

Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Die physiologische und pathophysiologische
Rolle des Kinase-gekoppelten Ionenkanals
TRPM6**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades
der Naturwissenschaft
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Annika Wisnowsky
aus Frankfurt (Oder)

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität

1. Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiß
2. Gutachter: PD Dr. Lars Kunz

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2014

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung	1
I Summary.....	2
II Einleitung.....	3
1 TRP-Kanäle.....	3
1.1 Topologie und Assemblierung der TRP-Kanäle.....	5
1.2 Melastatin verwandte TRP-Kanäle – TRPM	8
1.2.1 TRPM6.....	12
1.3 TRP-Kanäle und assoziierte Erkrankungen	15
1.3.1 Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalcämie.....	15
1.3.2 TRPM6 und HSH.....	16
2 Magnesiumhomöostase	18
2.1 Magnesium-Mangel	22
3 Die Laboratoriumsmaus als Tiermodell.....	23
4 Zielsetzung.....	23
III Material	25
1 Verbrauchsmaterialien	25
2 Chemikalien	25
3 Puffer und Lösungen.....	27
4 Enzyme und Kits.....	27
5 Oligonukleotide.....	28
6 Antikörper und Seren	29
7 Versuchstiere.....	30
8 Geräte	31
9 EDV.....	32
IV Methoden	33
1 Generierung der transgenen Mauslinien.....	33
1.1 Generierung der konditionalen Mauslinie <i>Trpm6</i> ^{Δ17/Δ17}	33
1.2 Geninaktivierung durch Verwendung des <i>loxP/Cre</i> -Rekombinase Systems.....	34
1.3 Genetische Konformität	36

1.4 Zuchtschema	36
1.5 Tierhaltung	37
1.6 Auswahl der Tiere	38
1.7 Charakterisierung der Mäuse	38
1.8 Reproduktionsverhalten – Zuchterfolg und Genotyp-Verteilung	39
2 Molekularbiologische Methoden (Genotypisierung der Mäuse).....	39
2.1 DNA-Extraktion.....	40
2.2 DNA-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (PCR)	40
2.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	44
3 Histologische und histochemische Methoden.....	45
3.1 Organentnahme und Fixierung	45
3.2 Einbettung der Organe	46
3.2.1 Einbettung in Gefriermedium - Kryokonservierung	46
3.2.2 Einbettung in Paraffin	46
3.3 Schneiden der Präparate.....	46
3.3.1 Gefrierschnitte mit dem Kryotom	46
3.3.2 Paraffinschnitte mit dem Schlittenmikrotom	47
3.4 Immunhistochemie.....	47
3.4.1 Indirekte Methode (Zwei-Schritt-Methode).....	47
3.4.2 Direkte Methode.....	50
3.4.3 Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode	50
3.4.4 Peroxidase-Reaktion (Meerrettichperoxidase, <i>Horseradish peroxidase</i> HRP)....	51
3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	51
3.6 <i>In-Situ</i> -Hybridisierung	52
3.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	52
4 Biochemische Methoden.....	53
4.1 Stoffwechselläufig	53
4.2 Photometrische Analysen.....	53
4.2.1 Proteinbestimmung im Serum.....	54
4.2.2 Magnesiumbestimmung mit Eriochromschwarz T	54
4.2.3 Calciumbestimmung.....	55
4.2.4 Zinkbestimmung.....	55
4.2.5 Phosphatbestimmung	55
4.2.6 Massenspektrometrie.....	56
4.3 ELISA	56
4.3.1 IGF-I-Immunoassay	57
4.3.2 Insulin-Bestimmung	57
4.3.3 Somatotropin-Bestimmung (<i>Growth-Hormone</i>)	57

4.3.4 Oxidativer Stress	57
4.3.4.1 8-Hydroxydeoxyguanosin-Bestimmung.....	58
4.3.5 Zytokin-Bestimmung	58
4.3.5.1 TNF- α -Bestimmung	58
4.3.5.2 Interleukin 6-Bestimmung.....	58
5 Statistische Auswertung.....	58
V Ergebnisse	60
1 Genotypisierung.....	60
1.1 Genotypisierung mittels PCR	60
1.2 Defiziensnachweis mittels Immunhistochemie.....	62
1.2.1 Immunhistochemischer Spezifitätstest von TRPM6-Antikörpern	63
1.2.2 Immunhistochemischer Nachweis des TRPM6-Proteins in der Maus.....	63
1.2.3 Nachweis des TRPM6 in der Maus mittels <i>In-Situ</i> -Hybridisierung	65
2 Charakterisierung der globalen <i>Trpm6</i>-defizienten Mauslinie	67
2.1 Reproduktionsbiologische Analyse von <i>Trpm6</i> -defizienten Mäusen	67
2.1.1 Zuchterfolg	68
2.1.2 Genotyp-Verteilung.....	68
2.2 Äußere Merkmale der <i>Trpm6</i> -defizienten männlichen Mäuse	69
2.2.1 Körpergewichtsentwicklung.....	70
2.2.2 Überlebensrate.....	71
2.2.3 Erscheinungsbild und Verhalten	72
2.2.4 Skelettanomalien	72
2.2.5 Organentwicklung	73
2.3 Morphologische Untersuchung verschiedener Gewebe von <i>Trpm6</i> -defizienten männlichen Mäusen	75
2.3.1 Übersichtsfärbung histologischer Präparate.....	75
2.3.2 Morphometrische Analyse	88
2.4 Biochemische Analyse von <i>Trpm6</i> -defizienten männlichen Mäusen.....	88
2.4.1 Elektrolythaushalt der <i>Trpm6</i> -defizienten männlichen Mäuse	88
2.4.1.1 Magnesiumhomöostase	89
2.4.1.2 Calcium-, Zink-, und Phosphatbestimmung	91
2.4.1.3 Haupt- und Spurenelementbestimmung mittels Massenspektrometrie	93
2.4.2 Oxidativer Stress	96
2.4.3 Inflammatorischer Stress.....	96
2.4.4 IGF-System	97
2.5 Magnesium-Supplementierung bei der <i>Trpm6</i> -defizienten Mauslinie	97

2.5.1 Reproduktionsbiologische Analyse von <i>Trpm6</i> -defizienten Mäusen mit einer Magnesium-Supplementierung	98
2.5.2 Äußere Merkmale der <i>Trpm6</i> -defizienten männlichen Mäuse mit einer Magnesium-Supplementierung	98
2.5.2.1 Körpergewichtsentwicklung.....	98
2.5.2.2 Überlebensrate	99
2.5.3 Magnesiumhomöostase von <i>Trpm6</i> -defizienten männlichen Mäusen mit einer Magnesium-Supplementierung	101
3 Charakterisierung der intestinalspezifischen <i>Trpm6</i>-defizienten Mauslinie	102
3.1 Äußere Merkmale der intestinalspezifischen <i>Trpm6</i> -defizienten männlichen Mäuse	102
3.1.1 Körpergewichtsentwicklung.....	102
3.1.2 Überlebensrate.....	103
3.2 Magnesiumbalance von intestinalspezifischen <i>Trpm6</i> -defizienten männlichen Mäusen	104
4 Charakterisierung der nierenspezifischen <i>Trpm6</i>-defizienten Mauslinie	107
4.1 Äußere Merkmale der nierenspezifischen <i>Trpm6</i> -defizienten männlichen Mäuse ..	107
4.1.1 Körpergewichtsentwicklung.....	107
4.1.2 Überlebensrate.....	108
4.2 Biochemische Analyse von nierenspezifischen <i>Trpm6</i> -defizienten männlichen Mäusen.....	109
4.2.1. Magnesiumbalance.....	109
VI Diskussion	112
1 Genotypisierung und Reproduktionsanalyse.....	112
2 Expression von <i>Trpm6</i> in der Maus	113
3 Phänotypische Analyse der globalen <i>Trpm6</i>-defizienten Mauslinie.....	114
4 Rolle von TRPM6 im Alterungsprozess	119
5 Magnesium-Supplementierung	123
6 Phänotypische Analyse der intestinalspezifischen <i>Trpm6</i>-defizienten Mauslinie....	124
7 Phänotypische Analyse der nierenspezifischen <i>Trpm6</i>-defizienten Mauslinie.....	125
8 Zusammenfassung und Ausblick	126
VII Literaturverzeichnis.....	129
VIII Anhang.....	147
1 Abkürzungsverzeichnis	147

2 PCR-Ergebnisse der gewebespezifischen <i>Knockout</i>-Mäuse.....	149
3 Immunhistochemischer Spezifitätstest von TRPM6-Antikörper.....	149
4 Immunhistochemischer Nachweis der TRPM6-Deletion in nierenspezifisch-defizienten Mäusen	150
5 <i>In-Situ</i>-Hybridisierung im Kolon intestinalspezifischer defizienter Mäuse.....	151
IX Danksagung	152
X Kongressbeiträge und Publikationen	154
XI Lebenslauf.....	155
XII Eidesstattliche Erklärung.....	156

I Zusammenfassung

Das TRPM6-Protein gehört zur Familie der Melastatin-verwandten TRP-Kanäle. Das Protein verbindet die Eigenschaft eines Ionenkanals mit denen einer atypischen α -Kinase, die kovalent an das C-terminale Ende des Kanalsegments gebunden ist. Der aktive Kationenkanal ist für divalente Kationen permeabel, vor allem für Magnesium und Calcium. TRPM6 wird in Epithelzellen des Intestinaltrakts sowie des distalen Konvoluts der Niere exprimiert. Mutationen des humanen *TRPM6*-Gens führen zu der autosomal rezessiven Erkrankung Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalcämie (HSH), welche durch niedrige Serumkonzentrationen von Magnesium und Calcium gekennzeichnet ist. Diese Erkenntnisse deuten auf eine entscheidende Rolle von TRPM6 in der Magnesiumhomöostase hin. Wie der TRPM6-Kanal in die Magnesiumhomöostase eingreift und was die pathophysiologischen Konsequenzen eines funktionellen TRPM6-Verlustes sind, ist bislang noch unklar.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte ein transgenes Mausmodell für das TRPM6-Protein zum Studium von Mangelerscheinungen entwickelt werden. Dazu wurden organspezifische Defizienzmodelle für *Trm6* mittels *loxP/Cre*-Rekombinase-Technik erstellt und hinsichtlich ihres Phänotyps charakterisiert.

Trpm6-defiziente Mäuse entwickelten eine schwere Magnesiumdefizienz und hatten eine kurze Lebensspanne. Sie waren zwergwüchsig, entwickelten eine Kyphose, Sarkopenie und zeigten reduzierte Fettdepots auf, was zusammen auf eine vorzeitige Alterung hindeutet. Diese phänotypischen Erscheinungen konnten durch eine Magnesiumsupplementation im Futter behoben werden, was darauf hinweist, dass dieser Phänotyp primär durch die Hypomagnesiämie verursacht wird. Durch eine spezifische Inaktivierung des intestinalen TRPM6 konnte gezeigt werden, dass die Störung der Magnesiumhomöostase vor allem durch eine reduzierte Aufnahme des Magnesiums im Intestinaltrakt hervorgerufen wird. Eine nierenspezifische Deletion des *Trpm6* zeigte dagegen keine stark veränderten Serum-magnesiumspiegel.

Der Verlust von TRPM6 führt folglich zu einer schweren Störung des Magnesiumhaushaltes, die von weiteren physiologischen Veränderungen begleitet wird, trotz zahlreicher anderer Magnesiumkanäle und -transporter. Es kann davon ausgegangen werden, dass der TRPM6-Kanal eine entscheidende Rolle im Magnesiumtransport sowie der Homöostase spielt.

Die für diese Arbeit erstmals entwickelten *in vivo* Mausmodelle repräsentieren einen experimentellen Ansatz zum besseren Verständnis der Magnesiumhomöostase und könnten eine Grundlage für weitere eingehende Studien sein wie z.B. die Untersuchung beteiligter Signalkaskaden.

I Summary

TRPM6 is a member of the melastatin-related transient receptor potential channel family, a bifunctional protein comprising a TRP channel segment covalently linked to an α -type serin/threonine protein kinase domain. The active cation channel is highly permeable to a broad range of divalent cations, including magnesium and calcium. TRPM6 is mainly expressed in the intestinal epithelia and the distal convoluted tubule in the kidney. Mutations in the human *TRPM6* gene cause hypomagnesemia with secondary hypocalcemia (HSH), an autosomal recessive disease, characterized by low serum levels of magnesium and calcium. These findings suggest that TRPM6 is crucial for systemic magnesium homeostasis. However, a role of TRPM6 channel in regulation of magnesium homeostasis and the pathophysiological consequences of *TRPM6* mutations remains poorly understood.

This thesis elucidates the physiological role of TRPM6 *in vivo* using conditional inactivation of TRPM6 in mice. A new mouse model lacking TRPM6 in the whole organism has been developed and a comprehensive phenotypic evaluation of the mutants has been performed with the main focus on homeostasis of main minerals.

Furthermore, it is still unclear whether impaired intestinal absorption or renal magnesium wasting causes hypomagnesemia. In order to resolve this issue, mice lines carrying intestine- and kidney-restricted mutations in *Trpm6* were generated and studied.

Trpm6-deficient adult mice develop a profound magnesium deficiency and exhibit a short life span, disability to grow, hypothermia, kyphosis, sarcopenia, reduced fat deposits and immune organs, which indicate a progeroid syndrome. These phenotypes were rescued by supplementation of animals with a magnesium enriched chow demonstrate that accelerated aging is primary induced by magnesium deficiency. Using intestine- and kidney-specific deletions of *Trpm6* reveals that the misbalance in magnesium homeostasis is mainly caused by a reduced intestinal uptake of this mineral.

As a conclusion, TRPM6 plays a key role in magnesium homeostasis despite the presence of numerous other magnesium channels and transporters. *Trpm6*^{-/-} mice represent an experimental *in vivo* model, which is a useful study subject for phenotypic changes in transcellular magnesium transport in whole organism and also allows the further investigation of homeostasis signaling pathways.

II Einleitung

1 TRP-Kanäle

Die *transient receptor potential*-Kanäle stellen eine umfangreiche Familie von Ionenkanälen dar, welche eine außergewöhnliche Anzahl an regulierenden Mechanismen aufweisen. Sie variieren trotz hoher Sequenzhomologie und Strukturähnlichkeit erheblich in ihrer Ionenselektivität und Art der Aktivierung (Montell et al., 2002). Ihre biologische Funktion ist facettenreich und reicht von einer zentralen Rolle in der Sinnesphysiologie (Wahrnehmung von Temperatur, Berührung und Schmerz) bis hin zur Mechanotransduktion, Regulation der Magnesiumhomöostase und Vasoregulation (Montell et al., 2002; Clapham, 2003; Ramsey et al., 2006). Sie reagieren dabei auf eine Vielzahl von extra- und intrazellulären Signalen.

Erstmals wurden TRP-Kanäle im Zusammenhang mit der Phototransduktion von *Drosophila melanogaster* entdeckt (Minke et al., 1975; Montell et al., 1985). Dabei führte eine Mutation im *trp*-Gen zu einem veränderten lichtinduziertem Strom im Auge unter Ausbildung eines transienten Rezeptorpotentials als Antwort auf einen kontinuierlichen Lichtreiz. Das *trp*-Gen kodiert einen Calcium-permeablen, spannungsunabhängigen Ionenkanal (Hardie & Minke, 1992). In der *trp*-Mutante war der durch Licht induzierte Calcium-Einstrom um das 10-fache reduziert (Hardie & Minke, 1992).

Die bislang identifizierten TRP-Proteine werden anhand ihrer Sequenzhomologien in sieben Unterfamilien klassifiziert (Abb. II 1) (Venkatachalam & Montell, 2007). Diese Einteilung ist untypisch, da Ionenkanäle in der Regel aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften oder ihrer biologischen Funktion unterteilt werden (Clapham, 2003). Die Funktion der TRP-Kanäle wurde jedoch erst nach der Klonierung der kodierenden Gene erkannt.

Die höchste Sequenzhomologie zu den TRP-Kanälen in *Drosophila* weisen die TRPC-Kanäle (*classical* oder *canonical*) auf. Die sieben Mitglieder (TRPC1-TRPC7) können aufgrund funktioneller Ähnlichkeiten in vier Untergruppen geteilt werden: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5 (Clapham et al., 2001; Vennekens et al., 2002). Alle weiteren Unterfamilien der TRP-Proteine werden nach dem jeweiligen zuerst klonierten Vertreter benannt.

Die TRPV-Unterfamilie (Vanilloidrezeptor-verwandt) wurde nach dem Vanilloid-Rezeptor 1 (TRPV1) benannt, welcher durch bestimmte aromatische Verbindungen, die eine Vanilloid-Struktur aufweisen, aktiviert wird (Caterina et al., 1997). Sechs Mitglieder sind bekannt, die basierend auf ihrer Sequenzhomologie und Funktion in zwei Gruppen klassifiziert werden können: TRPV1-4 und TRPV5/6 (Wu et al., 2010).

Für die TRPM-Subfamilie (Melastatin-ähnlich) war das erste identifizierte Mitglied, Melastatin (TRPM1), namensgebend. Es wurde durch eine verminderte Expression in malignen Melanozyten entdeckt (Duncan et al., 1998). Weitere sieben Mitglieder gehören zu

dieser Unterfamilie und werden zusammen mit TRPM1 in drei Untergruppen und zusätzlichen zwei einzelne Kanäle geordnet: TRPM1/3, TRPM4/5, TRPM6/7, TRPM2 und TRPM8 (Montell, 2005). Der TRPM6-Kanal ist Schwerpunkt dieser Arbeit und wird in Kapitel II 1.2.1 ausführlich beschrieben sowie deren zugehörige TRPM-Familie (Kap. II 1.2). Das Ankyrin-Transmembran-Protein TRPA1 (ANKTM1) zählt ebenfalls zu den TRP-Kanälen und ist der einzige humane Vertreter dieser Familie. Es wurde bei der Suche nach herunter regulierten Genen nach der onkogenen Transformation von Fibroblasten identifiziert (Jaquemar et al., 1999).

