4-1 Liste der putativen Interaktionspartner von TRPC4

Protein	Enthält Transmembran-domänen	Wahrscheinliche Lokalisation	Accession Number	Wahrscheinliche Funktion
Hspa8	Nein	Zytosol	AAH66191.1	Chaperon
Tarbp2	Nein	Zytosol, Nukleus	AAB38885.1	RNS bindendes Protein
Adip	Nein	Zell-Zell Kontakten	EDL11977.1	Zelladhäsion
Creatin Kinase b	Nein	Zytosol	BAE28690.1	Kinase, Transferase
Ataxin 10	Nein	Zytosol	NP_058539.2	
Stard 3 N-terminal like	Ja	späte endosomale Membran	BAE31167.1	Steroidgenese (möglich)
Vps24	vielleicht (Lipid-Anker)	Zytosol; Membran; Endosom	NP_080059.2	Transport, Zellteilung
14-3-3 beta	Nein	Zytosol	NP_061223.2	Phosphoprotein
14-3-3 eta	Nein	Zytosol	BAA13422.1	Phosphoprotein
Cab 39 Calcium binding protein 39	Nein	Zytosol	EDL40255.1	Protein bindendes Protein
eIF-4G 3			XP_001477672.1	Protein Biosynthese
Suppression of tumorigenicity 5	Nein	Zytosol	NP_001001326.1	
Exportin-T	Nein	Zytosol, Nukleus	NP_001074525.1	t-RNS Transport
GDP dissociation inhibitor 2	Ja	Zytosol, Membran	EDL32223.1	Protein Transport
Casein Kinase	Nein	Zytosol	EDL26109.1	Kinase

Abschließend zu dem Ergebnis der Screenings ist zu bemerken, dass von 207 gefundenen Klonen 45 (22 %) falsch-positiv Klone waren und 126 Klone (61 %) kodierten Hspa8. Acht Klone (3,8%) ließen sich nicht sequenzieren; 28 Klone kodierte für die in Tabelle 4-1 gezeigten Proteine.

Die meisten gefundenen cDNS Klone deckten nur einen Teil der Proteine ab, für die sie kodieren. In Abbildung 4-6 sind die Fragmente der Proteine gezeigt, welche in dem Screening mit dem C-Terminus von TRPC4 interagiert haben. Für die meisten putativen Interaktionspartner wurde ein einzelner Klon gefunden. Die Stard-3-N-terminal like- und Hspa8-Proteine wurden als Vollängen cDNS gefunden. Die Häufigkeit mit der die einzelnen cDNS-Klone gefunden, wurden war unterschiedlich, so wurden für Hspa8 126 Klone gefunden, für Adip ein einzelner Klon, für Tarbp2, Vps24 und 14-3-3 eta jeweils zwei unabhängige Klone.

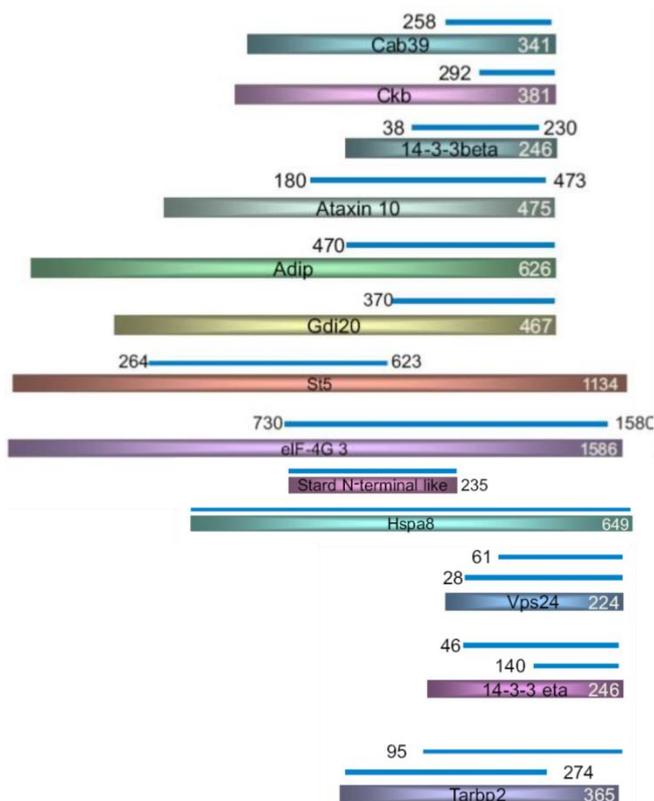


Abbildung 4-6 Fragmente der Interaktionspartner von TRPC4

Die dicken Balken zeigen das Vollängen Protein, die Ziffern bezeichnen die Aminosäurereste. Die blauen Striche zeigen die gefundenen Fragmente an.

4.1.1 Amplifikation der Vollängen Klone

Für die weiteren Untersuchungen mussten die Vollängen cDNS kloniert werden. Hierzu wurden von den Referenzsequenzen der NCBI Datenbank Primer abgeleitet, ein cDNS-Einzelstrang mithilfe von mRNA von Hirn von Maus hergestellt und unter Verwendung der genannten Primer die entsprechende Vollängen cDNS amplifiziert; vier cDNS wurden von imaGenes bezogen (Tabelle 3-8). Alle cDNS wurden anschließend sequenziert. Im nächsten Schritt wurden die cDNS in den p3xFlag Vektor kloniert, so dass nach Expression die jeweiligen Proteine mit der Flag Sequenz (Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp-Gly-Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp-Ile-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) markiert waren. Mit Hilfe eines anti-Flag-Antikörpers konnte das Protein dann im Western Blot identifiziert werden, ohne dass spezifische Antikörper für jedes Kandidaten Protein nötig gewesen wären.

Drei der 15 identifizierten Kandidaten cDNS, Exportin-T, GDP dissociation inhibitor 2 und eIF-4G 3 wurden bisher nicht weiter untersucht.

4.2 Bestätigung der Interaktion

Im nächsten Schritt sollten die Interaktionen der Proteine mit TRPC4 weiter untersucht werden. Hierzu wurden die cDNS von TRPC4 und vom jeweiligen Kandidaten-Protein in HEK293-Zellen koexprimiert und mittels Antikörper für TRPC4 und Flag die exprimierten Proteine aus Zelllysate angereichert. Für den Fall, dass ein Protein das TRPC4-Protein bindet, sollte es in einer Immunpräzipitation zusammen mit dem TRPC4-Protein präzipitiert werden. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE und folgendem Transfer auf Nitrozellulose sollten sich beide Proteine mit Antikörpern im Western Blot nachweisen lassen. Für die Koimmunpräzipitationen wurden die Vollängen-cDNS der Kandidaten-Proteine mit der Vollängen-cDNS von TRPC4 α in HEK293 Zellen exprimiert. Anschließend wurden Zelllysate hergestellt und im Western Blot überprüft, inwieweit die Proteine gebildet wurden. Daran anschließend wurde eine Koimmunpräzipitationen angeschlossen. Als weitere Schritte war geplant, die Bindungsstelle – bei positiver Koimmunpräzipitation – einzugrenzen, und die funktionellen Auswirkungen der Wechselwirkung zu untersuchen.

4.2.1 Koimmunpräzipitation

Für die Koimmunpräzipitationen wurden HEK293 Zellen mit der cDNS eines Kandidaten-Proteins und der cDNS von TRPC4 α oder β ko-transfiziert. TRPC4 ist ein Membranprotein und dementsprechend ist es vor der Immunpräzipitation notwendig, das Protein mittels Detergenzien aus der Lipidmembran zu solubilisieren. Hierzu wurden zwei Detergenzien getestet, das ionische SDS (Natriumdodecylsulfat) und das nicht-ionische DDM (Dodecylmaltosid). Es zeigte sich, dass die Wahl des Detergenz einen Einfluss auf das Ergebnis der Koimmunpräzipitation hatte. So war im Fall der Koimmunpräzipitation von Ataxin10 und TRPC4 α zu beobachten (Abbildung 4-7A), dass in Gegenwart von SDS eine Koimmunpräzipitation zwischen den Proteinen sichtbar war, nicht aber in Gegenwart von DDM (Abbildung 4-7B).

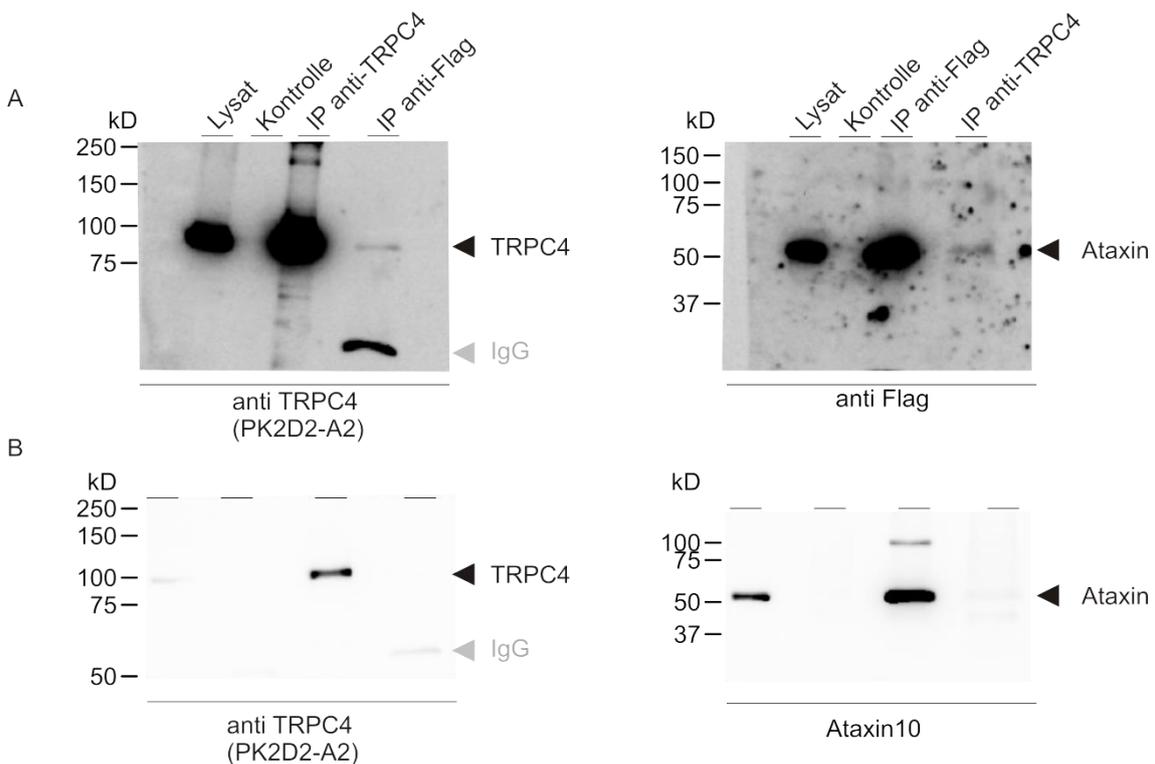


Abbildung 4-7 Western Blot nach Koimmunpräzipitation von TRPC4 und Ataxin in Gegenwart von SDS (A) und DDM (B)

Auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen Zelllysat (20 μ l), Kontrolle, Proteine, die mit dem Antikörper für TRPC4 präzipitiert wurden, Proteine, die mit dem Antikörper für Ataxin (hier anti-Flag) präzipitiert wurden. Nach dem Transfer der Proteine auf Blotmembranen erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper für TRPC4 (links) und Ataxin (rechts). Kontrolle, (A) ProteinG-Sepharose wurde mit Zelllysat inkubiert, abzentrifugiert und gebundene Proteine mit denaturierendem Probenpuffer wie in den präzipitierten Fraktionen eluiert, oder (B) die Proteine wurden mit unspezifische Antikörper präzipitiert.

TRPC4 kann in dem Lysat der HEK293 Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4-7, Lysat). In der Kontrolle ist kein TRPC4 nachzuweisen, das heißt das TRPC4-Protein bindet nicht unspezifisch an die ProteinG-Sepharose; TRPC4 wird aber mit dem Antikörper 869 angereichert (Abbildung 4-7, anti TRPC4). In derjenigen Fraktion in der Proteine mit dem Antikörper anti-Flag angereichert wurden, ist TRPC4 ebenso enthalten. Das Gleiche gilt für Ataxin10; es kann im Lysat nachgewiesen werden, und es eluiert aus der Fraktion von Proteinen, die mit dem anti-Flag Antikörper oder mit dem anti-TRPC4 Antikörper angereichert wurden (Abbildung 4-7A). Das entsprechende Experiment, das in Gegenwart von DDM durchgeführt wurde (Abbildung 4-7B) zeigt, dass unter diesen Bedingungen TRPC4 nicht in der Fraktion nachweisbar ist, die mit dem Antikörper für Ataxin angereichert wurde, Ataxin lässt sich in der Fraktion, die mit dem Antikörper gegen TRPC4 angereichert wurde, nicht nachweisen.

Alle Koimmunpräzipitationen wurden in Gegenwart von SDS oder DDM durchgeführt. In den Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9 sind die Ergebnisse, die in Gegenwart von DDM erzielt wurden, zu sehen. Bis auf die Ergebnisse zu Ataxin10 waren die Ergebnisse mit beiden Detergenzien ähnlich.

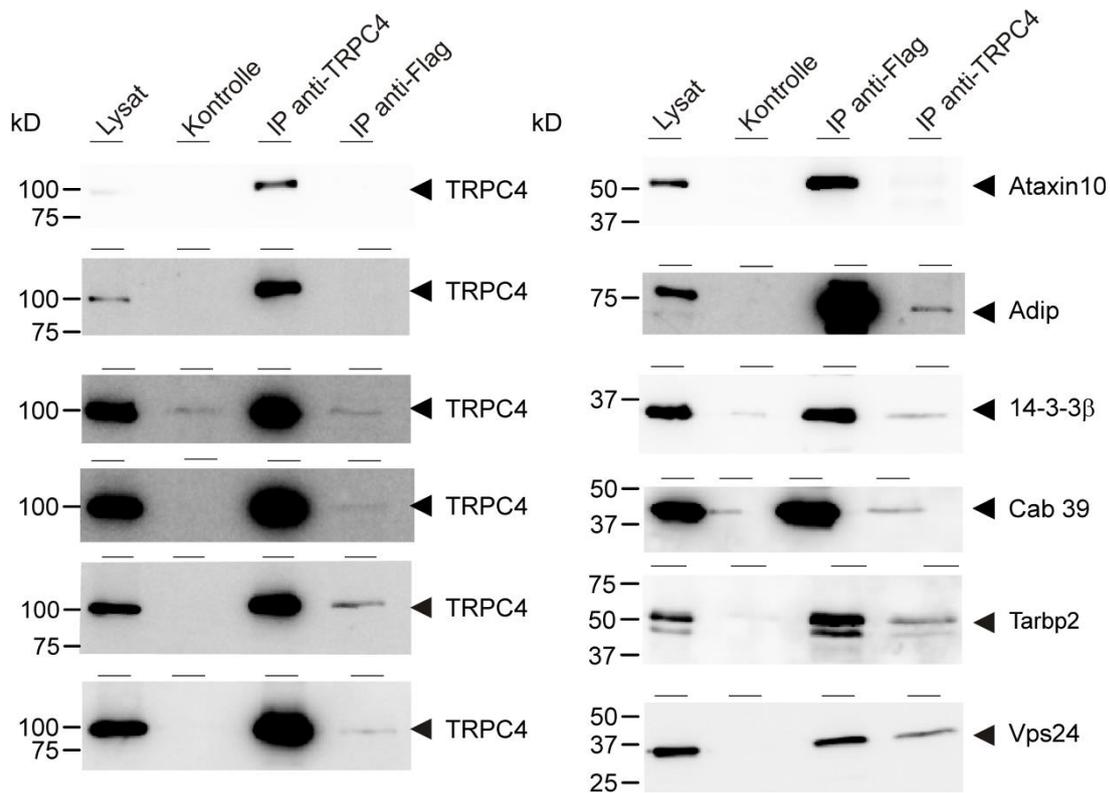


Abbildung 4-8 Western Blot: Koimmunpräzitationen von TRPC4 α mit Kandidatenproteinen

Auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen Zelllysate (20 μ l), Kontrolle, Proteine, die mit dem Antikörper für TRPC4 präzipitiert wurden, Proteine, die mit dem Antikörper für die Kandidaten-Proteine (hier anti-Flag) präzipitiert wurden. Nach dem Transfer der Proteine auf Blotmembranen erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern für TRPC4 (links) und Flag (rechts). Kontrolle, die Proteine wurden mit unspezifischen Antikörpern präzipitiert.

Alle Koimmunpräzitationen wurden mit TRPC4 α durchgeführt. Das Zelllysate der transfizierten HEK293 Zellen wurde mit den spezifischen Antikörpern, den Antikörpern für TRPC4 oder Flag, inkubiert und an ProteinG-Sepharose gebunden. Anders als in den Experimenten in Gegenwart von SDS, wurden in Gegenwart von DDM unspezifische Antikörper als Kontrolle verwendet. TRPC4 konnte in den Lysaten nachgewiesen werden. Auch ließ es sich immer mit dem Antikörper gegen TRPC4 anreichern. Die Koimmunpräzitation, das heißt die Anreicherung über das Kandidatenprotein, mit dem Antikörper gegen Flag war nicht immer möglich. Auch die Flag-fusionierten Proteine ließen sich ausnahmslos im Zelllysate nachweisen und sie konnten erfolgreich mit dem Antikörper gegen Flag angereichert werden. Doch die Koimmunpräzitation mit dem anti-TRPC4 Antikörper funktionierte nicht immer. So findet sich Adip in derjenigen Fraktion, in der TRPC4 angereichert wurde, TRPC4 findet sich aber

nicht in der Fraktion, die mit dem Antikörper für Adip (Flag) angereichert wurde (Abbildung 4-8). Das gleiche gilt für das Protein Stard3 (Abbildung 4-9).

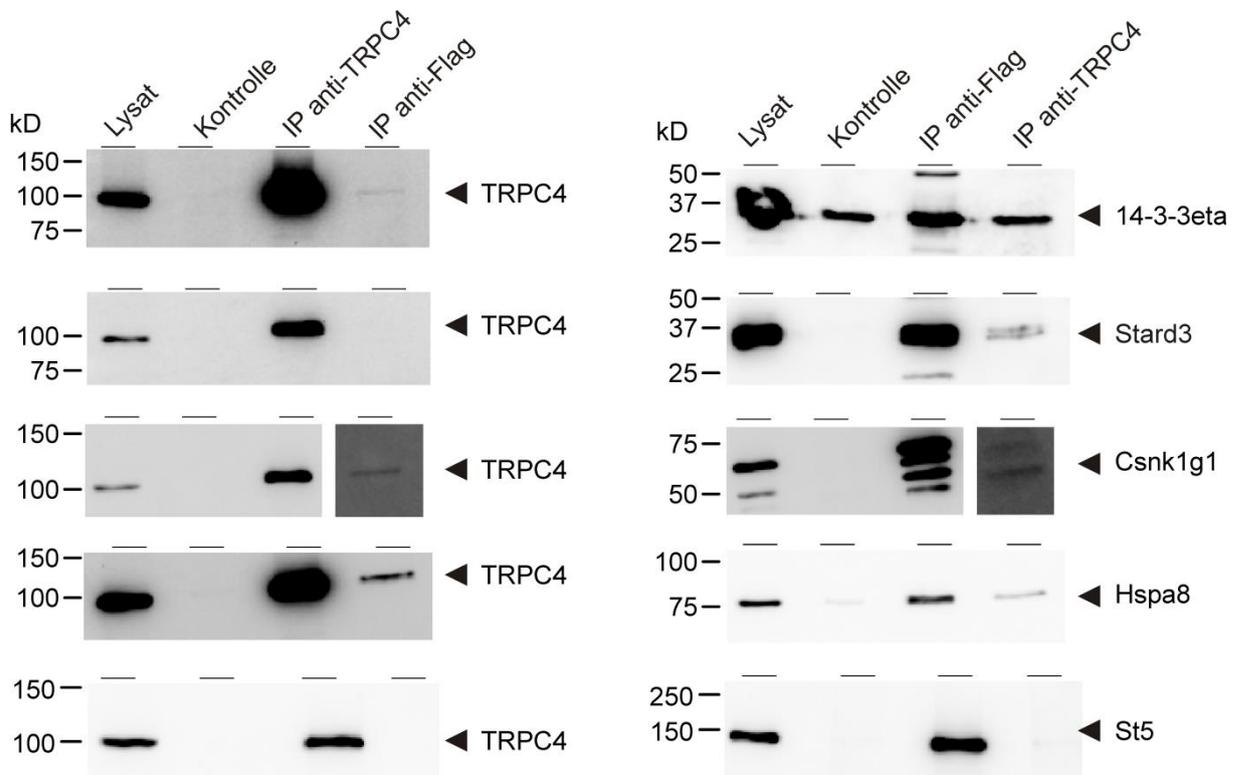


Abbildung 4-9 Western Blot: Koimmunpräzitationen von TRPC4 α mit weiteren Kandidatenproteinen

Auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen Zellysat (20 μ l), Kontrolle, Proteine, die mit dem Antikörper für TRPC4 präzipitiert wurden, Proteine, die mit dem Antikörper für die Kandidaten-Proteine (hier anti-Flag) präzipitiert wurden. Nach dem Transfer der Proteine auf Blotmembranen erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern für TRPC4 (links) und Flag (rechts). Kontrolle, die Proteine wurden mit unspezifischen Antikörpern präzipitiert.

Die Koimmunpräzitation von TRPC4 und 14-3-3eta zeigt ein anderes Bild. Sie wurde nicht weiter in Betracht gezogen, weil 14-3-3eta sich bereits sehr effektiv mit den unspezifischen Antikörpern (Kontrolle) präzipitieren lässt (Abbildung 4-9).

Abbildung 4-10 zeigt noch einmal eine unabhängiges Experiment zur Koimmunpräzitation von TRPC4 β und Tarbp2.

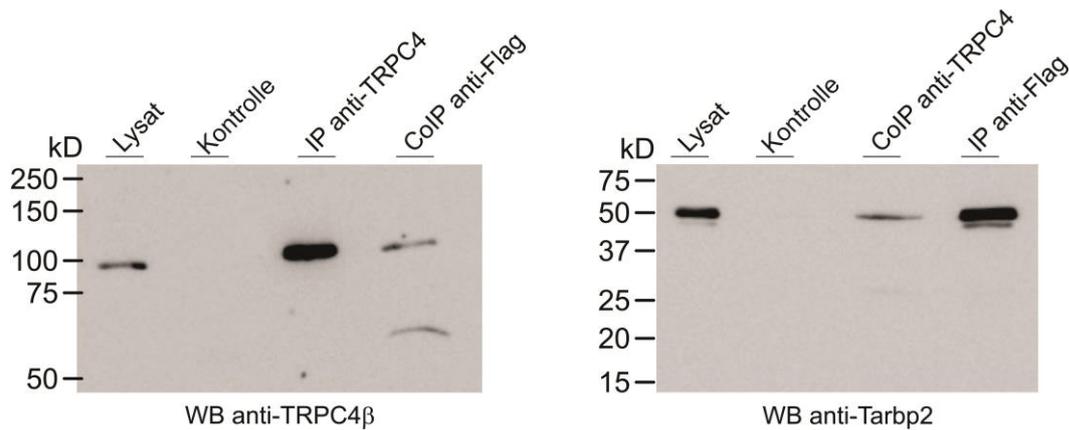


Abbildung 4-10 Western Blot: Koimmunpräzipitation Tarbp2 mit TRPC4β

Auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen Zelllysat (20 μ l), Kontrolle, Proteine, die mit dem Antikörper für TRPC4 präzipitiert wurden, Proteine, die mit dem Antikörper für Tarbp2 (hier anti-Flag) präzipitiert wurden. Nach dem Transfer der Proteine auf Blotmembranen erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper für TRPC4 (links) und Flag (rechts). Kontrolle, die Proteine wurden mit unspezifischen Antikörpern präzipitiert.

In Tabelle 4-2 sind diejenigen Proteine aufgelistet, die mit TRPC4 α und mit TRPC4 β koimmunpräzipitieren.

Tabelle 4-2 Proteine, die mit dem TRPC4-Protein koimmunpräzipitieren

Protein	mit TRPC4 α	mit TRPC4 β
Ataxin10	+	nicht getestet
Cab39	+	+
14-3-3 β	+	+
Hspa8	+	-
Adip	+	nicht getestet
Vps24	+	+
Tarbp2	+	+
Casein Kinase b	+	nicht getestet

Im Folgenden wurden diejenigen Proteine, welche mit TRPC4 koimmunpräzipitieren daraufhin getestet, ob sie einen Effekt auf die Funktion von TRPC4 haben.

4.3 Einfluss der identifizierten Interaktionspartner auf die Funktion von TRPC4

Nachdem Interaktionen von Kandidaten-Proteinen mit TRPC4 durch Koimmunpräzipitationen verifiziert worden waren, sollte nun deren Einfluss auf

TRPC4 Funktionen untersucht werden. Durch die Messung der Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration sollte eine mögliche Modulation des TRPC4 vermittelten Kalziumeinstroms experimentell nachgewiesen werden. Dazu wurden HEK293 Zellen verwendet, die stabil mit der cDNS des muskarinergen Rezeptors Typ 2 („M2R“) und jeweils der cDNS von der α - oder β -Variante von TRPC4 transfiziert waren (Tabelle 3-2).

Zunächst musste ein Protokoll für die Fura-Messungen etabliert werden, mit dem der TRPC4 vermittelte Kalziumeinstrom deutlich sichtbar war. Beim ersten Protokoll wurden die Zellen in kalziumhaltigem Puffer inkubiert und TRPC4-Aktivität durch Zugabe von Carbachol stimuliert. Es wurden hierzu zwei Zelllinien verwendet: Einmal die Zelllinie, die stabil mit der cDNS von TRPC4 β und dem muskarinergen Rezeptors Typ 2 („HEK M2R TRPC4 β “) transfiziert war und zur Kontrolle die korrespondierende Zelllinie, die lediglich mit der cDNS des muskarinergen Rezeptors Typ 2, nicht aber mit der cDNS von TRPC4 β transfiziert war („HEK M2R“). Abbildung 4-11 zeigt ein solches Experiment.

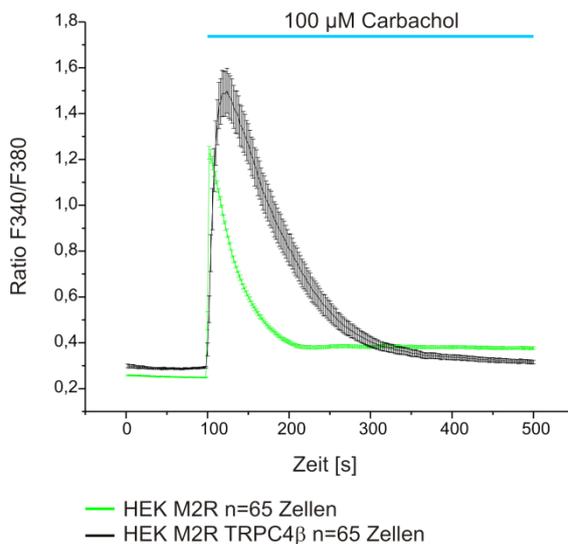


Abbildung 4-11 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK M2R Zellen mit und ohne TRPC4 β

Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK M2R Zellen (grün) und HEK M2R TRPC4 β Zellen (schwarz) nach Zugabe von Carbachol; die extrazelluläre Kalziumkonzentration beträgt 1 mM während des gesamten Experiments. Es wurden jeweils (n=) 65 Zellen untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. Insgesamt wurde das Experiment zweimal wiederholt, mit sehr ähnlichen Ergebnissen.

Nach Zugabe von 100 μ M Carbachol steigt die Kalziumkonzentration in Zellen, welche TRPC4 β exprimierten deutlich höher und länger an als in Zellen ohne TRPC4 β (Abbildung 4-11). Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration

in Zellen, die TRPC4 nicht exprimieren (Abbildung 4-11, grüne Spur) kommt durch zwei Effekte zustande, einmal durch die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speicher, zum anderen durch Aktivierung eines Kalziumeinstroms über Kanäle in der Plasmamembran, die nach Speicherentleerung aktiviert werden. Beide Vorgänge werden durch Carbachol aktiviert. Wird nun zusätzlich die cDNS von TRPC4 exprimiert kommt es zu einer weiteren Zunahme der zytosolischen Kalziumkonzentration (Abbildung 4-11, schwarze Spur). Dieses Ergebnis zeigt, dass es nach Zugabe von Carbachol in diesen Zellen zu einem zusätzlichen TRPC4 vermittelten Kalziumeinstrom kommt.

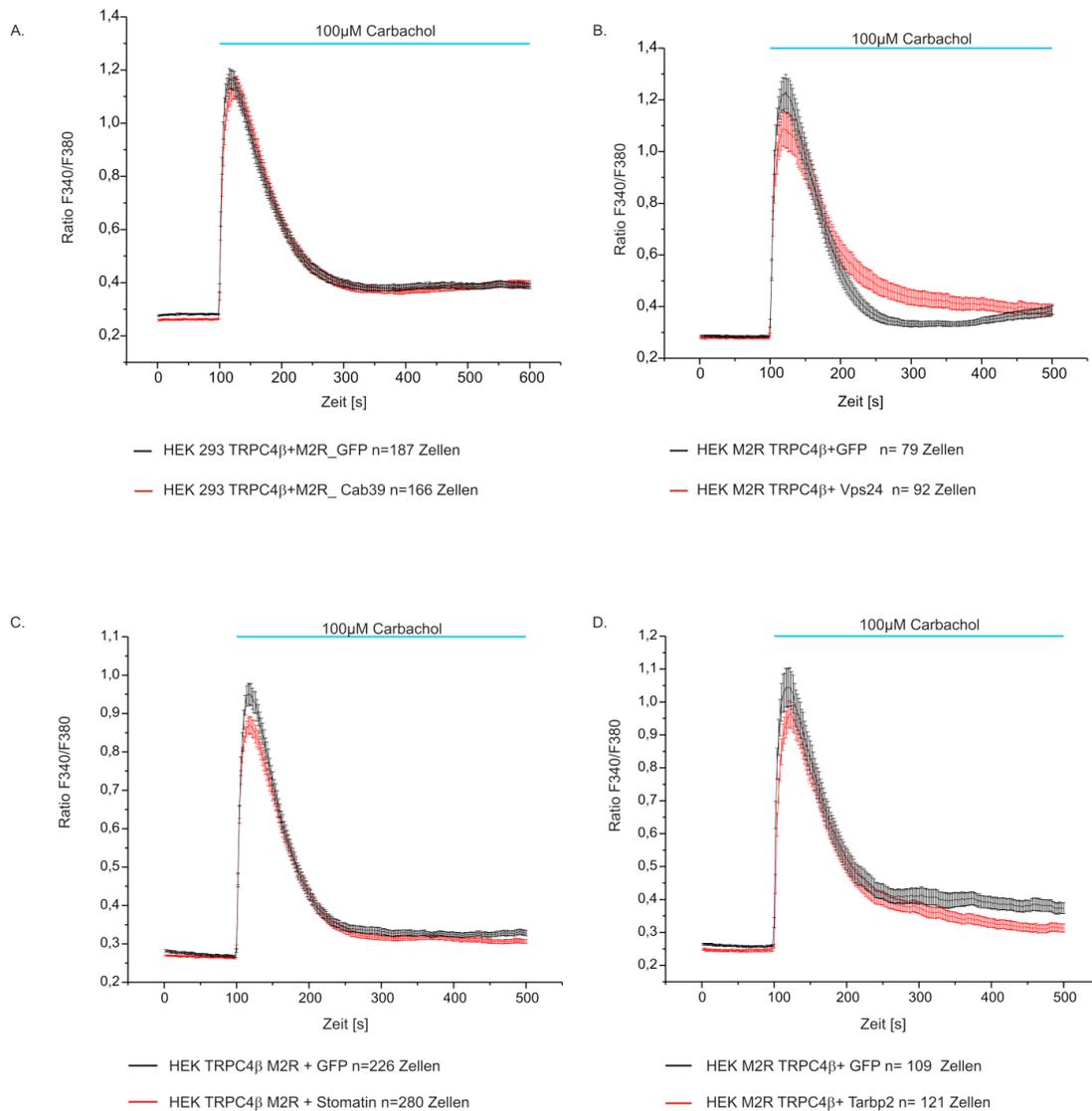


Abbildung 4-12 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration

Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK M2R TRPC4 β Zellen (schwarz) und HEK M2R TRPC4 β Zellen mit einem Kandidatenprotein (rot) nach Zugabe von Carbachol; die extrazelluläre Kalziumkonzentration beträgt 1 mM während des gesamten Experiments. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. A. Messung mit Cab39 n=166 Zellen, Kontrolle n=187 Zellen; B. Messung mit Vps24 n=92 Zellen, Kontrolle n=79 Zellen und C. Messung mit Stomatin n=280 Zellen, Kontrolle n=226 Zellen und D. Messung mit Tarbp2 n=121 Zellen, Kontrolle n=109 Zellen.

Dieses Protokoll wurde nun angewandt um den Einfluss der identifizierten Proteine auf die TRPC4-Aktivität zu untersuchen. Hierzu wurden jeweils die Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in Zellen die TRPC4 und den muskarinergen Rezeptor exprimieren (Abbildung 4-12, schwarze Spur) und in Zellen, die zusätzlich die cDNS eines der identifizierten Interaktionspartner exprimieren (Abbildung 4-12, rote Spur), verglichen. Abbildung 4-12 zeigt Ergebnisse bei denen Cab39 (Abbildung 4-12A), Vps24 (Abbildung 4-12B),

Stomatin (Abbildung 4-12C) und Tarbp2 (Abbildung 4-12D) koexprimiert wurden.

Wie in Abbildung 4-11 gezeigt überlagert die Zunahme des Carbachol-induzierten TRPC4 vermittelten Kalziumeinstroms die Carbachol-vermittelte Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration, die in Abwesenheit von TRPC4 gemessen wurde. Um die verschiedenen Einflüsse auf die zytosolische Kalziumkonzentration besser voneinander zu trennen und insbesondere den Beitrag von TRPC4 zu isolieren, wurde im nächsten Schritt das Protokoll wie folgt modifiziert.

Die Messungen wurden in kalziumfreier Badlösung durchgeführt. Durch die Zugabe von Thapsigargin wird zunächst die Ca-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums irreversibel gehemmt, Kalzium-Ionen die über ein bisher wenig charakterisiertes Leck entlang des Konzentrationsgradienten aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol strömen, können nicht mehr durch die ATPase ins Endoplasmatische Retikulum zurückgepumpt werden und die zytosolische Kalziumkonzentration steigt an (Abbildung 4-13). Nach einiger Zeit geht die zytosolische Kalziumkonzentration wieder auf das Ausgangsniveau zurück, da Pumpen und Austauscher der Plasmamembran und der Mitochondrien die Kalzium-Ionen aus dem Zytosol entfernen. Das Endoplasmatische Retikulum ist allerdings aufgrund der Thapsigargin Wirkung und des fortlaufenden Lecks an Kalzium-Ionen verarmt. Sobald jetzt Kalzium-Ionen zur extrazellulären Badlösung gegeben werden, werden aufgrund der entleerten ER-Speicher sogenannten Speicher-aktivierte Kanäle in der Plasmamembran aktiviert, und als Folge kommt es zum Kalziumeinstrom und Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration (Abbildung 4-13a, zweiter Anstieg). Mit der Zeit inaktivieren diese Kalzium-Einstromkanäle und die zytosolische Kalzium-Konzentration wird über die oben genannten Pumpen und Austauscher wieder normalisiert. Der Endoplasmatische Retikulum Kalzium-Speicher ist aufgrund der irreversiblen Hemmung der ATPasen immer noch geleert. Wird jetzt Carbachol zugegeben sollte allein der Effekt auf TRPC4 zu beobachten sein. Abbildung 4-13A fasst die Ergebnisse dieses Protokolls mit zwei Zelllinien zusammen, die schwarze Spur repräsentiert die Ergebnisse von Zellen die den muskarinergen Rezeptor und TRPC4 β exprimieren, die grüne

Spur die Ergebnisse von Zellen, die nur den muskarinergen Rezeptor exprimieren. Beide Zelltypen reagierten sowohl auf Thapsigargin als auch auf die Zugabe von Kalzium mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die Zugabe von Carbachol führt dagegen nur zu einer Erhöhung der Kalziumkonzentration in HEK M2R TRPC4 Zellen (Abbildung 4-13A). Dasselbe Protokoll führt mit TRPC4 α zu ähnlichen Ergebnissen (Abbildung 4-13B).

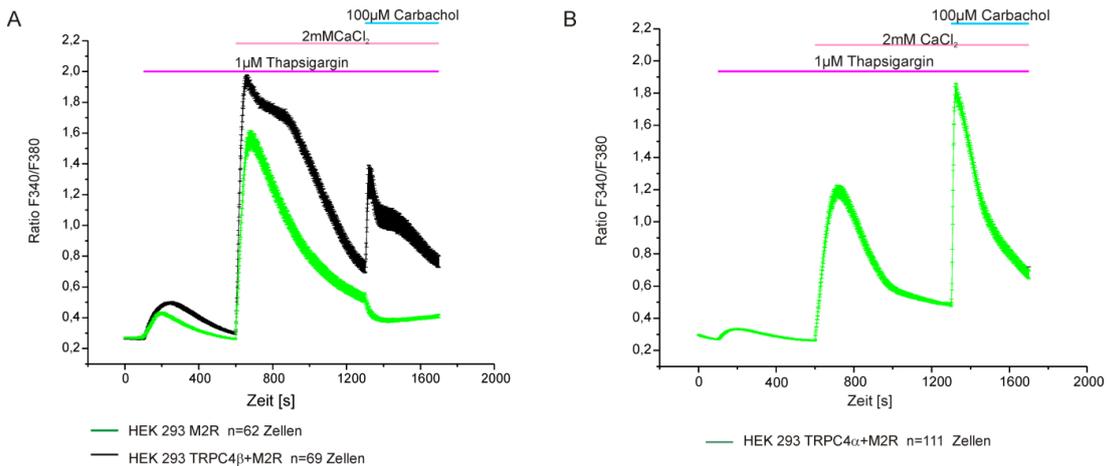


Abbildung 4-13 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration

A. Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK M2R Zellen (grün) und HEK M2R TRPC4 β Zellen (schwarz) nach sukzessiver extrazellulärer Zugabe von Thapsigargin, Kalzium und Carbachol; die extrazelluläre Kalzium Konzentration beträgt zu Beginn 0 mM nach Zugabe von Kalzium 2 mM während des restlichen Experiments. Es wurden für HEK M2R 62 Zellen und für HEK M2R TRPC4 β 69 Zellen untersucht. B. Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK M2R TRPC4 α Zellen (grün) nach Zugabe von Thapsigargin, Kalzium und Carbachol; die extrazelluläre Kalziumkonzentration beträgt zu Beginn 0 mM nach Zugabe von Kalzium 2 mM während des restlichen Experiments. Es wurden für HEK M2R TRPC4 α n= 111 Zellen untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. Insgesamt wurde das Experiment zweimal wiederholt, mit sehr ähnlichen Ergebnissen.

Im Folgenden wurde dieses zweite Protokoll dafür genutzt um mögliche Effekte der identifizierten Proteine auf den TRPC4-vermittelten Kalziumstrom zu messen. Abbildung 4-14 zeigt die entsprechenden Experimente für die identifizierten Proteine Vps24, Stomatin, 14-3-3beta und Cab39.

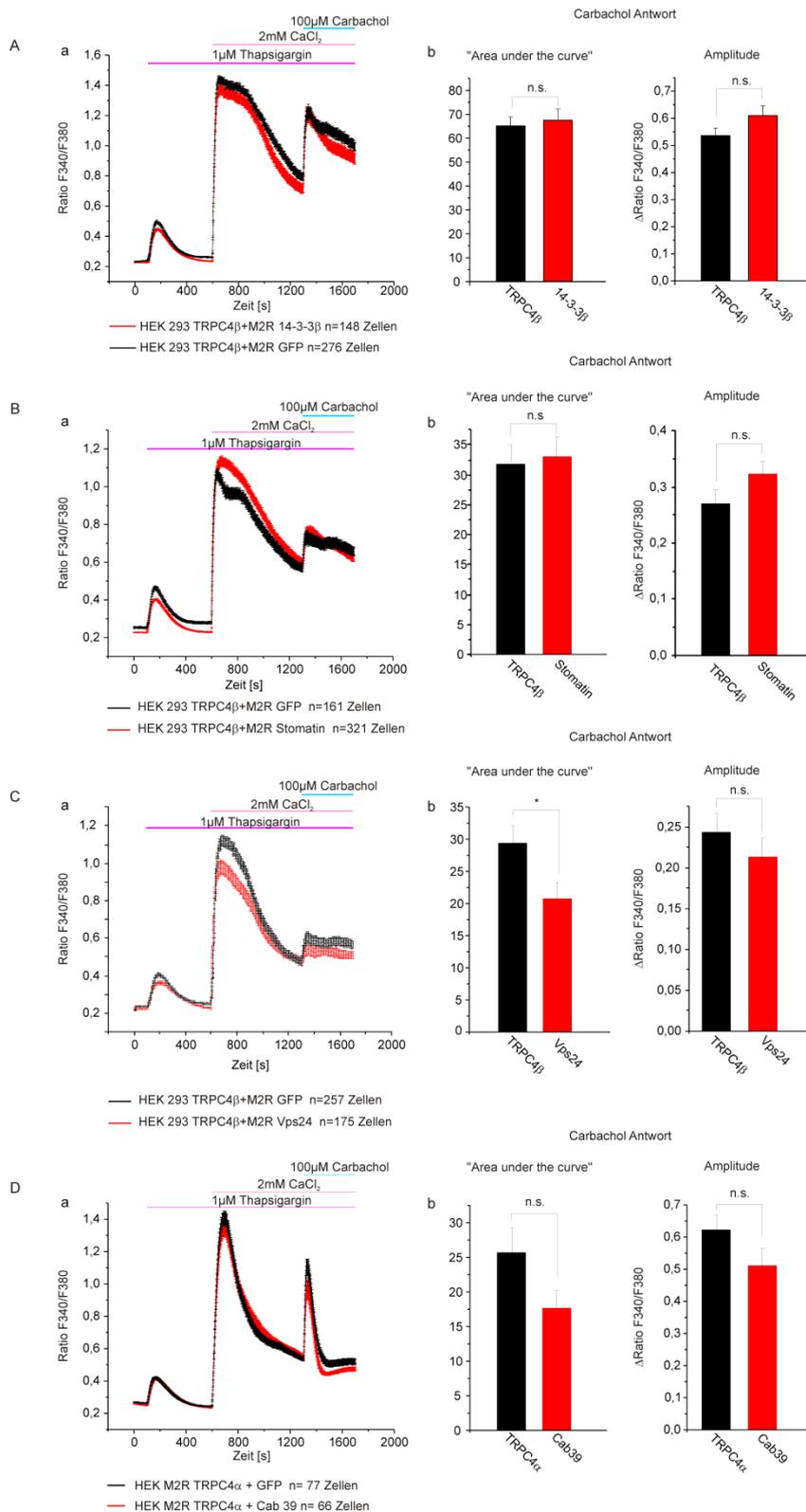


Abbildung 4-14 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration

Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK M2R TRPC4 Zellen (schwarz) und HEK M2R TRPC4 Zellen mit einem Kandidatenprotein (rot) nach Zugabe von Thapsigargin, Kalzium und Carbachol; die extrazelluläre Kalziumkonzentration beträgt zu Beginn 0 mM nach Zugabe von Kalzium 2 mM während des restlichen Experiments. Aa) Es wurden für HEK M2R TRPC4 β n=276 Zellen und für HEK M2R TRPC4 β mit 14-3-3 β n=148 Zellen untersucht. Ab) Die

Auswertung der Veränderung der Kalziumkonzentration nach Carbachol Zugabe (Amplitude sowie sogenannte „Area under the curve“). Ba) Es wurden für HEK M2R TRPC4 β n=161 Zellen und für HEK M2R TRPC4 β mit Stomatin n=321 Zellen untersucht. Ca) Es wurden für HEK M2R TRPC4 β n= 257 Zellen und für HEK M2R TRPC4 β mit Vps24 n=175 Zellen untersucht. Da) Es wurden für HEK M2R TRPC4 α n=77 Zellen und für HEK M2R TRPC4 α mit Cab39 n=66 Zellen untersucht. Die Auswertung der Veränderung der Kalziumkonzentration nach Carbachol Zugabe (Amplitude sowie sogenannte „Area under the curve“) ergab überwiegend keine signifikanten Unterschiede.

Wie Abbildung 4-14 zeigt, gibt es keine signifikanten Unterschiede im Carbachol-vermittelten TRPC4-induzierten Kalziumeinstrom bei Koexpression der identifizierten Proteine.

4.4 Tarbp2 und TRPC4

Ein weiteres Protein, das getestet wurde, ist Tarbp2. Das Protein Tarbp2 wurde mit der TRPC4 α - und TRPC4 β - Variante koimmunpräzipitiert (Abbildung 4-8 und Abbildung 4-10).

Zunächst wurden die cDNS von Tarbp2 mit TRPC4 β koexprimiert und die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration mit dem zweiten Protokoll gemessen. Es zeigte sich, dass die Koexpression von Tarbp2 und TRPC4 β zu einer deutlichen Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration nach Carbachol Stimulation führte (Abbildung 4-15 A), wohingegen die Anstiege der zytosolischen Kalziumkonzentration nach Zugabe von Thapsigargin oder extrazellulärem Kalzium in den Kontrollzellen, HEK M2R TRPC4 β , und den Zellen die zusätzlich Tarbp2 exprimierten, gleich waren. Die Auswertung von drei Experimenten zeigte, dass die Expression der Tarbp2 cDNS den Einstrom von Kalzium-Ionen nach Carbachol Stimulation in HEK M2R TRPC4 β signifikant im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht (Abbildung 4-15B), etwa um 30%.

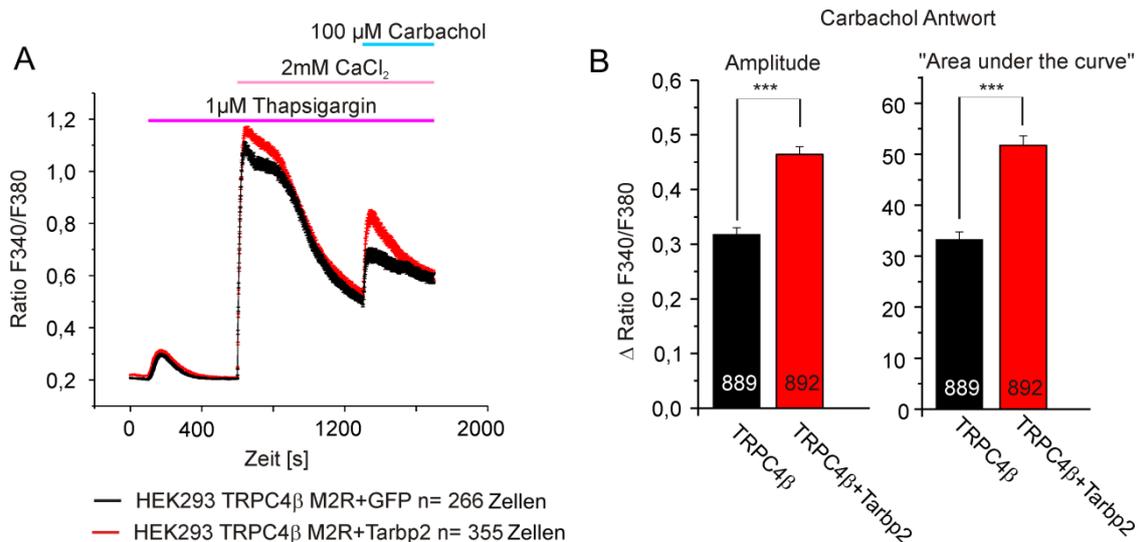


Abbildung 4-15 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration

Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK M2R TRPC4 β Zellen (schwarz) und HEK M2R TRPC4 β Zellen mit Tarbp2 (rot) nach Zugabe von Thapsigargin, Kalzium und Carbachol; die extrazelluläre Kalziumkonzentration beträgt zu Beginn 0 mM nach Zugabe von Kalzium 2 mM während des restlichen Experiments. A. Es wurden für HEK M2R TRPC4 β n= 266 Zellen und für HEK M2R TRPC4 β mit Tarbp2 n=355 Zellen untersucht. B. Die Auswertung der Veränderung der Kalziumkonzentration nach Carbachol Zugabe (Amplitude sowie sogenannte „Area under the curve“) von drei unabhängigen Experimenten ergab einen signifikanten Unterschied.

Die Messung mit Tarbp2 wurde ebenso mit den HEK M2R TRPC4 α Zellen durchgeführt. In diesen Messungen zeigte sich, dass auch die Koexpression von TRPC4 α und Tarbp2 zu einer Erhöhung des Carbachol-induzierten Kalzium Einstroms führt (Abbildung 4-16). Dagegen waren die Anstiege der intrazellulären Kalziumkonzentration, in den Zellen die TRPC4 α oder TRPC4 α und Tarbp2 exprimierten, nach Zugabe von Thapsigargin oder Kalzium in die extrazelluläre Badlösung gleich. Die Auswertung der Einzelexperimente mit jeweils 243 und 214 Zellen (Abbildung 4-16A) und die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten (Abbildung 4-16B) zeigt, dass der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Gabe von Carbachol signifikant in TRPC4 α und Tarbp2 koexprimierenden Zellen erhöht war.

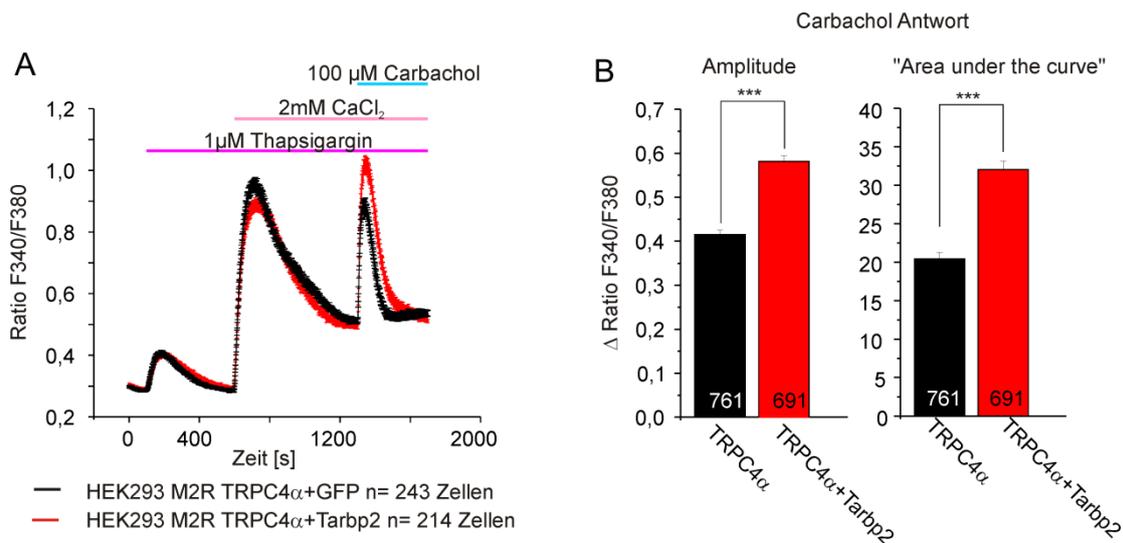


Abbildung 4-16 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration

Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK M2R TRPC4 α Zellen (schwarz) und HEK M2R TRPC4 α Zellen mit Tarbp2 (rot) nach Zugabe von Thapsigargin, Kalzium und Carbachol; die extrazelluläre Kalziumkonzentration beträgt zu Beginn 0 mM nach Zugabe von Kalzium 2 mM während des restlichen Experiments. A. Es wurden für HEK M2R TRPC4 α n= 243 Zellen und für HEK M2R TRPC4 α mit Tarbp2 n= 214 Zellen untersucht. B. Die Auswertung der Veränderung der Kalziumkonzentration nach Carbachol Zugabe (Amplitude sowie sogenannte „Area under the curve“) von drei unabhängigen Experimenten ergab einen signifikanten Unterschied.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Tarbp2 selbst einen eigenen funktionsfähigen kalziumpermeablen Kanal beziehungsweise eine Pore in der Zellmembran bildet, wurden HEK M2R Zellen mit der cDNS von Tarbp2 oder von GFP als Kontrolle transfiziert. Diese Zellen wurden mit dem gleichen Protokoll untersucht wie zuvor die TRPC4-exprimierenden Zellen. Wie Abbildung 4-17 zeigt, reagieren HEK M2R Zellen, die Tarbp2 transient exprimieren nicht mit einem Kalziumeinstrom auf die Stimulation mit Carbachol. Sie verhalten sich in der Messung wie die Kontroll-Zellen (Abbildung 4-17).

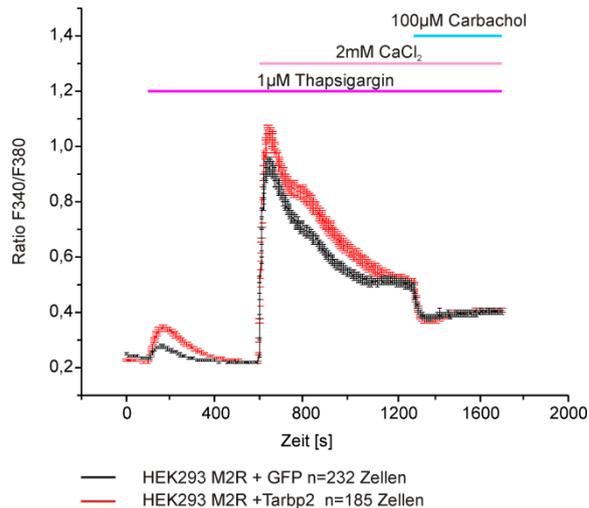


Abbildung 4-17 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration

Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK M2R Zellen (schwarz) und HEK M2R Zellen mit Tarbp2 (rot) nach Zugabe von Thapsigargin, Kalzium und Carbachol; die extrazelluläre Kalziumkonzentration beträgt zu Beginn 0 mM nach Zugabe von Kalzium 2 mM während des restlichen Experiments. Es wurden für HEK M2R n= 232 Zellen und für HEK M2R mit Tarbp2 n= 185 Zellen untersucht.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente (Abbildung 4-15 und Abbildung 4-16), dass die Koexpression von Tarbp2 und einer der beiden TRPC4 Varianten, TRPC4 α oder TRPC4 β , signifikant den durch TRPC4 hervorgerufenen Kalziumeinstrom in die Zelle erhöhte.

4.4.1 Eingrenzung der Bindedomänen durch Versuche mit TRPC4-Fragmenten und Tarbp2

Die bisherigen Experimente zeigen, dass Tarbp2 nicht nur mit TRPC4-Proteinen wechselwirkt, sondern auch TRPC4-Funktionen beeinflusst. In den nächsten Untersuchungen sollte die Bindungsdomäne des TRPC4-Proteins für das Protein Tarbp2 weiter eingegrenzt und charakterisiert werden. Der gesamte Carboxy-Terminus von TRPC4, die Aminosäurereste 622 bis 974, wurde fragmentiert und als rekombinante GST-Fusionsproteine exprimiert (Abbildung 4-18). Zum Teil konnte dabei auf cDNS-Konstrukte zurückgegriffen werden, die in der Arbeitsgruppe von Dr. Claudia Fecher-Trost bereitgestellt worden sind (Trost, Bergs et al. 2001). Das Fragment mCCEKO liegt im Bereich der extrazellulären Bereichs zwischen den Transmembrandomänen 5 und 6 und wurde als weitere Kontrolle verwendet.

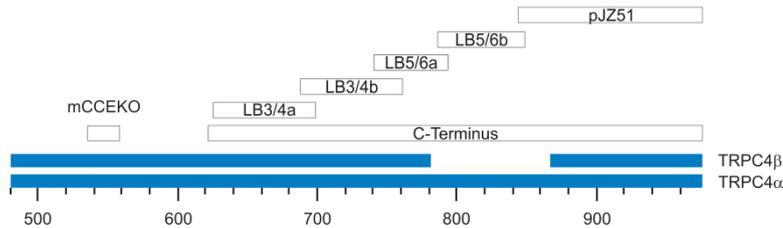


Abbildung 4-18 Fragmente des TRPC4 C-Terminus

Schematische Darstellung des C-Terminus von TRPC4 α und TRPC4 β , in blau. Die weißen Kästchen stellen die GST-TRPC4-Fusionskonstrukte dar.

Die einzelnen GST-TRPC4-Fusionsproteine wurden rekombinant in *E. coli* hergestellt und über GSH Sepharose aufgereinigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-19 zu sehen. Um die Menge, der an die Sepharose gebundenen Fusionsprotein zu bestimmen, wurde BSA in definierten Mengen auf das Gel aufgetragen. Alle GST-TRPC4 Fragmente ließen sich gut in *E. coli* exprimieren und aufreinigen, einzig Fragment LB3/4a war zunächst nur mit geringer Ausbeute vorhanden. Es wurde nochmals neu aufgereinigt und für die folgenden Pull-down Experimente verwendet. Alle GST-TRPC4-Fusionsproteine wurden in der Form verwendet, die in Abbildung 4-19 gezeigt ist.