Die Gruppe der TRPN-Proteine wurde nach dem NOMC-Protein (*no mechanoreceptor potential C*) in *Drosophila* benannt (Walker et al., 2000). Bis heute wurden jedoch ausschließlich Vertreter in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Danio rerio* gefunden.

Die bei der polyzystischen Nierenerkrankung (PKD) betroffenen Proteine bilden die TRPP-Familie mit den drei Mitgliedern TRPP2, TRPP3 und TRPP5, welche Calcium-permeabel sind (Montell, 2001).

Die TRPML Unterfamilie (Mucolipin) besteht ebenso aus drei Mitgliedern: TRPML1, TRPML2 und TRPML3. Sie werden vor allem in intrazellulären Endo- und Lysosomen exprimiert (Qian & Noben-Trauth, 2005).

In jüngerer Zeit wurde eine achte Subfamilie der TRP-Kanäle beschrieben: die TRPY-Proteine (*yeast*), die ausschließlich in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden (Palmer et al., 2001; Venkatachalam & Montell, 2007). Diese Existenz verdeutlicht, dass der Ursprung der TRP-Kanäle der Entstehung der Metazoa vorausgeht.

In Säugern sind bislang 28 Proteine mit Sequenzhomologie zum *Drosophila*-TRP-Protein bekannt (Wu et al., 2010). Diese nicht-selektiven Kationenkanäle sind größtenteils permeabel für monovalente und divalente Kationen, wobei die Selektivität einzelner TRP-Kanäle beachtlich variiert (Montell, 2005). Ebenso unterscheiden sich TRP-Kanäle stark in ihren Expressionsmustern. Sie werden in einer großen Anzahl von unterschiedlichen Geweben und Zelltypen exprimiert, was ihre große Anzahl an Funktionen erklären würde. Im Laufe der Forschung an TRP-Kanälen wurden umfangreiche Daten erhoben, welche jedoch außerordentlich widersprüchlich sind. Dies zeigt, wie komplex die Thematik ist.

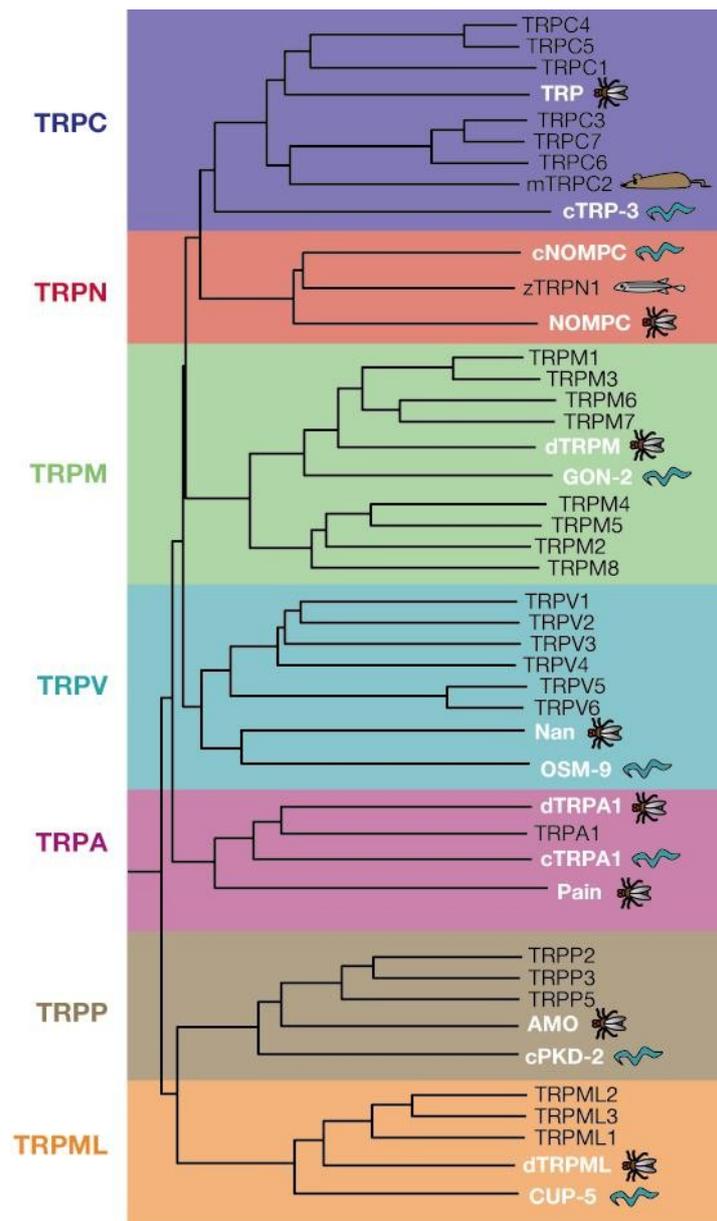


Abb. II 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanalproteine. Die humanen Vertreter sind in schwarzer Schrift dargestellt. Zusätzlich ist je ein homologes TRP-Protein von *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* in weiß mit entsprechendem Symbol gezeigt. TRPC2 ist mit einem m für *mouse* und dem passenden Symbol angegeben, da lediglich ein humanes Pseudogen existiert. In der Unterfamilie TRPN ist als einziger Vertreter jener aus dem *Danio rerio* aufgelistet und mit einem z und Symbol versehen (Venkatchalam & Montell, 2007).

1.1 Topologie und Assemblierung der TRP-Kanäle

Die ersten Vorhersagen der Sekundärstruktur der TRP-Proteine basieren auf Vergleichen mit spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Yellen, 2002). Viele über Kaliumkanäle gewonnene Erkenntnisse konnten für TRP-Kanäle bestätigt werden.

Die Mitglieder der TRP-Familien weisen in ihrer Struktur einige Gemeinsamkeiten auf. Wie in Abbildung II 2 gezeigt ist, bestehen alle TRP-Proteine aus sechs Transmembrandomänen. Zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment, welche über eine hydrophobe Schleife verbunden sind, wird die porenbildende Region vermutet (Vannier et al., 1998). Die amino- und carboxyterminalen Enden liegen intrazellulär (Doyle et al., 1998; Clapham et al., 2001; Montell et al., 2002). Diese intrazellulären Termini sind für jede TRP-Unterfamilie charakteristisch und werden daher ebenfalls zur Klassifizierung herangezogen.

TRPC- und TRPM-Proteine tragen unmittelbar hinter der sechsten Transmembrandomäne die sogenannte TRP-Domäne (Abb. II 2) (Montell, 2005). Diese Region besteht aus 23-25 Aminosäuren und beinhaltet die hochkonservierte TRP-Box1 mit der Konsensussequenz EWKFAR (Clapham, 2003; Montell, 2005). Die Funktion dieser Domäne wurde noch nicht vollständig geklärt. Sie spielt aber vermutlich eine Rolle als Interaktionsstelle für das Phospholipid Phosphatidyl-Inositol-Diphosphat (PIP₂) (Rohacs et al., 2005).

Ein weiteres Merkmal von TRPC und TRPM ist die prolinreiche Region im C-Terminus, welche als TRP-Box2 bezeichnet wird und an der Multimerisierung der Kanaluntereinheiten beteiligt ist (Clapham et al., 2005; Montell, 2005). Durch Co-Immunopräzipitation konnte eine Immunophilin-Interaktion an der prolinreichen Region von TRPC gezeigt werden (Sinkins et al., 2004).

Am N-Terminus der Mitglieder der TRPC-, TRPV-, TRPA- und TRPN-Unterfamilien befinden sich mehrere aufeinanderfolgende Ankyrin-Wiederholungssequenzen (Abb. II 2). Jede einzelne Ankyrin-Sequenz besteht aus 33 Aminosäuren und enthält zwei antiparallel angeordnete α -Helices (Mohler et al., 2002). Es wird angenommen, dass sie bei Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle spielen (Mohler et al., 2002). Diese Strukturen werden außerdem für die Assemblierung von Kanaluntereinheiten benötigt (Erler et al., 2004; Arniges et al., 2006).

Eine weitere charakteristische Region, welche ebenfalls wesentlich für die Assemblierung von Kanaluntereinheiten ist, ist die sogenannte *Coiled-Coil*-Domäne (Abb. II 2). Sie ist bei einigen TRPM-Kanälen (TRPM2 und TRPM8) und TRPC-Kanälen im N-Terminus zu finden (Erler et al., 2006; Mei et al., 2006; Tsuruda et al., 2006). Ein *Coiled-Coil* ist eine stabile lineare Domäne und besteht aus mehreren α -Helices. Durch Superspiralisierung entsteht die typische Tertiärstruktur, welche an der Dimerisierung von Proteinen beteiligt ist (Mason & Arndt, 2004).

Die einzigen bekannten TRP-Kanäle mit einer enzymatischen Domäne am carboxyterminalen Ende sind TRPM2, TRPM6 und TRPM7 (Cahalan, 2001; Riazanova et al., 2001; Ryazanov, 2002).

Die TRPP und TRPML-Unterfamilien besitzen eine lange extrazelluläre Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne (Venkatachalam & Montell, 2007).

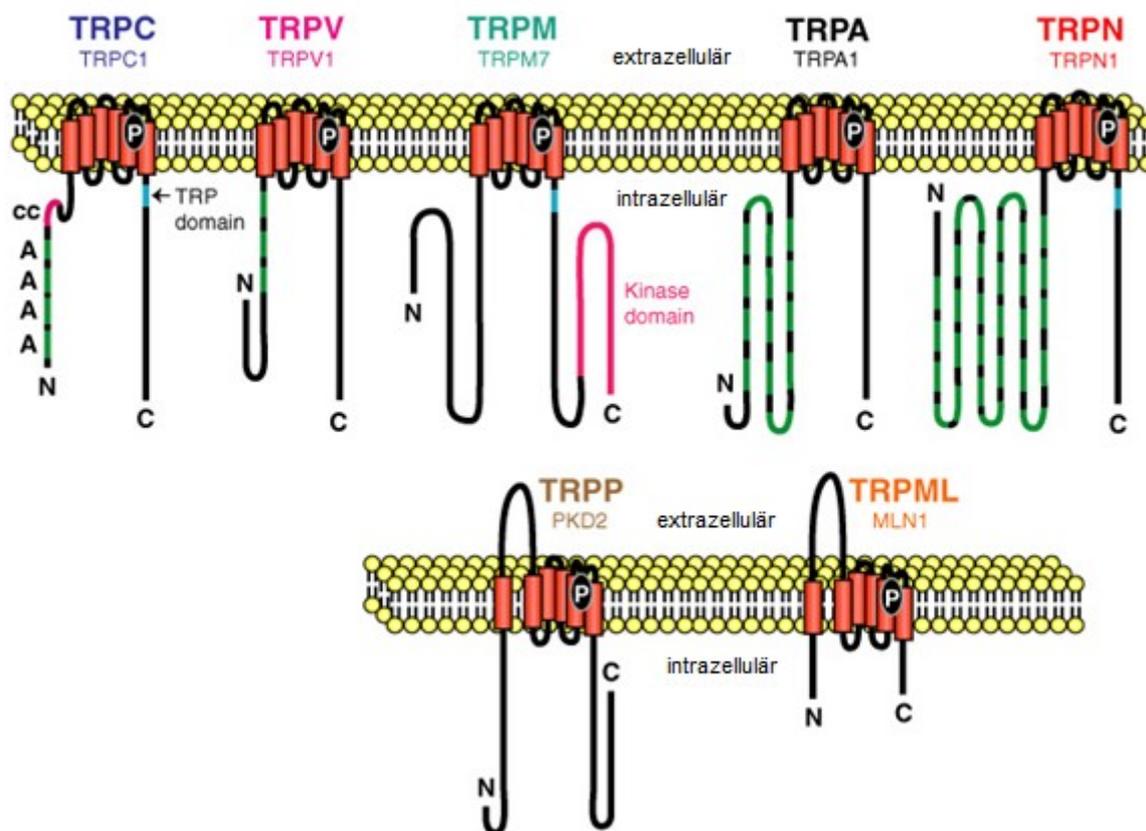


Abb. II 2: Topologie der TRP-Unterfamilien. Aus jeder Subfamilie ist ein Mitglied schematisch dargestellt. Die sechs Transmembrandomänen (rot), die porenbildende Region zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment (schwarze Ellipse, P) und die intrazellulären N- und C-Termini sind bei allen TRP-Proteinen zu finden. Zusätzlich sind die charakteristischen Merkmale eingezeichnet: A, Ankyrin-Wiederholungssequenz (grün); cc, *Coiled-Coil*-Domäne (pink); P, ionenleitende Pore (schwarz); TRP-Domäne (blau); Kinase-Domäne (pink) (modifiziert nach Venkatachalam & Montell, 2007).

Kaliumkanäle bilden einen funktionellen Kanal als Tetramer aus vier Kanaluntereinheiten. Da einige Grundeigenschaften dieser Kanäle ebenso für TRP-Proteine bestätigt werden konnten, kam die Vermutung auf, dass auch TRP-Kanäle tetramerisieren (Liman et al., 1992; Clapham et al., 2001; Hofmann et al., 2002). Diese tetramere Struktur von TRP-Ionenkanälen konnte bestätigt werden (Abb. II 3) (Hoenderop et al., 2003; Erler et al., 2004; Liao et al., 2013). Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von TRPC1, TRPP2 und TRPM8 wiesen ebenfalls die Assemblierung von vier Kanaluntereinheiten nach (Barrera et al., 2007; Kobori et al., 2009; Stewart et al., 2010). Dabei ist eine Homomerisierung wie auch eine Heteromerisierung möglich. Zu einer Formation hetero-tetramerer Kanäle sind jedoch nur nah verwandte Proteine in der Lage (Goel et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Hellwig et al., 2005). Die biophysikalischen Eigenschaften und biologischen Funktionen der TRP-Kanäle lassen sich um ein vielfaches erweitern, da sie durch eine Heteromerisierung moduliert werden können (Xu et al., 1997; Venkatachalam & Montell, 2007).

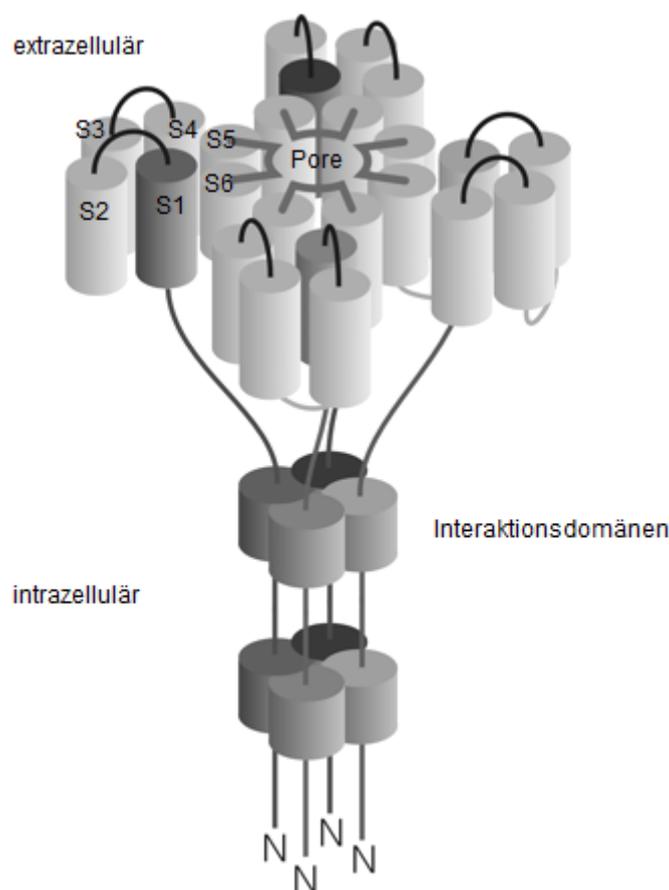


Abb. II 3: TRP-Tetramer. Dargestellt sind die sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und die Kanalpore, welche von den Transmembransegmenten S5 und S6 sowie der verbindenden hydrophoben Schleife gebildet wird. Die Interaktionsdomänen dienen der Assemblierung der vier Kanaluntereinheiten (modifiziert nach Erler et al., 2004).

Die strukturellen Unterschiede der einzelnen TRP-Unterfamilien sowie die Heteromerisierung können das weite Spektrum der unterschiedlichen Aufgaben, die von TRP-Kanälen wahrgenommen werden, erklären.

1.2 Melastatin verwandte TRP-Kanäle – TRPM

Die Unterfamilie der Melastatin verwandten TRP Kanäle bietet eine erstaunliche Variabilität an Kanälen. Sie unterscheiden sich in ihrer Selektivität und Permeabilität für Kationen. Die acht Mitglieder wurden aufgrund ihrer Sequenzhomologie in die drei Gruppen TRPM1/3, TRPM4/5 und TRPM6/7 und die Einzelkanäle TRPM2 und TRPM8 geteilt (Montell, 2005). TRPM-Proteine besitzen eine ~20%-ige Sequenzähnlichkeit mit den (klassischen) TRPC-Kanälen (Montell, 2005). Und wie TRPCs besitzen sie eine C-terminale TRP-Domäne, aber

keine Ankyrin-Wiederholungen am N-terminalen Ende, das im Vergleich zu anderen TRP-Familien verlängert ist. Die Sequenzlänge der C-terminalen Region variiert beträchtlich bei den einzelnen Mitgliedern (Montell, 2005). Die Ionenkanäle TRPM2, TRPM6 und TRPM7 besitzen an ihren langen C-Termini enzymatisch aktive Proteindomänen (Wu et al., 2010).