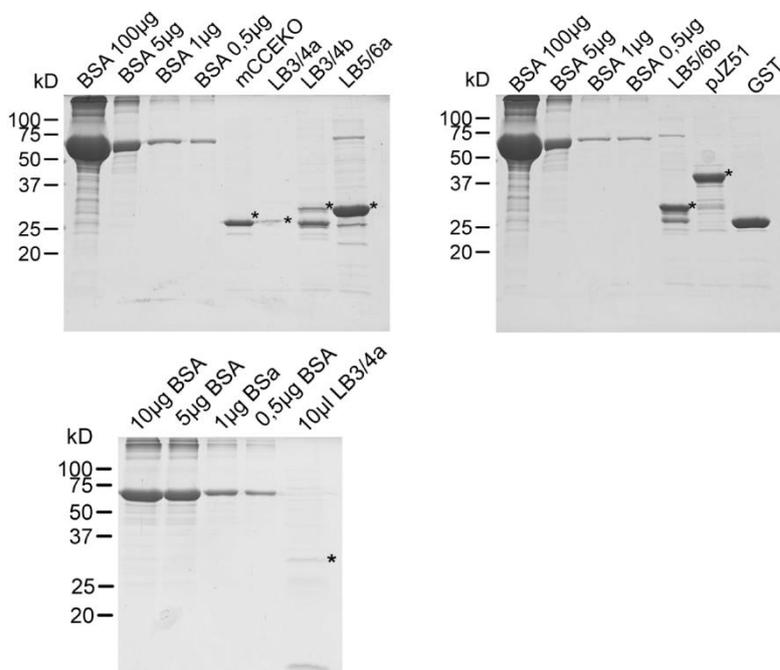


Abbildung 4-19 Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der rekombinanten GST-TRPC4 Fusionsproteinen

Coomassie gefärbtes 12% SDS Gel. BSA wurde als Mengenstandard aufgetragen. Es wurde jeweils 10 μ l GST-Sepharose auf das Gel aufgetragen. Erneute Aufreinigung von LB3/4a.

Mit den rekombinanten GST-TRPC4 Proteinen wurde – wie in Abschnitt 3.9.8 beschrieben – versucht, das in HEK-Zelllysat enthaltene Tarbp2-Protein zu binden. Hierzu wurde die Tarbp2 cDNS in HEK293 Zellen exprimiert und das HEK-Zelllysat anschließend mit dem an GSH-Sepharose gebundenen GST-TRPC4-Fusionsproteinen inkubiert. Anschließend wurden die an die GST-TRPC4-Fusionsproteine gebundenen Proteine eluiert und über ein SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel geblotted und die Membran mit dem Antikörper für Tarbp2 inkubiert. In Abbildung 4-20 ist das Ergebnis des Experimentes zu sehen. Es wurden gleiche Mengen an HEK-Zelllysat mit 12 µg GST-TRPC4-Fusionsprotein inkubiert. Der obere Western Blot in Abbildung 4-20 zeigt, dass Tarbp2 von zwei GST-TRPC4 Fusionsproteinen gebunden wird, von LB3/4a und LB5/6b. Das rekombinante GST-Protein wurde als Kontrolle verwendet; es bindet kein Tarbp2 (Abbildung 4-20, Spur ganz rechts). Der Western Blot wurde anschließend gestrippt und mit einem anti-GST Antikörper inkubiert. Dies diente als Kontrolle um zu untersuchen, ob gleiche Mengen GST-Fusionsproteinen eingesetzt worden waren. Man erkennt auf dem Western Blot (Abbildung 4-20, unten) mehrere Banden; das heißt neben den intakten GST-TRPC4 Fusionsprotein (mit * in Abbildung 4-20 markiert) wurden auch unvollständige Proteine gebildet, die jedoch den intakten GST-Anteil besitzen.

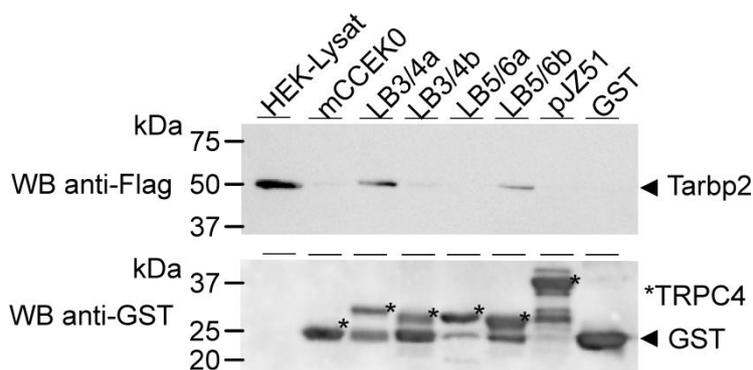


Abbildung 4-20 Western Blot des Pull down Experiments

Auf 10 % SDS-PAGE wurde aufgetragen Zelllysate (20 µl), Proteine, die an die TRPC4-GST-Fusionsproteine gebunden haben; Kontrolle, Proteine die an GST alleine binden. Nach dem Transfer der Proteine auf Blotmembranen erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper für Flag (Tarbp2 oben) und GST (unten).

Die Ergebnisse aus den Pull-down Experimenten zeigen, dass es mindestens zwei Abschnitte des TRPC4-Proteins gibt, die Tarbp2 binden, LB3/4a (Aminosäurereste 625 bis 697) und LB5/6b (Aminosäurereste 786 bis 847). Die

erste Bindestelle ist in TRPC4 α und in TRPC4 β identisch. Die zweite Bindestelle liegt genau in dem Sequenzabschnitt von TRPC4 α , der in TRPC4 β fehlt. Abbildung 4-21 zeigt die Sequenzen des Carboxy-Terminus von TRPC4 α und TRPC4 β sowie die identifizierten Bindestellen.

TRPC4 β	FGTYNVISLVVLLNMLIAMMNSY	QLIADHADIEWKFARTKLWMSYFEEGGTLPTPFNVI	660
TRPC4 α	FGTYNVISLVVLLNMLIAMMNSY	QLIADHADIEWKFARTKLWMSYFEEGGTLPTPFNVI	660
TRPC4 β		PSPKSLWYLVKWIWTHLCKKKMRRKPESFGTIGRRAADNLRHHQYQEVMRNLVKRYVAA	720
TRPC4 α		PSPKSLWYLVKWIWTHLCKKKMRRKPESFGTIGRRAADNLRHHQYQEVMRNLVKRYVAA	720
TRPC4 β	MIREAKTEEGLTEENVKELKQDISSFRFEVLGLLRGSKLSTIQSANAASSADSDEKSQSE		780
TRPC4 α	MIREAKTEEGLTEENVKELKQDISSFRFEVLGLLRGSKLSTIQSANAASSADSDEKSQSE		780
TRPC4 β	-----		
TRPC4 α	GNGKDKRKNLSLFDLTLIHPRSAAIASERHNLSNGSALVVQEPPEKQKRVNFDVADIKN		840
TRPC4 β	-----EETRQQAAGALERNIELESKGLASRGDRSIPGLNE		816
TRPC4 α	FGLFHRRSKQNAAEQNANQIFSVSEETRQQAAGALERNIELESKGLASRGDRSIPGLNE		900

Abbildung 4-21 Bindungsstellen von TRPC4 α und TRPC4 β für Tarbp2

Teilsequenz des C-Terminus von TRPC4 α bzw. TRPC4 β ; die Bindungsstellen für Tarbp2 sind pink unterlegt.

Die Aminosäuresequenz (625 bis 697) welche die erste Bindestelle in TRPC4 umfasst, ist sehr ähnlich zu den entsprechenden Aminosäuresequenzen in den anderen sechs TRPC-Proteinen (Abbildung 4-22). Insbesondere besteht eine große Ähnlichkeit mit der Sequenz von TRPC5.

mTRPC4	VVLLNMLIAMMNSYQLIADHADIEWKFARTKLWMSYFEEGGTLPTPFNVIIPSPKSLWYL	669
mTRPC5	VVLLNMLIAMMNSYQLIADHADIEWKFARTKLWMSYFDEGGTLPPPFNIIPSPKSLWYL	673
mTRPC1	IVLTKLLVAMLHKSFLIANHEDKWKFARAKLWLSYFDDKCTLPPPFNIIPSPKSLWYL	710
mTRPC3	VVLLNMLIAMINSSYQETEDDSVVEWKFARAKLWLSYFDDGKTLPPPFSLVPSPKSLWYL	781
mTRPC7	VVLLNMLIAMINSSYQETEDADVEWKFARAKLWLSYFDEGRTLPAPFNLVPSPKSLWYL	721
mTRPC6	IVLLNMLIAMINSSYQETEDADVEWKFARAKLWLSYFEEGRTLPVPFNLVPSPKSLWYL	775
mTRPC2	IVLLNMLIAMITNSFQKLEDDADVEWKFARAKLWLSYFREGTLTPVPFNLVPSPKSLWYL	969
mTRPC4	VKWIWTHLCKKK---MRRKPESFGTIGRR-----	695
mTRPC5	GNWFNNTFCPKRDPDGRRRRHNLRSFTEP-----	702
mTRPC1	ISSLSKWICSHT---SKGKVKRQNSLKEW-----	736
mTRPC3	IMRITN----FSKCRRRRLQKDLELGMGN-----SKSRLNLFQSN	818
mTRPC7	IMRITMCLIELCQSKAKRCENDLEMGLN-----SKFRKTRY-QAG	761
mTRPC6	LLKFKKWMCELIQGGKQGFQEDAEMNKRNEEKKFGISGSHEDLKSKFSLDKNQLAHNKQSS	835
mTRPC2	VRRITFRFLCCGSSCCAKKSDYPIGTFTN-----	999
mTRPC4	-----AADNLRHHQYQEVMRNLVKRYVAAMIREAKTEEGLTEEN-VKELKQDISSF	746
mTRPC5	-----HADSLIQNHQYQEVIRNLVKRYVAAMIRNSKTNEGLTEEN-FKELKQDISSF	753
mTRPC1	-----RNLKQKRDENYQKVMCCLVHRYLTSMRQKMQSTDQATVEN-LNELRQDLSKF	787
mTRPC3	SRVFESHFSFNSILNQPTRYQQIMKRLIKRYVLKAQVD-KENDEVNEGE-LKEIKQDISSL	876
mTRPC7	MRNSENLTANSTFSKPTRYQKIMKRLIKRYVLKAQVD-RENDEVNEGE-LKEIKQDISSL	819
mTRPC6	TRSSSEDYHLNSFSNPPRQYQKIMKRLIKRYVLQAQID-KESDEVNEGE-LKEIKQDISSL	893
mTRPC2	--PGARAGSAGEGERVSYRLRVIKALVQRYIETARREFEETRRKDLGNRLTELTKTVSRL	1057
mTRPC4	RFEVLGLLRGSKLSTIQSANAASSADSDEKSQSEGNGKDKRKNLSLFDLTLIHPRSAAI	806
mTRPC5	RYEVLDDLGNRKHPP--RRSLSTSSADFSQRDDTNDGSGGARAKSKSVSFNVGCKKKACHG	811
mTRPC1	RNEIRDLLGFRTS-----	800
mTRPC3	RYELLEDKSQATE-----	889
mTRPC7	RYELLEEKSQATG-----	832
mTRPC6	RYELLEEKSQNTE-----	906
mTRPC2	QSEVASVQKNLAAG-----	1071
mTRPC4	ASERHNLNSGSAVVQEPREKQKRVNFVADIKNFGLFHRRSKQNAAEQANQIFSVSEE	866
mTRPC5	APLIRTVPRASGAQGKPKSESSSKRSFMGPSFKKLGLFFSKFNGQTSEPTSEPMYTIISDG	871
mTRPC1	-----KYAMFYPRN-----	809
mTRPC3	-----ELAILIHKLSEK----LNPSVLRCE--	910
mTRPC7	-----ELADLIQQLSEKFGKLNKDHDLRVNQG	859
mTRPC6	-----DLAELIRKLGRLS--LEPKLEESRR-	930
mTRPC2	-----GAPRPPDGASILSRVITRVRNSFQNLGPPTSPTPAEL	1108

Abbildung 4-22 Alignment der C-Termini aller TRPCs

In dem Alignment ist nur der Ausschnitt der C-Termini zu sehen, die von den LB3/4a und LB5/6b Fragmenten abgedeckt werden, in pink unterlegt. Die LB3/4a korrespondierende Domäne ist in allen TRPCs konserviert, die Sequenzidentität von TRPC5 ist am größten.

Aufgrund dieser Beobachtung sollte Tarbp2 auch mit TRPC5 koimmunpräzipitieren. Die darauf durchgeführte Koimmunpräzipitation mit Tarbp2 und TRPC5 war dann auch positiv (Abbildung 4-23).

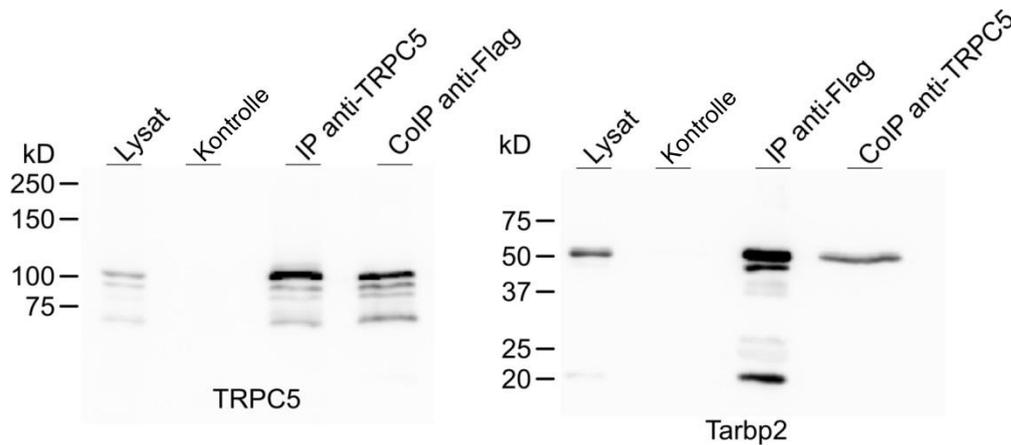


Abbildung 4-23 Western Blot: Koimmunpräzipitation von Tarbp2 und TRPC5

Auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen Zelllysate (20 μ l), Kontrolle, Proteine, die mit Antikörper für TRPC5 präzipitiert wurden, Proteine, die mit dem Antikörper für Tarbp2 (hier anti-Flag) präzipitiert wurden. Nach dem Transfer der Proteine auf Blotmembranen erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper für TRPC5 (links) und Flag (rechts). Kontrolle, die Proteine wurden mit unspezifischen Antikörpern präzipitiert.

Die zweite Bindestelle von Tarbp2 im TRPC4 C-Terminus, das LB5/6b Fragment ist eine bekannte *in vitro* Bindungsdomäne für Ca/Calmodulin (Trost, Bergs et al. 2001). Die Frage, ob Tarbp2 mit Calmodulin um die gemeinsame Bindestelle in TRPC4 konkurriert, wurde mit einem Verdrängungsversuch untersucht. Hierzu wurden konstante Mengen von rekombinantem LB5/6b GST-TRPC4 und Zelllysate von HEK293 Zellen, welche die cDNS von Tarbp2 exprimierten, mit steigenden Konzentrationen von rekombinantem Calmodulin inkubiert. Die Mengen an eingesetztem GST-TRPC4 Protein und Calmodulin sowie die Menge von Tarbp2 wurden im Western Blot überprüft (Abbildung 4-24)

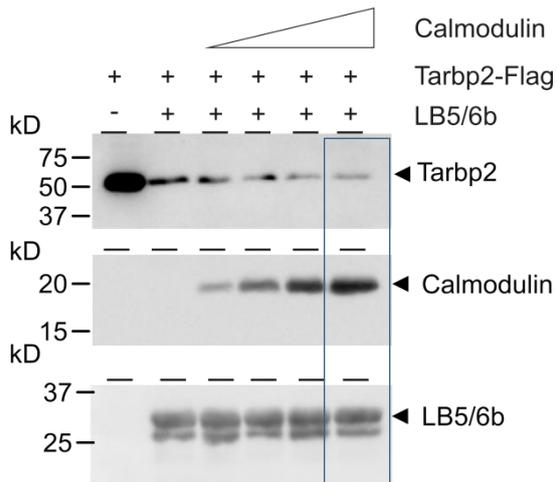


Abbildung 4-24 Bindungs-Experiment mit Tarbp2, Calmodulin und dem GST-TRPC4 Fusionsprotein LB5/6b

In Gegenwart von steigender Menge von Calmodulin (0,595 µg, 2,97 µg, 5,95 µg, 11,9 µg) nimmt die Bindung von Tarbp2 ab. Western Blot; derselbe Blot wurde zweimal gestrippt und mit einem anderen Antikörper inkubiert wurde. Oberster Blot mit anti-Flag inkubiert, mittlerer Blot mit anti-Calmodulin inkubiert und der untere Blot wurde mit anti-GST inkubiert. Kasten: Calmodulin und GST-TRPC4-Fusionsprotein liegen in äquimolaren Mengen vor.

Die Ergebnisse in Abbildung 4-24 zeigen, dass Tarbp2 und Calmodulin *in vitro* um die gemeinsame TRPC4-Bindestelle konkurrieren. Das Ausmaß der Bindung von Tarbp2 an LB5/6b nimmt ab je mehr Calmodulin vorhanden ist; gleichzeitig nimmt die Menge an gebundenen Calmodulin zu. Lagen Calmodulin und LB5/6b in etwa äquimolaren Mengen vor, war die Bindung von Tarbp2 deutlich schwächer ausgeprägt als die von Calmodulin (Abbildung 4-24).

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass TRPC4 in seinem Carboxy-Terminus über zwei Bindedomänen für Tarbp2 verfügt. Die in der Sequenz erste Bindungsstelle kommt in ähnlicher Form in allen Mitgliedern der TRPC Familie vor; sie ist besonders ähnlich zur Sequenz von TRPC5. Die zweite Bindedomäne ist dagegen TRPC4 α eigen. Die zweite Bindestelle bindet Ca/Calmodulin und es konnte gezeigt werden, dass Ca/Calmodulin *in vitro* mit Tarbp2 um die Bindung in TRPC4 konkurriert.

Die funktionale Konsequenz dieser Konkurrenz wurde im folgenden Experiment untersucht.

4.4.2 TRPC4 α , Tarbp2 und Calmodulin

Um die Auswirkungen der Bindung von Calmodulin und Tarbp2 auf die Funktion von TRPC4 zu untersuchen, wurden die cDNS von Calmodulin und Tarbp2 in HEK M2R TRPC4 α Zellen ko-transfiziert.

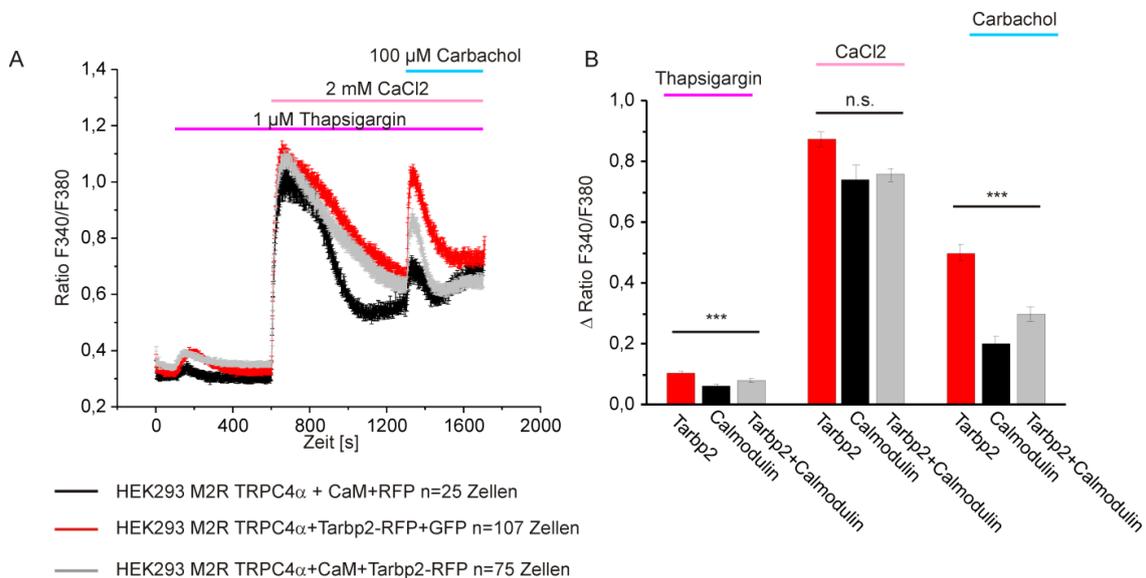


Abbildung 4-25 Veränderung der zytosolische Kalziumkonzentration von TRPC4 α Zellen mit Tarbp2 und Calmodulin

A. Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK M2R TRPC4 Zellen mit Calmodulin (schwarz) und HEK M2R TRPC4 Zellen mit Tarbp2 (rot) und HEK M2R TRPC4 Zellen mit Calmodulin und Tarbp2 (grau) nach Zugabe von Thapsigargin, Kalzium und Carbachol; die extrazelluläre Kalziumkonzentration beträgt zu Beginn 0 mM; nach Zugabe von Kalzium 2 mM während des restlichen Experiments. B. Die Auswertung der Veränderung der Kalziumkonzentration, die Amplitude, nach Zugabe von Thapsigargin, Kalzium und Carbachol ergab signifikante Unterschiede nach der Zugabe von Thapsigargin und Carbachol. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Die HEK M2R TRPC4 α Zellen, welche Calmodulin transient exprimierten, zeigten eine deutliche Reduktion des zytosolischen Kalziumanstiegs nach Carbachol Stimulation. Dies stimmt mit bereits publizierten Ergebnissen überein, die zeigen, dass Calmodulin einen hemmenden Effekt auf TRPC4-Funktionen hat (Tang, Lin et al. 2001). Zellen die nur Tarbp2 exprimieren, zeigen eine größere durch Carbachol induzierte Kalziumzunahme. Wenn nun Tarbp2 und Calmodulin zusammen in einer Zelle exprimiert wurden, zeigte sich, dass Tarbp2 den inhibitorischen Effekt von Calmodulin auf TRPC4 α teilweise aufheben konnte (Abbildung 4-25). Das Ergebnis des in Abbildung 4-25 gezeigten Experiments spricht dafür, dass Tarbp2 die hemmende Wirkung von Calmodulin auf den Carbachol aktivierten und TRPC4 vermittelten Kalziumstrom zum Teil aufheben kann. Allerdings wird auch die durch

Thapsigargin ausgelöste Freisetzung von Kalziumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum unterschiedlich beeinflusst.

4.4.3 Tarbp2 und eine konstitutiv offene TRPC4 Mutante

Die Charakterisierung der Bindedomänen von TRPC4 für Tarbp2 hatten zwei Bindestellen ergeben. Die erste Bindestelle des C-Terminus von TRPC4 ist möglicherweise an der konstitutiven Aktivität einer TRPC4-Variante beteiligt, die in der Arbeitsgruppe identifiziert wurde. So führt eine gezielte Punktmutation im Bereich der zytosolischen Schleife zwischen den Transmembrandomänen S4 und S5 zu einem konstitutiv offenen Kanal. Das heißt dieser Kanal ist auch in Abwesenheit von aktivierenden Stimuli geöffnet; er ermöglicht den permanenten Einstrom von Kalzium- und Natriumionen in die Zelle, die dann rasch aufgrund der Kalziumüberladung und der Depolarisation stirbt. Um diese TRPC4-Mutante untersuchen zu können wurde eine Zelllinie hergestellt, welche die cDNS der TRPC4 Mutante induzierbar exprimiert. Auf diese Weise entsteht eine Zeitfenster von zirka 24 h, indem die Funktion dieser Mutante gemessen werden kann. Die Mutante entsteht durch den Austausch des Aminosäurerests Glycin an Position 503 mit einem Serin. Möglicherweise interagiert dann dieses Serin mit einem Aminosäurerest im Bereich des C-Terminus und hält dadurch den TRPC4-Kanal offen. Aminosäurereste, die mit dem Serinrest der Mutante wechselwirken könnten sind in dem TRPC4-Sequenzabschnitt lokalisiert, der Tarbp2 bindet. Deshalb sollte getestet werden, ob die Bindung von Tarbp2 an den C-Terminus dieser Mutante einen Effekt auf den Kalziumeinstrom hat. Tarbp2 wurde in die HEK TRPC4_{G503S}-Zellen transfiziert und 24 h oder 48 h nach Transfektion wurde die Expression von TRPC4_{G503S} induziert. Messungen wurden nach zwei Induktionszeiten durchgeführt, nach 18 Stunden und nach 5 Stunden. Die erste Messung wurde 24 h nach Transfektion mit Tarbp2-IRES-GFP oder GFP (als Kontrolle) und 18 h nach Induktion von TRPC4_{G503S} durchgeführt (Abbildung 4-26).

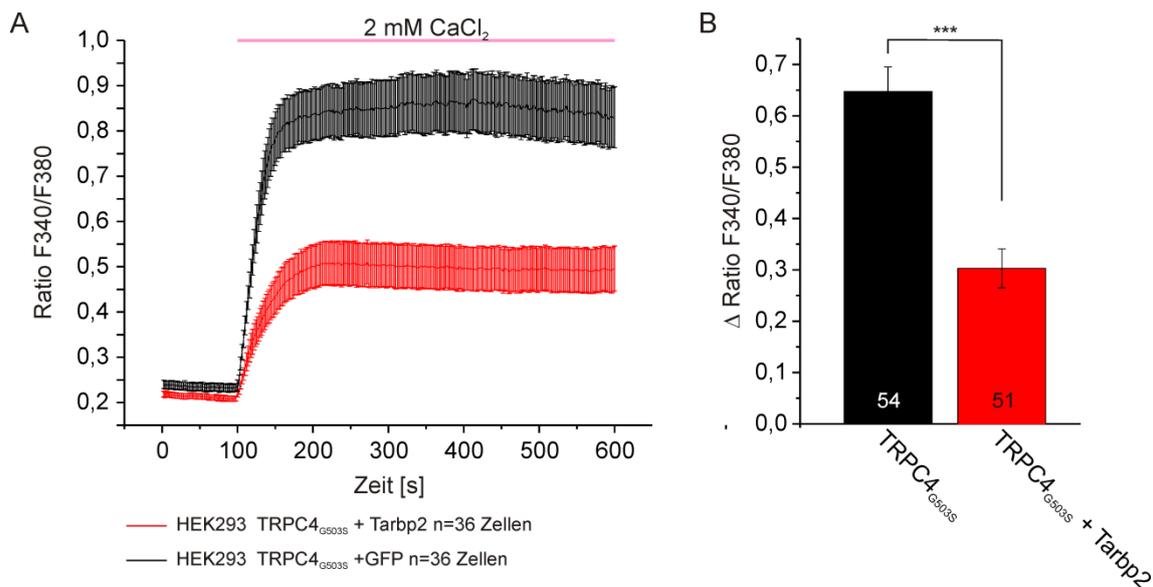


Abbildung 4-26 Veränderung der zytosolische Kalziumkonzentration von HEK TRPC4_{G503S} Zellen mit Tarbp2

Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK TRPC4_{G503S} Zellen mit Tarbp2 (rot) und HEK TRPC4_{G503S} mit GFP (schwarz) nach Zugabe von 2 mM Kalzium, 24h nach Transfektion und 18h nach Induktion. Es wurden jeweils 36 Zellen untersucht. B. Auswertung des Kalziumsignals, Amplitude von zwei unabhängigen Messungen. HEK TRPC4_{G503S} (schwarz) und HEK TRPC4_{G503S} transfiziert mit Tarbp2 (rot), die Expression von Tarbp2 reduziert den Kalziumeinstrom durch TRPC4_{G503S} signifikant.

Die Expression von TRPC4_{G503S} bewirkt, dass die Zellen deutliche morphologische Veränderungen zeigten. Sie waren abgerundet und es fanden sich nicht mehr viele lebende Zellen. Deshalb wurde bei den nächsten Messungen die Induktionszeit auf fünf Stunden verringert. Die Zellen exprimierten das Protein, waren aber noch nicht so geschädigt. Aufgrund des permanent geöffneten Kanals werden die Zellen zunächst in kalziumfreier Lösung gehalten (Abbildung 4-26). Nach Zugabe von Kalzium in die extrazelluläre Badlösung strömt Kalzium entlang eines Konzentrationsgradienten in die Zelle und die zytosolische Kalziumkonzentration steigt an. (schwarze Kurve in Abbildung 4-26). Das gleiche Experiment in Gegenwart von Tarbp2 führt zu einem deutlich geringeren zytosolischen Kalziumanstieg.

Die statistische Auswertung von 72 Zellen (Tarbp2) und 68 Zellen (Kontrolle) aus drei unabhängigen Experimenten ergab eine 50%ige Reduktion der Amplitude des Kalziumeinstroms nach Ko-Expression der Tarbp2 cDNS in den TRPC4_{G503S} exprimierenden Zellen (Abbildung 4-26B). Dies bedeutet, dass die

Bindung von Tarbp2 durch die Mutante TRPC4_{G503S} zu einer deutlichen Reduktion des Kalziumeinstroms führt.

Da Tarbp2 auch von TRPC5 gebunden wird (Abbildung 4-23), wurde ein ähnliches Experiment mit der konstitutiv offenen TRPC5 Mutanten durchgeführt (Abbildung 4-27).

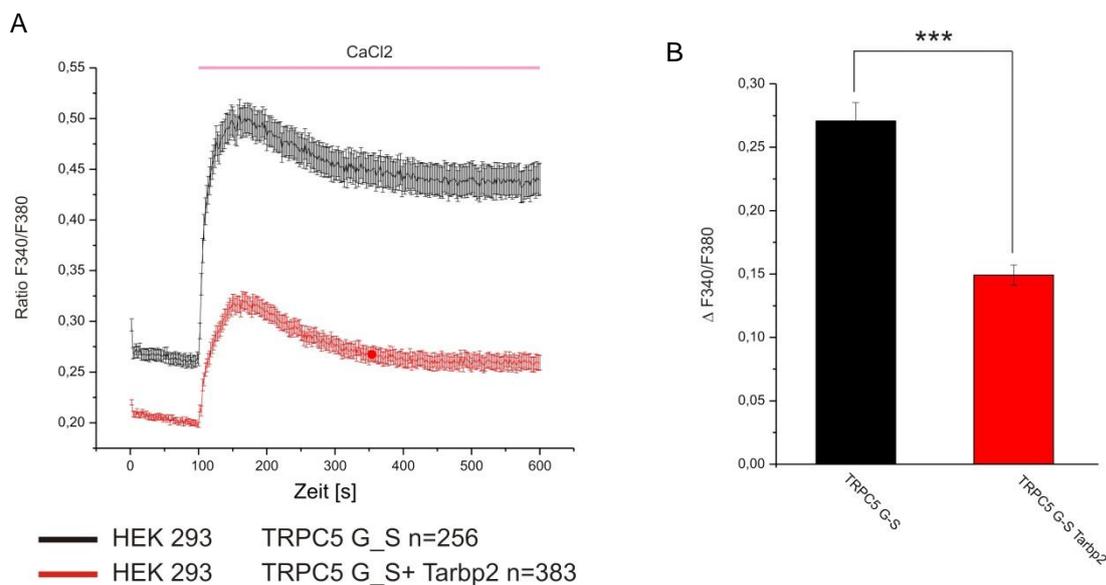


Abbildung 4-27 Veränderung der zytosolische Kalziumkonzentration von TRPC5_{G504S} Zellen mit Tarbp2

Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK TRPC5_{G504S} Zellen mit Tarbp2 (rot) und HEK TRPC5_{G504S} mit GFP (schwarz) nach Zugabe von 2 mM Kalzium, 24h nach Transfektion und 14 h nach Induktion. Es wurden jeweils für HEK TRPC5_{G504S} 256 Zellen gemessen und für HEK TRPC5_{G504S} mit Tarbp2 383 Zellen. B. Auswertung des Kalziumsignals Amplitude von zwei unabhängigen Messungen. HEK TRPC5_{G504S} (schwarz) und HEK TRPC5_{G504S} transfiziert mit Tarbp2 (rot), die Expression von Tarbp2 reduziert den Kalziumeinstrom durch TRPC5_{G504S} signifikant.

Auch hier zeigte sich, dass die Expression von Tarbp2 den Kalziumeinstrom durch die TRPC5 Mutante deutlich verringert.

4.4.4 TRPC4 und die ΔTarbp2 Mutante

Die bisherigen Untersuchungen zeigen eine Wechselwirkung von TRPC4 und TRPC5 mit Tarbp2; diese Wechselwirkung hat Auswirkungen auf die durch TRPC4 und TRPC5 vermittelten Ströme. Im Folgenden sollte die Bindung von Tarbp2 durch TRPC4 weiter charakterisiert werden. Im Tarbp2-Protein sind die Bindestellen für doppelsträngige RNS (dsRNS) wichtige Domänen. Um festzustellen, ob die Bindung von Tarbp2 und TRPC4 RNS abhängig ist, wurde eine Mutante von Tarbp2 hergestellt, welcher eine Bindestelle für dsRNS fehlt

(Aminosäurereste 209-223). Dieser Sequenzbereich ist in beiden cDNS Klonen vorhanden, welche in dem Screening mit dem Hefe-zwei-Hybrid System identifiziert worden waren (Abbildung 4-28A).

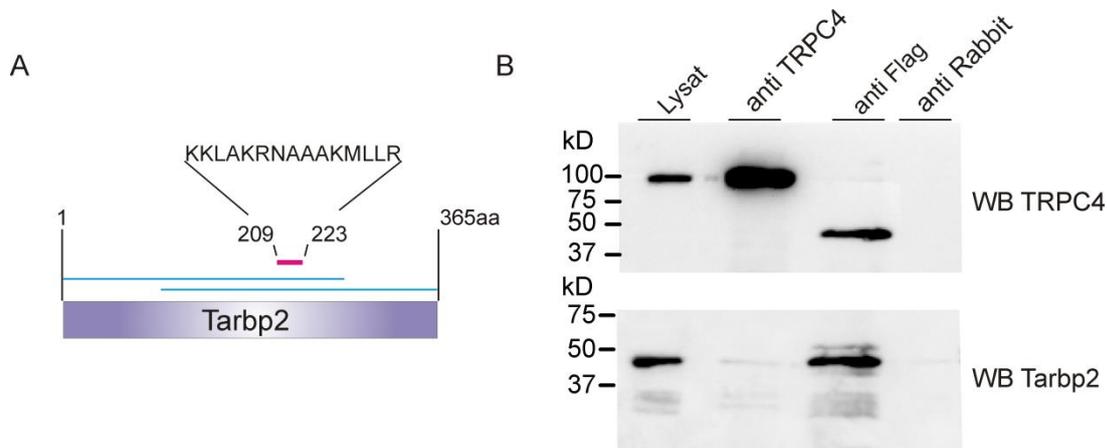


Abbildung 4-28 Lokalisation der Deletion in Tarbp2 sowie Koimmunpräzitation von TRPC4 und Tarbp2^{Δ209-223aa}

A Lokalisation der deletierten Aminosäurereste 209-223 in dem Tarbp2 Protein. B Auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen Zelllysat (20 μ l), Proteine, die mit dem Antikörper für TRPC4 präzipitiert wurden, Proteine, die mit dem Antikörper für Tarbp2 (hier anti-Flag) präzipitiert wurden und die Kontrolle unspezifische Kaninchen Antikörper. Nach dem Transfer der Proteine auf Blotmembranen erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern für TRPC4 (oben) und Flag (unten).

TRPC4 α und Flag-Tarbp2^{Δ209-223} wurden in HEK293 Zellen ko-exprimiert und anschließend wurde eine Koimmunpräzitation durchgeführt. TRPC4 ließ sich in dem Lysat nachweisen und mit dem anti-TRPC4 Antikörper wurde TRPC4 in der Immunpräzitation angereichert (Abbildung 4-28B, oberer Western Blot) nicht aber Tarbp2. Tarbp2^{Δ209-223} konnte mit dem Flag Antikörper im Lysat nachgewiesen werden und mit dem anti-Flag Antikörper konnte das Protein angereichert werden (Abbildung 4-28B, unterer Western Blot) nicht aber mit TRPC4. Es zeigte sich, dass die Deletion der fünfzehn Aminosäuren die Bindung von TRPC4 durch Tarbp2 deutlich einschränkt.

4.5 Mögliche Wechselwirkungen von Tarbp2, Dicer und TRPC4

Es ist bekannt, dass die Interaktion von Dicer und Tarbp2 für die Biogenese von microRNS (miRNS) wichtig ist (Chendrimada *et al.* 2005; Gregory *et al.* 2005; Lee and Doudna 2012). Im nächsten Schritt sollte deshalb untersucht werden,

ob die Interaktion von TRPC4 und Tarbp2 einen Einfluss auf die Aktivität von Dicer hat.

Dazu wurden HEK M2R TRPC4 α Zellen mit der cDNS von Tarbp2 und Dicer ko-transfiziert, die cDNS von Tarbp2 war mit der cDNS der Flag-Sequenz fusioniert, die cDNS von Dicer war mit der cDNS für den HA-Tag fusioniert. Auf diese Weise konnten die resultierenden Proteine mit dem anti-Flag oder einem anti-HA Antikörper immunpräzipitiert und im Western Blot detektiert werden. Mit dem Lysat der Zellen wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt (Abbildung 4-29).

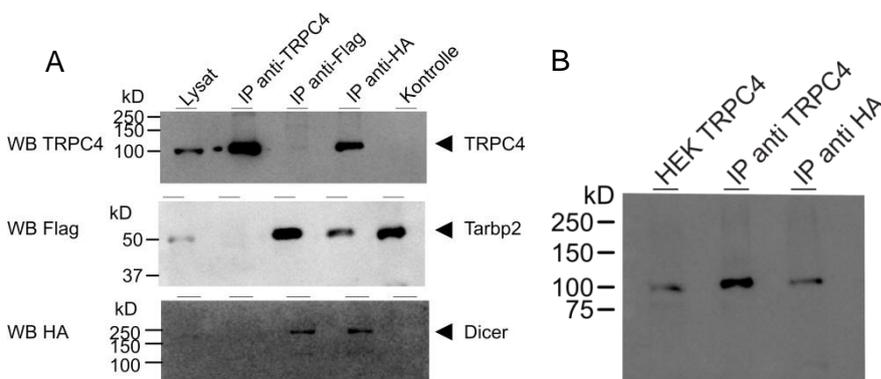


Abbildung 4-29 Koimmunpräzipitation mit TRPC4 α , Tarbp2 und Dicer und Kontrollversuch mit anti-HA Antikörpern

A Auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen Zelllysat (20 μ l), Proteine, die mit Antikörper für TRPC4 präzipitiert wurden, Proteine, die mit Antikörper für Dicer (hier anti-HA) präzipitiert wurden und Proteine, die mit Antikörper für Tarbp2 (hier anti-Flag) präzipitiert wurden. Als Kontrolle wurden die Proteine mit unspezifischen Antikörpern von Maus präzipitiert. Nach dem Transfer der Proteine auf Blotmembran erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper für TRPC4 (oben), Tarbp2 (Mitte) und Dicer (unten). B Kontrollversuch auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen Zelllysat (20 μ l), Proteine, die mit Antikörper für TRPC4 präzipitiert wurden und Proteine, die mit Antikörper anti-HA präzipitiert wurden. Die Blotmembran wurde mit dem Antikörper für TRPC4 inkubiert.

Der Western Blot zeigt (Abbildung 4-29A), dass alle drei Proteine im Lysat zu identifizieren sind und dass in Gegenwart von Dicer TRPC4 und Tarbp2 nicht mehr koimmunpräzipitieren. Dagegen sieht es so aus als würde TRPC4 mit Dicer koimmunpräzipitieren. Ein Kontrollversuch allerdings zeigt, dass bereits der anti-HA Antikörper TRPC4 präzipitierte, obwohl es nicht mit dem HA-Epitop fusioniert ist (Abbildung 4-29B).

Um den HA-Antikörper zu umgehen wurde die Koimmunpräzipitation mit dem anti-Dicer Antikörper durchgeführt. Der Western Blot zeigt, dass alle Protein im

Lysat zu identifizieren sind (Abbildung 4-30). TRPC4 und Tarbp2 lassen sich in der mit anti-Dicer präzipitierten Proteinfraction nachweisen, auch lassen sich die Proteine Dicer und TRPC4 mit Tarbp2 präzipitieren (Abbildung 4-30). Allerdings präzipitiert Tarbp2 nicht mehr mit TRPC4 (Abbildung 4-30, unterer Blot).

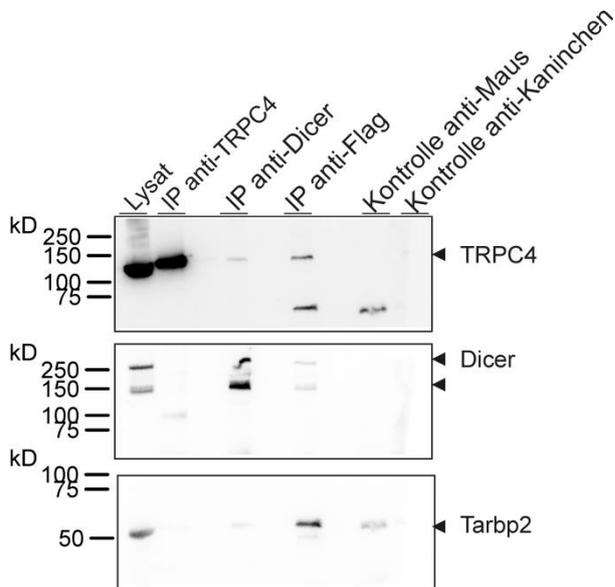


Abbildung 4-30 Western Blot: Koimmunpräzipitation mit TRPC4, Tarbp2 und Dicer

Auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen Zelllysat (20 μ l), Proteine, die mit Antikörper für TRPC4 präzipitiert wurden, Proteine, die mit Antikörper für Dicer präzipitiert wurden und Proteine, die mit Antikörper für Tarbp2 (hier anti-Flag) präzipitiert wurden. Als Kontrolle wurden die Proteine mit unspezifischen Antikörpern aus Maus und Kaninchen präzipitiert. Nach dem Transfer der Proteine auf Blotmembran erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper für TRPC4 (oben), Dicer (Mitte) und Tarbp2 (unten).

Um eine mögliche Wechselwirkung von TRPC4 und Dicer unabhängig von dem HA-Tag zu überprüfen wurde eine Koimmunpräzipitation von TRPC4 einmal mit Dicer, nach Transfektion der Zellen mit der Dicer cDNS, und einmal mit dem endogenen Dicer, der in HEK Zellen vorhanden ist, durchgeführt (Abbildung 4-31).

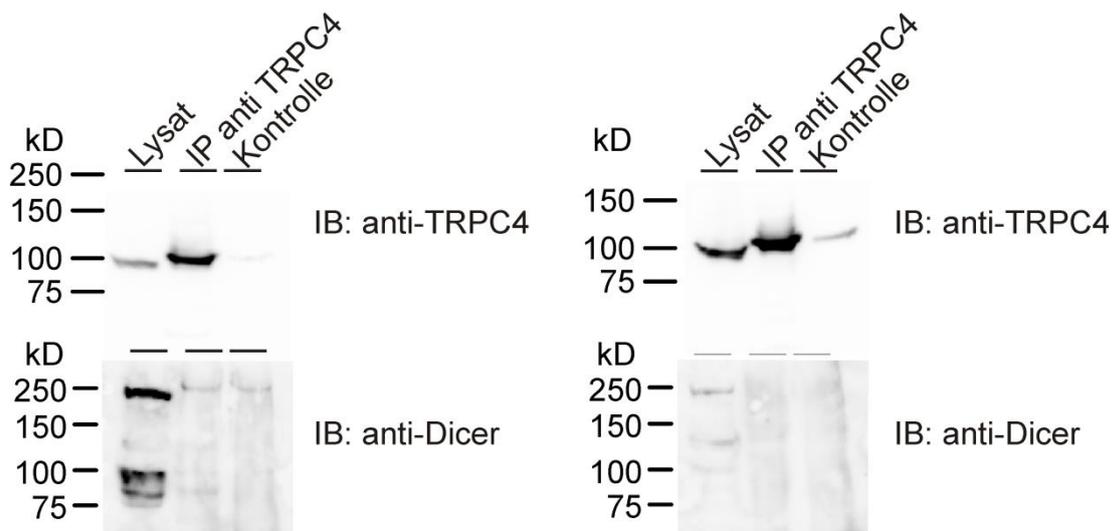


Abbildung 4-31 Koimmunpräzipitation von TRPC4 mit Dicer

Links: Überexprimierter Dicer. Auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen Zelllysat (20 μ l), Proteine, die mit Antikörper für TRPC4 präzipitiert wurden, als Kontrolle wurden die Proteine mit unspezifischen Antikörpern aus Kaninchen präzipitiert. Rechts: Immunpräzipitation mit dem endogenen Dicer. Auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen Zelllysat (20 μ l), Proteine, die mit Antikörper für TRPC4 präzipitiert wurden, als Kontrolle wurden die Proteine mit unspezifischen Antikörpern aus Kaninchen präzipitiert.

TRPC4 ließ sich über Präzipitation mit den anti-TRPC4 Antikörpern anreichern (Abbildung 4-31, jeweils obere Blots). Unter den Proteinen die mit TRPC4 präzipitiert werden ist das überexprimierte Dicer Protein (Abbildung 4-31, unterer Blot links), nicht aber das endogen vorhandene Dicer Protein (Abbildung 4-31, unterer Blot rechts). Allerdings wird das Dicer Protein auch von den nicht-spezifischen Antikörpern präzipitiert (Abbildung 4-31, unterer Blot links, rechte Spur), was gegen eine spezifische TRPC4-Dicer-Interaktion spricht.

Allerdings könnte Dicer über die Bindung an Tarbp2 die Funktion von TRPC4 beeinflussen. Dazu wurde die Funktion der TRPC4_{G503S} Mutante in Anwesenheit von Tarbp2, Tarbp2 plus Dicer oder Dicer im Hinblick auf Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration untersucht (Abbildung 4-32).

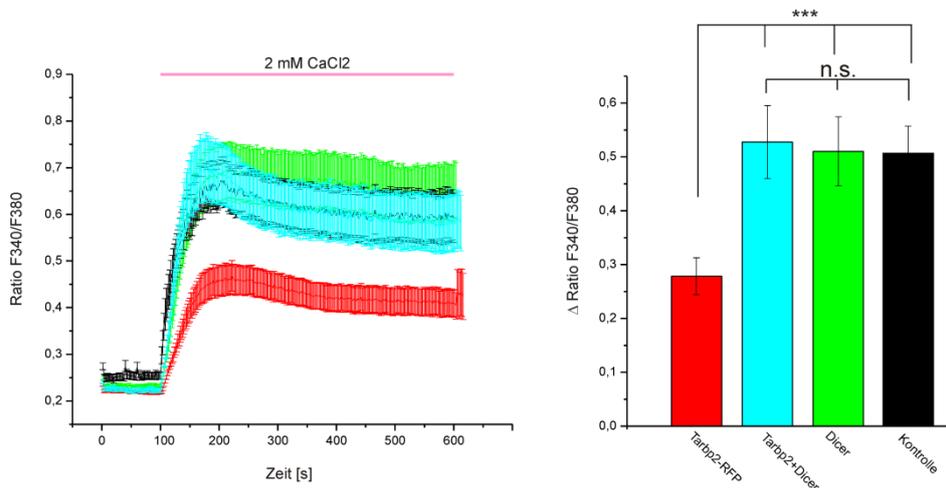


Abbildung 4-32 Veränderung der zytosolische Kalziumkonzentration von TRPC4_{G503S} Zellen mit Tarbp2 und Dicer

Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK TRPC4_{G503S} Zellen mit Tarbp2 n=63 Zellen (rot), HEK TRPC4_{G503S} Zellen mit Dicer n=53 Zellen (grün), HEK TRPC4_{G503S} Zellen mit Dicer und Tarbp2 n= 32 Zellen (türkis) und HEK TRPC4_{G503S} n=56 Zellen (schwarz) nach Zugabe von 2 mM Kalzium, 48 h nach Transfektion und 5 h nach Induktion. B. Auswertung des Kalziumsignals Amplitude von zwei unabhängigen Messungen. Allein die Expression von Tarbp2 reduziert den Kalziumeinstrom durch TRPC4_{G503S} signifikant. Kontrolle HEK TRPC4_{G503S} Zellen die nur die cDNS von GFP und RFP exprimieren.

Wie in Abbildung 4-26 gezeigt führt Tarbp2 zu einer Verminderung des Kalziumeinstroms durch die TRPC4 Mutante. Dagegen hat die Expression der Dicer cDNS keinen Effekt auf den Kalziumeinstrom und ebenso wenig die Ko-Expression der cDNS von Tarbp2 und Dicer. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass Dicer Tarbp2 bindet und Tarbp2 somit nicht mehr zur Wechselwirkung mit TRPC4 zur Verfügung steht.

4.5.1 Dicer Aktivität und Kalzium

Um einen möglichen Zusammenhang von Dicer, Tarbp2 und TRPC4 zu untersuchen, wurden Dicer-Aktivitäts-Experimente durchgeführt. Die Endoribonuklease Dicer spaltet längere dsRNS Stücke in ~22nt lange Fragmente. Als Rate für die Dicer Aktivität wurde der Abbau einer doppelsträngigen RNS verwendet. Dicer wurde ein Substrat angeboten und der Abbau des Substrats unter verschiedenen Bedingungen beobachtet. Als Substrat wurde eine 37 Nukleotide lange doppelsträngige RNS, 37ab, verwendet. Die dsRNS 37ab weist einen Überhang am 3' Ende auf (Abbildung

4-33); dieses Substrat wurde schon für ähnliche Experimente verwendet (MacRae *et al.* 2007; Ma, MacRae *et al.* 2008). Es ist bekannt, dass Dicer und auch Tarbp2 bevorzugt an doppelsträngige RNS mit einem freien 3' Ende binden (Kok *et al.* 2007; Parker *et al.* 2008; Gredell *et al.* 2010). Die dsRNS 37ab sollte von Dicer in ein 22 nt und ein 15 nt langes Fragment gespalten werden. Die Experimente zur Bestimmung der Aktivität von Dicer wurden jeweils mit radioaktivem Substrat in Gegenwart von rekombinatem Dicer beziehungsweise in Gegenwart von Proteinen aus HEK Zelllysaten durchgeführt. Dicer wird in HEK Zellen endogen exprimiert.

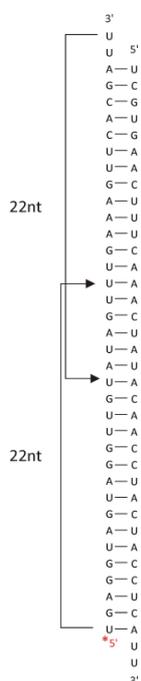


Abbildung 4-33 Doppelsträngige RNS 37ab und die durch die Dicer-Aktivität entstehenden Fragmente

Die doppelsträngige RNS besteht aus den Einzelsträngen a und b. Der Einzelstrang 37a wird am 5' Ende mit ^{32}P (rot *) markiert und mit dem unmarkierten 37b Strang, welcher komplementär ist, hybridisiert. Dicer schneidet 22 nt lange Fragmente von der dsRNS ab. Die Pfeile zeigen die erwartete Länge der Produkte an. Es könne zwei ^{32}P markierte Fragmente von 22 nt und 15 nt entstehen.

Zunächst wurde der rekombinante Dicer mit der radioaktiv markierten dsRNS 37ab inkubiert. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und über ein Harnstoff-PAGE Gel aufgetrennt (Abbildung 4-34).

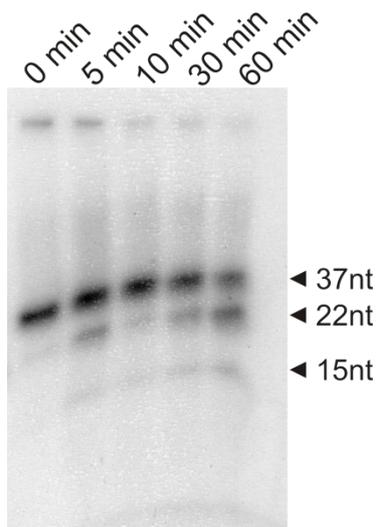


Abbildung 4-34 Zeitabhängigkeit der Spaltung der dsRNS 37ab durch rekombinanten Dicer

Autoradiogramm: Die Proben wurden über ein 15% PAGE 7M Harnstoff Gel aufgetrennt. Die radioaktiv markierte RNS 37ab wurde mit rekombinanten Dicer bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 min, 5 min, 10 min, 30 min und 60 min wurden die Proben entnommen und auf das Gel aufgetragen.

Der rekombinante Dicer spaltet die 37 nt lange dsRNS 37ab zu einem 22 nt langen Fragment und zu einem 15 nt langen Fragment (Abbildung 4-34). Das Substrat 37ab wird von Dicer zeitabhängig gespalten.

Nachdem gezeigt worden war, dass Dicer das Substrat 37ab in die erwarteten Fragmente spaltet, wurde im nächsten Schritt das Dicer Aktivitäts-Experiment in HEK293 Zelllysaten durchgeführt. Für das erste Experiment wurden HEK M2R TRPC4 α Zellen verwendet. Das Zelllysate wurde mit radioaktiv markierter dsRNS 37ab inkubiert und es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen (Abbildung 4-35A).

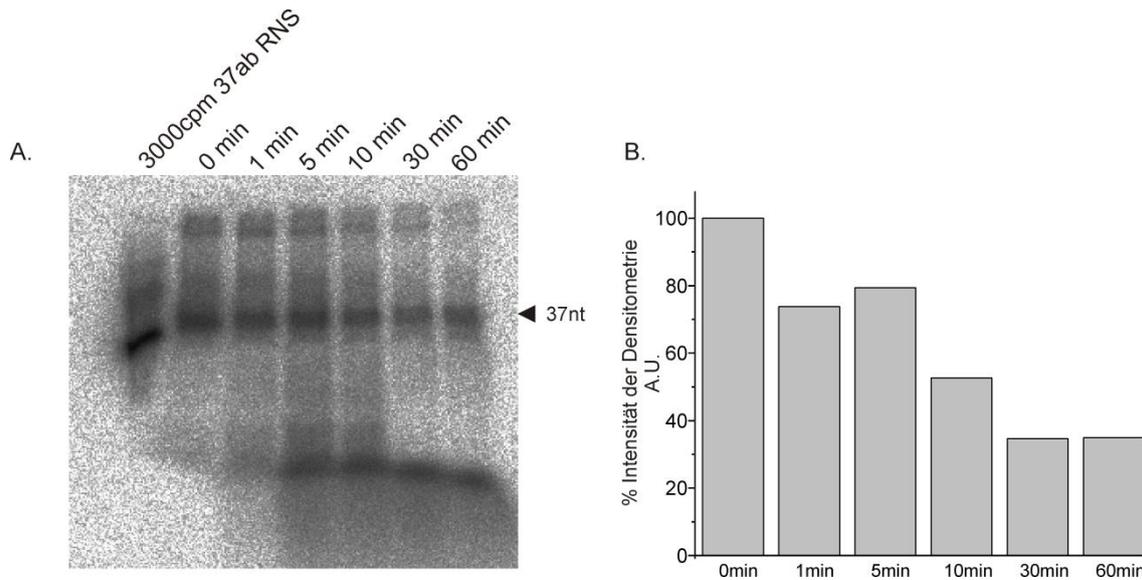


Abbildung 4-35 Zeitabhängigkeit der Spaltung der dsRNS 37ab durch endogenen Dicer

A. Autoradiogramm: Lysat von HEK M2R TRPC4 α wurde mit radioaktiver dsRNS 37ab bei 37°C für 0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min und 60 min inkubiert. Die Proben wurden über ein 15% PAGE 7M Harnstoff Gel aufgetrennt. B. Densitometrische Auswertung der Intensität der 37 nt Bande angegeben in sogenannten Arbitrary Units (A.U.)

Es konnte eine Abnahme der Intensität der 37 nt Bande beobachtet werden (Abbildung 4-35A). Die erwarteten zwei Produkte mit der Größe 22 nt und 15 nt konnten jedoch nicht eindeutig identifiziert werden (Abbildung 4-35A). Es schien, als würden diese Fragmente in dem HEK Zelllysat einem weiteren Abbau unterworfen sein. Die densitometrische Auswertung der oberen 37 nt Bande zeigte eine stetige Abnahme der Intensität über die Zeit, dass bedeutet, dass die 37ab dsRNS gespalten wird (Abbildung 4-35B). Ob es sich dabei um einen Dicer spezifischen Abbau handelt, sollte nun untersucht werden. Hierzu wurden HEK M2R TRPC4 α Zellen mit der cDNS von Dicer und/oder Tarbp2 transfiziert. Die Zelllysate dieser Zellen wurden für das folgende Dicer Aktivitäts-Experiment verwendet. Gleichzeitig wurde das Zelllysat von untransfizierten Zellen in den Versuch eingesetzt. Bei dem Versuch wurde die Reaktion nach 5 Minuten abgestoppt (Abbildung 4-36A).