TRPM1/3-Kanäle

TRPM1 ist das Gründungsmitglied der TRPM-Familie und wurde als putativer Tumorsuppressor identifiziert, da die Expression von TRPM1 in malignen Melanomen mit dem Ausmaß der Metastasierung abnahm (Duncan et al., 1998). Das *TRPM1*-Gen, welches mindestens 31 Exons umfasst, kodiert für verschiedene Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen können. Die Analyse der mRNA wies dabei fünf Isoformen auf, welche Ionenkanäle in humanen Melanozyten, Melanomazellen, neuronale Zellen und der Retina bilden (Hunter et al., 1998; Fang & Setaluri, 2000; Oancea et al., 2009). In einer Studie von Devi *et al.* konnte gezeigt werden, dass ein *knockdown* von TRPM1 die Menge der Melanin-Pigmente reduzierte, was auf eine mögliche Rolle in der Melanogenese hinweist (Devi et al., 2009; Oancea et al., 2009). Bisher ist jedoch wenig über die funktionellen Eigenschaften bzw. zellulären Funktionen des TRPM1-Kanals bekannt. Es scheint eine Funktion im Sehprozess einzunehmen. Durch molekulare, immunhistochemische und elektro-physiologische Methoden an Maus-Retinas konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in der inneren, retinalen Kernschicht angereichert ist (Morgans et al., 2009). Zudem werden Mutationen im humanen TRPM1 mit der kongenitalen, stationären Nachtblindheit (CSNB) assoziiert (Audo et al., 2009; Nakamura et al., 2010).

TRPM3 ist am nächsten verwandt zum TRPM1-Protein. Wie auch bei TRPM1 konnten verschiedene Spleißvarianten beschrieben werden, welche sich in ihren biophysikalischen Eigenschaften erheblich unterscheiden (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005). So ist die Permeabilität für Calcium beim murinen TRPM3 α 2 10-fach höher und für Magnesium 100-fach höher als bei der TRPM3 α 1-Variante (Oberwinkler et al., 2005). Das TRPM3-Protein wird in verschiedenen Geweben exprimiert, vor allem in der Niere, im Plexus des Gehirns sowie der Hypophyse, dem Auge und dem Pankreas (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005). In pankreatischen β -Zellen wird TRPM3 durch das von Säugern endogen gebildete Neurosteroid Pregnenolonsulfat aktiviert, was zu einer Steigerung der Glukose-induzierten Insulinsekretion führt (Wagner et al., 2008). Es wurde darüber hinaus eine Expression in kontraktilen vaskulären glatten Muskelzellen beschrieben (Naylor et al., 2010).

TRPM4/5-Kanäle

TRPM4 und TRPM5 sind in der Lage heteromultimere Komplexe zu bilden, da sie nah verwandte Proteine sind. Sie bilden eine ungewöhnliche TRP-Untergruppe, denn sie sind Calcium-aktivierte Kanäle und die einzigen Mitglieder, welche monovalent selektiv sind und daher impermeabel für Calcium und andere divalente Kationen (Launay et al., 2002; Hofmann et al., 2003; Nilius et al., 2003; Prawitt et al., 2003).

Für das *TRPM4*-Gen existieren zwei Spleißvarianten. TRPM4a bildet vorwiegend einen Calcium-permeablen Ionenkanal, während TRPM4 monovalente Kationen leitet, nachdem es durch intrazelluläre Calciumänderungen aktiviert wurde (Xu et al., 2001; Launay et al., 2002). Der TRPM4-Kanal ist möglicherweise am Calciumeinstrom in Mastzellen beteiligt (Vennekens et al., 2007). Darüber hinaus wird ihm eine Beteiligung an der Regulation der zerebralen Durchblutung zugeschrieben (Reading & Brayden, 2007).

Das *TRPM5*-Gen wurde ursprünglich bei der Suche nach Kandidatengen für Erkrankungen, die mit der Chromosomenposition 11p15.5 gekoppelt sind, entdeckt (Prawitt et al., 2000). Dazu zählt auch das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), das sich im frühen Kindesalter manifestiert. Das TRPM5-Protein wurde unter anderem in den Geschmacksknospen nachgewiesen. Daher wird ihm eine Rolle in der Geschmackstransduktion zugeschrieben (Perez et al., 2002; Zhang et al., 2003). Die Gruppe um Talavera konnte zeigen, dass der TRPM5-Kanal temperatursensitiv ist und bei Temperaturen zwischen 15°C und 35°C aktiviert wird (Talavera et al., 2005).

TRPM2-Kanal

TRPM2 ist ebenfalls wie TRPM6 und 7 ein Chanzym (*channel plus enzyme*). Es bildet einen selektiven Kationenkanal mit einer carboxyterminalen Enzymdomäne, eine ADP-Ribose-Pyrophosphatase (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001). Der Kanal wird durch die intrazelluläre ADP-Ribose, die an die enzymatische Domäne bindet, aktiviert. Außerdem erfolgt eine Aktivierung durch Pyrimidin-Nukleotide und das Nicotinamid-Adeninnukleotid (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001; Kuhn & Luckhoff, 2004). Darüber hinaus kann TRPM2 durch reaktive Sauerstoffspezien (ROS) wie Wasserstoffperoxid aktiviert werden und dient als Sensor für den zellulären Redoxstatus, der möglicherweise an der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose beteiligt ist (Hara et al., 2002; Wehage et al., 2002).

TRPM8-Kanal

Obwohl TRPM8 kein Chanzym ist, besitzt er den größten Verwandtschaftsgrad zum TRPM2. Die Identifikation des Gens erfolgte bei der Suche nach Genen, welche im Prostatakarzinom verstärkt exprimiert werden (Tsavalier et al., 2001). Die Expression wird auch in anderen

Primärtumoren der Mammae, des Darms und der Lunge hochreguliert (Tsavaler et al., 2001). Das TRPM8-Protein bildet einen nichtselektiven, temperatursensitiven Kanal, welcher durch kalte Temperaturen (<28°C) und kältevermittelnde Substanzen wie Menthol, Eukalyptol und Icilin aktiviert wird (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Da TRPM8 in schmerz- und temperatursensitiven Neuronen exprimiert wird, wird angenommen, dass dieser Kanal als Thermosensor für Kälte in sensorischen Neuronen fungiert (Tsavaler et al., 2001; McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002).

TRPM6/7-Kanäle

TRPM6- und TRPM7-Proteine haben einen sehr ungewöhnlichen Strukturaufbau. An ihren langen C-terminalen Enden ist jeweils eine atypische Serin/Threonin-Proteinkinase gekoppelt (Nadler et al., 2001; Runnels et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Kinase des TRPM7 das Protein selbst und Annexin I phosphorylieren kann, jedoch ist die physiologische Bedeutung dieser Phosphorylierungen noch unklar (Dorovkov & Ryazanov, 2004; Matsushita et al., 2005).

Beide TRPM-Kanäle sind an der zellulären Magnesiumhomöostase beteiligt. Sie sind die ersten Kanäle, welche stark permeabel für Magnesium sind (Nadler et al., 2001; Voets et al., 2004). Sie leiten neben Magnesium auch andere divalente Ionen wie Calcium und Zink. Die Aktivität der Kanäle wird durch die intrazelluläre Magnesiumkonzentration reguliert (Voets et al., 2004).

Mutationen im *TRPM6*-Gen führen zu der autosomal rezessiv vererbten Erkrankung Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalcämie (HSH, Kap. II 1.3.1) (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Dies ließ darauf schließen, dass der Kanal für die Magnesium-(Re)absorption in der Niere und im Darm verantwortlich ist.

TRPM7 und TRPM6, welches in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, sind in der Lage Heteromere auszubilden. Jedoch wird TRPM7 im Gegensatz zu TRPM6 ubiquitär exprimiert (Nadler et al., 2001; Runnels et al., 2001). Durch intrazelluläres Magnesium, Magnesium-ATP und auch Magnesium-GTP kann der konstitutiv aktive TRPM7-Kanal inhibiert werden (Nadler et al., 2001; Demeuse et al., 2006). Auf Grund des umfangreichen Expressionsmusters, der Magnesiumpermeabilität und der gleichzeitigen Regulation durch Magnesium, wurde dem TRPM7-Kanal eine grundlegende Rolle in magnesium-abhängigen Prozessen zugesprochen.

Trotz ähnlicher Struktur und Fähigkeiten der beiden Kanäle, können sich diese nicht gegenseitig kompensieren. So konnten überexprimierte TRPM6-Proteine das Absterben von TRPM7-defizienten DT-40-Zellen nicht verhindern (Schmitz et al., 2005). Dementsprechend übernimmt TRPM7 auch nicht die Funktion des TRPM6-Kanals in HSH-Patienten (Kap. II 1.3.2).

Der für die Arbeit relevante TRPM6-Kanal wird im Folgenden nochmals genauer vorgestellt.

1.2.1 TRPM6

Die Suche nach Homologen der *elongation factor II* Kinase führte 2001 zu der Entdeckung von α -Kinasen. Dazu gehört die *kidney α -kinase*, welche ebenfalls eine Sequenzhomologie zu den Ionenkanälen TRP aufwies (Riazanova et al., 2001). Nachfolgend wurde das Protein ChaK2 (*channel-kinase 2*) genannt, welches heute als TRPM6 bekannt ist (Ryazanov, 2002). Das TRPM6-Protein ist aufgrund der enzymatischen Domäne am C-terminalen Ende des Kanal-Segmentes bifunktional und wird als Chanzym (*channel plus enzyme*) bezeichnet (Cahalan, 2001). Die kovalent gebundene α -Kinase ist eine atypische Serin/Threonin-Proteinkinase, welche ihre Substrate innerhalb der α -Helices phosphoryliert (Ryazanov et al., 1988; Drennan & Ryazanov, 2004).

Das humane *TRPM6*-Gen (NCBI ID 140803) ist auf dem Chromsom 9 an der Position 9q21.13 lokalisiert und umfasst 39 Exons (Abb. II 4) (Schlingmann et al., 2002). Durch alternatives Spleißen werden multiple mRNA Isoformen exprimiert. So wurden drei alternative erste Exons gefunden, welche in drei vollständige mRNA-Varianten resultieren: *TRPM6a*, *TRPM6b* und *TRPM6c* (Chubanov et al., 2004). Ob diese verschiedenen Isoformen sich in ihren bio-physikalischen Eigenschaften unterscheiden ist bis heute noch unklar, da bisher in den meisten Untersuchungen ein Augenmerk auf das TRPM6a-Protein gelegt wurde. Zusätzlich wurden verkürzte Transkripte gefunden, bei denen Exons, die für Kanal-Segmente kodieren, nicht translatiert werden. Diese drei Genprodukte werden dementsprechend M6-Kinase 1, 2 und 3 genannt (Chubanov et al., 2004). Eine Testikel-spezifische Variante, welche das alternative Exon 36B enthält und in einem Stop-Codon endet, wurde ebenfalls identifiziert. Es kodiert lediglich eine Kanal-Untereinheit ohne Kinase-Domäne (Chubanov et al., 2004).

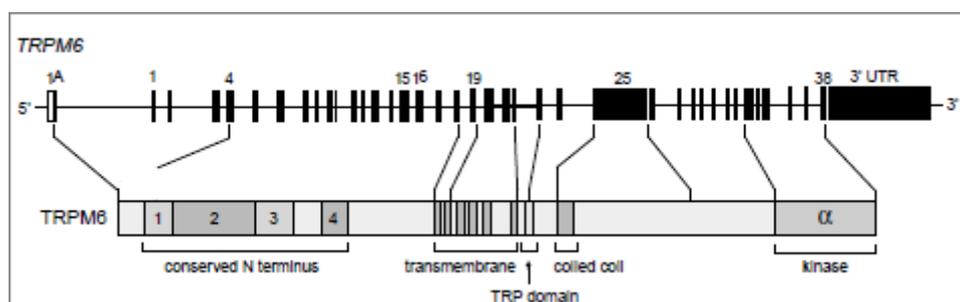


Abb. II 4: Organisation des humanen *TRPM6*-Gens und mRNA-Struktur. Das Gen umfasst 39 Exons (schwarze Boxen) inklusive das zusätzliche Exon 1A (modifiziert nach Schlingmann et al., 2002).

Die Expression von *TRPM6* wurde in unabhängigen Studien untersucht. So konnten *TRPM6*-Transkripte im Intestinaltrakt sowie in der Niere identifiziert werden (Schlingmann et al., 2002; Voets et al., 2004). Weitere Experimente an Rattennieren wiesen eine erhöhte

Expression des TRPM6-Kanals im distalen Konvolut auf, im Gegensatz zu einem niedrigen Expressionsspiegel im proximalen Tubulus und Sammelrohr. Das Expressionsmuster des humanen *TRPM6* wurde mittels *in situ* Hybridisierung geprüft. Dabei konnte das *TRPM6* im distalen Konvolut der Niere und zusätzlich in den Epithelialzellen des Kolon nachgewiesen werden (Schlingmann et al., 2002). Zusätzliche Northern-Blot Analysen von verschiedenen humanen Gewebeproben konnten eine hohe Expressionsrate in Niere, Kolon und Testikel zeigen. Es wurden aber auch schwache Signale in Lunge und Leukozyten detektiert (Schlingmann et al., 2002). Durch die Immunfluoreszenzfärbung des murinen TRPM6 mit einem polyklonalen TRPM6-spezifischen Antikörper konnte gezeigt werden, dass das Protein überwiegend auf der apikalen Seite von distalen Tubulus-Zellen (DCT) in der Niere und in Epithelzellen des Duodenums lokalisiert ist (Voets et al., 2004). Der Kanal konnte in verschiedenen Zell-Linien detektiert werden. In unterschiedlichen Studien mit Hilfe von Western-Blots und RT-PCRs wurde die Expression des *TRPM6* in HEK 293 Zellen, kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen H69 und H510, humanen bronchialen Epithelzellen (Chubanov et al., 2004), primären glatten Mausmuskelzellen (Touyz et al., 2006), humanen Mammakarzinomzellen MCF-7 (Guilbert et al., 2009), intestinalen Epithelzellen Caco 2 (Gouadon et al., 2012) und murinen Gasser- und Spiral-Ganglien gezeigt (Vandewauw et al., 2013).

Wie andere TRP-Kanäle bildet TRPM6 ein Tetramer für einen funktionsfähigen Kanal. Mit seinem nächsten Verwandten, dem TRPM7-Protein, kann es heteromerisieren. Ob TRPM6 in der Lage ist, homomere Kanäle zu bilden, ist umstritten. Einige Studien konnten funktionale homomere TRPM6-Kanäle detektieren, deren biophysikalischen Charakteristika dem TRPM7 sehr ähneln (Voets et al., 2004; Li et al., 2006; Topala et al., 2007; Xie et al., 2011). Andere Gruppen untersuchten verschiedene Expressionssysteme für die Charakterisierung des TRPM6, stellten aber fest, dass TRPM6 keinen effizienten homomultimeren Kanal-Komplex bilden kann (Chubanov et al., 2004; Schmitz et al., 2005; Chubanov et al., 2007). Erst nach einer Koexpression mit TRPM7 konnte das TRPM6-Protein detektiert werden. Die Koexpression der beiden Kanäle führte zu einer deutlichen Amplifikation der TRPM7-typischen Ströme (MIC: *magnesium-inhibited currents*; MagNuM: *magnesium nucleotide-regulated metal ion currents*) (Chubanov et al., 2004). Die Magnesium-Leitfähigkeit des TRPM6-Kanals ist gegenüber der des TRPM7-Kanals fünffach erhöht (Voets et al., 2004). Beide können aber durch intrazelluläres Magnesium, ATP, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), Wasserstoffperoxid, 17 β -Estradiol und Sphingosin inhibiert werden (Voets et al., 2004; Li et al., 2006; Cao et al., 2010; Xie et al., 2011; Qin et al., 2013). Bei beiden Kanälen konnte eine pH-Sensitivität nachgewiesen werden, welche allerdings schwächer bei TRPM6 ausgeprägt ist (Li et al., 2006). Ein großer Unterschied ist dagegen die Kanalaktivität nach der Zugabe von 2-Aminoethoxid-Diphenylborat (2-APB). Während mikromolare Konzentrationen von 2-APB den TRPM7-Kanal inhibieren, potenziert es die Kanalaktivität bei TRPM6 (Li et al., 2006).

Bislang ist sehr wenig über die Kinaseaktivität des TRPM6 bekannt. Die Gruppe um Cao stellte eine mögliche Interaktion der Kinase-Domäne von TRPM6 mit dem Rezeptor der aktivierten Proteinkinase C 1 (RACK1), der Methioninsulfoxid-Reduktase B1 (MsrB1) und dem *repressor of estrogen receptor activity* (REA) fest (Cao et al., 2008; Cao et al., 2009; Cao et al., 2010). *In vitro* Studien konnten zeigen, dass die TRPM6-Kinase Myosin IIA, IIB und IIC phosphoryliert, wie auch die Kinase des TRPM7-Proteins (Clark et al., 2006; Clark et al., 2008a). Daher wurde vermutet, dass möglicherweise auch andere Substrate der TRPM7-Kinase von TRPM6 phosphoryliert werden können, wie Annexin A1, die *elongation factor II* Kinase oder Phospholipase C γ 2 (Dorovkov & Ryazanov, 2004; Perraud et al., 2011; Deason-Towne et al., 2012). Jedoch konnte dies bisher noch nicht *in vivo* nachgewiesen werden. TRPM6 ist aber zur Autophosphorylierung in der Lage und kann ebenfalls TRPM7, unter Bildung eines Heteromers, phosphorylieren (Schmitz et al., 2005; Clark et al., 2008b). Die physiologische Bedeutung und funktionalen Konsequenzen dieser Phosphorylierungen sind dennoch unklar.

Im Jahre 2002 stellten zwei unabhängige Arbeitsgruppen zeitgleich fest, dass Mutationen des *TRPM6*-Gens zur Ausprägung der Erkrankung Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalcämie (HSH; Kap. II 1.3.1) führen (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Das Expressionsmuster von *TRPM6* sowie deren Beteiligung an der HSH unterstützen die Hypothese, dass der TRPM6-Kanal am Magnesiumtransport in die Epithelzellen von Darm und Niere beteiligt und somit verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Magnesiumbalance im gesamten Organismus ist. In Tiermodellen, bei denen eine Hypomagnesiämie induziert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Trpm6* verändert war, was ebenfalls darauf schließen lässt, dass der TRPM6-Kanal eine wichtige Rolle in den erworbenen Formen der Hypomagnesiämie und der Magnesiumhomöostase spielt (da Silva et al., 2009; Dimke et al., 2010; Bai et al., 2012; Famularo et al., 2013; Lameris et al., 2013; Ledeganck et al., 2013; Perazella, 2013; van Angelen et al., 2013).

Um die physiologische Rolle des TRPM6-Kanals *in vivo* aufzuklären, versuchten bisher nur zwei Forschungsgruppen ein Tiermodell mit genetisch modifizierten Mäusen zu etablieren. Dabei verhinderte jedoch die hohe Letalität in der frühen embryonalen Entwicklung das Studium von adulten *Trpm6*-gendifizienten Mäusen. Walder *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass *Trpm6*-defiziente Mäuse am Embryonaltag 12,5 versterben (Walder et al., 2009). Einige wenige Tiere, welche etwas älter wurden, wiesen zudem Neuralrohrdefekte auf. Daher kamen die Autoren zu dem Schluss, dass TRPM6 eine direkte Rolle in der Neuralrohrentwicklung spielt. Eine weitere Gruppe stellte ebenfalls fest, dass Mäuse mit einer homozygoten konstitutiven TRPM6-Inaktivierung nicht lebensfähig sind (Woudenberg-Vrenken et al., 2011).

1.3 TRP-Kanäle und assoziierte Erkrankungen

Eine große Bedeutung der TRP-Kanäle besteht nicht nur in ihrer Rolle in der sensorischen Physiologie, sondern auch in der Pathophysiologie. Mutationen und damit verbundene Störungen ihrer Funktion konnten mit diversen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Nilius & Voets, 2005; Venkatachalam & Montell, 2007). Beispielsweise hat die Gruppe um Sweeney erkannt, dass die Expression von TRPC1 in proliferierenden glatten Muskelzellen im Atemweg erhöht ist und dieser eine Rolle in Asthma und der chronischen obstruktiven Pneumopathie spielen könnte (Sweeney et al., 2002). Bei der autosomal dominant vererbten Glomerulosklerose (FSGS) wurden verschiedene *missense*-Mutationen im *TRPC6*-Gen identifiziert (Reiser et al., 2005; Winn et al., 2005). Bestimmte Mutationen in den für *TRPP1* und *TRPP2* kodierenden Genen führten zur autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) (Wu et al., 2000; Hsu et al., 2007). Die lysosomale Speicherkrankheit Mucopolysaccharidose Typ IV kann durch *nonsense*- oder *missense*-Mutationen in *TRPML1* verursacht werden (Bassi et al., 2000; Altarescu et al., 2002). *TRPV5*-Null-Mäuse weisen eine verringerte Ca^{2+} -Reabsorption in der Niere auf, was zu einer schweren Hyperkalziurie, Ansäuerung des Urins und reduzierten Knochendichte führt (Hoenderop et al., 2003; Mensenkamp et al., 2007). Die TRPV6- und TRPV8-Kanäle werden in Prostata-, Brust-, Schilddrüsen- sowie Kolonkarzinomen überexprimiert (Tsavaler et al., 2001; Zhuang et al., 2002). Demgegenüber wird für TRPM1 eine Funktion als Tumorsuppressor diskutiert (Duncan et al., 2001). Seit einer neueren Studie ist zusätzlich bekannt, dass Mutationen in TRP-Kanälen auch degenerative Erkrankungen der peripheren Nerven auslösen können (Landouere et al., 2010).

Loss of function-Mutationen im *TRPM6*-Gen sind der Grund für die seltene Erkrankung Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalcämie (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Auf sie soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

1.3.1 Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalcämie

Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalcämie (HSH) wurde zum ersten Mal durch Paunier *et al.* (1968) beschrieben. Bisher sind jedoch nur einzelne Familien betroffen. Aufgrund einer Prädominanz beim männlichen Geschlecht wurde zunächst ein X-chromosomaler Erbgang vermutet (Vainsel et al., 1970; Chery et al., 1994). Später konnte jedoch aufgrund genetischer Untersuchungen an betroffenen Familien, der für die HSH verantwortliche Genort auf dem Chromosom 9q12-9q22.2 lokalisiert werden (Walder et al., 1997). Diese autosomal rezessiv vererbte Erkrankung manifestiert sich bereits im Säuglingsalter. Die betroffenen Individuen weisen einen extrem niedrigen Magnesiumspiegel sowie einen sehr niedrigen Calciumspiegel im Serum auf. So wurden HSH-Patienten beschrieben mit einer Magnesiumkonzentration von nur 0,04 mmol/l. Der Durchschnitt dieser Patienten liegt bei 0,24 mmol/l für Magnesium und

für Calcium bei 1-1,6 mmol/l (Shalev et al., 1998). Der normale Serumgehalt beträgt 0,7-1,1 mmol/l Magnesium und 2,2-2,9 mmol/l Calcium. Durch den außergewöhnlichen Magnesiummangel und der sich sekundär entwickelnden Hypocalcämie kommt es vor allem zu neuromuskulären Auffälligkeiten wie Muskelkrämpfen, Tetanien und zerebralen Krampfanfällen. Ältere Kinder zeigen eine veränderte Sprachmotorik und choreatiforme Bewegungsstörungen. Wird eine HSH-Erkrankung nicht erkannt und bleibt unbehandelt, kann sie zu dauerhaften neurologischen Schäden und sogar zum Tod führen (Shalev et al., 1998; Schlingmann & Gudermann, 2005). Der Krankheitsverlauf lässt sich mit einer lebenslangen oralen Magnesiumzugabe, welche sehr hoch dosiert ist, günstig beeinflussen. Durch die teilweise 16-fach erhöhte Dosis des normalen Tagesbedarfs kann die intestinale Magnesiumaufnahme (Kap II 2) gesteigert werden (Cole & Quamme, 2000). Der Serum-Magnesiumspiegel normalisiert sich jedoch nicht vollständig (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002; Konrad et al., 2004). Er reicht aber aus, um eine normale Körperfunktion zu gewährleisten.

Die primäre Ursache des Magnesiumverlustes ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Zunächst wurde angenommen, dass allein ein intestinaler Magnesium-Absorptionsdefekt verantwortlich sei (Milla et al., 1979; Shalev et al., 1998). Bei einigen Patienten konnte aber ebenfalls eine erhöhte renale Magnesiumausscheidung festgestellt werden und somit eine gestörte Magnesiumreabsorption in der Niere (Matzkin et al., 1989). Der sekundäre Calciumverlust wird durch eine verminderte Sekretion des Parathormons, welches normalerweise für die Reabsorption des Calciums im distalen Nephron verantwortlich ist, hervorgerufen (Anast et al., 1972). Magnesiummangel hemmt die Funktion der Nebenschilddrüse, deren Produkt das Parathormon ist, so dass es nachfolgend zum Calciummangel kommt (Vetter & Lohse, 2002). Die Behandlung mit hohen oralen Magnesiumdosen wirkt sich daher indirekt auf den Calciumspiegel im Serum aus und bringt diesen auf ein annähernd normales Niveau (Schlingmann et al., 2002; Schlingmann et al., 2007).

1.3.2 TRPM6 und HSH

Zwei unabhängige Arbeitsgruppen konnten zeitgleich zeigen, dass Mutationen im humanen *TRPM6*-Gen zu der autosomal rezessiv vererbten HSH führen (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Somit wurde dem TRPM6 eine Beteiligung an der Magnesiumabsorption zugesprochen. Dementsprechend wird das TRPM6-Protein hauptsächlich im Bürstensaum des Intestinaltraktes und der apikalen Membran des distalen Konvoluts der Niere exprimiert (Kap. II 1.2.1), wo die aktive Magnesiumaufnahme stattfindet (Voets et al., 2004).

Die meisten bekannten *TRPM6*-Mutationen bei HSH-Patienten führen zu verfrühten Stopcodons, Verschiebungen des Leserasters oder alternativem Spleißen, was die Expression

des TRPM6-Proteins verhindert und in einem *loss of function* Phänotyp resultiert (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002; Chubanov et al., 2004; Chubanov et al., 2007). Zusätzlich wurden fünf Punktmutationen beschrieben, von denen vier im N-Terminus lokalisiert sind, welcher eine kritische Rolle in der Kanalfunktion spielt. So wird bei der Punktmutation S141L das mutierte Protein komplett translatiert, bildet jedoch aufgrund einer gestörten Multimerisierung keinen funktionellen Kanal mehr (Chubanov et al., 2004). Eine weitere Punktmutation, P1017R, wurde in der putativen Poren-Region lokalisiert (Chubanov et al., 2007). Diese Mutation beeinträchtigt die Kanalaktivität und Magnesiumionen können nicht mehr in die Zelle geleitet werden. Diese Studien unterstützen die Rolle des TRPM6-Kanals in der Magnesiumabsorption. Er scheint dort eine zentrale Stellung einzunehmen. Da durch Mutationen im *TRPM6*-Gen die Magnesiumhomöostase im gesamten Organismus gestört ist, ist TRPM6 wahrscheinlich das verantwortliche Protein für den aktiven transzellulären Transportweg (Kap. II 2). Es nimmt die Magnesiumionen apikal in die Epithelzellen des Darms auf wie auch im distalen Konvolut des Nephrons. Bei HSH-Patienten ist aufgrund defekter TRPM6-Kanäle diese Magnesiumaufnahme nicht mehr gewährleistet. Magnesiumionen können nur noch über den passiven parazellulären Weg aufgenommen werden, welcher im Darm durch eine hoch dosierte orale Magnesiumverabreichung gesteigert werden kann (Abb. II 5).

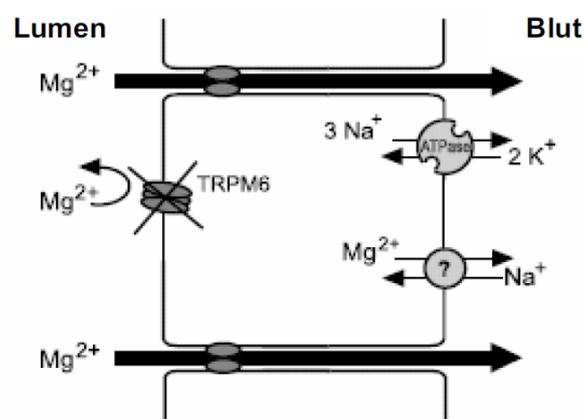


Abb. II 5: Magnesiumabsorption im Intestinaltrakt eines HSH-Patienten. Der aktive transzelluläre Transportweg ist aufgrund defekter TRPM6-Kanäle gehindert. Durch hochdosierte orale Magnesiumzugabe wird die parazelluläre Magnesiumabsorption jedoch verstärkt. An der basolateralen Membran befinden sich Natrium-Kalium-Pumpen sowie vermutlich Magnesium-Natrium-Austauscher (modifiziert nach Konrad et al., 2004).

In der Niere ist jedoch im distalen Konvolut die Magnesiumreabsorption komplett unterbunden, da ausschließlich der aktive transzelluläre Transport stattfindet (Kap. II 2; (Quamme, 1989; Dai et al., 1997). Eine Magnesiumgewinnung ist nur in den davorliegenden Tubulusabschnitten möglich.

2 Magnesiumhomöostase

Magnesium ist eines der wichtigsten zellulären Kationen im Organismus. Es spielt eine zentrale Rolle in Stoffwechselprozessen, in der Regulation des Zellzyklus und ist an der Aktivierung und Regulation von über 300 bekannten Enzymen beteiligt (Romani & Scarpa, 2000; Konrad et al., 2004; Romani, 2011). Es stabilisiert als Strukturelement die Plasmamembran, Ribosomen und Nukleinsäuren (Altura & Altura, 1996). Eine weitere überaus wichtige Funktion des Magnesiums besteht darin, als Komplexpartner von Adenosintriphosphat (ATP) zu fungieren. Denn vor allem mit dem Magnesium-ATP-Komplex ist die energiebereitstellende Funktion des ATPs gegeben (Dufour et al., 1980). Somit ist eine intakte Magnesiumhomöostase Voraussetzung für die Aufrechterhaltung vieler Lebensvorgänge.

Die Magnesiumbalance im gesamten Organismus wird durch das Zusammenspiel der Absorption im Intestinaltrakt, der Speicherung und Freisetzung im Knochen und der Exkretion durch die Niere streng geregelt und aufrecht erhalten (Romani, 2011), wobei die Gesamtheit der Regulationsvorgänge bisher noch nicht aufgeklärt ist.

Die Magnesiumkonzentration des Gewebes eines erwachsenen Menschen beträgt im Durchschnitt 20-28 g (Yago et al., 2000). Dabei sind etwa 52% des Magnesiums im Knochen gespeichert. 46% sind in den Muskeln zu finden und nur 2% sind in extrazellulären Flüssigkeiten lokalisiert (Yago et al., 2000). Die totale Magnesiumkonzentration auf zellulärer Ebene in Säugetierzellen beträgt 17 – 20 mM (Romani & Scarpa, 1992; Wolf et al., 2003). Der Großteil (15-18 mM) des Magnesiums liegt allerdings in der Zelle gebunden vor und in nur sehr geringen Mengen in ionisierter Form. Es ist an Phospholipide, Proteine, Nukleinsäuren und Nukleotide gebunden. Die zytosolische Magnesiumkonzentration an freien Magnesiumionen wird zwischen 0,5 – 1,2 mM aufrecht erhalten (Jung et al., 1990; Rutter et al., 1990; Romani, 2007).

Mit der Nahrung sollten 300 – 350 mg Magnesium pro Tag aufgenommen werden und in den Magen-Darm-Trakt gelangen (Kerstan & Quamme, 2002). Davon werden unter normalen physiologischen Bedingungen 30-50% hauptsächlich im Dünndarm aufgenommen. Bei einem Magnesiumdefizit oder reduzierter oraler Aufnahme kann die intestinale Absorptionsrate jedoch bis auf zu 70% kompensatorisch erhöht werden (Brannan et al., 1976).

In den Glomeruli der Niere wird aus dem Blut der Primärharn gefiltert und in die Nierentubuli weitergeleitet, wo die Resorption der benötigten Elektrolyte stattfindet. Etwa 80% des Magnesiums aus dem Serum wird dabei in den Glomeruli gefiltert und >95% entlang des Nephrons reabsorbiert (Abb. II 6) (Cole & Quamme, 2000; Konrad et al., 2004). Im proximalen Tubulus wird mit 15-20% nur ein geringer Teil des glomerulär gefilterten Magnesiums rückresorbiert (Quamme, 1997). Der Hauptanteil der Magnesiumreabsorption (65-70%) findet in der Henleschen Schleife statt, insbesondere im dicken kortikalen Abschnitt des aufsteigenden Astes (Quamme, 1989). Nur noch 5-10% Magnesium werden im distalen

Konvolut resorbiert, was die geringste Menge darstellt (Quamme, 1989). Dennoch wird in diesem Tubulusabschnitt die endgültige Ausscheidungsmenge und somit die Feineinstellung des Magnesiumhaushaltes bestimmt, da keine bedeutsame Magnesiumresorption im nachfolgenden Tubulus mehr stattfindet (Brunette et al., 1978; Bengel et al., 1980). Am Ende werden nur 3-5% des glomerulär filtrierten Magnesiums mit dem Endharn ausgeschieden (Satoh & Romero, 2002). Die Niere ist aber auch in der Lage bei einem Magnesium-Mangel das gefilterte Magnesium fast komplett zu reabsorbieren (Satoh & Romero, 2002).

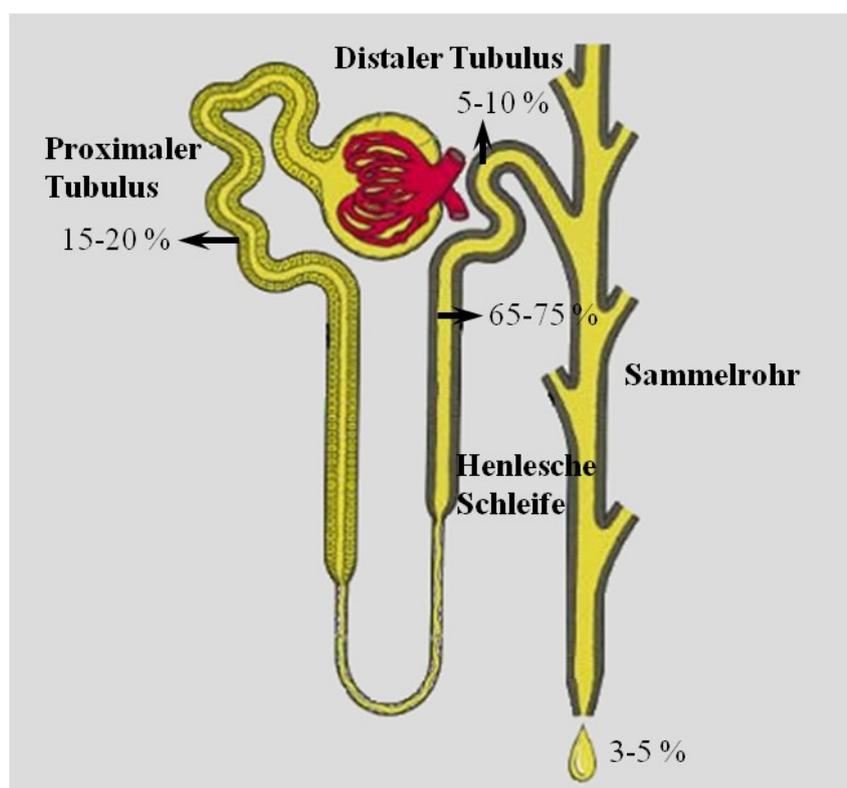


Abb. II 6: Magnesium-Reabsorptionsraten in den verschiedenen Tubulusabschnitten des Nephrons. Die verschiedenen Raten aus dem glomerulär filtrierten Magnesium sind je nach Tubulusabschnitt in Prozent angegeben sowie der Magnesiumverlust mit dem Urin.