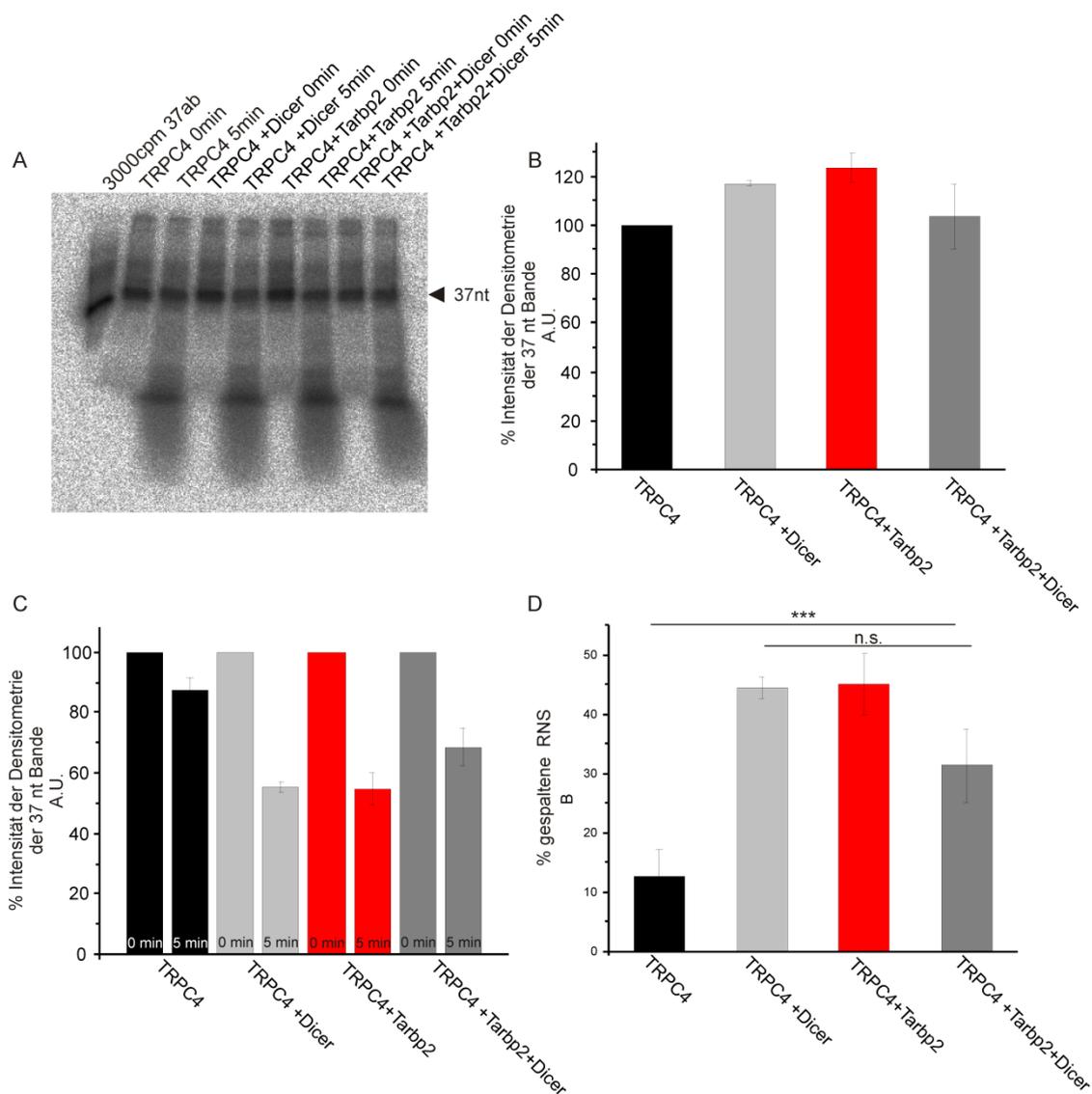


Abbildung 4-36 Vergleich der Aktivität von endogenem Dicer in HEK M2R TRPC4 α Lysat mit Zelllysaten, welche die cDNS von Dicer, Tarbp2 oder von Tarbp2 und Dicer überexprimieren

A Autoradiogramm: Lysate von HEK M2R TRPC4 α und Zellen die mit der cDNS von Dicer, Tarbp2 oder Dicer und Tarbp2 transfiziert worden waren, wurden mit ^{32}P markierter dsRNS 37ab bei 37°C für 5 min, inkubiert. Die Proben wurden über ein 15% PAGE 7M Harnstoff Gel aufgetrennt. B Densitometrische Auswertung der Intensität der 37 nt Bande zum Zeitpunkt 0, normalisiert auf den Wert, der mit endogenem Dicer erhalten wurde (A.U.). C Densitometrische Auswertung der 37 nt Bande nach 5 Minuten; die Werte sind auf den korrespondierenden Wert zum Zeitpunkt 0 normalisiert. D Ausmaß der Abnahme der 37 nt Bande unter den vier Bedingungen. Die Ergebnisse stammen von drei Experimenten.

Die Proben wurden über ein Harnstoff-PAGE Gel aufgetrennt, das Gel getrocknet und ein Röntgenfilm exponiert. Es war zu beobachten, dass auch bei diesem Versuch die 22 nt und 15 nt langen Fragmente nicht eindeutig identifiziert werden konnten (Abbildung 4-36A). Zur Auswertung wurde jeweils die 37 nt Banden zum Zeitpunkt 0 densitometrisch ausgewertet. Die Werte

wurden auf den Wert des endogenen Dicers normalisiert (Abbildung 4-36B). In einem weiteren Auswertungsschritt wurde die 37 nt Bande nach 5 Minuten densitometrisch ausgewertet und auf den korrespondierenden 0 Wert normalisiert (Abbildung 4-36C). Es zeigte sich, dass die Intensitäten der 37nt Banden unterschiedlich stark abnahmen. So verringerte sich die Intensität der 37 nt Bande in dem HEK M2R TRPC4 α Zelllysate in 5 Minuten nur um 15% (Abbildung 4-36C, schwarzer Balken). Das heißt, dass der endogen exprimierte Dicer in dem HEK M2R TRPC4 α Zelllysate nach fünf Minuten ungefähr 15% Prozent der dsRNS abgebaut hatte (Abbildung 4-36D, schwarzer Balken). Dieser Wert ist dem Wert aus dem vorangegangenen Experiment ähnlich (Abbildung 4-35B, 5 min) Es war zu beobachten, dass die Intensität der 37nt Bande in Zelllysaten mit überexprimiertem Dicer in 5 Minuten schneller abnahm als in Zelllysaten mit endogenem Dicer (Abbildung 4-36C, hellgraue Balken). Wurde die Dicer-cDNS in den Zellen überexprimiert, wurde mehr als 40% der dsRNS 37ab gespalten (Abbildung 4-36D, hellgrauer Balken). In Zelllysaten mit überexprimierter Tarbp2-cDNS, nahm die Intensität der 37 nt Bande in fünf Minuten ebenfalls über 40% ab (Abbildung 4-36D, rote Balken). Insgesamt zeigte die Auswertung der Intensität der 37 nt Bande, dass signifikant mehr dsRNS abgebaut wurde wenn die Zellen Dicer-cDNS überexprimierten (Abbildung 4-36D). Das Gleiche war nach Überexpression der Tarbp2-cDNS zu beobachten (Abbildung 4-36D). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Spaltung des 37 nt Fragments durch Dicer geschieht, da die Überexpression der cDNS von Dicer und die der cDNS von Tarbp2, welches die Aktivität von Dicer erhöht, zu einer signifikanten Erhöhung der Spaltung von 37ab führt (Abbildung 4-36D).

Nachdem die Aktivität von Dicer in HEK293 M2R TRPC4 α Zelllysaten nachgewiesen werden konnte, wurde nun untersucht ob ein Zusammenhang zwischen der Dicer Aktivität und der Aktivität von TRPC4 besteht. Es ist bekannt, dass die Aktivität von Dicer Kalzium und Calpain abhängig ist (Lugli *et al.* 2005). Im nächsten Schritt wurde deshalb die Auswirkung von Kalzium auf die Aktivität von Dicer untersucht. Hierzu wurden Zelllysate von HEK293 M2R TRPC4 α Zellen in Gegenwart des Kalziumchelators BAPTA hergestellt. Für die daran anschließenden Experimente wurde ein Reaktionspuffer verwendet, der kein Ca²⁺ enthielt (Abschnitt 3.2.2). Die Lysate wurden in Gegenwart von 2 mM CaCl₂ oder 1 mM BAPTA 30 Minuten präinkubiert; darauffolgend wurde

die Aktivität von Dicer untersucht. Es wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen und über ein Harnstoff-PAGE Gel aufgetrennt (Abbildung 4-37A und B). Unter diesen Bedingungen waren die erwarteten Abbau-Produkte (22 nt und 15 nt RNS Fragmente) zu beobachten (Abbildung 4-37A und B). Für die Auswertung wurde die Intensität aller drei Banden densitometrisch bestimmt. In dem ersten Schritt der Auswertung wurden die Experimente einzeln ausgewertet. Die Ab- oder Zunahme der Intensität der Banden wurden auf die Werte, welche mit dem rekombinanten Dicer erzielt worden sind auf 100%, normalisiert. In Abbildung 4-37C ist die Auswertung exemplarisch für ein Experiment mit 1 mM BAPTA gezeigt, die Intensität der 22 nt Bande (grau) nimmt über die Zeit deutlich zu, während die Intensität der 37 nt Bande (schwarz) und der 15 nt Bande (weiß) abnimmt. Auch unter der Kalzium Bedingung nimmt die Intensität der 22 nt Bande (Abbildung 4-37 D, grau) deutlich zu. Dagegen nimmt die Intensität der 37 nt Bande (Abbildung 4-37 D, schwarz) nur minimal ab.

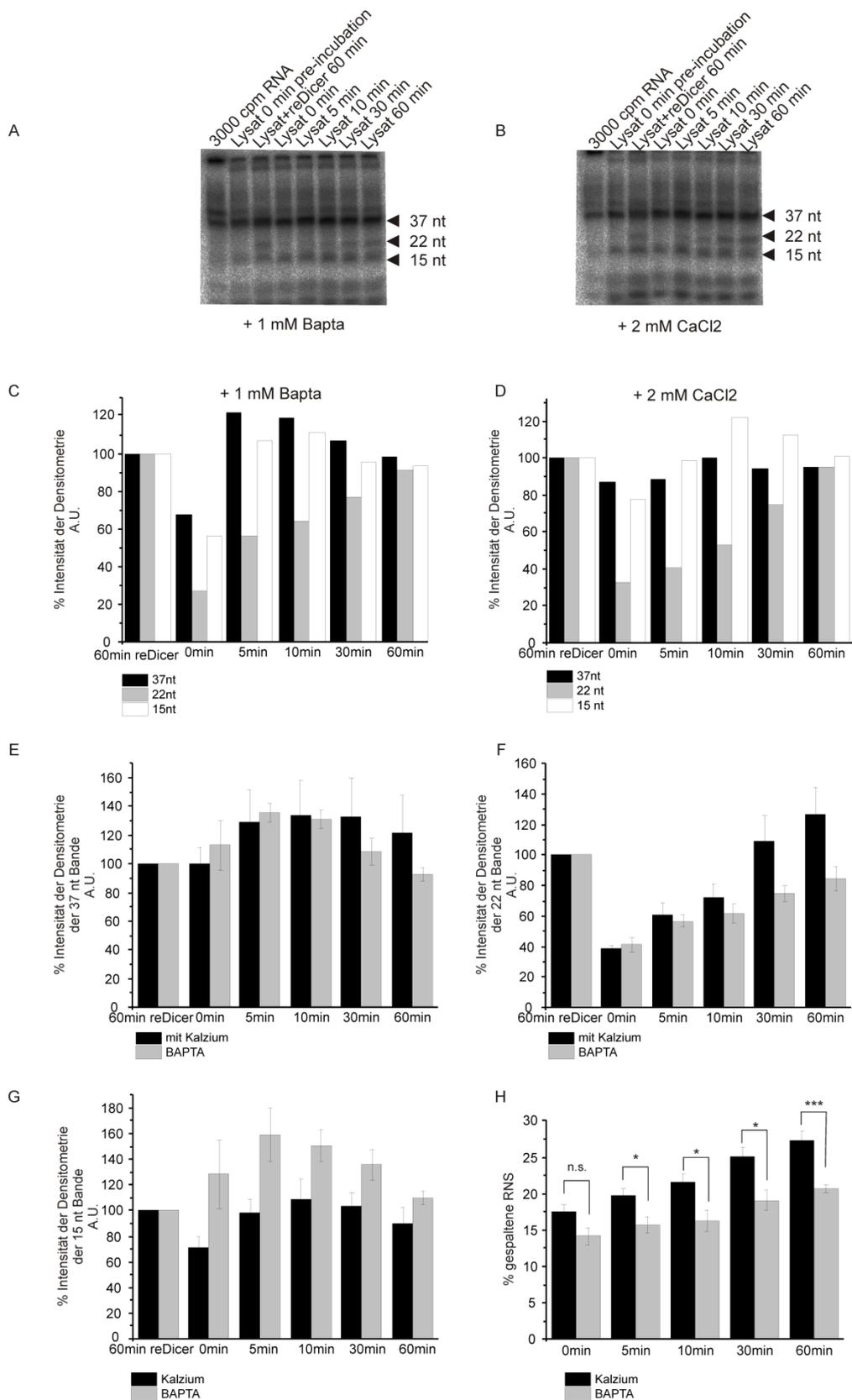


Abbildung 4-37 Kalziumabhängigkeit von Dicer

A Autoradiogramm: Lysate von HEK M2R TRPC4 α Zellen die mit der cDNS von Dicer transfiziert worden waren, wurden mit radioaktiver dsRNS 37ab bei 37°C mit 1 mM BAPTA inkubiert. Proben wurden zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min und 60 min genommen. Als Kontrolle diente Lysat mit rekombinatem Dicer. Die

Proben wurden über ein 15% PAGE 7M Harnstoff Gel aufgetrennt. B Lysate von HEK M2R TRPC4 α Zellen die mit der cDNS von Dicer transfiziert worden waren, wurden mit radioaktiver dsRNS 37ab bei 37°C mit 2 mM Kalzium inkubiert. Proben wurden zu den Zeitpunkten 0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min und 60 min genommen. Als Kontrolle diente Lysat mit rekombinanten Dicer. Die Proben wurden über ein 15% PAGE 7M Harnstoff Gel aufgetrennt. C Densitometrische Auswertung der Intensität der Bande 37 nt (schwarz), 22 nt (grau) und 15 nt (weiß) eines Experiments mit 1 mM BAPTA, normalisiert auf die Werte, welche von dem rekombinanten Dicer erhalten worden sind, (A.U.). D Densitometrische Auswertung der Intensität der Bande 37 nt (schwarz), 22 nt (grau) und 15 nt (weiß) eines Experiments mit 2 mM CaCl₂, normalisiert auf die Werte, welche von dem rekombinanten Dicer erhalten worden sind, (A.U.). E Zusammenfassung der densitometrische Auswertung der Intensität der 37 nt Bande, von vier unabhängigen Versuchen mit 1 mM BAPTA (grau) und mit 2 mM Kalzium (schwarz), normalisiert auf die Werte, welche von dem rekombinanten Dicer erhalten worden sind (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte und die \pm S.E.M. F Zusammenfassung der densitometrische Auswertung der Intensität der 22 nt Bande, von vier unabhängigen Versuchen mit 1 mM BAPTA (grau) und mit 2 mM Kalzium (schwarz), normalisiert auf die Werte, welche von dem rekombinanten Dicer erhalten worden sind (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte und die \pm S.E.M. G Zusammenfassung der densitometrische Auswertung der Intensität der 15 nt Bande, von vier unabhängigen Versuchen mit 1 mM BAPTA (grau) und mit 2 mM Kalzium (schwarz), normalisiert auf die Werte, welche von dem rekombinanten Dicer erhalten worden sind (A.U.). Gezeigt sind die Mittelwerte und die \pm S.E.M. H Berechnung der gespaltenen RNS mit 2 mM Kalzium (schwarz) und mit 1 mM BAPTA (grau). Gezeigt sind die Mittelwerte und \pm S.E.M. aus vier Experimenten. Die Auswertung ergab eine signifikant erhöhte Dicer-Aktivität in Gegenwart von Kalzium.

In dem nächsten Schritt der Auswertung wurden die Werte der Intensität der einzelnen Banden von vier unabhängigen Experimenten zusammengefasst und auf die jeweilige Kontrolle normalisiert (Abbildung 4-37 E-F). Die Intensität der 37 nt Bande nahm über die Zeit nicht sehr viel ab (Abbildung 4-37E). Die Intensität der 22 nt Bande nahm unter beiden Bedingungen zu, es war zu beobachten, dass die Intensität der 22 nt Bande in der Gegenwart von Kalziumchlorid tendenziell stärker zunahm als mit BAPTA (Abbildung 4-37F). Die densitometrische Auswertung der Intensität der 15 nt Bande ist dagegen nicht eindeutig (Abbildung 4-37G). Der Wert für die gespaltenen RNS (Abbildung 4-37H) wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{((\text{Wert } 22 \text{ nt} + \text{Wert } 15 \text{ nt}) * 100)}{(\text{Wert } 37 \text{ nt} + \text{Wert } 22 \text{ nt} + \text{Wert } 15 \text{ nt})} = \text{Anteil der gespaltenen RNS } \%$$

Die Auswertung der vier unabhängigen Experimente ergab, dass die RNS in Zelllysaten mit Kalzium schneller von Dicer gespalten wird als in Zelllysaten ohne Kalzium (Abbildung 4-37H). Das Ergebnis zeigt, dass die Dicer-Aktivität durch Kalzium signifikant erhöht wird.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Dicer-Aktivität auch in unserem Zellsystem kalziumabhängig ist, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob dies durch die Abspaltung der autoinhibitorischen Helikasedomäne durch die kalziumabhängige Protease Calpain verursacht wurde. Hierzu wurden Lysate von HEK293 M2R TRPC4 Zellen mit BAPTA hergestellt. Die Lysate wurden unter denselben Bedingungen hergestellt wie für den Dicer Aktivitäts-Test. Die Lysate wurden mit 2 mM Kalziumchlorid oder 1 mM BAPTA 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden über ein PAGE Gel aufgetrennt, die Proteine wurden auf eine Blotmembran überführt und die Membran wurde mit dem anti-Dicer Antikörper inkubiert. Das Dicer-Protein konnte in allen Lysaten nachgewiesen werden (Abbildung 4-38). Es war zu beobachten, dass in den Lysaten, die mit Kalzium inkubiert worden waren, Dicer gespalten wird (Abbildung 4-38) Es konnte gezeigt werden, dass Dicer *in vitro* in HEK Zelllysaten kalziumabhängig gespalten wird.

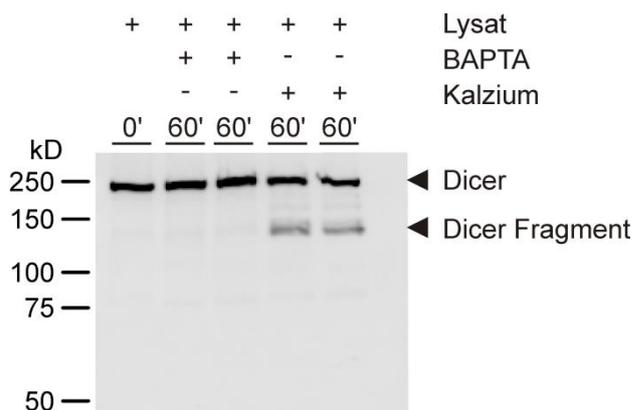


Abbildung 4-38 Western Blot: Kalziumabhängige Spaltung von Dicer

Auf 7% SDS-PAGE wurde aufgetragen 20 µl Zelllysate von HEK M2R TRPC4α Zellen, zweimal Zelllysate das 60 min mit 1 mM BAPTA inkubiert wurde und zweimal Zelllysate das 60 min mit 2 mM Kalzium inkubiert wurde. Die Proteine wurden auf eine Blotmembran transferiert, die Blotmembran wurde danach mit dem Antikörper für Dicer inkubiert.

Die Dicer Aktivität lässt sich durch die Interaktion mit Tarbp2 und durch die Inkubation mit Kalzium steigern. Ob die Steigerung der Dicer Aktivität auch durch die Aktivität von TRPC4 erreicht werden kann, bleibt allerdings offen.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es Proteine zu finden, die mit dem TRPC4-Protein wechselwirken. Die möglichen Interaktionspartner wurden mit dem Hefe-zwei-Hybrid System CytoTrap gesucht. Mit einem Hefe-zwei-Hybrid System wurde bereits ein Interaktionspartner von TRPC4 identifiziert, der IP₃-Rezeptor, allerdings wurde keine Durchmusterung einer cDNS Bibliothek durchgeführt, sondern die cDNS von TRPC4 und dem IP₃-Rezeptors gezielt in die Hefen eingebracht (Mery, Magnino et al. 2001). Mit der Durchmusterung einer ganzen cDNS Bibliothek konnten in dieser Arbeit mehrere Interaktionspartner von TRPC4 identifiziert werden. Im Folgenden wurde dann der Effekt der Wechselwirkung der Proteine auf die Funktion von TRPC4 untersucht.

5.1 Screening und Interaktion

Für das Screening nach Interaktionspartnern von TRPC4 wurde das Hefe-zwei-Hybrid System CytoTrap verwendet, da bei diesem System die Interaktion der Köder- und Beute-Proteine im Zytosol stattfindet. Anstatt der Expression eines Reportergens dient bei diesem System die Aufhebung eines temperatursensitiven Phänotyps als Zeichen einer Wechselwirkung zwischen dem Köder- und Beute-Protein. Das CytoTrap System schien deshalb für die Suche nach neuen Interaktionspartnern eines Membranproteins geeignet. Vor den Screening-Experimenten wurden Kontrollversuche durchgeführt. Die Überprüfung der cDNS Bibliothek von Hirn von Maus ergab eine durchschnittliche Insertgröße von 1,8 kb (Abbildung 4-1), was einem Proteinfragment von ungefähr 60 kD entspricht. Im nächsten Schritt wurde die Expression des Fusionsproteins hSos-TRPC4-C-Terminus in Hefezellen untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass das Fusionsprotein gebildet wurde (Abbildung 4-2). Ein weiteres Kontrollexperiment ergab, dass das Fusionsprotein hSos-TRPC4-C-Terminus für die Durchmusterungsexperimente geeignet war, da es alleine nicht in der Lage war den temperatursensitiven Phänotyp des *cdc25H* Stammes zu kompensieren. Das bedeutet, dass der zytosolische Terminus von TRPC4 in dem System nicht von alleine an die Membran der Hefezellen assoziierte. Somit konnten die Durchmusterungs-

Experimente durchgeführt werden. Damit ein Klon als putativer Interaktionspartner von TRPC4 angesehen werden konnte musste er drei Kriterien erfüllen: Erstens musste der Klon Wachstum auf Galaktose bei 37°C zeigen auch bei dem zweiten Ausplattieren; zweitens musste die Sequenzierung des Klons ergeben, dass die Sequenz des Myristylierungssignals und die Sequenz des Klons im gleichen Leseraster sind (Abbildung 4-3); drittens muss der Klon nach Retransformation, in den *cdc25H* Stamm, Wachstum bei der restriktiven Temperatur (37°C) auf Galaktose zeigen (Abbildung 4-4). Auf den Retransformationsplatten zeigten sich bei 37°C auch auf Glukose Wachstum von Klonen (Abbildung 4-4 und Abbildung 4-5). Das Wachstum auf Glukose kann auf eine leichte Hintergrund-Aktivität des nicht-induzierten Gal1 Promoters zurückzuführen sein; diese „undichte“ Expression wurde schon von anderen Gruppen beobachtet (Kristoffersen *et al.* 2000; Camblong *et al.* 2009). Wichtig war jedoch, dass die Klone alleine nicht auf Glukose bei 37°C wuchsen (Abbildung 4-4). Die Klone, die diese Kriterien erfüllten, wurden weiter untersucht.

Das Screening mit dem Hefe-zwei-Hybrid System CytoTrap ergab fünfzehn putative Interaktionspartner von TRPC4. Die meisten der gefunden Proteine waren zytosolische Proteine; es konnten jedoch auch Membranproteine identifiziert werden. Im Folgenden wurden die gefundenen Proteine (Tabelle 4-1) grob charakterisiert und ihre mögliche Verbindung zu TRPC4 diskutiert.

Bei dem Screening wurde das Hspa8-Protein (Heat shock protein 8) am häufigsten gefundenen, es wird auch Hsc70 genannt. Es ist ein ubiquitär exprimiertes Chaperon, das zu der Familie der Hitzeschock Proteine 70 gehört. Hspa8 kommt unter anderem im Gehirn vor und konnte dort in den Synapsen nachgewiesen werden (Bechtold *et al.* 2000). Hspa8 scheint eine wichtige Funktion in dem Schutz vor Parkinson zu haben, in dem es die Aggregation von alpha-Synuclein verhindert (Pemberton *et al.* 2011). Es ist bereits bekannt, dass Hspa8 mit einem Natriumkanal interagiert und bei dessen Transport vom Endoplasmatischen Retikulum in die Zellmembran eine wichtige Rolle spielt (Vila-Carriles *et al.* 2007; Grifoni *et al.* 2008). Eine ähnliche Funktion der Interaktion könnte man sich für Hspa8 und TRPC4 vorstellen.

Das Tarbp2-Protein wurde mit zwei unabhängigen Klonen in dem Screening gefunden (Abbildung 4-6). Das humane Tarbp2 Protein wurde in Zusammenhang mit dem Hi-Virus entdeckt; es wurde als Protein charakterisiert, das an die Trans- activation responsive RNS des HIV-1 bindet (Gatignol et al. 1991). Das Tarbp2 Protein ist ein RNS bindendes Protein, das ausschließlich doppelsträngige RNS bindet. Für die Bindung von dsRNS besitzt das Tarbp2-Protein zwei Bindestellen, eine dritte Bindestelle hat jedoch keine dsRNS bindende Funktion (Yamashita et al. 2011). Frühere Untersuchungen zeigten, dass die zweite Bindestelle dsRNS mit höher Affinität binden kann als die erste dsRNS-Bindedomäne, beide Bindestellen zusammen haben die höchste Affinität für dsRNS (Gatignol et al. 1993). In Abbildung 5-1 sind die bekannten Bindedomänen von Tarbp2 eingezeichnet, es ist zu erkennen, dass der Carboxy-Terminus für die Interaktion mit verschiedenen Proteinen wichtig ist. Als Medipal Domäne wird der Bereich von Tarbp2 bezeichnet, an den die Proteine Merlin, Dicer und PACT binden (Lee et al. 2004; Haase et al. 2005; Laraki et al. 2008)

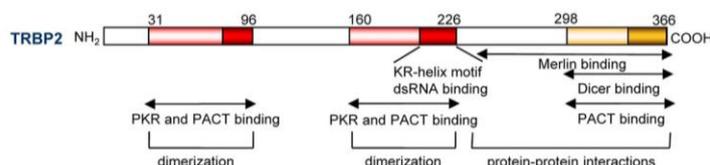


Abbildung 5-1 Humanes Tarbp2

Humanes Tarbp2 eingezeichnet sind die dsRNS Bindestellen (rot) und die Domänen, welche für die Interaktion mit anderen Proteinen wie PACT, Dicer und PKR bekannt sind (Daniels and Gatignol 2012).

Das murine Tarbp2 wurde zuerst in Spermatozoen identifiziert und Prbp (Protamine RNA binding protein) genannt (Zhong et al. 1998). Die Deletion des murine Tarbp2 hat einen starken Phänotyp. So sterben fast alle $\text{tarbp2}^{-/-}$ Tiere kurz nach der Entwöhnung. Die überlebenden Tarbp2-defizienten Tiere sind kleiner als ihre Wildtyp-Geschwister und die Männchen haben einen Defekt in der Spermatogenese (Zhong et al. 1999).

Ein bekannter Interaktionspartner des humanen Tarbp2 ist die RNS abhängige Proteinkinase R (PKR); die beiden Proteine interagieren jedoch RNS unabhängig. Durch die Interaktion mit Tarbp2 wird die Aktivität der PKR inhibiert

und die Inhibierung von der PKR führt dazu, dass Tarbp2 ein gewisses onkogenes Potential besitzt (Benkirane et al. 1997). Ein weiterer Interaktionspartner von Tarbp2 ist das Protein PACT; es handelt sich um ein dsRNS bindendes Protein welches Tarbp2 sehr ähnlich ist. PACT interagiert auch mit der PKR, jedoch wird die PKR durch diese Interaktion aktiviert (Gupta et al. 2003). Der Tumorsuppressor Merlin bindet an Tarbp2 und sorgt für die Ubiquitinierung und Degradation von Tarbp2 (Lee et al. 2006). Tarbp2 scheint verschiedene Funktionen in der Zelle zu besitzen; so spielt es eine Rolle bei Virusinfektionen, dem Zellwachstum und es hat onkogene Eigenschaften. Eine weitere wichtige Funktion von Tarbp2 ist die mikroRNS Biogenese. Seit 2005 ist bekannt, dass Tarbp2 mit dem Protein Dicer interagiert und für die mikroRNS Biogenese entscheidend ist (Chendrimada et al. 2005; Gregory et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass Tarbp2 zusammen mit Dicer, der miRNS und Ago2 den RISC loading complex (RLC) bildet. Dieser Komplex ist der Vorgänger des RNA induced silencing complex (RISC). Die möglichen funktionellen Konsequenzen der Interaktion von Tarbp2 mit TRPC4 wurden in der vorgelegten Arbeit untersucht.

Ein weiterer putativer Interaktionspartner von TRPC4 ist das Adip-Protein (Afadin dilute domain-interacting protein), welches auch unter dem Namen Ssx2ip synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein bekannt ist. Adip ist als Afadin bindendes Protein beschrieben worden, welches an den Zell-Zell Adhäsions-Verbindungen lokalisiert ist; es wird über eine mögliche Rolle des Proteins als Verbindung zwischen dem Nectin-Afadin und dem Cadherin-Catenin-Systems spekuliert, und dass Adip auch für die Organisation des Aktinzytoskelets wichtig ist (Asada et al. 2003). Des Weiteren scheint Adip eine wichtige Funktion in der Zellbewegung zu haben (Fukumoto et al. 2011). Die Lokalisation von TRPC4 an Zell-Zell Kontakten und der Interaktion mit β -Catenin ist bekannt (Graziani et al. 2010). Eine Interaktion von Adip und TRPC4 an Zell- Zell Adhäsions-Verbindungen wäre demnach vorstellbar.

Es konnten zwei Kinasen als Interaktionspartner von TRPC4 identifiziert werden. Eine davon ist die Creatine Kinase b, ein Gehirn spezifisches zytosolisches Enzym, das für die Energieversorgung im Gehirn von Bedeutung ist (Wallimann et al. 1992). Es ist bekannt dass die Creatine Kinase b mit den

Kalium-Chlorid Ko-Transportern KCC2 und KCC3 interagiert (Inoue *et al.* 2004; Salin-Cantegrel *et al.* 2008). Vielleicht könnte die Kinase auch mit Kationenkanälen wie TRPC4 interagieren.