Die intestinale und renale Absorption von Magnesium wird prinzipiell über zwei verschiedene Transportwege geregelt: den parazellulären und den transzellulären Weg (Fine et al., 1991; Kerstan & Quamme, 2002). Der parazelluläre Weg folgt passiv dem Konzentrationsgefälle und dem elektrochemischen Gradienten zwischen den Epithelzellen und vorbei an Zell-Zell-Verbindungen (*tight junctions*) hindurch in die Blutbahn (Phillips et al., 1991). Es wird angenommen, dass zusätzliche aktive Komponenten an der Ionenaufnahme beteiligt sind (Karbach & Feldmeier, 1991). So konnte gezeigt werden, dass Paracellin-1 (Claudin-16) bei der Formation der *tight junctions* involviert ist und eine Rolle in der Magnesiumabsorption

spielt (Simon et al., 1999; Wong & Goodenough, 1999). Der transzelluläre Transportweg erfolgt aktiv durch die Zelle hindurch. Die Magnesiumionen müssen dazu apikal ins Zellinnere transportiert werden, vermutlich über selektive Magnesiumionenkanäle (Dai et al., 2001). Ein entscheidender Ionenkanal für den epithelialen Magnesiumtransport wurde mit dem TRPM6-Kanal entdeckt, welcher an der erblichen HSH (Kap. II 1.3.1) beteiligt ist (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Aber auch der TRPM7-Kanal wird als Magnesiumtransporter, der die intrazelluläre Magnesiumkonzentration reguliert, vermutet (Nadler et al., 2001; Schmitz et al., 2005). Der Magnesiumausstrom aus der Zelle an der basolateralen Membran ist bisher nur gering verstanden. Möglicherweise ist ein Natrium-Magnesium-Austausch daran beteiligt (Gunther, 1993; Quamme, 1997; Dai et al., 2001). An der basolateralen Membran konnte ein Magnesium-/Calcium-sensitiver Rezeptor lokalisiert werden, welcher an der Transportregulation beteiligt sein soll (Yang et al., 1997; Bapty et al., 1998).

Unter normalen physiologischen Bedingungen erfolgt die primäre intestinale Magnesiumaufnahme im Dünndarm aus einer Kombination des parazellulären sowie des transzellulären Transportweges (Abb. II 7) (Schlingmann & Gudermann, 2005; Schlingmann et al., 2007). Bei geringen intraluminalen Magnesiumkonzentrationen besteht zwischen dem Darmlumen und dem Interstitium kein bedeutendes Konzentrationsgefälle und das Magnesium wird primär über den transzellulären Weg aufgenommen. In der Niere unterscheiden sich die Magnesiumreabsorptionsraten in ihrem Ausmaß je nach Tubulusabschnitt, wie oben beschrieben. Die Transportwege unterscheiden sich ebenso in den verschiedenen Tubuli (Abb. II 7). Im proximalen Konvolut werden die Magnesiumionen über den passiven parazellulären Weg aufgenommen (Wong et al., 1979; Quamme, 1982). Ebenso ist der Transportweg in der Henleschen Schleife parazellulärer Natur, aufrechterhalten durch den elektrochemischen Gradienten über dem Epithel (Quamme, 1982; Mandon et al., 1993). Im distalen Konvolut findet jedoch ausschließlich der aktive transzelluläre Transport statt, unabhängig von Konzentrationsgefälle oder elektrochemischem Gradienten (Quamme, 1989; Dai et al., 1997).

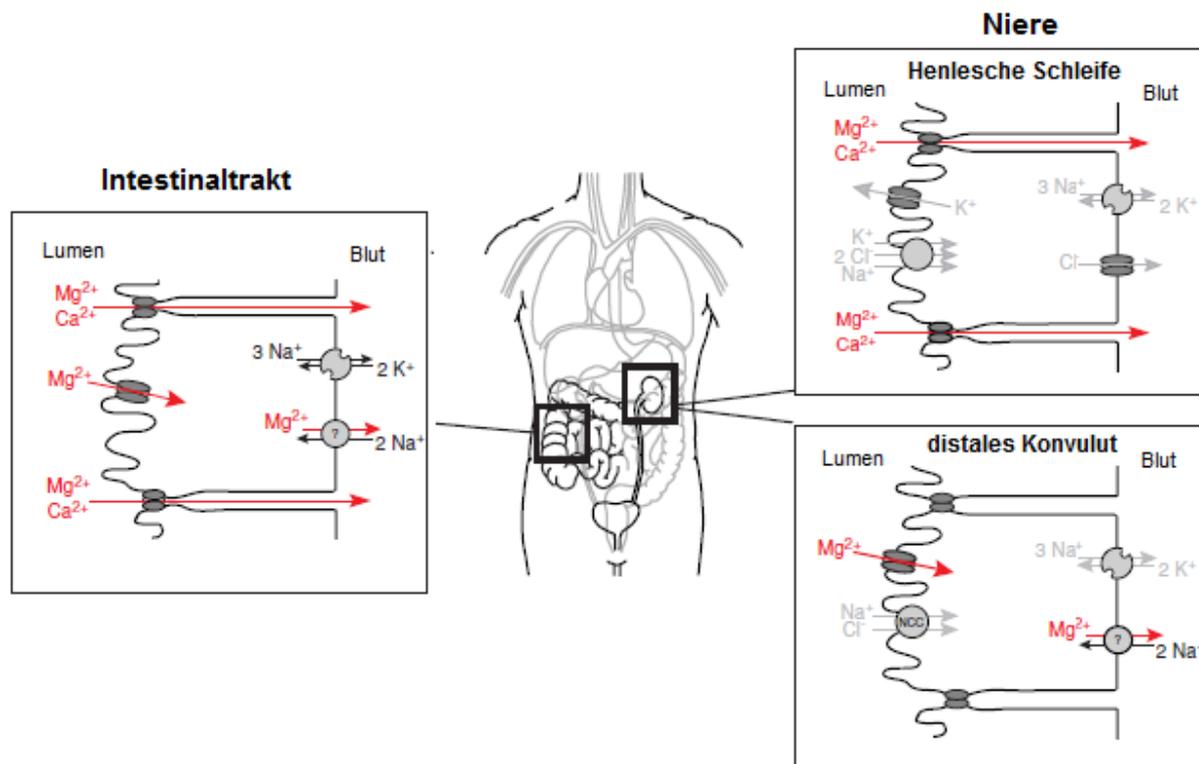


Abb. II 7: Mechanismen der Magnesiumaufnahme im Intestinaltrakt und in der Niere. Im Intestinaltrakt wird Magnesium zum Einen über den passiven parazellulären Weg aufgenommen über die Zell-Zell-Verbindungen (*tight junctions*). Zum Anderen ist auch eine transzelluläre Magnesiumabsorption durch einen putativen Magnesiumkanal auf der apikalen Membran möglich. An der basolateralen Membran befinden sich Natrium-Kalium-Pumpen sowie vermutlich Magnesium-Natrium-Austauscher. In der Niere gelangen Magnesiumionen in der Henleschen Schleife ausschließlich über den parazellulären Weg in die Blutbahn. An der apikalen Membran sind weiterhin Kaliumkanäle und Natrium-Kalium-Chlorid-Symporter vorhanden. Diese Ionen gelangen an der basolateralen Seite durch Chloridkanäle und Natrium-Kalium-Pumpen in die Blutbahn. Der Magnesiumtransport im distalen Konvolut ist dagegen transzellulärer Natur. Natrium-Chlorid-Kotransporter befinden sich ebenfalls auf der apikalen Seite, während Natrium-Kalium-Pumpen sowie vermutlich Magnesium-Natrium-Austauscher basolateral zu finden sind. (modifiziert nach Schlingmann & Gudermann, 2005)

Durch das Zusammenspiel bzw. die Regulation des MagnesiumEinstroms und –ausstroms wird die zelluläre Magnesiumkonzentration präzise aufrecht erhalten. Dabei kann eine Vielzahl von hormonellen Signalen Einfluss auf diese Transportprozesse nehmen (Quamme, 1997). Jedoch sind die molekularen Grundlagen sowie genauen Hintergründe der Regulation noch nicht bekannt.

2.1 Magnesium-Mangel

Repräsentative Untersuchungen zeigen, dass ein großer Anteil hospitalisierter Patienten eine Hypomagnesiämie aufweist (Lum, 1992). Dieser Magnesium-Mangel kann verschiedene Ursachen haben. Bei angeborenen Magnesium-Verlusterkrankungen kann eine gestörte Aufnahme des Magnesiums zu einer deutlichen Abnahme der Magnesiumkonzentration führen oder eine gesteigerte renale Ausscheidung. Weitere Gründe für eine verminderte Aufnahme sind Diäten, einseitige Ernährung oder auch an Magnesium „verarmte“ Nahrungsmittel. So wurde in der VERA-Studie gezeigt, dass etwa 10 % der erwachsenen Bevölkerung sehr niedrige Serum-Magnesium-Konzentrationen aufgrund geringer Magnesium-Zufuhr aufwiesen (Kohlmeier et al., 1995). Zusätzlich ist ein hoher Magnesium-Verlust über den Urin wie bei Diabetes mellitus Patienten möglich. Auch Änderungen der Säure-Basen-Bilanz haben einen Einfluss auf die Magnesiumkonzentration, wie eine Studie an gesunden Probanden zeigte. Dabei ging eine höhere Säurelast (Azidose) mit einem erhöhten renalen Magnesium-Verlust einher (Rylander et al., 2006). Hierbei könnte der TRPM6-Kanal eine große Rolle spielen, da eine Azidose die Expression des TRPM6-Proteins hemmt (Rylander et al., 2006). Magnesium-Defizienzen werden ebenfalls medikamentös verursacht durch Einnahme von Diuretika oder Cetuximab. Der monoklonale Antikörper Cetuximab, welcher in der Krebstherapie eingesetzt wird, trägt erheblich zur gesteigerten Magnesium-Ausscheidung bei (Glaudemans et al., 2010).

Bei der Ausprägung einer Hypomagnesiämie kann es zur Ausbildung vieler verschiedener komplexer Symptome kommen. Beim Menschen stehen eine erhöhte neuromuskuläre Erregbarkeit mit Muskelverspannungen, Krämpfen, Herzrhythmusstörungen und einer latenten Tetanie im Vordergrund (Durlach, 1988; Rude, 1998). Da ein großer Anteil des Magnesiums im Knochen gespeichert ist und bis zu einem Drittel unter Mangelbedingungen aktiviert werden kann, trägt eine bestehende Magnesium-Defizienz zur Osteoporose bei. In weiteren Untersuchungen wurde die Bedeutung von Magnesium in der Migräneprophylaxe gezeigt. So führte die tägliche Magnesiumeinnahme zu einer deutlichen Verminderung von Migräneattacken (Peikert et al., 1996). Eine weitere Studie hatte zudem eine verbesserte Durchblutung bestimmter Hirnareale als Ergebnis (Koseoglu et al., 2008).

Die Magnesium-Supplementation stellt eine wichtige Option zur Prävention und zur Therapie verschiedener Erkrankungen dar. Daher sollte auf einen ausreichenden Magnesiumgehalt in der Nahrung geachtet werden, da er von großer Bedeutung ist (Vormann, 2010).

3 Die Laboratoriumsmaus als Tiermodell

Überschaubare Modelle aus niedrigen Organismen wie z.B. aus der *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans* eignen sich für die Beantwortung einfacher Fragestellungen und die Aufklärung grundsätzlicher mechanistischer Vorgänge. Um jedoch die Funktionen menschlicher Gene im Kontext des gesamten Organismus zu definieren, ist die Maus *Mus musculus* aufgrund ihrer verhältnismäßig hohen anatomischen, physiologischen und genetischen Ähnlichkeit zum Menschen bislang das beste Modell. Die Maus zeigt im Gegensatz zu höheren Säugetieren entscheidende Vorteile: kurze Generationszeiten, eine hohe Reproduktionsrate und relativ niedrige Haltungskosten. Desweiteren sind viele etablierte Protokolle zur Mutagenese verfügbar, sowie eine Reihe von Linien embryonaler Stammzellen und etablierten In- und Auszuchten vieler Stämme, welche jeweils besondere Eignungen für bestimmte Fragestellungen haben. Die wissenschaftliche Datenbasis über genetisch veränderte Mausmodelle nimmt rapide zu (<http://tbase.jax.org/>, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, oder <http://www.bioscience.org/Knock-out/knohome.htm>, Frontiers in Bioscience, Albertson, NY, USA). Direkte Vergleiche bzw. Vergleiche ähnlicher Phänotypen können zum besseren Verständnis von Genfunktionen im Gesamtorganismus beitragen. Aufgrund dieser aufgeführten Eigenschaften wurde in der vorgelegten Arbeit das Mausmodell genutzt.

4 Zielsetzung

Die Identifizierung verschiedener Mutationen im *TRPM6*-Gen bei Patienten mit Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalcämie (HSH) machte die Rolle des TRPM6-Kanals bei der Absorption von Magnesium im Darm sowie der Resorption in der Niere deutlich.

Im Gegensatz zu den Transportvorgängen anderer Ionen, wie Calcium, Natrium und Chlorid, ist die Aufrechterhaltung der Magnesiumhomöostase bislang nicht vollständig geklärt. Untersuchungen angeborener Störungen des Magnesiumhaushaltes, z.B. ein pathologischer Magnesiumverlust wie in der vorgelegten Arbeit, bieten die Möglichkeit, Magnesiumtransportvorgänge *in vivo* zu studieren. Die vergleichende Analyse der Phänotypen von Tiermodellen und der Erkrankungen der Magnesiumhomöostase war bereits sehr hilfreich, um ein besseres Verständnis der Magnesiumhomöostase zu erlangen.

In der vorgelegten Arbeit wurden *Trpm6*-defiziente Mäuse generiert und die Auswirkung des fehlenden TRPM6-Proteins im gesamten Organismus sowie in der Niere und im Intestinaltrakt untersucht. Ziel war die funktionelle Charakterisierung des TRPM6-Kanals.

Um lebensfähige *Trpm6*-defiziente Nachkommen zu erhalten, sollten transgene Mäuse mit einer konditionalen Mutation generiert und das *Trpm6*-Gen anschließend durch das

sogenannte *loxP/Cre*-Rekombinase-System organspezifisch inaktiviert werden. Dieses Mausmodell sollte zum Verständnis der HSH-Erkrankung beitragen, sowie letztendlich die Rolle des TRPM6 in der Magnesiumhomöostase aufzuklären helfen.

Ob der TRPM6-Kanal tatsächlich entscheidend an der Magnesiumhomöostase beteiligt ist und dessen Inaktivierung zum HSH Phänotyp führt, sollte an Mäusen mit einer globalen *Trpm6*-Defizienz geklärt werden. Hierzu wurde der Magnesiumhaushalt anhand von gemessenen Magnesiumkonzentrationen im Serum, Knochen, Urin und Faeces charakterisiert, sowie weitere Ionenhomöostasen analysiert.

Es war bereits bekannt, dass eine hohe Magnesium-Supplementierung die Symptome von HSH kompensiert, was die Vermutung nahe legte, dass der Magnesiummangel der primäre Mechanismus ist, der der HSH zugrunde liegt (Cole & Quamme, 2000; Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002; Konrad et al., 2004). Auch der Einfluss von verschiedenen Magnesiumkonzentrationen im Futter auf das Wachstum und die Physiologie von Mäusen war bereits gut untersucht worden (Alcock & Shils, 1974; Newberne & Fox, 1980; Fahim et al., 1990). Darauf aufbauend sollte geprüft werden, ob Magnesium angereichertes Futter (0,75% Mg^{2+}) im Gegensatz zu Normalfutter (0,22% Mg^{2+}) die erwartete Hypomagnesiämie *Trpm6*-defizienter Mäuse kompensieren kann.

Die Schlüsselmechanismen der Pathophysiologie von HSH sind noch ungeklärt (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002; Konrad et al., 2004). Es war auch unklar, ob die verminderte Absorption aus dem Intestinaltrakt oder der Magnesiumverlust über die Niere ausschlaggebend für HSH ist. Um dies zu überprüfen, sollten Tiere mit organspezifischen Mutationen des *Trpm6*-Gens in Niere und Intestinaltrakt generiert und deren Magnesiumhaushalt analysiert werden.

Im Tiermodell sollte die Proteinexpression *in vivo* analysiert werden, um andere Expressionsorte des TRPM6-Kanals zu ermitteln und weitere Funktionen zu identifizieren.

Die eingehende Betrachtung und Untersuchung des TRPM6-Kanals im Tiermodell sollte einen Einblick in die Regulation geben, da die momentane Datenlage außerordentlich widersprüchlich ist.

III Material

1 Verbrauchsmaterialien

96-Lochplatten	Sarstedt; Nümbrecht, # 83.1835
Deckgläser 24 x 60 mm	Carl Roth; Karlsruhe, # 878
Einbettkassetten	Carl Roth; Karlsruhe, # AA78.1
Einmal-Aufsätze für den Homogenisator	Quiagen; Hilden, # 990890
Einmalpipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt; Nümbrecht
Falkongefäße (15, 50 ml)	Sarstedt; Nümbrecht, # 62.554.502
Färbekästen	Carl Roth; Karlsruhe, # 2290.2
Färbeeinsatz	Carl Roth; Karlsruhe, # 2291.2
Fettstift (DakoCytomation Pen)	Dako Cytomation; Hamburg, # S2002
Kanülen, Sterican	Braun; Melsungen, # 4657667
Mikrotom-Einmalklingen	Leica; Nussloch 14035838925
Objekträger (Superfrost Plus)	Menzel; Braunschweig, # J1800AMNZ
Objekträgerkästen	Carl Roth; Karlsruhe, # K532.1
Parafilm	American National Can; Chicago, # WI54956
Pasteurpipetten	Carl Roth; Karlsruhe, # 4522
Pipettenspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)	Sarstedt; Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5, 2 ml)	Sarstedt; Nümbrecht
Skalpell, steril	Braun; Melsungen, # 5518091
Spritzen, steril (1 ml)	Braun; Melsungen, # 9166017V
Sterilfilter	Carl Roth; Karlsruhe, # KH55.1
Sterile Reaktionsgefäße (200, 500 µl, 1,5, 2ml)	Sigma-Aldrich; Deisenhofen

2 Chemikalien

Aceton	Merck; Karlsruhe, # 14
Agarose (NEEO Ultra Qualität)	Carl Roth; Karlsruhe, # 2267.3
Ammoniumchlorid	Merck; Karlsruhe, # 1.011.451.000
Ammoniumhydroxidlösung	Carl Roth; Karlsruhe, # 677.1
Calciumchlorid Dihydrat	Merck; Karlsruhe, # 2382
Chloroform	Sigma-Aldrich; Deisenhofen, # C2432
Dako Fluorescent mounting Medium	Dako Cytomation; Hamburg, # S3023

Desoxy-Nukleotid-5'-triphosphate (dNTPs, je 10 mM)	Fermentas; St. Leon-Rot, # RO192
DNA-Größenstandard (100 bp)	Fermentas; St. Leon-Rot, # SM0241
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen; Karlsruhe, # 14040083
DyLight®488 Streptavidin	BIOZOL; Eching, # SA5488
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Microsystems; Wetzlar, # 14020108926
Eosin Y-Lösung	Carl Roth; Karlsruhe, # 3137.2
Eriochromschwarz T	Carl Roth; Karlsruhe, # K860.1
Ethanol absolute	Carl Roth; Karlsruhe, # 5054.1
Ethanol 96% vergällt	Carl Roth; Karlsruhe, # T171.2
Ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth; Karlsruhe, # 9105.3
Ethidiumbromid, 1% (EtBr)	Carl Roth; Karlsruhe, # 2218.1
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck; Karlsruhe, # 108418
Eukitt Eindeckmedium	Sigma-Aldrich; Deisenhofen, # 03989
Hämalaun nach Mayer	Carl Roth; Karlsruhe, # T865.2
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth; Karlsruhe, # 2189.3
Mono-Natriumcitrat	Carl Roth; Karlsruhe, # HN13.1
PCR-Reaktionspuffer, 10x	Sigma-Aldrich; Deisenhofen, # D8312
Paraformaldehyd, 16%	Science Services; München, # 15710
Paraffin, Paraplast Plus	Carl Roth; Karlsruhe, # X881.2
Rotihistol	Carl Roth; Karlsruhe, # 6640.4
Roti®-Safe GelStain	Carl Roth; Karlsruhe, # 3865.2
TRI-Reagent	Sigma-Aldrich; Deisenhofen, # T9424
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth; Karlsruhe, # 4855.2
Triton X-100	Merck; Karlsruhe, # 11869
Tween 20	Sigma-Aldrich; Deisenhofen, # P7949
Ziegenserum	Sigma-Aldrich; Deisenhofen, # 9023
Zitronensäure-Monohydrat	Merck; Karlsruhe, # 1.00244.1000

3 Puffer und Lösungen

Ammoniak-Ammoniumsalz-Puffer	50 mM Ammoniak, 10 mM Ammoniumchlorid, pH=10,0
EDTA-Puffer	1 mM EDTA, pH=8,0
Natriumcitratpuffer	10 mM Natriumcitrat, 0,05% Tween 20, pH=6,0
TAE-Puffer, 50x	2 M Tris, 0,05 M EDTA, 1 M Acetat, pH=8,5
Tris-EDTA-Puffer	1 mM EDTA, 10 mM Tris, 0,05% Tween 20, pH=9,0
Zitronensäurepuffer	100 mM Natriumcitrat, 100 mM Zitronensäure

4 Enzyme und Kits

Colorimetric Calcium Assay Kit	BioVision; Milpitas, # K380-250
Colorimetric Zinc Assay Kit	BioVision; Milpitas, # K387-100
GenElute™ Mammalian Genomics DNA Miniprep Kit	Sigma-Aldrich; Deisenhofen, # G1N350
DNA Damage EIA Kit	Enzo; Lause. # ADI-EKS-350
Malachite Green Phosphate Detection Kit	R&D Systems; Minneapolis, # DY996
Mix-n-Stain™ CFT™488A Antibody Labeling Kit	Sigma-Aldrich; Deisenhofen, # MX488AS50-1KT
Mouse/Rat IGF-I Immunoassay (ELISA-Kit)	R&D Systems; Minneapolis, # MG100
Mouse IL-6 CytoMax ELISA Kit	U-CyTech; Utrecht, # CT984-2
Mouse TNF-α ELISA Kit	U-CyTech; Utrecht, # CT303A
Proteinkinase K	Sigma-Aldrich; Deisenhofen, # P2308
Protein Quantification Kit-Rapid	Sigma-Aldrich; Deisenhofen, # 51254-1KT
Rat/Mouse Growth-Hormone (ELISAKit)	Millipore; St.Charles, # EZRMGH-45K
Rat/Mouse Insulin (ELISA-Kit)	Millipore; St.Charles, # EZRMI-13K
REDTaq Genomic DNA Polymerase (1 U/μl)	Sigma-Aldrich; Deisenhofen; # D8312
Streptavidin/Biotin Blocking Kit	BIOZOL, Eching, # CCA94010
TSA™PLUS Fluorescence Kits	PerkinElmer; Boston, # NEL741E001KT

5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert. Sie lagen jeweils in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l vor. Die Primer wurden bei -20°C gelagert.

M6 wt: Annealing-Temperatur: 64°C; PCR-Produktlänge: 549 bp

vorwärts 5'-AGAGACGTGCAGTGTAGGACAGAG-3'

rückwärts 5'-ACGGCACACAGAAAACACCAG-3'

M6 cond: Annealing-Temperatur: 53°C; PCR-Produktlänge: 368 bp

vorwärts 5'-GCAAATACAAGCAACACCTCC-3'

rückwärts 5'-TGTCTTCCATGTTGCTACGA-3'

M6 Null: Annealing-Temperatur: 59°C; PCR-Produktlänge: 362 bp

vorwärts 5'-TGTCTTCCATGTTGCTACGA-3'

rückwärts 5'-CTTCCGGTCCACAGTTCAT-3'

Sox-Cre: Annealing-Temperatur: 59°C; PCR-Produktlänge: 446 bp

vorwärts 5'-TCCGGGCTGCCACGACCAA-3'

rückwärts 5'-GGCGCGCAACACCATTTTT-3'

Ksp-Cre: Annealing-Temperatur: 59°C; PCR-Produktlänge: 606 bp

vorwärts 5'-ACCGCCTACCTGCTCAAGTGTC-3'

rückwärts 5'-GGATCCGCCGCATAACCAGT-3'

Vil-Cre: Annealing-Temperatur: 59°C; PCR-Produktlänge: 1100 bp

vorwärts 5'-GTGTGGGACAGAGAACAAACC-3'

rückwärts 5'-ACATCTTCAGGTTCTGCGGG-3'

M6 WC: Annealing-Temperatur: 59°C; PCR-Produktlänge: 325 bp

vorwärts 5'-GATCCATTTCTGAGCAGCCGCCTTAG-3'

rückwärts 5'-GCAGACCTCCAGAGACCGCCAGTTTCAA-3'

6 Antikörper und Seren

Die verwendeten Antiseren sowie die polyklonalen Antikörper der Firma Eurogentec wurden durch Doppelimmunisierung (Double X-Programm) von jeweils zwei Kaninchen gewonnen. In den nachstehenden Tabellen sind alle Antikörper aufgelistet. Primärantikörper und Seren wurden bei -20°C gelagert. Die Sekundärantikörper wurden bei 4°C gelagert.

Tab. III 1: Verwendete Seren und aufgereinigte polyklonale Primärantikörper für die Immunfluoreszenz an Kryo- und Paraffinschnitten.

Antikörper/Serum	Art	Aminosäuresequenz des Epitopes	Herkunft
Guinea pig anti-mouse serum	Antiserum	GCERDKNRSSLERHTRL	abcam®
Anti-TRPM6 (extrazellulär)	Antikörper	CVKDYDLERGPDEK	Alomone Labs
Rabbit anti-mouse TRPM6 125	Antiserum	H2N-CNLGFGQTIEPTEELP-CONH2	abcam®
Rabbit anti-mouse TRPM6 126	Antiserum	H2N-CNLGFGQTIEPTEELP-CONH2	Eurogentec
Rabbit anti-phospho-mouse 62	Antiserum	AcNH-RLSQT(p)IPFTPIQC-CONH2	Eurogentec
Rabbit anti-phospho-mouse 63	Antiserum	AcNH-RLSQT(p)IPFTPIQC-CONH2	Eurogentec
Phospho-TRPM6	Antikörper	AcNH-RLSQT(p)IPFTPIQC-CONH2	Eurogentec
Non-Phospho-TRPM6	Antikörper	AcNH-RLSQTIPFTPIQC-CONH2	Eurogentec
Rabbit anti-mouse TRPM6 512	Antiserum	H2N-CERDKNRSSLEDHTRL-COOH	Eurogentec
Rabbit anti-mouse TRPM6 513	Antiserum	H2N-CERDKNRSSLEDHTRL-COOH	Eurogentec
Ab 75a anti-TRPM6 *	Antikörper	H2N-CERDKNRSSLEDHTRL-COOH	Eurogentec
Ab 75b anti-TRPM6 *	Antikörper	H2N-CERDKNRSSLEDHTRL-COOH	Eurogentec
Ab 76 anti-TRPM6	Antikörper	H2N-CKISTSLKSPQEPHHH-CONH2	Eurogentec

*: dieselben Antikörper aus unterschiedlichen Chargen

Als Sekundärantikörper wurden Anti-rabbit-IgG-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) und Anti-guinea pig-IgG-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) verwendet.

7 Versuchstiere

Die transgenen Mauslinien, welche in der vorgelegten Arbeit als Versuchstiere genutzt wurden, sind der Tabelle III 2 zu entnehmen.

Tab. III 2: Transgene Mauslinien. Angegeben sind die jeweiligen Transgene, sowie der Mausstamm auf dem jene Linien gezüchtet wurden und die Herkunft.

Linie	Transgen	Mausstamm	Herkunft
<i>Trpm6</i> ^{Δ17/Δ17}	Konditionale Mutation an Exon 17	C57BL/6J	TaconicArtemis GmbH
<i>Sox2-Cre</i>	Sox2-Cre-Rekombinase	C57BL/6J	Jackson Laboratory; stock #008454
<i>Ksp1.3-Cre</i>	Ksp1.3-Cre-Rekombinase	C57BL/6J	Jackson Laboratory; stock #012237
<i>Villin1-Cre</i>	Villin1-Cre-Rekombinase	C57BL/6J	Jackson Laboratory; stock #004586

Trpm6^{Δ17/Δ17}-Mäuse besitzen ein gefloxtes *Trpm6*-Gen (konditional), das erst in Kombination mit der *Cre*-Rekombinase deletiert wird. Ohne die Inaktivierung durch *Cre* wird das Gen transkribiert und translatiert. Dieser Mausstamm wurde mit den folgenden transgenen Mäusen gekreuzt, die verschiedene *Cre*-Rekombinasen exprimieren, um organspezifische Inaktivierungen des TRPM6 zu erhalten.

Sox2-Cre-Mäuse exprimieren die *Cre*-Rekombinase lediglich im Epiblast und nicht in der Plazenta (Hayashi et al., 2003). Somit wird bei der Kreuzung mit der oben genannten Mauslinie das konditionale Gen nur in Epiblastzellen deletiert, was zu einer Inaktivierung im gesamten Körper führt. *Sox2-Cre* hat keinen Einfluss auf die Physiologie und das Verhalten der Mäuse.

Das *Ksp1.3-Cre*-Transgen steuert die *Cre*-Expression im sich entwickelnden Nephron (Shao et al., 2002). Somit wird bei der Kreuzung mit der oben genannten Mauslinie das konditionale Gen nur in der Niere deletiert. *Ksp1.3-Cre* hat keinen Einfluss auf die Physiologie und das Verhalten der Mäuse.

Das *Villin1-Cre*-Transgen steuert die *Cre*-Expression in intestinalen Epithelzellen (Madison et al., 2002). Somit wird bei der Kreuzung mit der oben genannten Mauslinie das konditionale Gen nur in Epithelzellen des Intestinaltrakts deletiert. *Villin1-Cre* hat keinen Einfluss auf die Physiologie und das Verhalten der Mäuse.

8 Geräte

Analysewaage (KERN 572)	KERN; Balingen
Analysewaage (Bachofer AND HR-202)	Bachofer; Reutlingen
Brutschrank Model HERAUES kelvitron®t	Thermo Scientific; Langenselbold
Brutschrank Model 600	Memmert; Schwabach
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen; Isernhage
Elektrophoresesystem für Agarosegele	PeqLab; Erlangen
Feuchtkammer	Eigenbau
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss; Jena
Geldokumentation (Infinity-3026 WL/26MX)	PeqLab; Erlangen
Gewebeeinbettssystem (EG1150)	Leica Microsystems; Wetzlar
Gewebeinfiltrationsautomat (TP1020)	Leica Microsystems; Wetzlar
Heizblock	PeqLab; Erlangen
Kryotom (CM 3050 S)	Leica Microsystems; Wetzlar
Kühlplatte	Leica; Bensheim
Kühlzentrifuge (HERAEUS Fresco21)	Thermo Scientific; Osterode
Laser Scanning Mikroskop LSM 540 Meta	Zeiss; Oberkochen
Micro-Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	PeqLab; Erlangen
Mikroplattenleser (FLUOstar Omega)	Labtech; Offenburg
Mikroskop, Model IX71S1F-3	OLYMPUS Cooperation; Tokyo
Mikroskop, Model CX41	OLYMPUS, Hamburg
Mikrowelle (Microwave & Grill)	Severin; Sundern
Paraffineinbettstation	Leica; Bensheim
pH-Meter	inoLab; Weilheim
Photometer (BioPhotometer plus)	Eppendorf; Hamburg
Rotor-Stator-Homogenisator	Quiagen; Hilden
Schlittenmikrotom (Accu-Cut SRM 200)	Leica Microsystems; Wetzlar
Stickstofftank	Thermo Scientific; Osterode
Thermomixer TS 100	PeqLab; Erlangen
Vortexer IKA® MS3 basic	Ika; Staufen
Wasserbad für die Histologie	Leica Microsystems; Wetzlar
Zentrifuge, HERAEUS Pico 17	Thermo Scientific; Osterode

9 EDV

Cell*A Version3.1

GraphPad Prism Version 3.02

Infinity-Capt1

IrfanView-Bildbetrachter

LSM 510 Version 4.2

Windows Excel 2007

Windows 2007 Professional

Windows Office 2007

OLYMPUS, Hamburg

GraphPad Software, Inc.; La Jolla,
USA

PeqLab; Erlangen

Irfan Skiljan; Wien

Zeiss; Oberkochen

Windows; Bellevue, USA

Windows; Bellevue, USA

Windows; Bellevue, USA

IV Methoden

1 Generierung der transgenen Mauslinien

Die Gruppe um Walder (Walder et al., 2009) konnte zeigen, dass ein konstitutiver Verlust des TRPM6-Proteins zu einer Embryonenletalität im frühen Stadium wegen massiver Neuralrohrdefekte führte. Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe mit einem Mausmodell, bei dem ein β geo-Reportergen in die *Trpm6* kodierende Sequenz eingeführt wurde, ergaben, dass mutierte Embryonen um den Embryonaltag 11,5 abstarben. Jedoch wurde die Expression des Reportergens im extra-embryonalen Gewebe, vor allem in Trophoblasten, nachgewiesen, aber nicht im Neuralrohr oder anderen Geweben des Embryos. Infolge dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die embryonale Letalität bei *Trpm6*-defizienten Mäusen sekundär auf einen Defekt der Plazenta zurückzuführen ist.

Aus diesen Gründen wurden Mäuse mit einer konditionalen Mutation am TRPM6-Protein generiert und die *loxP/Cre*-Rekombinase Technik angewendet, um lebensfähige *Trpm6*^{-/-} Tiere zu erhalten (Abb. IV 1; Abb. IV 2). Diese konditionale *Trpm6* Mutation ermöglichte zudem organspezifische Inaktivierungen des *Trpm6*-Gens.

1.1 Generierung der konditionalen Mauslinie *Trpm6* ^{$\Delta 17/\Delta 17$}

Für die Erstellung der transgenen Tiere mit einer konditionalen Mutation wurde zunächst *in vitro* ein geeignetes DNA-Konstrukt (Transgen) erstellt. Dieses Transgen beinhaltete neben der kodierenden Gensequenz des TRPM6-Kanals zwei *loxP* Stellen, welche das Exon 17 flankierten, und eine mit zwei *FRT*-Sequenzen flankierende Neomycinkassette (Abb. IV 1). Das gentechnisch veränderte Zielgen wurde dann in kultivierte, totipotente embryonale Stammzellen transfiziert und durch homologe Rekombination in das Mausgenom integriert. Die Neomycinkassette diente als Selektionsmarker, um Zellen mit einem positiven Rekombinationsereignis zu identifizieren (Capecchi, 1989). Positiv transfizierte Stammzellen wurden in einem nächsten Schritt in Blastozysten injiziert und hormonell vorbehandelten, pseudoschwangeren Ammen-Weibchen implantiert. Nachkommen der F0-Generation, welche von den injizierten transgenen Zellen und von den nicht-transgenen Blastozysten abstammen, werden als Chimäre bezeichnet (Gossler et al., 1986). Da eine Keimbahneteiligung vorlag, konnte die gezielt veränderte Gensequenz von der Chimäre an die nachfolgende Generation vererbt werden (Bradley et al., 1984). Die positiv selektierbare Neomycinkassette wurde durch das *Flp/FRT*-System (analog zum *loxP/Cre*-Rekombinase-System; Kap. IV 1.2) entfernt. Schlussendlich wurde eine transgene Linie mit einer konditionalen Mutation am Exon 17 des *Trpm6*-Gens generiert (*Trpm6* ^{$\Delta 17/\Delta 17$}). Dabei wurden die *loxP*-Sequenzen in die

Introns so eingebaut, dass das sogenannte gefloxtes Gen funktionsfähig blieb und die transgene, gefloxtes Maus sich phänotypisch und physiologisch nicht vom Wildtyp unterschied. Durch Kreuzungen mit Mäusen, die eine *Cre-Rekombinase* tragen, wurde das Exon 17 deletiert, was zu einer Leserasterverschiebung und somit zu einer *loss-of-function*-Mutation führte (Kap. IV 1.2).