Als weiteren Interaktionspartner von TRPC4 wurde das Ataxin10-Protein gefunden. Über die Funktion des Proteins ist jedoch noch wenig bekannt. Es konnte im Gehirn von Ratte, Maus und Mensch nachgewiesen werden und scheint dort in den Zellen im Zytoplasma lokalisiert zu sein (Marz *et al.* 2004; Waragai *et al.* 2006). Eine Mutation des Proteins wird mit der Krankheit Spinozerebellärer Ataxie Typ 10 (SCA10) in Verbindung gebracht (Matsuura *et al.* 2000; Wakamiya *et al.* 2006). Ataxin10 hat mehrere bekannte Interaktionspartner dazu gehören die Proteine Polo-like Kinase 1 (Li *et al.* 2011), die G- Protein $\beta 2$ Untereinheit 11; diese Interaktion wurde über ein Hefe-zwei-Hybrid System gefunden (Waragai, Nagamitsu *et al.* 2006) und das Protein O-GlcNAc Transferase in pankreatischen β Zellen; diese Interaktion wurde mit dem CytoTrap System gefunden (Andrali *et al.* 2005).

Das Protein Stard3-nl wird auch MENTHO, MLN64 N-terminal homologue, genannt. Bei dem Protein handelt es sich um ein Membranprotein, welches in der Membran von späten Endosomen vorkommt, und in dem Zusammenhang mit dem Transport von Cholesterin gefunden wurde. MENTHO ist ein Phosphoprotein. Untersuchungen haben ergeben, dass der Amino- und der Carboxy-Terminus in das Zytoplasma ragen (Alpy *et al.* 2002). Ob und wie eine mögliche Interaktion von Stard3-nl und TRPC4 aussehen könnte und welche Funktion diese haben könnte ist offen.

Das Screening nach Interaktionspartnern von TRPC4 ergab ein weiteres endosomales Protein, Vps24, auch Chmp3 (Charged multivesicular body protein) genannt. Das Protein Vps24 ist über basische Aminosäurereste an die Plasmamembran assoziiert. Das Protein hat eine Funktion bei der Abspaltung von Endosomen (Muziol *et al.* 2006). Ob die Interaktion von Vps24 mit TRPC4 eine Rolle für den Transport von TRPC4 aus der Zellmembran hat, muss untersucht werden.

Von der Familie der 14-3-3 Proteine wurden zwei Isoformen in dem Screening gefunden. Die Proteine 14-3-3 beta und 14-3-3 eta konnten als mögliche

Interaktionspartner von TRPC4 identifiziert werden. Die 14-3-3 Proteinen kommen in allen Zellen und Geweben von Eukaryoten vor (van Heusden 2005) und bilden dort Homo- oder Heterodimere aus (Jones *et al.* 1995). Die Interaktion von 14-3-3 Proteinen mit den Kaliumkanälen, TASK-1, TASK-3 und TASK-5 ist wichtig für deren zelluläre Lokalisation und Funktion (Rajan *et al.* 2002). Eine ähnliche Funktion der Interaktion von den 14-3-3 Proteinen für TRPC4 wäre denkbar.

Das Protein Cab39 (Calcium binding protein 39) ist auch unter dem Namen MO25 bekannt, da es 1993 aus Maus Morula kloniert wurde. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu kalziumbindenden Proteinen wurde angenommen, dass es sich um ein kalziumbindendes Protein handelt (Miyamoto *et al.* 1993). Über die Funktion des Proteins war aber lange nichts bekannt. In neuerer Zeit ist ein wenig mehr über die Funktion des Cab39 Proteins bekannt geworden. So konnte gezeigt werden, dass Cab39 mit einer Pseudokinase STRAD α/β interagiert und zusammen mit der Kinase LKB1 einen Komplex bildet. Die Interaktion mit Cab39 erhöht die Aktivität der Kinase LKB1 (Boudeau *et al.* 2003). Des Weiteren scheint Cab39 die Aktivität anderer Kinasen zu regulieren, dazu gehören die Proteinkinasen SPAK/OSR1 und MST3/ MST4/ YSK1. SPAK/OSR1 sind für die Regulation der Ionen Homöostase und den Blutdruck verantwortlich und MST3/ MST4/ YSK1 spielen eine Rolle bei der Entwicklung und Morphogenese. Die Interaktion mit Cab39 hat die Kinaseaktivität von SPAK/OSR1 stark erhöht (Filippi *et al.* 2011). Es ist denkbar, dass eine Interaktion von Cab39 mit TRPC4 eine Phosphorylierung von TRPC4 zur Folge haben könnte.

In dem Screening wurde eine weitere Kinase gefunden, die Casein Kinase gamma. Die Casein Kinasen sind eine Familie von Serin/ Threonin Kinasen, die verschiedene regulatorische Funktionen erfüllen. Wichtig sind die Casein Kinasen zum Beispiel für den circadianen Rhythmus, Membrantransport oder das Zytoskelett (Cheong and Virshup 2011). Die Casein Kinase Gamma ist in der Familie der Casien Kinasen einzigartig, da sie über einen palmitoylierten Carboxy-Terminus verfügt über den sie in der Plasmamembran verankert ist, sie verbindet die Aktivierung des Wnt Rezeptors mit dem zytoplasmatischen Signalweg (Davidson *et al.* 2005). Die Membranlokalisierung der Casein Kinase

1 gamma macht sie zu einem interessanten putativen Interaktionspartner von TRPC4.

Das Screening Verfahren war demnach erfolgreich. Es wurden 15 putative Interaktionspartner von TRPC4 gefunden. Keines der gefundenen Proteine war bis dahin als Interaktionspartner von TRPC4 oder andern TRPC Kanälen bekannt gewesen. Einige der Proteine sind jedoch mit anderen Ionenkanälen oder der Plasmamembran assoziiert. Das CytoTrap System erwies sich als geeignet für das Auffinden neuer Interaktionspartner von TRPC4. Auffällig war jedoch die hohe Quote an falsch-positiven Ergebnissen, diese waren auf die Rückmutation des *cdc25* Gens zurückzuführen. Die Hitzesensitivität des *cdc25H* Stammes ist allein von einer Punktmutation in dem *cdc25* Gen abhängig. Durch die langen Inkubationszeiten kommt es zu Revertanten. Die Möglichkeit der Rückmutation wurde vom Hersteller erwähnt. Durch die Retransformation konnten die falsch-positiven Klone einfach erkannt und aussortiert werden (Abbildung 4-5). Die Ergebnisse des Screenings waren ein erster Hinweis auf eine mögliche Interaktion der gefundenen Proteine mit TRPC4; in den folgenden Versuchen wurde versucht, diese Interaktion unabhängig zu bestätigen und einen möglichen Effekt auf die TRPC4-Aktivität zu identifizieren.

5.2 Bestätigung der Wechselwirkung der Proteine mit TRPC4

Die in dem Hefe-zwei-Hybrid Systems identifizierten Interaktionspartner von TRPC4 sollten unabhängig auf ihre Interaktion mit TRPC4 untersucht werden. Um die Interaktion der Proteine mit TRPC4 zu verifizieren wurden Koimmunpräzitationen durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Vollängen cDNS der Protein aus cDNS von Hirn von Maus amplifiziert, oder käuflich erworben und in den p3xFlag Vektor kloniert. Die cDNS wurden mit dem 3xFlag Epitop als Fusionsproteine exprimiert. In der Arbeitsgruppe ist ein guter Antikörper für TRPC4 und auch ein guter Antikörper gegen das Flag Epitop vorhanden. Die cDNS der Proteine wurden in der menschlichen Zelllinie HEK293 exprimiert. TRPC4 ist ein Membranprotein; um für eine Koimmunpräzitation zugänglich zu sein, muss es mit einer Detergenz aus der Membran gelöst werden. Die Wahl der Detergenz ist dabei entscheidend. Für

die Koimmunpräzipitationen wurden in dieser Arbeit das ionische Detergenz SDS und das nicht-ionische Detergenz DDM verwendet. Es konnte beobachtet werden, dass das Ergebnis der Koimmunpräzipitation abhängig von der verwendeten Detergenz war; so konnte eine Wechselwirkung zwischen Ataxin10 und TRPC4 nur in Gegenwart von SDS nachgewiesen werden nicht aber in Gegenwart von DDM (Abbildung 4-7A und B). Alle anderen Koimmunpräzipitationen ergaben mit SDS und DDM das gleiche Ergebnis. Von den fünfzehn Interaktionspartnern, aus dem Hefe-zwei-Hybrid, präzipitierten acht Proteine mit TRPC4; darunter waren die Proteine Ataxin10, 14-3-3 β , Cab39, Hspa8, Adip, Vps24, Tarbp2 und Casein Kinase b (Tabelle 4-2).

Wie an dem Beispiel von Ataxin10 und TRPC4 gezeigt, kann das Ergebnis einer Koimmunpräzipitation von der Verwendung von Detergenzien abhängig sein. In dieser Arbeit wurden nur die Proteine weiter auf ihren Effekt auf TRPC4 getestet, die in der Koimmunpräzipitation positiv waren. Die positive Koimmunpräzipitation zusammen mit dem vorangegangenen positiven Ergebnis in dem Hefe-zwei-Hybrid System wurden als Beweis für eine Interaktion der Proteine mit TRPC4 angesehen.

5.3 Effekt der Interaktionen auf die TRPC4 Aktivität

Nachdem die Interaktion der Proteine durch die positiven Koimmunpräzipitationen verifiziert worden war; sollte nun der Effekt der Interaktion auf den durch TRPC4 vermittelten Kalziumeinstrom untersucht werden. Hierzu wurde die Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK Zellen gemessen. Im ersten Schritt wurden HEK M2R TRPC4 Zellen untersucht, die in kalziumhaltiger Badlösung gehalten und dann mit Carbachol stimuliert wurden. Carbachol ist ein Agonist der muskarinergen Rezeptoren; nach Bindung von Carbachol an einen muskarinergen Rezeptoren werden die jeweiligen G-Proteine aktiviert und dissoziieren. Die G-Proteine vom G_{q/11} Typ aktivieren wiederum die Phospholipase C welche PIP₂ zu DAG und IP₃ hydrolysiert. IP₃ interagiert mit dem IP₃Rezeptor; dies führt zur Kalziumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum und einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die Entleerung des Endoplasmatischen Retikulums führt zu einer Aktivierung von

speicheraktivierten Kalziumkanälen, z.B. von Orai-Kanälen. Carbachol aktiviert in den HEK M2R Zellen allerdings gleichzeitig G-Proteine vom $G_{\alpha i/o}$ -Typ und die $G_{\alpha i}$ - oder der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des trimären G-Proteins aktivieren direkt oder indirekt TRPC4 (Jeon, Lee et al. 2008; Jeon, Hong et al. 2012); die gleichzeitige Aktivierung von $G_{\alpha q}$ führt zur Verminderung von PIP_2 und gleichzeitig zum Anstieg von DAG und IP_3 , was wiederum zur Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern führt. Wie in der Einleitung ausgeführt ist die Verminderung der PIP_2 -Konzentration und eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration – neben der $G_{\alpha i/o}$ -Aktivierung – notwendig um den TRPC4-Kanal zu öffnen.

Die zunächst durchgeführte Stimulation mit Carbachol bewirkt also eine Kalziumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum und gleichzeitig einen Kalziumeinstrom über Orai-Kanäle aus dem extrazellulären Raum. Zuerst wurde das Protokoll an HEK Zellen getestet, die die cDNS des muskarinergen Rezeptors Typ 2 stabil exprimieren und Zellen die zusätzlich die cDNS von TRPC4 exprimieren. Das Ergebniss des Versuchs zeigte, dass in beiden Zelltypen ein Kalziumeinstrom nach Stimulation mit Carbachol erfolgte (Abbildung 4-11). Die Zellen ohne TRPC4 zeigten eine Änderung der Kalziumkonzentration; dies ist auf die beschriebenen Vorgänge, Kalziumausstrom aus dem Endoplasmatischen Retikulum und Kalziumeinstrom aus dem extrazellulären Raum, zurückzuführen. Der beobachtete Kalziumeinstrom war jedoch wesentlich geringer, als der in Zellen die die cDNS von TRPC4 exprimierten. Die HEK M2R TRPC4 Zellen zeigten im Vergleich zu HEK M2R Zellen eine größere Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration, die Amplitude des Kalziumeinstroms war höher. Auf die Erhöhung der Kalziumkonzentration durch Ausstrom aus dem Endoplasmatischen Retikulum und Kalziumeinstrom aus dem extrazellulären Raum durch Orai-Kanäle, kam noch der Kalziumeinstrom aus dem extrazellulären Raum durch TRPC4.

Der Vergleich der Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration, hervorgerufen durch Carbachol Stimulation, von Zellen, die die cDNS von TRPC4 und Zellen, die die cDNS von TRPC4 und einem Interaktionspartner exprimieren, sollte Aufschluss über einen Effekt der Proteine auf die Funktion

von TRPC4 geben. In den ersten Versuchen wurden HEK M2R TRPC4 β Zellen mit Zellen verglichen, die zusätzlich die cDNS eines Interaktionspartners exprimierten. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied der Änderung des zytosolischen Kalziums (Abbildung 4-12). Der Effekt, den ein Kandidaten-Protein auf TRPC4 haben könnte, war vielleicht zu gering um ihn unter diesen Bedingungen zu sehen. Die Potenzierung oder die Inhibierung der TRPC4-Aktivität müssten schon sehr ausgeprägt sein, um sie unter diesen Bedingungen zu sehen. Dies war aber nicht der Fall, und es konnte bei keinem der Kandidaten-Proteine ein Effekt auf die TRPC4-Aktivität nachgewiesen werden.

Um die Aktivität von TRPC4 von anderen Kalziumkanälen in den Zellen zu isolieren, wurde ein zweites Messprotokoll verwendet (Abschnitt 3.12.1 und 4.3). In diesem Protokoll wurden die Kalziumströme differenziell aktiviert. Zuerst wurde in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium die Ca-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums mit Thapsigargin inhibiert; dies führt zu einer passiven Entleerung der Kalziumspeicher des Endoplasmatischen Retikulums. Dann wurde der Speicher-aktivierte Kalziumstrom durch die Zugabe von extrazellulärem Kalzium ermöglicht; dieser Kalziumstrom wird über die Zeit durch Kalzium inhibiert. Erst dann wurde TRPC4 durch Carbachol stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration nach Carbachol Stimulation um einen TRPC4 vermittelten Kalziumstrom handelt, da die Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration nur in HEK Zellen, die TRPC4 exprimierten, zu beobachten war (Abbildung 4-13). Um die Messung auszuwerten, wurden die Amplitude und die Fläche unter der Kurve des Carbachol induzierten Kalziumstroms berechnet. Der Vergleich der Amplitude und der Fläche unter der Kurve zeigten, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollzellen und Zellen, die zusätzlich ein Interaktionspartner von TRPC4 besaßen, gab (Abbildung 4-14A-D). So hatte die Koexpression der Interaktionspartner Vps24, 14-3-3 β und Cab39 mit TRPC4 keinen messbaren Effekt auf die Funktion von TRPC4 α oder TRPC4 β . Der Kalziumstrom durch TRPC4 war nicht signifikant verändert unabhängig davon, ob die cDNS des interagierenden Proteins koexprimiert war.

5.4 Tarbp2 und seine Interaktion mit TRPC4

Das Tarbp2-Protein wurde in dieser Arbeit als Interaktionspartner von TRPC4 identifiziert, der einen Einfluss auf die TRPC4-Funktion hat. Beide TRPC4 Varianten, TRPC4 α und TRPC4 β binden Tarbp2 (Abbildung 4-8 und Abbildung 4-10). Der Effekt, den Tarbp2 auf die Aktivität von TRPC4 haben könnte, wurde nun untersucht. Die Messung der Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration, mit dem ersten Protokoll ergab keinen signifikanten Effekt von Tarbp2 auf die Funktion von TRPC4 (Abbildung 4-12D). Dagegen zeigten die Messungen mit dem zweiten Protokoll, dass Tarbp2 einen signifikanten Effekt auf den Kalziumeinstrom durch TRPC4 β nach Stimulation der Zellen mit Carbachol hatte (Abbildung 4-15A). Der Vergleich der Amplitude und der Fläche unter der Kurve zeigte eine signifikante Steigerung bei Koexpression von TRPC4 β und Tarbp2 (Abbildung 4-15B). Auch die Messung mit Zellen, die die TRPC4 α cDNS exprimierten zeigte eine signifikante Steigerung des Kalziumeinstroms nach Carbachol Stimulation nach Koexpression der cDNS von Tarbp2 (Abbildung 4-16A). Die Koexpression von Tarbp2 und TRPC4 α oder β führte zu einer 30%igen Erhöhung des Kalziumeinstroms nach Carbachol Stimulation. Um auszuschließen, dass Tarbp2 selbst eine Pore oder einen Kationenkanal bildet, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Tarbp2 wurde in HEK M2R Zellen exprimiert und die Messung wurde mit dem zweiten Protokoll durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Zellen die Tarbp2-cDNS exprimierten, sich genauso verhielten wie die Kontrollzellen, die nur GFP exprimierten, beide reagierten nicht auf die Carbachol Stimulation (Abbildung 4-17). Tarbp2 alleine war demnach nicht in der Lage einen kalziumpermeablen Kanal oder eine Pore zu formen, durch die Kalzium in die Zelle gelangen konnte. Die Erhöhung des Kalziumeinstroms durch TRPC4 in Gegenwart von Tarbp2 war also auf Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen.

Es konnte gezeigt werden, dass Tarbp2 nicht nur mit dem TRPC4-Protein wechselwirkt sondern auch einen Einfluss auf die Funktion des TRPC4-Kanals hat. Um die Interaktion von Tarbp2 und TRPC4 näher zu untersuchen wurde die Bindedomäne von Tarbp2 im C-Terminus von TRPC4 genauer charakterisiert. Hierzu wurde ein Pull-down Experiment benutzt. Es wurden GST-Fusionsproteine von dem TRPC4 Carboxy-Terminus hergestellt und mit

diesen Fusionproteinen wurde Tarbp2 gebunden. Die Ergebnisse des Experiments zeigen, dass zwei Abschnitte in der TRPC4 Sequenz, aa 625-697 und aa 786-847, Tarbp2 binden (Abbildung 4-20). Die erste Bindestelle für Tarbp2 im TRPC4 C-Terminus ist eine hochkonservierte Region, die in allen TRPCs vorkommt (Abbildung 4-22). Die höchste Sequenzidentität zu der gefundenen Bindestelle in TRPC4 unter den TRPC Proteinen weist TRPC5 auf. Daraufhin wurde getestet, ob Tarbp2 auch mit TRPC5 interagiert. Es zeigte sich, dass TRPC5 Tarbp2 bindet (Abbildung 4-23). Die zweite Bindestelle ist nur in TRPC4 α vorhanden; sie liegt genau in der Region, in der sich TRPC4 α von TRPC4 β unterscheidet (Abbildung 4-21). Diese Domäne ist als *in vitro* Bindestelle von Calmodulin bekannt (Trost, Bergs et al. 2001). Calmodulin ist als ein Inhibitor von TRPC4 beschrieben worden (Tang, Lin et al. 2001). In einem Verdrängungsexperiment wurde untersucht, ob Tarbp2 mit Calmodulin um diese Bindestelle konkurriert. Dazu wurde des TRPC4 C-terminale Fusionsprotein LB5/6b (aa 786-847) mit Tarbp2 und steigenden Mengen an Calmodulin inkubiert. Das Ergebnis des Experiments zeigt, dass *in vitro* Calmodulin Tarbp2 von der Bindestelle im C-Terminus von TRPC4 verdrängt (Abbildung 4-24). Ob sich eine funktionale Konsequenz aus der Competition der Proteine Tarbp2 und Calmodulin um die Bindestelle in TRPC4 ergibt, wurde im nächsten Schritt untersucht. Hierzu wurde die cDNS von Tarbp2 und Calmodulin in HEK M2R TRPC4 α Zellen exprimiert. Zellen die zusätzlich die cDNS von Calmodulin exprimierten zeigten eine signifikante Reduktion des TRPC4 vermittelten Kalziumeinstroms nach Carbachol Stimulation (Abbildung 4-25, schwarze Spur). Wurde die cDNS von Calmodulin und Tarbp2 in HEK M2R TRPC4 α Zellen koexprimiert konnte der inhibitorische Effekt von Calmodulin teilweise aufgehoben werden (Abbildung 4-25, hellgraue Spur). Die teilweise Aufhebung des inhibitorischen Effekts von Calmodulin auf TRPC4, bei der Koexpression der cDNS von Calmodulin und Tarbp2, könnte auf die Competition von Tarbp2 mit Calmodulin zurückzuführen sein.

Nachdem die Bindung von TRPC4 an Tarbp2 näher charakterisiert worden war sollte nun die Bindung von Tarbp2 an TRPC4 untersucht werden. Dazu wurde eine Tarbp2 Mutante hergestellt, welcher die zweite dsRNS Bindestelle fehlte. Die Deletion der Aminosäurereste aa 209-223 in Tarbp2 führte zu der Mutante Tarbp2 Δ 209-223 (Abbildung 4-28A). Die Aminosäurereste liegen in einem

überlappenden Sequenzabschnitt der beiden Tarbp2 Klone, die in dem Hefe-zwei-Hybrid System gefunden worden waren (Abbildung 4-28A). Die cDNS dieser Tarpb2 Mutante und die cDNS von TRPC4 wurden nun in HEK Zellen koexprimiert; mit den Lysaten wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Es zeigte sich, dass Tarbp2^{Δ209-223} TRPC4 nicht mehr bindet (Abbildung 4-28B). Ob die Aminosäurereste 209-223 die Bindedomäne von Tarbp2 für TRPC4 bilden ist damit aber nicht sicher. Die deletierten Aminosäurereste könnten zu einer Konformationsänderung des mutierten Tarbp2 Proteins geführt haben, dies wiederum könnte Einfluss auf die Interaktion mit TRPC4 haben. Auch kann keine endgültige Aussage darüber getroffen werden, ob die Bindung von Tarbp2 an TRPC4 RNS vermittelt ist. Um dies zu überprüfen könnten die Zellysate vor einer Koimmunpräzipitation mit RNase behandelt werden.

In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tarbp2 TRPC4 bindet, und dass diese Wechselwirkung einen potenzierenden Effekt auf die TRPC4 Aktivität hat.

5.5 Die Bindung von Tarbp2 an eine konstitutiv offene TRPC4 Mutante

Die Untersuchung der Bindedomänen von TRPC4 für Tarbp2 ergab zwei Sequenzabschnitte in dem Carboxy- Terminus von TRPC4 (Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21). In der Arbeitsgruppe wurde eine konstitutiv offen TRPC4-Mutante identifiziert. Die konstitutive Öffnung des Kanals wird durch eine gezielte Punktmutation erreicht. An der Position 503 wird ein Glycinrest durch einen Serinrest ausgetauscht. Dieses Serin könnte mit Aminosäureresten in dem TRPC4 Carboxy-Terminus interagieren und die dadurch hervorgerufene Konformationsänderung des Proteins führt zu einer Öffnung der Pore. Die Aminosäurereste die mit dem Serin wechselwirken könnten, liegen in einem Sequenzabschnitt an den auch Tarbp2 bindet. Der Effekt der Bindung von Tarbp2 an die TRPC4_{G503S} Mutante wurde mittels Messung der Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration untersucht. Für die Untersuchungen wurden die Zellen in kalziumfreiem Puffer gehalten, nach Zugabe von Kalzium steigt die Kalziumkonzentration in den Zellen an (Abbildung 4-26). Die cDNS von Tarbp2 wurde in HEK Zellen exprimiert die induzierbar die cDNS von

TRPC4_{G503S} exprimierten. Die Untersuchung der Zellen zeigte, dass die Koexpression von Tarbp2 mit der TRPC4_{G503S} Mutante eine Reduktion des Kalziumeinstroms um 50% bewirkte (Abbildung 4-26). Dabei handelt es sich nicht um eine Modulation des Kanals sondern um den Einfluss der Bindung von Tarbp2 an TRPC4 und wahrscheinlich um eine damit einhergehende Konformationsänderung (Abbildung 5-2).

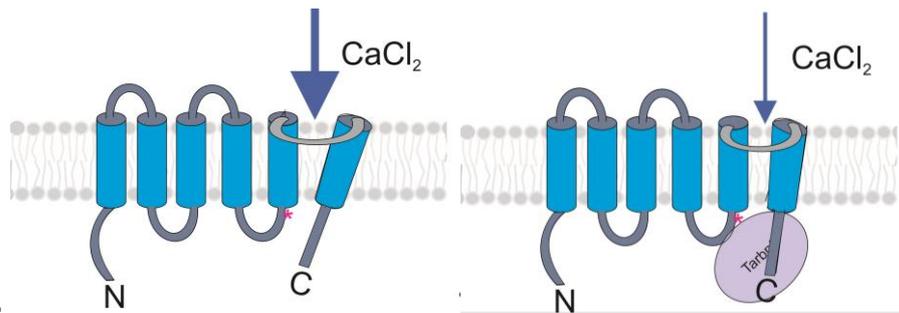


Abbildung 5-2 Bindung von TRPC4_{G503S} und Tarbp2

Durch eine Punktmutation ist der C-Terminus der konstitutiv offene Mutante TRPC4_{G503S} in seiner Konformation geändert und die Mutante lässt Kalzium in die Zelle einströmen. Durch die Bindung von Tarbp2 an den C-Terminus wird der Kalziumeinstrom in die Zelle gemindert.

Den gleichen Effekt konnte bei der TRPC5_{G504S} Mutante beobachtet werden, wenn die cDNS von Tarbp2 koexprimiert wurde (Abbildung 4-27).

5.6 Dicer, Tarbp2 und TRPC4

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Interaktion von Tarbp2 funktionelle Konsequenzen auf die Aktivität von TRPC4 hat, sollte nun untersucht werden, ob TRPC4 über Tarbp2 mit dem Dicer-Protein einen Komplex bildet. Das Enzym Dicer ist ein Hauptinteraktionspartner von Tarbp2 und ein Schlüsselprotein des RISC Loading Complex (RLC) (Chendrimada, Gregory et al. 2005; Gregory, Chendrimada et al. 2005; Haase et al. 2005). Dicer ist eine Endoribonuklease Typ III, welche spezifisch doppelsträngige RNS schneidet (Nicholson 1999). Das Enzym Dicer ist ein zytoplasmatisches Protein, jedoch konnte auch eine membranassoziierte Lokalisation von Dicer nachgewiesen werden (Tahbaz et al. 2004). Die Endoribonuklease Dicer wurde aufgrund seiner Fähigkeit längere dsRNS in kleiner 22nt lange Fragmente zu schneiden, Dicer, nach einem Küchengerät, benannt (Bernstein et al. 2001). Die Endonuklease Aktivität von Dicer von Vertebraten ist ATP-unabhängig (Zhang

et al. 2002), anders als das Dicer-2 Protein von *Drosophila*, welches ATP für seine Aktivität benötigt (Cenik *et al.* 2011).

Die Struktur von Dicer weist verschiedenen Domänen auf, welche für die Funktion des Enzyms von entscheidender Bedeutung sind (Abbildung 5-3). Die Funktion der Helikase Domäne ist noch nicht eindeutig charakterisiert; sie hat einen autoinhibitorischen Effekt auf Dicer. Wenn sie fehlt oder mutiert ist, weist das Enzym eine wesentlich höhere Aktivität auf (Ma, MacRae *et al.* 2008). Des Weiteren ist die Helikase Domäne als Bindestelle von Tarbp2 an Dicer bekannt (Daniels *et al.* 2009). Es gibt Hinweise, dass die Helikase Domäne für die Selektion des Substrates von Dicer zuständig ist, da sie mit der einzelsträngigen Schleife der pre-miRNS interagiert (Ma *et al.* 2012). Die PAZ (Piwi/ Argonaute/ Zwiile) Domäne ist eine RNS bindende Domäne, konserviert in Dicer und Ago Proteinen; in die PAZ Bindetasche passt ein 7 nt langes RNS Fragment (Yan *et al.* 2003). Um 22 nt lange Fragmente aus den längeren dsRNS Substraten zu generieren, ist das Zusammenwirken der PAZ Domäne und der dsRNase Domänen nötig (Ma, Zhou *et al.* 2012).

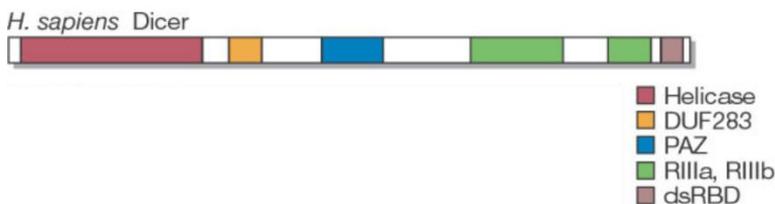


Abbildung 5-3 Struktur von Dicer

Struktur des humanen Dicers nach (Meister and Tuschl 2004). Im Amino-Terminus befindet sich eine Helikasedomäne (rot). Die PAZ Domäne ist für die korrekte RNS Fragmentlänge wichtig (blau). Im Carboxy-Terminus befinden sich die beiden dsRNase IIIa und b Domänen (grün); am Ende des Carboxy-Terminus befindet sich die dsRNS Bindestellen (braun).