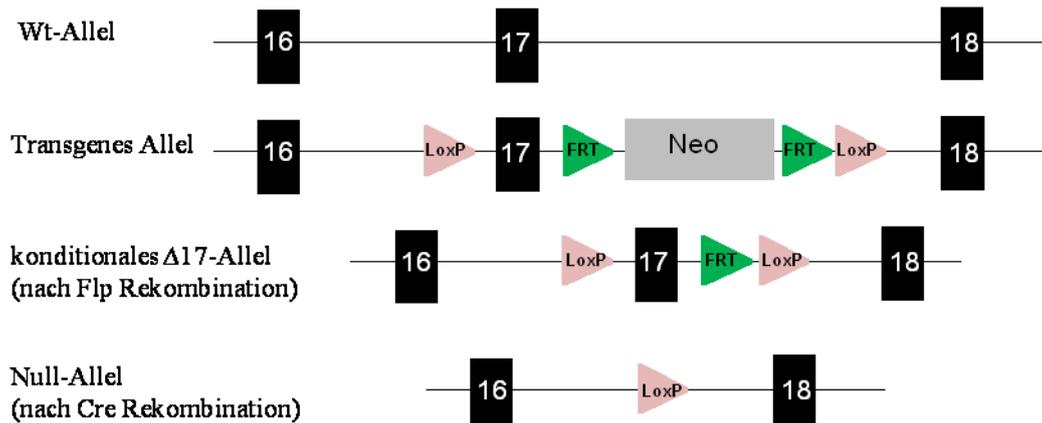


Abb. IV 1: Targeting Strategie für die Generierung der konditionalen Mutation im *Trpm6*-Gen. In das *Trpm6* Allel wurden gezielt zwei *loxP*-Stellen (rosa Pfeil) hinzugefügt, welche das Exon 17 flankierten. Ebenfalls wurde eine Neomycinkassette (graue Box; Neo), flankiert durch *FRT*-Stellen (grüner Pfeil) eingefügt. Diese wurde durch die *FLP* Rekombinase, welche *FRT*-Sequenzen erkennt und schneidet, entfernt, um ein konditionales $\Delta 17$ -Allel zu erzielen. Durch eine global oder lokal exprimierte *Cre* Rekombinase konnte Exon 17 im konditionalen $\Delta 17$ -Allel deletiert werden, woraus eine *frameshift*-Mutation resultierte.

Die transgene Mauslinie *Trmp6* ^{$\Delta 17/\Delta 17$} wurde bei der Firma TaconicArtemis GmbH, Köln, generiert und gezüchtet.

1.2 Geninaktivierung durch Verwendung des *loxP/Cre*-Rekombinase Systems

Die *Cre*-Rekombinase (*cyclization recombination*) stammt aus dem Bakteriophagen P1 (Sauer & Henderson, 1988; Nagy, 2000). Dieses Enzym erkennt eine spezifische 34 bp lange Nukleotidsequenz, die *loxP*-Erkennungssequenz (*locus of X-over of P1*) (Abremski & Gottesman, 1981) und katalysiert die Rekombination zwischen zwei dieser Stellen (Abb. IV 2). So wird ein chromosomaler Genabschnitt, welcher sich zwischen zwei gleichgerichteten *loxP*-Stellen befindet (ein „gefloxtes“ DNA-Segment) durch die *Cre*-Rekombinase in Form eines zirkulären Produktes aus dem Gen herausgeschnitten und in der Zelle abgebaut.

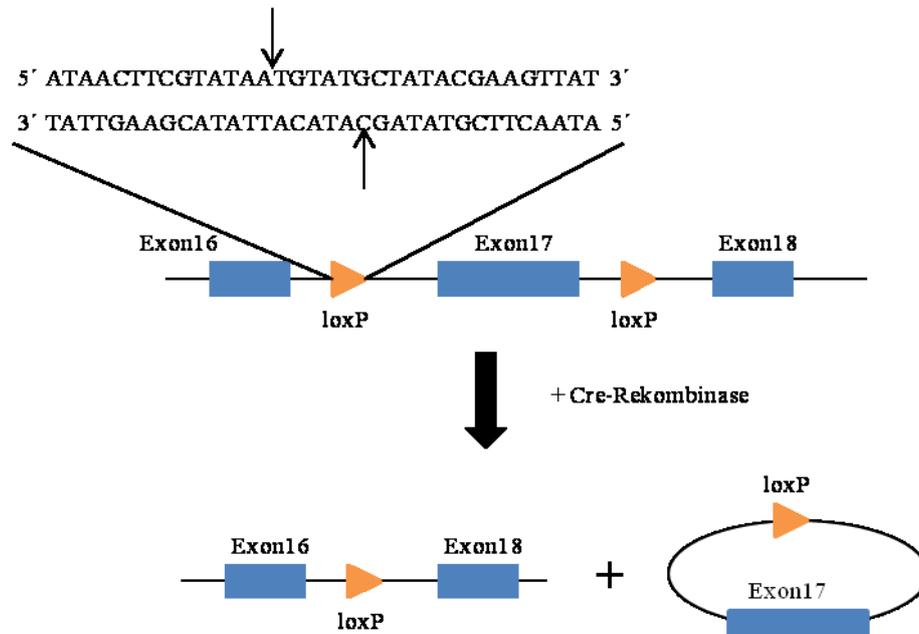


Abb. IV 2: *Cre/loxP*-vermittelte Exzision. Die Basenfolge der *loxP*-Sequenz ist angegeben und die Schnittstellen, die von der *Cre*-Rekombinase erkannt werden, durch Pfeile markiert. Bei Expression der *Cre*-Rekombinase wird der Genabschnitt zwischen den *loxP*-Stellen herausgeschnitten und später in der Zelle abgebaut.

Um eine Geninaktivierung des *Trpm6* durch eine *loxP/Cre*-vermittelten Gendeletion in Mäusen hervorzurufen, wurden zwei genetisch veränderte Mauslinien benötigt. Zum Einen die Mauslinie mit dem *loxP*-flankiertem Genabschnitt im TRPM6-Protein (konditionale Mauslinie, Kap. IV 1.1) und zum Anderen eine Mauslinie, welche die *Cre*-Rekombinase exprimiert. Dabei bestimmt der Promoter, unter dessen Kontrolle *Cre* steht, in welchen Zelltypen das Enzym exprimiert wird. Somit konnten eine globale und gewebespezifische (Intestinaltrakt, Niere) *Trpm6*-defiziente Mauslinien generiert werden (Kap. IV 1.4). Die verschiedenen *Cre*-Mauslinien wurden vom *The Jackson Laboratory* bezogen. Die jeweilige Gewebespezifität der verwendeten Linien ist der Tab. IV 1 zu entnehmen.

Tab. IV 1: Bezogene Mauslinien mit exprimierender *Cre*-Rekombinase und verschieden vorgeschalteten Promotoren. Angegeben sind die jeweiligen Promotoren mit den dazugehörigen Expressionsgeweben, sowie der Mausstamm auf dem jene Linien gezüchtet wurden und die Herkunft.

Linie	Gewebespezifität	Mausstamm	Herkunft	Referenz
<i>Sox2-Cre</i>	Expression im Epiblast	C57BL/6J	Jackson Laboratory; stock #008454	(Hayashi et al., 2003)
<i>Ksp1.3-Cre</i>	Expression in renale Epithelzellen	C57BL/6J	Jackson Laboratory; stock #012237	(Shao et al., 2002)
<i>Villin1-Cre</i>	Expression in Enterozyten	C57BL/6J	Jackson Laboratory; stock #004586	(Madison et al., 2002)

1.3 Genetische Konformität

Genetische Variabilitäten sollten soweit wie möglich bei Untersuchungen von Genfunktionen unter Verwendung von gezielt genetisch veränderten Tieren minimiert werden. Daher wurden die transgenen Mauslinien auf einen möglichst einheitlichen genetischen Hintergrund rückgekreuzt oder von Anfang an auf einen einheitlichen Hintergrund gezüchtet. In dieser Arbeit war dies die C57BL/6J-Inzuchtlinie, da dessen Physiologie und Pathophysiologie gut beschrieben ist (www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/C57BL.shtml) und sich der genetische Hintergrund somit zum Vergleich von *Knockout*- und Wildtyp-Tieren eignet. Nur transgene Tiere wurden mit C57BL/6J-Tieren auf 6 Generationen weitergezüchtet. In der sechsten Generation ist rein rechnerisch 98,5% des Genoms von C57BL/6J abstammend.

1.4 Zuchtschema

Zunächst wurden heterozygot gefloxt Männchen mit Weibchen verpaart, welche Träger der *Sox2-Cre*-Rekombinase waren, um Tiere mit einem Null-Allel und dem *Sox2-Cre*-Transgen zu generieren (Abb. IV 3), welche in der weiteren Zucht eingesetzt wurden (Abb. IV 4).

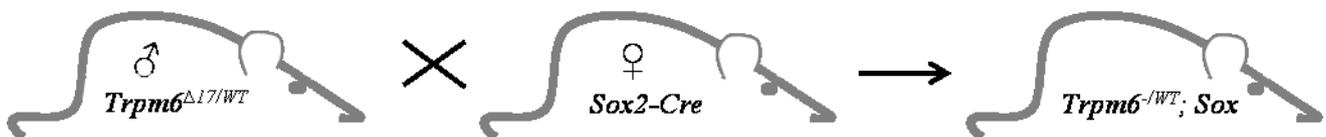


Abb. IV 3: Zuchtschema zur Generierung von Mäusen mit einem Null-Allel und dem *Sox2-Cre*-Transgen

$Trpm6^{\Delta17/\Delta17}$ wurden für Kreuzungen mit heterozygoten transgenen Tieren, welche verschiedene *Cre*-Rekombinasen exprimierten, verwendet, um organspezifische Inaktivierungen des TRPM6 zu erhalten (Abb. IV 4).

Um Mäuse mit einer globalen *Trpm6*-Defizienz ($Trpm6^{-/-}$) zu erhalten, wurden weibliche, gefloxt Mäuse ($Trpm6^{\Delta17/\Delta17}$) mit heterozygoten, *Sox2-Cre* transgenen Männchen ($Trpm6^{-/WT}; Sox$) gekreuzt. Das paternal vererbte *Sox2-Cre* Transgen wird selektiv in Geweben exprimiert, das vom Epiblasten abstammt, aber nicht in der Plazenta (Kap. IV 1) (Hayashi et al., 2003). Durch die heterozygote Verpaarung konnten *knockout*-Tiere und Kontrollgeschwister in einem Wurf generiert werden, was einen zuverlässigen Vergleich gewährleistet. Als Kontrolltiere wurden $Trpm6^{\Delta17/WT}$ -Mäuse verwendet, da sich das konditionale Allel wie ein Wildtypallel verhält.

Eine weitere Zucht von *Trpm6*^{-/-}-Tieren bestand in der Verpaarung von homozygoten *Trpm6*^{-/-}-Mäusen. Hierbei konnte das Reproduktionsverhalten von *Trpm6*-defizienten Mäusen analysiert werden (Kap. IV 1.7).

Da das *Ksp1.3-Cre* Transgen die *Cre*-Rekombinase-Expression im sich entwickelnden Nephron steuert (Shao et al., 2002), wurden für eine Deletion des TRPM6 Proteins in den Epithialzellen der Niere, *Trpm6*^{Δ17/Δ17}-Weibchen mit *Trpm6*^{/WT}-Mäusen, die *Ksp1.3-Cre* Träger waren, verpaart.

Die Inaktivierung von TRPM6 in intestinalen Epithialzellen erfolgte mit der Verpaarung von *Trpm6*^{Δ17/Δ17}-Weibchen mit *Trpm6*^{/WT} Männchen, die *Villin1-Cre* transgen waren, da die *Villin1* gesteuerte *Cre*-Rekombinase nur dort exprimiert wird (Madison et al., 2002).

Eine schematische Darstellung dieser Verpaarungen zeigt Abb. IV 4.

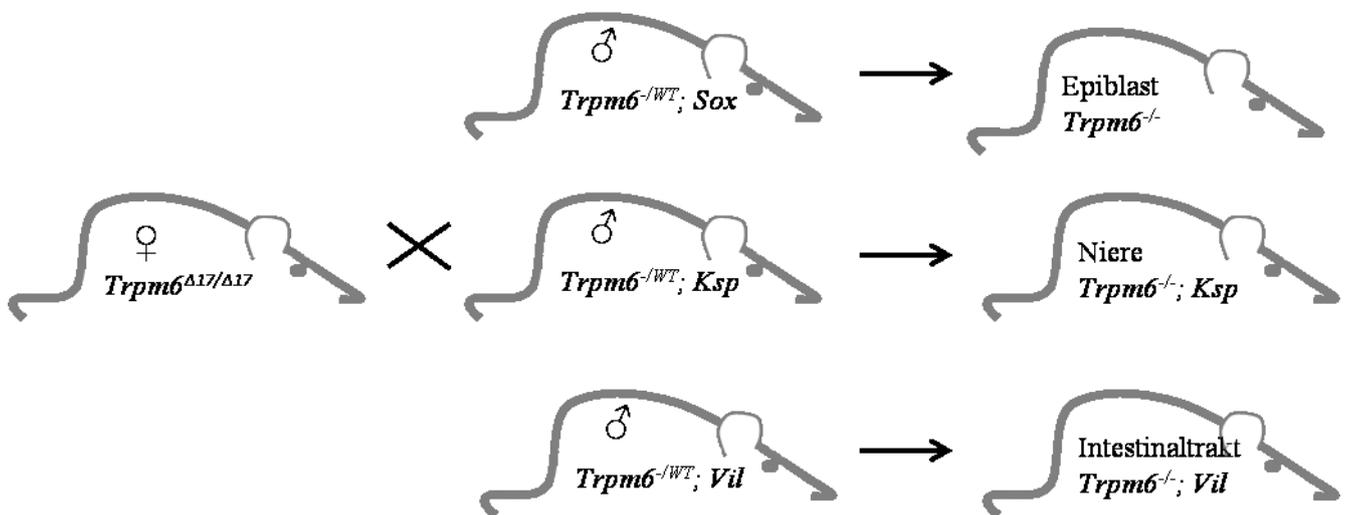


Abb. IV 4: Zuchtschema zur gewebespezifischen Inaktivierung des TRPM6-Kanals. Das väterlich vererbte *Sox2-Cre* Transgen führte zu einer Inaktivierung des TRPM6 Proteins im Epiblast und somit zu einer Inaktivierung im gesamten Organismus. Eine Deletion des *Trpm6* Gens im Nierengewebe wurde durch eine *Ksp1.3* gesteuerte *Cre*-Rekombinase (*Ksp*) hervorgerufen und im Intestinaltrakt durch die *Villin1* gesteuerte *Cre*-Rekombinase (*Vil*).

Um die konditionale Linie (*Trpm6*^{Δ17/Δ17}) aufrecht zu erhalten, wurden nebenbei auch homozygote *Trpm6*^{Δ17/Δ17} Tiere miteinander verpaart. Die weiblichen Nachkommen wurden dann wiederum in der Zucht der anderen Linien eingesetzt (Abb. IV 4).

1.5 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte in Kleingruppen (bis zu 6 Tiere in einem Käfig) in individuell belüfteten Käfigen (Typ II L, Tecniplast; Hohenpeißenberg). Im gesamten Tierstall herrschten

Standardbedingungen bei 21-21,7°C Raumtemperatur und 47-55% Luftfeuchtigkeit. Das Pappel-Granulat-Einstreu (#H1505-30, ssniff Spezialdiäten GmbH; Soest) wurde einmal wöchentlich gewechselt. Zusätzlich waren die Käfige zur Beschäftigung der Mäuse mit Holzwolle (#NBG E-012, ssniff Spezialdiäten GmbH; Soest) bestückt. Die Tiere wurden in einem 12:12h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Futter (ssniff R/M-H 15 mm, #V1535, ssniff Spezialdiäten GmbH; Soest) und Leitungswasser. Zuchtpaaren wurde spezielles Zuchtfutter (ssniff M-Z, 15 mm, #V1125, ssniff Spezialdiäten GmbH; Soest) angeboten sowie Nistmaterial (Nestlets, #11081100754, PLEXX B.V., Elst; Niederlande) zur Aufzucht der Jungen. Im Alter von drei Wochen wurden die Jungtiere von den Elterntieren abgesetzt und in separaten Käfigen gehalten.

Um zu prüfen, ob die zu erwartende Hypomagnesiämie der primäre Phänotyp dieser Mutation ist, wurde Tieren mit einer Inaktivierung des TRPM6 im gesamten Organismus und deren Kontrollgruppe verschiedene Magnesiumkonzentrationen (1%, 0,75%, 0,5%) im Futter (ssniff R/M-H 10 mm, #V1534, +0,8% Mg²⁺, + 0,55% Mg²⁺, + 0,30% Mg²⁺, ssniff Spezialdiäten GmbH; Soest) angeboten.

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden unter Einhaltung der Bestimmungen der Deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern genehmigt (55.2-1-54-2532-134-13).