Die RNase III Domänen sind für die katalytische Aktivität von Dicer verantwortlich. Durch die interne Dimerisierung, die Bildung eines intramolekularen Pseudodimers, der beiden RNase Domänen RNase IIIa und RNase IIIb, wird die doppelsträngige RNS geschnitten (Du *et al.* 2008). Die doppelsträngige RNS Bindedomäne (dsRBD) hat eine wichtige Funktion bei der Bindung des Substrates durch Dicer (Ma, Zhou *et al.* 2012).

Das Enzym Dicer ist essentiell für die Entwicklung; so sind Dicer-defiziente Tiere nicht lebensfähig und sterben in den ersten Tagen der

Embryonalentwicklung ab (Bernstein *et al.* 2003). Es konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der Expression von Dicer einen Einfluss auf die Bildung von Tumoren im Menschen hat (Pellegrino *et al.* 2012). Die Depletion von Dicer in Nestin-exprimierenden, sich in der Entwicklung befindende, Vorläuferzellen führte dazu, dass sich das Gehirn in der embryonalen Entwicklung nicht richtig entwickelte. Die miRNS Regulation ist für verschiedene Stadien der neuronalen Differenzierung und Migration zuständig (McLoughlin *et al.* 2012). Dicer ist nicht nur für die Entwicklung des Gehirns essentiell sondern auch für die Entwicklung des Herzens. Mäuse bei denen das Dicer-Gen im Herzen deletiert ist, weisen eine dilatative Kardiomyopathie auf und sterben kurz nach der Geburt (Chen *et al.* 2008).

Die Regulation der Dicer Aktivität geschieht auf verschiedenen Ebenen. So wird Dicer durch einen Feedback Loop seines eigenen Produkts let-7 (miRNS) reguliert, indem let-7 die mRNA von Dicer angreift (Forman *et al.* 2008). Es gibt Hinweise, dass Dicer auf eine Kalzium/Calpain abhängige Weise aktiviert wird. So soll das native Dicer Enzym in einer inaktiven Form vorliegen und durch die kalziumabhängige Protease Calpain zu einer aktiven Form gespalten werden (Lugli, Larson *et al.* 2005).

Um nun zu untersuchen, ob es einen TRPC4-Tarbp2-Dicer Komplex gibt, oder die Aktivität von TRPC4 und Tarbp2 einen Effekt auf die Aktivität von Dicer hat, wurden Koimmunpräzipitationen und funktionelle Experimente durchgeführt. Hierzu wurde im ersten Schritt die cDNS von Tarbp2, fusioniert an die cDNS des Flag-Tags, und Dicer, fusioniert an die cDNS des HA-Tags, in HEK M2R TRPC4 α Zellen koexprimiert. Mit den Lysaten dieser Zellen wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Das Ergebnis dieses Experiments war nicht eindeutig (Abbildung 4-29A). Auffällig war, dass in der Fraktion die mit dem Antikörper für TRPC4 präzipitiert worden war Tarbp2 nicht mehr detektierbar war (Abbildung 4-29A, mittlerer Blot). Die Interaktion zwischen Tarbp2 und Dicer ist bekannt und konnte in dem Experiment bestätigt werden. Die Koimmunpräzipitation zeigt jedoch, dass die Koexpression von Dicer die Bindung von Tarbp2 an TRPC4 unterbindet (Abbildung 4-29). Dicer scheint mit TRPC4 um die Bindung an Tarbp2 zu konkurrieren. Scheinbar präzipitierte TRPC4 mit Dicer (Abbildung 4-29A, oberer Blot). Ein Kontrollexperiment bei

dem TRPC4 in Abwesenheit von HA-Dicer, mit dem Antikörper für den HA-Tag präzipitiert wurde, zeigte, dass TRPC4, auch ohne an ein HA-Tag fusioniert zu sein, sehr gut mit dem HA-Antikörper präzipitiert werden kann (Abbildung 4-29B). Um den HA- Antikörper zu umgehen, wurde die Koimmunpräzipitation mit dem anti-Dicer Antikörper wiederholt. Auch dieser Versuch hatte vor allem ein konsistentes Ergebnis, nämlich das in der Gegenwart von Dicer Tarbp2 nicht mehr mit dem Antikörper für TRPC4 präzipitiert werden kann (Abbildung 4-30, unterer Blot). Weitere Immunpräzipitationen mit TRPC4 und endogenem oder überexprimiertem Dicer zeigten, dass TRPC4 nicht mit Dicer interagiert (Abbildung 4-31). Die Ergebnisse der Koimmunpräzipitationen lassen den Schluss zu, dass Tarbp2, Dicer und TRPC4 nicht in einem Komplex vorliegen. Eher scheint es so, dass Dicer um die Bindung von Tarbp2 mit TRPC4 konkurriert. Um einen möglichen Effekt von Dicer auf die Funktion von TRPC4, durch die Bindung an Tarbp2, zu untersuchen, wurde die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration von Zellen, die die cDNS der TRPC4_{G503S} Mutante exprimieren, genutzt. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass - wenn die cDNS von Tarbp2 mit der von TRPC4_{G503S} Mutante koexprimiert wird - sich der Kalziumeinstrom in die Zellen um 50% nach Zugabe von Kalzium verringert (Abbildung 4-26). Dies geschieht allein durch die Bindung von Tarbp2 an den C-Terminus der Mutante. Für die Untersuchung, ob Dicer einen Einfluss auf die TRPC4 Aktivität hat, wurde die Funktion von TRPC4_{G503S} in Gegenwart von Dicer, Dicer und Tarbp2 und Tarbp2 miteinander verglichen. Das Ergebnis zeigte, dass Dicer keinen Einfluss auf den Kalziumeinstrom durch TRPC4_{G503S} hatte (Abbildung 4-32A, grüne Spur). Die Koexpression der cDNS von Tarbp2 und Dicer führte zu keiner Änderung des TRPC4_{G503S} vermittelten Kalziumeinstroms verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 4-32A, vergleiche türkise Spur mit schwarzer Spur). Das bedeutet, dass Dicer um die Bindung von Tarbp2 mit TRPC4 konkurriert. Nur in Gegenwart von Tarbp2 wurde der Kalziumeinstrom durch TRPC4_{G503S} signifikant reduziert (Abbildung 4-32A, rote Spur). Auch die Auswertung der Amplitude des Kalziumeinstroms zeigte, dass einzig Tarbp2 einen Einfluss auf die Funktion von TRPC4_{G503S} hat (Abbildung 4-32, B). Es konnte gezeigt werden, dass Dicer nicht in einem trimären Komplex mit Tarbp2 und TRPC4 in

der Zelle vorliegt. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Dicer mit TRPC4 um die Bindung von Tarbp2 konkurriert.

5.6.1 Die Dicer Aktivität

Nachdem gezeigt worden war, dass Dicer keinen Einfluss auf die Funktion von TRPC4 hat, sollte nun untersucht werden, ob TRPC4 vielleicht einen Einfluss auf die Funktion von Dicer hat. Hierzu wurden Dicer-Aktivitäts-Experimente durchgeführt. Im ersten Schritt wurde rekombinanter humaner Dicer mit einer kurzen doppelsträngigen mit ^{32}P markierten RNS inkubiert und die Spaltung der dsRNS über die Zeit beobachtet (Abbildung 4-34). Die Abbauprodukte des rekombinanten Dicers entsprachen den Erwartungen; es entstanden ein 22 nt Fragment und ein 15 nt Fragment (Abbildung 4-34). Im nächsten Schritt wurde die dsRNS mit HEK Zelllysate inkubiert. HEK Zellen exprimieren endogenen Dicer. Der Abbau der dsRNS ließ sich auch unter diesen Bedingungen beobachten; es konnten jedoch nicht die erwarteten Abbauprodukte identifiziert werden (Abbildung 4-35). Um zu untersuchen, ob der Abbau der dsRNS in dem Zelllysate von Dicer vermittelt war, wurden HEK M2R TRPC4 α Zellen mit der cDNS von Dicer und Tarbp2 transfiziert. Mit den Zelllysaten wurde ein weiteres Dicer-Aktivitäts-Experiment durchgeführt. Auch in diesem Ansatz waren die Abbauprodukte 22 nt und 15 nt nicht zu identifizieren. Es zeigte sich aber, dass wenn die cDNS von Dicer oder Tarbp2 überexprimiert war, es zu einem schnelleren Abbau der dsRNS kam (Abbildung 4-36D). Die Überexpression der cDNS von Tarbp2 führt zu einem schnelleren Abbau der dsRNS, weil Tarbp2 die Aktivität des endogenen Dicers steigert. Somit konnte gezeigt werden, dass auch wenn die erwarteten Abbauprodukte nicht eindeutig identifiziert werden konnten, die Spaltung der dsRNS von Dicer vermittelt war. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Aktivität von TRPC4 mit der Aktivität von Dicer zu finden, wurde eine Kalzium-Abhängigkeit der Dicer Aktivität untersucht. Dies könnte ein Hinweis auf das Zusammenspiel von TRPC4 und der Biogenese von mikroRNS sein. Um die Kalzium-Abhängigkeit von Dicer zu testen, wurden Lysate von HEK293 M2R TRPC4 α Zellen in Abwesenheit von Kalziumionen hergestellt, welche mit der cDNS von Dicer transfiziert worden waren. Die Lysate wurden anschließend in Abwesenheit

oder in Gegenwart von Kalziumionen präinkubiert; danach wurde das Dicer-Aktivitäts-Experiment durchgeführt. Unter diesen Bedingungen waren die Abbauprodukte in Form eines 22 nt Fragments und eines 15 nt Fragments zu identifizieren (Abbildung 4-37A und B). Die densitometrische Auswertung der Banden 37 nt, 22 nt und 15 nt, welche auf die Werte, die mit dem rekombinanten Dicer erhalten worden sind, normalisiert wurden zeigen, dass vor allem die 22 nt Bande über die Zeit an Intensität zunimmt (Abbildung 4-37C und D). Vergleicht man die Zunahme der Intensität der 22 nt Bande unter beiden Bedingungen, das heißt in Anwesenheit und in Abwesenheit von Kalziumionen, so ist eine Tendenz zu beobachten, dass die Intensität der Bande in den Lysaten mit Kalzium schneller zunimmt (Abbildung 4-37F). Wurde nun der Quotient der Banden 37 nt, 22 nt und 15 nt berechnet und miteinander verglichen zeigte sich, dass der Abbau der dsRNS durch Dicer in den Lysaten mit Kalzium signifikant schneller war als in den Lysaten ohne Kalzium (Abbildung 4-37 H). Eine kalziumabhängige Steigerung der Dicer Aktivität wurde in Neuronen gezeigt, sie wurde auf die Proteolyse von Dicer durch Calpain zurückgeführt (Lugli, Larson et al. 2005). Calpaine sind kalziumabhängige Cystein-Proteasen, wobei das Besondere an der Spaltung durch Calpain ist, dass das Substrat nicht abgebaut sondern proteolytisch prozessiert wird (Ono and Sorimachi 2012). Dies kann dazu führen, dass ein Calpain Produkt aktiver ist, als das Ausgangssubstrat. Es zeigte sich, dass die Aktivität von Dicer auch in HEK Zellen durch Kalzium signifikant gesteigert werden konnte. Nun sollte untersucht werden, ob Dicer in HEK293 Zellen auch kalziumabhängig gespalten wird. Dazu wurden Lysate aus HEK M2R TRPC4 α Zellen unter denselben Bedingungen wie für die Dicer-Aktivitäts- Experimente hergestellt. Die Lysate wurden für 1 h in Anwesenheit und in Abwesenheit von Kalziumionen inkubiert. Das Ergebnis des Versuchs zeigt, dass der endogene Dicer kalziumabhängig gespalten wird (Abbildung 4-38). Dicer besitzt eine autoinhibitorische Helikase-Domäne (Ma, MacRae et al. 2008), diese scheint kalziumabhängig abgespalten werden zu können.

Mit den Untersuchungen konnte kein direkter Einfluss von TRPC4 auf die Dicer-Aktivität nachgewiesen werden. Jedoch könnte die Kalziumabhängigkeit von Dicer ein erster Hinweis auf das Zusammenspiel von dem Kationenkanal TRPC4 und der Regulation der miRNS Biogenese auf Dicer Ebene, über die

Interaktion von TRPC4 mit Tarbp2 sein. So wäre denkbar, dass wenn wenig Dicer vorhanden ist, das überschüssige Tarbp2 an TRPC4 bindet und dadurch die TRPC4-Aktivität erhöht (Abbildung 4-15 und Abbildung 4-16). Wenn die TRPC4-Aktivität, durch die Wechselwirkung mit Tarbp2 erhöht ist, strömt mehr Kalzium in die Zelle ein. Die erhöhte Kalziumkonzentration führt zu der kalziumabhängigen Spaltung von Dicer durch Calpain. Das dadurch aktivere Dicer prozessiert mehr pre-miRNS und es kommt zu einer Erhöhung der miRNS. Die schematische Darstellung dieser Hypothese ist in Abbildung 5-4 zu sehen.

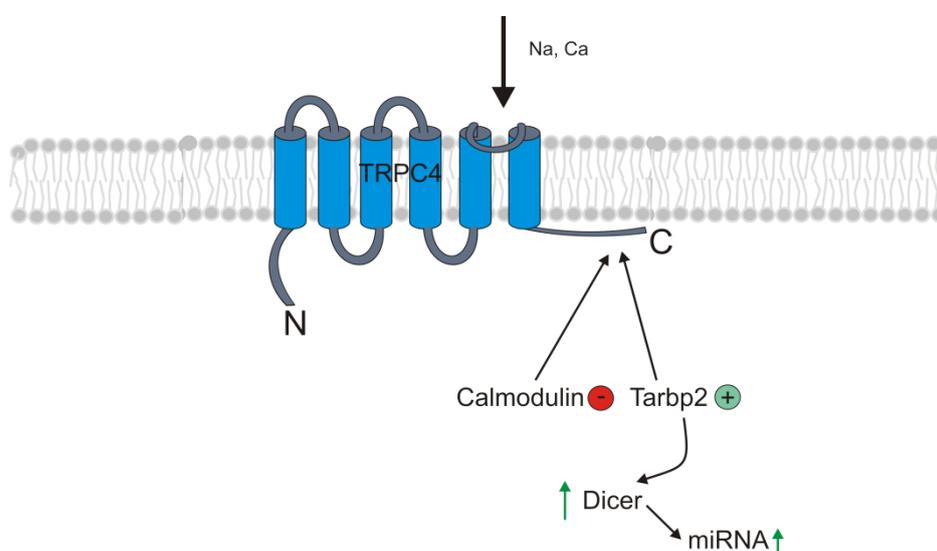


Abbildung 5-4 TRPC4, Tarbp2 und Dicer

Schematische Darstellung des Effekts der Aktivität von TRPC4 auf Tarbp2 und Dicer. Durch die Interaktion von Tarbp2 und TRPC4 strömt Kalzium in die Zelle ein, Calpain spaltet Dicer in seine aktivere Form und es wird mehr miRNS gebildet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten erste Anhaltspunkte für eine neue Funktion von TRPC4 und der Regulation der miRNS Biogenese. Für einen andern TRPC Kanal, *Xenopus* TRPC1, konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Kalziumeinstrom durch TRPC1 ausreicht um Calpain zu aktivieren (Kerstein *et al.* 2013).

5.7 Ausblick

Die vorgelegte Arbeit bietet Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Als erstes könnten die Proteine, welche eine negative Koimmunpräzipitation mit TRPC4 gezeigt haben noch einmal mit anderen Detergenzien getestet werden; in der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wahl der Detergenz auf das Ergebnis der Koimmunpräzipitation einen Einfluss haben kann.

Es könnte interessant sein, die Interaktionspartner zu untersuchen, die in den Koimmunpräzipitationen TRPC4 gebunden haben, aber keinen Effekt auf die TRPC4 Aktivität zeigten. Für diese Proteine müsste ein geeignetes Protokoll zur Untersuchung ihrer Wirkung auf die Aktivität von TRPC4 gefunden werden. Vielleicht ist die Änderung der Kalziumkonzentration nicht der geeignete Indikator um die funktionelle Interaktion der Proteine zu untersuchen. Womöglich wären Studien zur Lokalisation von TRPC4 für die Interaktion mit den endosomalen Proteinen angebracht. Eine Analyse des Phosphorylierungsstatus von TRPC4 scheint für die Untersuchung der Kinasen geeignet.

In dieser Arbeit konnten 15 neue Interaktionspartner von TRPC4 identifiziert werden. Acht der Proteine zeigten auch in den Koimmunpräzipitationen Wechselwirkungen mit TRPC4. Vier von diesen Proteinen wurden auf ihren Effekt auf die TRPC4-Aktivität getestet und ein Protein, Tarbp2, hatte einen positiven Effekt auf die TRPC4-Aktivität.

Auffällig war, dass mit dem CytoTrap System kein Protein gefunden wurde, das bereits als potenzieller Interaktionspartner von TRPC4 beschrieben wurde, z.B. TRPC1, TRPC5, der IP₃-Rezeptor, Calmodulin, die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine oder NHERF. Es konnte in einem Kontrollversuch mit dem CytoTrap System, bei dem gezielt die cDNS des Hefe TRPs Yvc1 und seines bekannten Interaktionspartners Calmodulin (Dissertation Yiming Chang, Medizinische Fakultät 2010) in die Beute- und Köder-Vektoren kloniert wurden, die Interaktion nicht festgestellt werden. Warum die Interaktion nicht gezeigt werden konnte, ist unklar. Ob mehrere Screens wiederholt durchgeführt werden müssen, oder ob die Bedingungen des CytoTrap Systems eventuell nicht optimal sind, um die

oben genannten Proteine zu finden, ist unklar. Inwieweit andere Methoden angesichts der Komplexität des Proteoms zielführend sind, muss sich zeigen.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Zitierte Veröffentlichungen

1. Adams, B. G. (1972). Induction of Galactokinase in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics of Induction and Glucose Effects. Journal of bacteriology **111**(2): 308-315.
2. Allen, J. B., M. W. Walberg, M. C. Edwards und S. J. Elledge (1995). Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. Trends in Biochemical Sciences **20**(12): 511-516.
3. Alpy, F., C. Wendling, M. C. Rio und C. Tomasetto (2002). MENTHO, a MLN64 homologue devoid of the START domain. The Journal of biological chemistry **277**(52): 50780-50787.
4. Altarescu, G., M. Sun, D. F. Moore, J. A. Smith, E. A. Wiggs, B. I. Solomon, N. J. Patronas, K. P. Frei, S. Gupta, C. R. Kaneski, O. W. Quarrell, S. A. Slaugenhaupt, E. Goldin und R. Schiffmann (2002). The neurogenetics of mucopolidosis type IV. Neurology **59**(3): 306-313.
5. Ambudkar, I. S. (2009). Unraveling Smooth Muscle Contraction: The TRP Link. Gastroenterology **137**(4): 1211-1214.
6. Andersson, D. A., C. Gentry, S. Moss und S. Bevan (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **28**(10): 2485-2494.
7. Andrali, S. S., P. Marz und S. Ozcan (2005). Ataxin-10 interacts with O-GlcNAc transferase OGT in pancreatic beta cells. Biochemical and biophysical research communications **337**(1): 149-153.
8. Aronheim, A., D. Engelberg, N. Li, N. al-Alawi, J. Schlessinger und M. Karin (1994). Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. Cell **78**(6): 949-961.
9. Aronheim, A., E. Zandi, H. Hennemann, S. J. Elledge und M. Karin (1997). Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. Molecular and cellular biology **17**(6): 3094-3102.
10. Asada, M., K. Irie, K. Morimoto, A. Yamada, W. Ikeda, M. Takeuchi und Y. Takai (2003). ADIP, a novel Afadin- and alpha-actinin-binding protein localized at cell-cell adherens junctions. The Journal of biological chemistry **278**(6): 4103-4111.

11. Bargal, R., N. Avidan, E. Ben-Asher, Z. Olender, M. Zeigler, A. Frumkin, A. Raas-Rothschild, G. Glusman, D. Lancet und G. Bach (2000). Identification of the gene causing mucopolidosis type IV. Nature genetics **26**(1): 118-123
12. Bechtold, D. A., S. J. Rush und I. R. Brown (2000). Localization of the heat-shock protein Hsp70 to the synapse following hyperthermic stress in the brain. Journal of Neurochemistry **74**(2): 641-646.
13. Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond und G. J. Hannon (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature **409**(6818): 363-366.
14. Bernstein, E., S. Y. Kim, M. A. Carmell, E. P. Murchison, H. Alcorn, M. Z. Li, A. A. Mills, S. J. Elledge, K. V. Anderson und G. J. Hannon (2003). Dicer is essential for mouse development. Nature genetics **35**(3): 215-217.
15. Bimboim, H. C. und J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research **7**(6): 1513-1523.
16. Boudeau, J., A. F. Baas, M. Deak, N. A. Morrice, A. Kieloch, M. Schutkowski, A. R. Prescott, H. C. Clevers und D. R. Alessi (2003). MO25[alpha]/[beta] interact with STRAD[alpha]/[beta] enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. EMBO J **22**(19): 5102-5114.
17. Camblong, J., N. Beyrouthy, E. Guffanti, G. Schlaepfer, L. M. Steinmetz und F. Stutz (2009). Trans-acting antisense RNAs mediate transcriptional gene cosuppression in *S. cerevisiae*. Genes & development **23**(13): 1534-1545.
18. Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum und D. Julius (2000). Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. Science **288**(5464): 306-313.
19. Cenik, E. S., R. Fukunaga, G. Lu, R. Dutcher, Y. Wang, T. M. Tanaka Hall und P. D. Zamore (2011). Phosphate and R2D2 restrict the substrate specificity of Dicer-2, an ATP-driven ribonuclease. Molecular Cell **42**(2): 172-184.
20. Chen, J.-F., E. P. Murchison, R. Tang, T. E. Callis, M. Tatsuguchi, Z. Deng, M. Rojas, S. M. Hammond, M. D. Schneider, C. H. Selzman, G. Meissner, C. Patterson, G. J. Hannon und D.-Z. Wang (2008). Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(6): 2111-2116.
21. Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura und R. Shiekhattar (2005). TRBP recruits the Dicer

- complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature **436**(7051): 740-744.
22. Cheong, J. K. und D. M. Virshup (2011). Casein kinase 1: Complexity in the family. The international journal of biochemistry & cell biology **43**(4): 465-469.
 23. Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz und S. Fields (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proceedings of the National Academy of Sciences **88**(21): 9578-9582.
 24. Chrambach, A., R. A. Reisfeld, M. Wyckoff und J. Zaccari (1967). A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical biochemistry **20**(1): 150-154.
 25. Chung, C. T., S. L. Niemela und R. H. Miller (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(7): 2172-2175.
 26. Cosens, D. J. und A. Manning (1969). Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. Nature **224**(5216): 285-287.
 27. Daniels, S., C. Melendez-Pena, R. Scarborough, A. Daher, H. Christensen, M. El Far, D. Purcell, S. Laine und A. Gatignol (2009). Characterization of the TRBP domain required for Dicer interaction and function in RNA interference. BMC Molecular Biology **10**(1): 38.
 28. Daniels, S. M. und A. Gatignol (2012). The Multiple Functions of TRBP, at the Hub of Cell Responses to Viruses, Stress, and Cancer. Microbiology and Molecular Biology Reviews **76**(3): 652-666.
 29. Davidson, G., W. Wu, J. Shen, J. Bilic, U. Fenger, P. Stanek, A. Glinka und C. Niehrs (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. Nature **438**(7069): 867-872.
 30. Dietrich, A., Y. S. M. Mederos, M. Gollasch, V. Gross, U. Storch, G. Dubrovskaya, M. Obst, E. Yildirim, B. Salanova, H. Kalwa, K. Essin, O. Pinkenburg, F. C. Luft, T. Gudermann und L. Birnbaumer (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. Molecular and cellular biology **25**(16): 6980-6989.
 31. Du, Z., J. K. Lee, R. Tjhen, R. M. Stroud und T. L. James (2008). Structural and biochemical insights into the dicing mechanism of mouse Dicer: A conserved lysine is critical for dsRNA cleavage. Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(7): 2391-2396.
 32. Elles, R. G., A. P. Read, K. A. Hodgkinson, A. Watters und R. Harris (1990). Recombination or heterogeneity: is there a second locus for adult polycystic kidney disease? Journal of medical genetics **27**(7): 413-417.

33. Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold und M. Danielsen (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **84**(21): 7413-7417.
34. Fields, S. und O.-k. Song (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. Nature **340**(6230): 245-246.
35. Filippi, B. M., P. de los Heros, Y. Mehellou, I. Navratilova, R. Gourlay, M. Deak, L. Plater, R. Toth, E. Zeqiraj und D. R. Alessi (2011). MO25 is a master regulator of SPAK/OSR1 and MST3/MST4/YSK1 protein kinases. EMBO J **30**(9): 1730-1741.
36. Flockerzi, V. (2007). An introduction on TRP channels. Handbook of experimental pharmacology(179): 1-19.
37. Forman, J. J., A. Legesse-Miller und H. A. Coller (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(39): 14879-14884.
38. Freichel, M., S. H. Suh, A. Pfeifer, U. Schweig, C. Trost, P. Weissgerber, M. Biel, S. Philipp, D. Freise, G. Droogmans, F. Hofmann, V. Flockerzi und B. Nilius (2001). Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. Nature cell biology **3**(2): 121-127.
39. Fukumoto, Y., S. Kurita, Y. Takai und H. Ogita (2011). Role of scaffold protein afadin dilute domain-interacting protein (ADIP) in platelet-derived growth factor-induced cell movement by activating Rac protein through Vav2 protein. The Journal of biological chemistry **286**(50): 43537-43548.
40. Garcia, R. L. und W. P. Schilling (1997). Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. Biochemical and biophysical research communications **239**(1): 279-283.
41. Garreau, H., J. H. Camonis, C. Guitton und M. Jacquet (1990). The *Saccharomyces cerevisiae* CDC25 gene product is a 180 kDa polypeptide and is associated with a membrane fraction. FEBS letters **269**(1): 53-59.
42. Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell und R. Nairn (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. Journal of General Virology **36**(1): 59-72.
43. Graziani, A., M. Poteser, W. M. Heupel, H. Schleifer, M. Krenn, D. Drenckhahn, C. Romanin, W. Baumgartner und K. Groschner (2010). Cell-cell contact formation governs Ca²⁺ signaling by TRPC4 in the vascular endothelium: evidence for a regulatory TRPC4-beta-catenin interaction. The Journal of biological chemistry **285**(6): 4213-4223.

44. Gredell, J. A., M. J. Dittmer, M. Wu, C. Chan und S. P. Walton (2010). Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. Biochemistry **49**(14): 3148-3155.
45. Gregory, R. I., T. P. Chendrimada, N. Cooch und R. Shiekhattar (2005). Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. Cell **123**(4): 631-640.
46. Grifoni, S. C., S. E. McKey und H. A. Drummond (2008). Hsc70 regulates cell surface ASIC2 expression and vascular smooth muscle cell migration. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology **294**(5): H2022-H2030.
47. Gross, S. A., G. A. Guzman, U. Wissenbach, S. E. Philipp, M. X. Zhu, D. Bruns und A. Cavalie (2009). TRPC5 is a Ca²⁺-activated channel functionally coupled to Ca²⁺-selective ion channels. The Journal of biological chemistry **284**(49): 34423-34432.
48. Grynkiewicz, G., M. Poenie und R. Y. Tsien (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. Journal of Biological Chemistry **260**(6): 3440-3450.
49. Haase, A. D., L. Jaskiewicz, H. Zhang, S. Laine, R. Sack, A. Gatignol und W. Filipowicz (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. EMBO Rep **6**(10): 961-967.
50. Hardie, R. C. und B. Minke (1992). The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors. Neuron **8**(4): 643-651.
51. Hartmann, J., E. Dragicevic, H. Adelsberger, H. A. Henning, M. Sumser, J. Abramowitz, R. Blum, A. Dietrich, M. Freichel, V. Flockerzi, L. Birnbaumer und A. Konnerth (2008). TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. Neuron **59**(3): 392-398.
52. Hoenderop, J. G. J., T. Voets, S. Hoefs, F. Weidema, J. Prenen, B. Nilius und R. J. M. Bindels (2003). Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. EMBO J **22**(4): 776-785.
53. Hofmann, T., A. G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann und G. Schultz (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. Nature **397**(6716): 259-263.
54. Holmes, D. S. und M. Quigley (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Analytical biochemistry **114**(1): 193-197.
55. Hopper, J. E. und L. B. Rowe (1978). Molecular expression and regulation of the galactose pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Distinct messenger RNAs specified by the Gali and Gal7 genes in the Gal7-Gal10-Gal1 cluster. Journal of Biological Chemistry **253**(20): 7566-7569.

56. Inoue, K., S. Ueno und A. Fukuda (2004). Interaction of neuron-specific K⁺-Cl⁻ cotransporter, KCC2, with brain-type creatine kinase. FEBS letters **564**(1-2): 131-135.
57. Inoue, R., T. Okada, H. Onoue, Y. Hara, S. Shimizu, S. Naitoh, Y. Ito und Y. Mori (2001). The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2⁺)-permeable cation channel. Circulation research **88**(3): 325-332.
58. Jeon, J. P., C. Hong, E. J. Park, J. H. Jeon, N. H. Cho, I. G. Kim, H. Choe, S. Muallem, H. J. Kim und I. So (2012). Selective Galphai subunits as novel direct activators of transient receptor potential canonical (TRPC)4 and TRPC5 channels. The Journal of biological chemistry **287**(21): 17029-17039.
59. Jeon, J. P., K. P. Lee, E. J. Park, T. S. Sung, B. J. Kim, J. H. Jeon und I. So (2008). The specific activation of TRPC4 by Gi protein subtype. Biochemical and biophysical research communications **377**(2): 538-543.
60. Johnston, M. und R. W. Davis (1984). Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular biology **4**(8): 1440-1448.
61. Jones, D. H., S. Ley und A. Aitken (1995). Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. FEBS letters **368**(1): 55-58.
62. Jones, S., M. L. Vignais und J. R. Broach (1991). The CDC25 protein of *Saccharomyces cerevisiae* promotes exchange of guanine nucleotides bound to ras. Molecular and cellular biology **11**(5): 2641-2646.
63. Kedei, N., T. Szabo, J. D. Lile, J. J. Treanor, Z. Olah, M. J. Iadarola und P. M. Blumberg (2001). Analysis of the Native Quaternary Structure of Vanilloid Receptor 1. Journal of Biological Chemistry **276**(30): 28613-28619.
64. Keegan, L., G. Gill und M. Ptashne (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. Science **231**(4739): 699-704.
65. Kerstein, P. C., B. T. Jacques-Fricke, J. Rengifo, B. J. Mogen, J. C. Williams, P. A. Gottlieb, F. Sachs und T. M. Gomez (2013). Mechanosensitive TRPC1 Channels Promote Calpain Proteolysis of Talin to Regulate Spinal Axon Outgrowth. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **33**(1): 273-285.
66. Kiselyov, K., X. Xu, G. Mozhayeva, T. Kuo, I. Pessah, G. Mignery, X. Zhu, L. Birnbaumer und S. Muallem (1998). Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. Nature **396**(6710): 478-482.

67. Kochukov, M. Y., A. Balasubramanian, R. C. Noel und S. P. Marrelli (2013). Role of TRPC1 and TRPC3 Channels in Contraction and Relaxation of Mouse Thoracic Aorta. Journal of vascular research **50**(1): 11-20.
68. Kok, K. H., M. H. Ng, Y. P. Ching und D. Y. Jin (2007). Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. The Journal of biological chemistry **282**(24): 17649-17657.
69. Kristoffersen, P., G. B. Jensen, K. Gerdes und J. Piškur (2000). Bacterial Toxin-Antitoxin Gene System as Containment Control in Yeast Cells. Applied and environmental microbiology **66**(12): 5524-5526.
70. Kuwahara, K., Y. Wang, J. McAnally, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby, J. A. Hill und E. N. Olson (2006). TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. The Journal of clinical investigation **116**(12): 3114-3126.
71. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**(5259): 680-685.
72. Lee, H. Y. und J. A. Doudna (2012). TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. RNA.
73. Lepage, P. K., M. P. Lussier, F.-O. McDuff, P. Lavigne und G. Boulay (2009). The self-association of two N-terminal interaction domains plays an important role in the tetramerization of TRPC4. Cell Calcium **45**(3): 251-259.
74. Leybold, B. G., C. R. Yu, T. Leinders-Zufall, M. M. Kim, F. Zufall und R. Axel (2002). Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(9): 6376-6381.
75. Li, H. S., X. Z. Xu und C. Montell (1999). Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. Neuron **24**(1): 261-273.
76. Li, J., A. Mahajan und M.-D. Tsai (2006). Ankyrin Repeat: A Unique Motif Mediating Protein-Protein Interactions†. Biochemistry **45**(51): 15168-15178.
77. Li, J., J. Wang, W. Hou, Z. Jing, C. Tian, Y. Han, J. Liao, M. Q. Dong und X. Xu (2011). Phosphorylation of Ataxin-10 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. Cell cycle **10**(17): 2946-2958.
78. Lugli, G., J. Larson, M. E. Martone, Y. Jones und N. R. Smalheiser (2005). Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse

- brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. Journal of Neurochemistry **94**(4): 896-905.
79. Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. Trends in Biochemical Sciences **21**(10): 375-382.
80. Lussier, M. P., S. Cayouette, P. K. Lepage, C. L. Bernier, N. Francoeur, M. St-Hilaire, M. Pinard und G. Boulay (2005). MxA, a Member of the Dynamamin Superfamily, Interacts with the Ankyrin-like Repeat Domain of TRPC. Journal of Biological Chemistry **280**(19): 19393-19400.
81. Ma, E., I. J. MacRae, J. F. Kirsch und J. A. Doudna (2008). Autoinhibition of Human Dicer by Its Internal Helicase Domain. Journal of molecular biology **380**(1): 237-243.
82. Ma, E., K. Zhou, M. A. Kidwell und J. A. Doudna (2012). Coordinated Activities of Human Dicer Domains in Regulatory RNA Processing. Journal of molecular biology(0).
83. Ma, J. und M. Ptashne (1987). A new class of yeast transcriptional activators. Cell **51**(1): 113-119.
84. Macpherson, L. J., S. W. Hwang, T. Miyamoto, A. E. Dubin, A. Patapoutian und G. M. Story (2006). More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. Molecular and cellular neurosciences **32**(4): 335-343.
85. MacRae, I. J., K. Zhou und J. A. Doudna (2007). Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. Nat Struct Mol Biol **14**(10): 934-940.
86. Marz, P., A. Probst, S. Lang, M. Schwager, S. Rose-John, U. Otten und S. Ozbek (2004). Ataxin-10, the spinocerebellar ataxia type 10 neurodegenerative disorder protein, is essential for survival of cerebellar neurons. The Journal of biological chemistry **279**(34): 35542-35550.
87. Matsuura, T., T. Yamagata, D. L. Burgess, A. Rasmussen, R. P. Grewal, K. Watase, M. Khajavi, A. E. McCall, C. F. Davis, L. Zu, M. Achari, S. M. Pulst, E. Alonso, J. L. Noebels, D. L. Nelson, H. Y. Zoghbi und T. Ashizawa (2000). Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. Nature genetics **26**(2): 191-194.
88. McKay, R. R., C. L. Szymeczek-Seay, J. P. Lievreumont, G. S. Bird, C. Zitt, E. Jungling, A. Luckhoff und J. W. Putney, Jr. (2000). Cloning and expression of the human transient receptor potential 4 (TRP4) gene: localization and functional expression of human TRP4 and TRP3. The Biochemical journal **351 Pt 3**: 735-746.
89. McKemy, D. D., W. M. Neuhauser und D. Julius (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. Nature **416**(6876): 52-58.

90. McLoughlin, H. S., S. K. Fineberg, L. L. Ghosh, L. Tecedor und B. L. Davidson (2012). Dicer is required for proliferation, viability, migration and differentiation in corticoneurogenesis. Neuroscience **223**: 285-295.
91. Meister, G. und T. Tuschl (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature **431**(7006): 343-349.
92. Mery, L., F. Magnino, K. Schmidt, K. H. Krause und J. F. Dufour (2001). Alternative splice variants of hTrp4 differentially interact with the C-terminal portion of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. FEBS letters **487**(3): 377-383.
93. Minke, B., C. Wu und W. L. Pak (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in Drosophila mutant. Nature **258**(5530): 84-87.
94. Miyamoto, H., A. Matsushiro und M. Nozaki (1993). Molecular cloning of a novel mRNA sequence expressed in cleavage stage mouse embryos. Molecular reproduction and development **34**(1): 1-7.
95. Mizuno, N., S. Kitayama, Y. Saishin, S. Shimada, K. Morita, C. Mitsuhashi, H. Kurihara und T. Dohi (1999). Molecular cloning and characterization of rat trp homologues from brain. Brain research. Molecular brain research **64**(1): 41-51.
96. Montell, C. und G. M. Rubin (1989). Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. Neuron **2**(4): 1313-1323.
97. Mori, Y., N. Takada, T. Okada, M. Wakamori, K. Imoto, H. Wanifuchi, H. Oka, A. Oba, K. Ikenaka und T. Kurotaki (1998). Differential distribution of TRP Ca²⁺ channel isoforms in mouse brain. Neuroreport **9**(3): 507-515.
98. Muziol, T., E. Pineda-Molina, R. B. Ravelli, A. Zamborlini, Y. Usami, H. Gottlinger und W. Weissenhorn (2006). Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. Developmental cell **10**(6): 821-830.
99. Nealen, M. L., M. S. Gold, P. D. Thut und M. J. Caterina (2003). TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. Journal of neurophysiology **90**(1): 515-520.
100. Nicholson, A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. FEMS microbiology reviews **23**(3): 371-390.
101. Okada, T., R. Inoue, K. Yamazaki, A. Maeda, T. Kurotaki, T. Yamakuni, I. Tanaka, S. Shimizu, K. Ikenaka, K. Imoto und Y. Mori (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. The Journal of biological chemistry **274**(39): 27359-27370.

102. Ono, Y. und H. Sorimachi (2012). Calpains — An elaborate proteolytic system. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics **1824**(1): 224-236.
103. Otsuguro, K., J. Tang, Y. Tang, R. Xiao, M. Freichel, V. Tsvilovskyy, S. Ito, V. Flockerzi, M. X. Zhu und A. V. Zholos (2008). Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. The Journal of biological chemistry **283**(15): 10026-10036.
104. Parker, G. S., T. S. Maity und B. L. Bass (2008). dsRNA binding properties of RDE-4 and TRBP reflect their distinct roles in RNAi. Journal of molecular biology **384**(4): 967-979.
105. Peier, A. M., A. Moqrich, A. C. Hergarden, A. J. Reeve, D. A. Andersson, G. M. Story, T. J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan und A. Patapoutian (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. Cell **108**(5): 705-715.
106. Peier, A. M., A. J. Reeve, D. A. Andersson, A. Moqrich, T. J. Earley, A. C. Hergarden, G. M. Story, S. Colley, J. B. Hogenesch, P. McIntyre, S. Bevan und A. Patapoutian (2002). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. Science **296**(5575): 2046-2049.
107. Pellegrino, L., J. Jacob, L. Roca-Alonso, J. Krell, L. Castellano und A. E. Frampton (2012). Altered expression of the miRNA processing endoribonuclease Dicer has prognostic significance in human cancers. Expert Review of Anticancer Therapy **13**(1): 21-27.
108. Pemberton, S., K. Madiona, L. Pieri, M. Kabani, L. Bousset und R. Melki (2011). Hsc70 protein interaction with soluble and fibrillar alpha-synuclein. The Journal of biological chemistry **286**(40): 34690-34699.
109. Philipp, S., A. Cavalie, M. Freichel, U. Wissenbach, S. Zimmer, C. Trost, A. Marquart, M. Murakami und V. Flockerzi (1996). A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to Drosophila TRP and TRPL. The EMBO journal **15**(22): 6166-6171.
110. Philipp, S., C. Trost, J. Warnat, J. Rautmann, N. Himmerkus, G. Schroth, O. Kretz, W. Nastainczyk, A. Cavalié, M. Hoth und V. Flockerzi (2000). TRP4 (CCE1) Protein Is Part of Native Calcium Release-activated Ca²⁺-like Channels in Adrenal Cells. Journal of Biological Chemistry **275**(31): 23965-23972.
111. Phillips, A. M., A. Bull und L. E. Kelly (1992). Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. Neuron **8**(4): 631-642.
112. Puram, S. V., A. Riccio, S. Koirala, Y. Ikeuchi, A. H. Kim, G. Corfas und A. Bonni (2011). A TRPC5-regulated calcium signaling pathway controls dendrite patterning in the mammalian brain. Genes & development **25**(24): 2659-2673.

113. Rajan, S., R. Preisig-Müller, E. Wischmeyer, R. Nehring, P. J. Hanley, V. Renigunta, B. Musset, G. Schlichthörl, C. Derst, A. Karschin und J. Daut (2002). Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. The Journal of physiology **545**(1): 13-26.
114. Reiser, J., K. R. Polu, C. C. Moller, P. Kenlan, M. M. Altintas, C. Wei, C. Faul, S. Herbert, I. Villegas, C. Avila-Casado, M. McGee, H. Sugimoto, D. Brown, R. Kalluri, P. Mundel, P. L. Smith, D. E. Clapham und M. R. Pollak (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. Nature genetics **37**(7): 739-744.
115. Riccio, A., Y. Li, J. Moon, K. S. Kim, K. S. Smith, U. Rudolph, S. Gapon, G. L. Yao, E. Tsvetkov, S. J. Rodig, A. Van't Veer, E. G. Meloni, W. A. Carlezon, Jr., V. Y. Bolshakov und D. E. Clapham (2009). Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. Cell **137**(4): 761-772.
116. Robzyk, K. und Y. Kassir (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. Nucleic Acids Research **20**(14): 3790.
117. Rohacs, T., C. M. Lopes, I. Michailidis und D. E. Logothetis (2005). PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. Nature neuroscience **8**(5): 626-634.
118. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**(4839): 487-491.
119. Salin-Cantegrel, A., M. Shekarabi, S. Holbert, P. Dion, D. Rochefort, J. Laganriere, S. Dacal, P. Hince, L. Karemera, C. Gaspar, J. Y. Lapointe und G. A. Rouleau (2008). HMSN/ACC truncation mutations disrupt brain-type creatine kinase-dependant activation of K⁺/Cl⁻ co-transporter 3. Human molecular genetics **17**(17): 2703-2711.
120. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press **Vol. 1, 2, 3**.
121. Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnology **24**: 104-108.
122. Schaefer, M., T. D. Plant, A. G. Obukhov, T. Hofmann, T. Gudermann und G. Schultz (2000). Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. The Journal of biological chemistry **275**(23): 17517-17526.
123. Schaefer, M., T. D. Plant, N. Stresow, N. Albrecht und G. Schultz (2002). Functional differences between TRPC4 splice variants. The Journal of biological chemistry **277**(5): 3752-3759.

124. Schiestl, R. H. und R. D. Gietz (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. Current Genetics **16**(5): 339-346.
125. Segal, M., I. Marbach, D. Engelberg, G. Simchen und A. Levitzki (1992). Interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* CDC25 gene product and mammalian ras. Journal of Biological Chemistry **267**(32): 22747-22751.
126. Seth, M., Z. S. Zhang, L. Mao, V. Graham, J. Burch, J. Stiber, L. Tsiokas, M. Winn, J. Abramowitz, H. A. Rockman, L. Birnbaumer und P. Rosenberg (2009). TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. Circulation research **105**(10): 1023-1030.
127. Shaner, N. C., M. Z. Lin, M. R. McKeown, P. A. Steinbach, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson und R. Y. Tsien (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. Nat Meth **5**(6): 545-551.
128. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical biochemistry **150**(1): 76-85.
129. Stowers, L., T. E. Holy, M. Meister, C. Dulac und G. Koentges (2002). Loss of Sex Discrimination and Male-Male Aggression in Mice Deficient for TRP2. Science **295**(5559): 1493-1500.
130. Stratagene CytoTrap XR Premade Libraries.
131. Strubing, C., G. Krapivinsky, L. Krapivinsky und D. E. Clapham (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. Neuron **29**(3): 645-655.
132. Strübing, C., G. Krapivinsky, L. Krapivinsky und D. E. Clapham (2003). Formation of Novel TRPC Channels by Complex Subunit Interactions in Embryonic Brain. Journal of Biological Chemistry **278**(40): 39014-39019.
133. Sun, M., E. Goldin, S. Stahl, J. L. Falardeau, J. C. Kennedy, J. S. Acierno Jr, C. Bove, C. R. Kaneski, J. Nagle, M. C. Bromley, M. Colman, R. Schiffmann und S. A. Slaugenhaupt (2000). Mucopolipidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. Human molecular genetics **9**(17): 2471-2478.
134. Tahbaz, N., F. A. Kolb, H. Zhang, K. Jaronczyk, W. Filipowicz und T. C. Hobman (2004). Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. EMBO reports **5**(2): 189-194.
135. Tang, J., Y. Lin, Z. Zhang, S. Tikunova, L. Birnbaumer und M. X. Zhu (2001). Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. The Journal of biological chemistry **276**(24): 21303-21310.

136. Tang, Y., J. Tang, Z. Chen, C. Trost, V. Flockerzi, M. Li, V. Ramesh und M. X. Zhu (2000). Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. The Journal of biological chemistry **275**(48): 37559-37564.
137. Trost, C., C. Bergs, N. Himmerkus und V. Flockerzi (2001). The transient receptor potential, TRP4, cation channel is a novel member of the family of calmodulin binding proteins. The Biochemical journal **355**(Pt 3): 663-670.
138. Tsvilovskyy, V. V., A. V. Zholos, T. Aberle, S. E. Philipp, A. Dietrich, M. X. Zhu, L. Birnbaumer, M. Freichel und V. Flockerzi (2009). Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. Gastroenterology **137**(4): 1415-1424.
139. Tuschl, T. (2001). RNA Interference and Small Interfering RNAs. ChemBiochem : a European journal of chemical biology **2**(4): 239-245.
140. van Heusden, G. P. (2005). 14-3-3 proteins: regulators of numerous eukaryotic proteins. IUBMB life **57**(9): 623-629.
141. Venkatachalam, K. und C. Montell (2007). TRP channels. Annu Rev Biochem **76**: 387-417.
142. Vila-Carriles, W. H., Z.-H. Zhou, J. K. Bubien, C. M. Fuller und D. J. Benos (2007). Participation of the Chaperone Hsc70 in the Trafficking and Functional Expression of ASIC2 in Glioma Cells. Journal of Biological Chemistry **282**(47): 34381-34391.
143. Vriens, J., G. Owsianik, T. Hofmann, Stephan E. Philipp, J. Stab, X. Chen, M. Benoit, F. Xue, A. Janssens, S. Kerselaers, J. Oberwinkler, R. Vennekens, T. Gudermann, B. Nilius und T. Voets (2011). TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat. Neuron **70**(3): 482-494.
144. Wakamiya, M., T. Matsuura, Y. Liu, G. C. Schuster, R. Gao, W. Xu, P. S. Sarkar, X. Lin und T. Ashizawa (2006). The role of ataxin 10 in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 10. Neurology **67**(4): 607-613.
145. Wallimann, T., M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay und H. M. Eppenberger (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. The Biochemical journal **281 (Pt 1)**: 21-40.
146. Waragai, M., S. Nagamitsu, W. Xu, Y. J. Li, X. Lin und T. Ashizawa (2006). Ataxin 10 induces neuritogenesis via interaction with G-protein beta2 subunit. Journal of neuroscience research **83**(7): 1170-1178.
147. Wedel, B. J., G. Vazquez, R. R. McKay, G. St. J. Bird und J. W. Putney (2003). A Calmodulin/Inositol 1,4,5-Trisphosphate (IP3) Receptor-binding Region Targets TRPC3 to the Plasma Membrane in a Calmodulin/IP3

- Receptor-independent Process. Journal of Biological Chemistry **278**(28): 25758-25765.
148. Wegierski, T., K. Hill, M. Schaefer und G. Walz (2006). The HECT ubiquitin ligase AIP4 regulates the cell surface expression of select TRP channels. EMBO J **25**(24): 5659-5669.
149. Wes, P. D., J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten und C. Montell (1995). TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. Proceedings of the National Academy of Sciences **92**(21): 9652-9656.
150. Wightman, B., I. Ha und G. Ruvkun (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. Cell **75**(5): 855-862.
151. Winn, M. P., P. J. Conlon, K. L. Lynn, M. K. Farrington, T. Creazzo, A. F. Hawkins, N. Daskalakis, S. Y. Kwan, S. Ebersviller, J. L. Burchette, M. A. Pericak-Vance, D. N. Howell, J. M. Vance und P. B. Rosenberg (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. Science **308**(5729): 1801-1804.
152. Wissenbach, U., B. A. Niemeyer, T. Fixemer, A. Schneidewind, C. Trost, A. Cavalié, K. Reus, E. Meese, H. Bonkhoff und V. Flockerzi (2001). Expression of CaT-like, a Novel Calcium-selective Channel, Correlates with the Malignancy of Prostate Cancer. Journal of Biological Chemistry **276**(22): 19461-19468.
153. Yan, K. S., S. Yan, A. Farooq, A. Han, L. Zeng und M. M. Zhou (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. Nature **426**(6965): 468-474.
154. Zanou, N., G. Shapovalov, M. Louis, N. Tajeddine, C. Gallo, M. Van Schoor, I. Anguish, M. L. Cao, O. Schakman, A. Dietrich, J. Lebacqz, U. Rungg, E. Roulet, L. Birnbaumer und P. Gailly (2010). Role of TRPC1 channel in skeletal muscle function. American journal of physiology. Cell physiology **298**(1): C149-162.
155. Zhang, H., F. A. Kolb, V. Brondani, E. Billy und W. Filipowicz (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. The EMBO journal **21**(21): 5875-5885.
156. Zhu, X., P. B. Chu, M. Peyton und L. Birnbaumer (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the Drosophila *trp* gene. FEBS letters **373**(3): 193-198.
157. Zimmermann, K., J. K. Lennerz, A. Hein, A. S. Link, J. S. Kaczmarek, M. Delling, S. Uysal, J. D. Pfeifer, A. Riccio und D. E. Clapham (2011). Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(44): 18114-18119.

6.2 Eigene Veröffentlichungen

Publizierte Abstracts

Zimmermann, J., C. Fecher-Trost & V. Flockerzi (2011) Identification of protein interaction partners of the murine TRPC4 proteins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (20) 383 (Suppl 1): 49

Zimmermann, J., A. Beck & V. Flockerzi (2012) Novel interaction partners of the murine TRPC4 protein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2012) 385 (Suppl 1): 476

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Stammbaum der TRP-Gene.....	7
Abbildung 2-2 Die sechs TRP Unterfamilien in Mammalia	8
Abbildung 2-3 Die wahrscheinliche Transmembranarchitektur von TRPC-Proteinen	9
Abbildung 2-4 Aktivierung von TRPC4.....	14
Abbildung 2-5 Hefe-zwei-Hybrid System.....	18
Abbildung 2-6 Schematische Übersicht über das Screening System CytoTrap.....	20
Abbildung 3-1 Screening Vektor pSos	54
Abbildung 3-2 Vektor pMyr.....	54
Abbildung 3-3 Eigenschaften des Kalzium-bindenden Farbstoffes Fura-2	58
Abbildung 4-1 Restriktionsanalyse der cDNS Bibliothek	61
Abbildung 4-2 Expression von hSos und dem Fusionsprotein hSos-TRPC4-C-Terminus	62
Abbildung 4-3 Teil- Sequenz des Klons D7.....	63
Abbildung 4-4 Retransformationsplatten des Screening D	64
Abbildung 4-5 Screening D mit Tarbp2	65
Abbildung 4-6 Fragmente der Interaktionspartner von TRPC4.....	67
Abbildung 4-7 Western Blot nach Koimmunpräzipitation von TRPC4 und Ataxin in Gegenwart von SDS (A) und DDM (B).....	69
Abbildung 4-8 Western Blot: Koimmunpräzipitationen von TRPC4 α mit Kandidatenproteinen.....	71
Abbildung 4-9 Western Blot: Koimmunpräzipitationen von TRPC4 α mit weiteren Kandidatenproteinen.....	72
Abbildung 4-10 Western Blot: Koimmunpräzipitation Tarbp2 mit TRPC4 β	73
Abbildung 4-11 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in HEK M2R Zellen mit und ohne TRPC4 β	74
Abbildung 4-12 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration	76
Abbildung 4-13 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration	78
Abbildung 4-14 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration	79
Abbildung 4-15 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration	81
Abbildung 4-16 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration	82
Abbildung 4-17 Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration	83
Abbildung 4-18 Fragmente des TRPC4 C-Terminus	84

Abbildung 4-19 Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der rekombinanten GST-TRPC4 Fusionsproteinen.....	84
Abbildung 4-20 Western Blot des Pull down Experiments.....	85
Abbildung 4-21 Bindungsstellen von TRPC4 α und TRPC4 β für Tarbp2.....	86
Abbildung 4-22 Alignment der C-Termini aller TRPCs	87
Abbildung 4-23 Western Blot: Koimmunpräzipitation von Tarbp2 und TRPC5	88
Abbildung 4-24 Bindungs-Experiment mit Tarbp2, Calmodulin und dem GST-TRPC4 Fusionsprotein LB5/6b	89
Abbildung 4-25 Veränderung der zytosolische Kalziumkonzentration von TRPC4 α Zellen mit Tarpb2 und Calmodulin	90
Abbildung 4-26 Veränderung der zytosolische Kalziumkonzentration von HEK TRPC4 _{G503S} Zellen mit Tarbp2	92
Abbildung 4-27 Veränderung der zytosolische Kalziumkonzentration von TRPC5 _{G504S} Zellen mit Tarbp2.....	93
Abbildung 4-28 Lokalisaton der Deletion in Tarbp2 sowie Koimmunpräzipitation von TRPC4 und Tarbp2 ^{Δ209-223aa}	94
Abbildung 4-29 Koimmunpräzipitation mit TRPC4 α , Tarbp2 und Dicer und Kontrollexperiment mit anti-HA Antikörpern	95
Abbildung 4-30 Western Blot: Koimmunpräzipitation mit TRPC4, Tarbp2 und Dicer ...	96
Abbildung 4-31 Koimmunpräzipitation von TRPC4 mit Dicer.....	97
Abbildung 4-32 Veränderung der zytosolische Kalziumkonzentration von TRPC4 _{G503S} Zellen mit Tarbp2 und Dicer.....	98
Abbildung 4-33 Doppelsträngige RNS 37ab und die durch die Dicer-Aktivität entstehenden Fragmente.....	99
Abbildung 4-34 Zeitabhängigkeit der Spaltung der dsRNS 37ab durch rekombinanten Dicer	100
Abbildung 4-35 Zeitabhängigkeit der Spaltung der dsRNS 37ab durch endogenen Dicer	101
Abbildung 4-36 Vergleich der Aktivität von endogenem Dicer in HEK M2R TRPC4 α Lysat mit Zelllysaten, welche die cDNS von Dicer, Tarbp2 oder von Tarbp2 und Dicer überexprimieren.....	102
Abbildung 4-37 Kalziumabhängigkeit von Dicer	105
Abbildung 4-38 Western Blot: Kalziumabhängige Spaltung von Dicer.....	107
Abbildung 5-1 Humanes Tarbp2	110
Abbildung 5-2 Bindung von TRPC4 _{G503S} und Tarbp2	121
Abbildung 5-3 Struktur von Dicer	122
Abbildung 5-4 TRPC4, Tarbp2 und Dicer.....	127

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Pipettierschema für SDS-PAGE	25
Tabelle 3-2 Liste der verwendeten Zelllinien	30
Tabelle 3-3: Oligonukleotide mit Nukleotidsequenz und Verwendungszweck	31
Tabelle 3-4 RNS Oligonukleotide.....	39
Tabelle 3-5: Ausgangsvektoren und deren Quelle	39
Tabelle 3-6: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide	40
Tabelle 3-7 Protokoll für die Standard PCR	41
Tabelle 3-8 Liste der käuflich erworbenen Vollängen Klone	42
Tabelle 3-9 Beispiel für die Retransformation des Screenings D.....	57
Tabelle 4-1 Liste der putativen Interaktionspartner von TRPC4	66
Tabelle 4-2 Proteine, die mit dem TRPC4-Protein koimmunpräzipitieren	73

8 Danksagung

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi für das interessante Projekt und die exzellente Betreuung.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann für die Übernahme des Zweitgutachtens ganz herzlich bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Schlenstedt, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes für das Screening mit meinem Hefe-zwei-Hybrid System, und an die gesamte Arbeitsgruppe die mir Platz in den Inkubatoren gemacht hat und immer freundlich und hilfsbereit war.

Ich möchte mich bei dem Graduiertenkolleg 845 und Frau Dr. Gabriele Amoroso bedanken, da ich durch die Teilnahme an den unterschiedlichsten Aktivitäten und den Austausch mit anderen Doktorandinnen viel gelernt habe.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Freunden und Kollegen bedanken allen voran Karin Wolske (ohne die das Arbeiten nur halb so viel Spaß gemacht hätte), Lorenz Latta (der immer hilfsbereit und für den kein PC Problem unlösbar ist) und Dr. Ulrich Wissenbach (mit dem man über alles diskutieren kann). Natürlich auch Dr. Pascal Schalkowsky, Dr. Christoph Störger, Sandra Plant, Dr. Janka Dörr, Katja Frohnweiler, Anouar Belkacemi, Dr. Claudia Fecher-Trost und Dr. Stephan Philipp. Ein besonderer Dank geht an Dr. Andreas Beck, für die Hilfe mit den Fura-Versuchen. Für die immer perfekten Zellen möchte ich mich bei Heidi Löhr bedanken.

Ein großes Dankschön geht an die Essensgruppe Florian Mohr, Julia Stab und Sandeep Dembla, die das Mittagessen zu einem Erlebnis gemacht haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Mutter bedanken, ohne deren Unterstützung ich nie so weit gekommen wäre. Vielen Dank!