1.6 Auswahl der Tiere

Geschlechtsspezifische hormonelle Schwankungen haben großen Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System der Tiere. Da bei weiblichen Tieren, bedingt durch den ovariellen Zyklus auch mit einem Einfluss der Geschlechtshormone gerechnet werden muss, erfolgten die Untersuchungen an männlichen Tieren. Weil Alter und genetischer Hintergrund auf die Magnesiumkonzentration im Blut Einfluss haben können, waren die männlichen Versuchstiere bei den Experimenten, wenn nicht anders angegeben, 8 bis 9 Wochen alt und wurden auf dem genetischen Hintergrund C57BL/6J gezüchtet (Kap. IV 1.3). Die für diese Arbeit verwendeten Tiere entstammten der hauseigenen Zucht und standen zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung. Der jeweilige Genotyp wurde anhand von DNA-Extraktion (Kap. IV 2.1) und anschließender PCR-Analysen (Kap. IV 2.2), sowie mit Hilfe von histologischen Methoden (Kap. IV 3) ermittelt.

1.7 Charakterisierung der Mäuse

Durch eine erfolgreiche Zucht mutierter Nachkommen erfolgte die phänotypische Charakterisierung. Im ersten Teil wurde zunächst das allgemeine Erscheinungsbild

begutachtet. Die Nachkommen der Zuchtpaare (Kap. IV 1.4) wurden hierfür klinisch auf Veränderungen ihres Wachstums und Körpergewichtes untersucht. Neben der Untersuchung der Organe auf makroanatomische und histologische Anomalien (histologische Methoden; Kap. IV 3) wurde bei der phänotypischen Untersuchung auch ein breites Spektrum verschiedener Blut- und Ausscheidungsparameter analysiert (biochemische Methoden; Kap. IV 4).

Die Körpergewichtsentwicklung wurde anhand eines Wiegeprotokolls erfasst. Mit einer Präzisionswaage wurde das Körpergewicht nach dem Absetzen der Jungtiere vom Muttertier wöchentlich gemessen und protokolliert.

Im Alter von acht bis neun Wochen wurden die Tiere einer Blutabnahme (Kap. IV 4.1) mit anschließender Organentnahme unterzogen. Durch labordiagnostische Verfahren sollten Fehlfunktionen verschiedener Organsysteme, metabolische Störungen und Änderungen der Homöostase des Elektrolythaushaltes diagnostiziert werden.

1.8 Reproduktionsverhalten – Zuchterfolg und Genotyp-Verteilung

Ob sich die Gendefizienz des *Trpm6* auf die Reproduktion der mutierten Tiere auswirkt, wurde durch die Analyse des Zuchterfolges homozygoter *Trpm6*-defizienter Mäuse beurteilt. Dazu wurde die Anzahl der Nachkommen pro Wurf protokolliert. Zusätzlich wurde denselben Zuchtpaaren eine erhöhte Magnesiumkonzentration (0,75%) im Futter angeboten, um zu prüfen, inwieweit eine Magnesiumergänzung für das Reproduktionsverhalten relevant ist. Die Anzahl der Nachkommen wurde ebenfalls protokolliert.

Der Genotyp der Nachkommen heterozygoter Zuchtpaare ($Trpm6^{\Delta17/\Delta17} \times Trpm6^{-/WT}; Sox$) wurde mittels Genotypisierung (Kap. IV 2.1-2.3) überprüft. Im Anschluss wurde das Verhältnis zwischen homozygoten *Trpm6*-defizienten ($Trpm6^{-/-}$), heterozygoten ($Trpm6^{\Delta17/-}; Trpm6^{-/WT}; Sox$) und Kontrolltieren ($Trpm6^{\Delta17/WT}$) ermittelt. Dieses Verhältnis konnte anschließend mit der zu erwartenden Mendelschen Verteilung verglichen werden.

2 Molekularbiologische Methoden (Genotypisierung der Mäuse)

Die molekularbiologischen Analysen in der vorliegenden Arbeit dienten der Genotypisierung der verschiedenen Mäuse. Um eine Verfälschung der Typisierungsergebnisse zu vermeiden und Kontaminationen vorzubeugen, wurden Kriterien zur Authentifizierung der DNA-Daten eingehalten. Dazu gehörten unter anderem die räumliche Trennung der Arbeitsbereiche von Prä- und Post-PCR-Raum, der Gebrauch von aliquotierten Reagenzien und Chemikalien, deren ausschließliche Zuordnung zu einem der Bereiche, sowie die Durchführung von Kontrollexperimenten.

2.1 DNA-Extraktion

Die genomische DNA wurde jeweils aus den abgeschnittenen Schwanzspitzen (0,3 – 0,5 cm) der Mäuse gewonnen, welche in der Tierhaltung vorbereitet wurden.

Mit Hilfe eines kommerziellen Kits (GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma-Aldrich) und nach Angaben des Herstellers wurde die DNA der zu untersuchenden Mäuse aus den Schwanzbiopsien isoliert und analysiert.

Das Prinzip des Kits beruht auf einer initialen alkalischen Lyse der Zellen und anschließender Trennung der freigesetzten genomischen DNA von den restlichen Zellbestandteilen durch selektive Zentrifugation. Die Aufreinigung der DNA erfolgte in weiteren Zentrifugationsschritten über Silicamembranen. Zum Schluss wurde die genomische DNA mit einer Tris-EDTA Lösung eluiert. Die Eluate wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.2 DNA-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), eine von Saiki *et al.* (1985) erstmals publizierte *in vitro* Technik, ist ein wichtiges Werkzeug für molekulargenetische Analysen. Hiermit können kurze definierte DNA-Sequenzen gezielt vervielfältigt werden. In drei eigenständigen Temperaturschritten, die zyklisch wiederholt werden, wird das von Startermolekülen (*primer*) eingerahmte Matrizenfragment verdoppelt.

Die DNA wird zunächst thermisch denaturiert (*denaturation*), so dass sie einzelsträngig vorliegt. Durch eine anschließende Temperatursenkung kommt es zur Anlagerung (*annealing*) der spezifischen PCR-Primer an ihre komplementären Zielsequenzen auf den DNA-Einzelsträngen (Abb. IV 5). Dabei weist jedes Primerpaar ein spezifisches Temperaturoptimum auf. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase, die in ungefähr 35 Zyklen an den 3'-Enden der Primer immer wieder eine DNA-Synthese startet (*elongation*), wird die zwischen den Primern liegende Zielsequenz exponentiell amplifiziert. Dafür müssen im Reaktionsansatz die 4 Desoxynukleotide (dNTPs) dATP, dTTP, dCTP und dGTP vorliegen. Die optimale Synthesetemperatur für die DNA-Polymerase liegt bei 72°C.

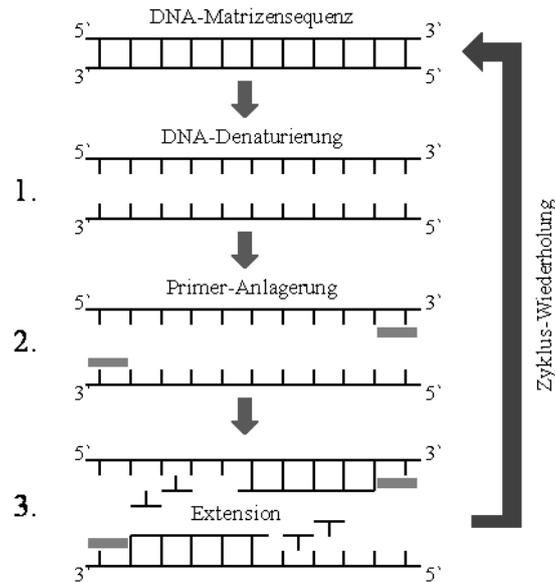


Abb. IV 5: Das PCR-Prinzip. 1. Schritt, DNA-Denaturierung: Die Template-DNA wird auf 94°C erhitzt, die beiden Stränge trennen sich. 2. Schritt, Primer-Anlagerung: Die Temperatur wird gesenkt, um den Primern (hellgrau) Gelegenheit zu geben, an die DNA zu hybridisieren. 3. Schritt, Extension: Die Temperatur wird auf das Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase erhöht, um eine optimale Zweitstrangsynthese zu erlauben.

In der vorliegenden Arbeit dienten die durchgeführten PCR zur Genotypisierung der gezüchteten Mäuse der verschiedenen Linien. Dazu wurden die relevanten Allele amplifiziert und später analysiert.

Die PCR-Ansätze zur Amplifikation der jeweiligen DNA-Sequenzen erfolgten generell in einem Volumen von 25 µl. Zumeist wurden 0,5 µl der zu amplifizierenden DNA zu einem aliquotierten Mastermix gegeben. Die Zusammensetzung eines Mastermixes ist in Tabelle IV 2 dargestellt. Die verwendeten Primer, die Amplikonlängen, sowie die primerspezifischen *Annealing*-Temperaturen sind aus der Tabelle IV 3 zu entnehmen. Diese wurden durch die *DNASTAR-Software* erstellt.

Neben den Proben wurden eine Negativkontrolle und mehrere Positivkontrollen mitamplifiziert. Die Negativkontrolle enthielt Reinstwasser anstelle eines DNA-Extraktes und diente dem Ausschluss einer möglichen Kontamination.

Alle notwendigen Reagenzien, mit Ausnahme der DNA, wurden zur Erstellung des Mastermixes nach ihren Volumina pipettiert. Die entsprechenden Volumina wurden durch Multiplikation mit der Probenzahl plus zwei (um Pipettierfehler auszugleichen) errechnet.

Tab. IV 2: Allgemeiner Mastermix der PCR-Ansätze

Reagenzien	Volumina	Konzentration	Firma
PCR Reaktionspuffer	2,5	10 x	Sigma-Aldrich
dNTPs	0,5	je 10 mM	Fermentas
Vorwärts-Primer	0,1	100 pmol/μl	Metabion
Rückwärts-Primer	0,1	100 pmol/μl	Metabion
REDTaq Genomic DNA Polymerase	1	1 U/μl	Sigma-Aldrich
Reinstwasser	20,3	-	-

Tab. IV 3: Liste der verwendeten Primer zur Amplifikation der möglichen Allele. Angegeben sind die Primer mit ihren jeweiligen Sequenzen, *Annealing*-Temperaturen sowie die Länge des generierten Fragments. wt=Wildtypallel, cond=konditionales Allel, Sox=Sox2-Cre-Rekombinase, Ksp=Ksp1.3-Cre-Rekombinase, Vil=Villin1-Cre-Rekombinase, WC=Wildtypallel und konditionales Allel

Allel	Primer	Sequenz	Produktlänge	Annealing Temperatur
wt	M6 wt-For	5'-AGAGACGTGCAGTGTAGGACAGAG-3'	549 bp	64°C
	M6 wt-Rev	5'-ACGGCACACAGAAAACACCAG-3'		
cond	M6 cond-For	5'-GCAAATACAAGCAACACCTCC-3'	368 bp	53°C
	M6 cond-Rev	5'-GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCC-3'		
Null	Null-For	5'-TGTCTTCCATGTTGCTACGA-3'	362 bp	59°C
	Null-Rev	5'-CTTCCGGTCCACAGTTCAT-3'		
Sox	SoxCre-For	5'-TCCGGGCTGCCACGACCAA-3'	446 bp	59°C
	SoxCre-Rev	5'-GGCGCGGCAACACCATTTTT-3'		
Ksp	KspCre-For	5'-ACCGCCTACCTGCTCAAGTGTC-3'	606 bp	59°C
	KspCre-Rev	5'-GGATCCGCCGCATAACCAGT-3'		
Vil	VilCre-For	5'-GTGTGGGACAGAGAACAAACC-3'	1100 bp	59°C
	VilCre-Rev	5'-ACATCTTCAGGTTCTGCGGG-3'		
WC	WC-For	5'-GATCCATTTCTGAGCAGCCGCCTTAG-3'	325 bp	59°C
	WC-Rev	GCAGACCTCCAGAGACCGCCAGTTTCAA-3'		

Die PCR wurde mit Hilfe eines Thermocyclers durchgeführt, bei dem die PCR-Parameter (Tab. IV 4 – IV 7) eingestellt werden konnten.

Tab. IV 4: PCR-Bedingungen für die Amplifikation des wt-Allels. p. Z.=pro Zyklus

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	94°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	0,5 min	
Annealing	75°C -1°C p. Z.	1 min	10
Elongation	72°C	1,5 min	
Denaturierung	94°C	0,5 min	
Annealing	64°C	1 min	35
Elongation	72°C	1 min	
Abschlussextension	72°C	5 min	1
	8°C	kontinuierlich	1

Tab. IV 5: PCR-Bedingungen für die Amplifikationen des cond-Allels und des Null-Allels. p. Z.=pro Zyklus

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	0,5 min	
Annealing	64°C -1°C p. Z.	0,5 min	10
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	95°C	0,5 min	
Annealing	53°C	0,5 min	35
Elongation	72°C	1 min	
Abschlussextension	72°C	5 min	1
	8°C	kontinuierlich	1

Tab. IV 6: PCR-Bedingungen für die Amplifikationen der Sox-Cre-Rekombinase und der WC-PCR. p. Z.=pro Zyklus

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	94°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	0,5 min	
Annealing	70°C -1°C p. Z.	0,5 min	10
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	95°C	0,5 min	
Annealing	59°C	0,5 min	35
Elongation	72°C	1 min	
Abschlussextension	72°C	5 min	1
	8°C	kontinuierlich	1

Tab. IV 7: PCR-Bedingungen für die Amplifikationen der Ksp-Cre-Rekombinase und der Vil-Cre-Rekombinase. p. Z.=pro Zyklus

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	0,5 min	
Annealing	70°C -1°C p. Z.	1 min	10
Elongation	72°C	1,5 min	
Denaturierung	95°C	0,5 min	
Annealing	59°C	1 min	35
Elongation	72°C	1,5 min	
Abschlussextension	72°C	5 min	1
	8°C	kontinuierlich	1

Alle Amplifikationen wurden freundlicherweise durch Frau Renate Heilmair am Walther-Straub-Institut etabliert.

2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente diente die Agarose-Gelelektrophorese. Bei diesem Verfahren wird die DNA in die Taschen eines Agarosegels pipettiert. Das Gel befindet sich in einem Laufpuffer (1x TAE-Puffer) und mit Hilfe von Elektroden wird ein

Spannungsfeld aufgebaut. Da die Nukleinsäuren negativ geladen sind bewegen sie sich in einem elektrischen Feld in Richtung der Kathode. Dabei fungiert das Gel wie ein Molekularsieb, das von kleineren DNA-Fragmenten aufgrund geringerer sterischer Hinderung schneller passiert werden kann. Es erfolgt also eine Auftrennung der Moleküle entsprechend ihrer Größe bzw. Länge. Durch Zugabe der fluoreszierenden Substanz Ethidiumbromid (EtBr; Carl-Roth), die zwischen den Wasserstoffbrücken des DNA-Doppelstrangs interkaliert, oder der Färbemischung Roti®-Safe GelStain (Carl-Roth) können die DNA-Banden anschließend unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht, lokalisiert und dokumentiert werden.

Zum Nachweis der PCR-Produkte und zur Abschätzung der relativen Quantität und Qualität der Proben wurden diese auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Zunächst wurden 200 ml 1x TAE-Puffer durch eine 1:50-Verdünnung der 50x Stammlösung hergestellt und mit 2 g Agarose (Roth) versetzt. Die Suspension wurde unter Verwendung einer Mikrowelle aufgeköcht und gelöst. Nachdem die homogene Lösung abgekühlt war, erfolgte die Zugabe von 10 µl EtBr. Später wurde das EtBr aus Sicherheitsgründen durch 10 µl Roti®-Safe GelStain ersetzt. Zur weiteren Herstellung des Gels wurde die Lösung in eine abgedichtete Gelkammer gegossen und nach Einsetzen von zwei Kämmen für mindestens 30 Minuten ausgehärtet. Anschließend wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer platziert und mit 1x TAE-Puffer überschichtet, der als Laufpuffer diente. Danach mussten die Kämmen entfernt und jeweils 23 µl der Proben aufgetragen werden. Zur Einordnung der Produktgrößen wurde als Längenstandard eine 100bp-DNA-Leiter (Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 100 V für ca. 45 Minuten. Am Ende wurden die Gele in der Geldokumentation (peQLab) photographisch analysiert.

3 Histologische und histochemische Methoden

Die zu untersuchenden Organe können auf verschiedene Art und Weise für eine histologische Untersuchung vorbereitet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dabei zum Einen die Kryostat-Histologie und zum Anderen die Paraffin-Histologie angewendet. Nachfolgend sind die üblichen Vorgehensweisen beschrieben, die mit einer eventuellen Fixierung beginnt. Es folgt die Einbettung und schließlich das Anfertigen von Schnittpräparaten.

3.1 Organentnahme und Fixierung

Nach Tötung der Maus durch eine zervikale Dislokation wurden die zu untersuchenden Organe präpariert und je nach Art der Einbettung fixiert oder nicht.

Eine der gebräuchlichsten Art der Gewebeerhaltung ist die Formalin-Fixierung. Dabei denaturiert und vernetzt Formaldehyd die Proteine und verleiht dem Gewebe eine

gummiartige Konsistenz. Zur Fixierung wurden die Proben in 4% Paraformaldehyd/ 1 x PBS überführt. Nach 24-48 h wurde diese Formalin-Lösung durch eine 0,4% Paraformaldehyd/1 x PBS-Lösung ersetzt. Darin lagerten die Gewebe bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C.

3.2 Einbettung der Organe

3.2.1 Einbettung in Gefriermedium - Kryokonservierung

Diese Einfriermethode der Gewebe ist eine der einfachsten Methoden organische Proben haltbar zu machen. Die Wassermoleküle in den Zellen werden dabei unbeweglich und fixieren demzufolge die Zellstrukturen.

Zur Kryokonservierung wurden die Proben direkt nach der Entnahme in eiskaltes *freezing tissue*-Medium (Leica) eingebettet und sofort eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.2 Einbettung in Paraffin

Die Paraffin-Einbettung erfordert eine aufwendigere Bearbeitung der Organe als bei der Kryo-Histologie. Jedoch ist die Strukturhaltung deutlich besser.

Nach der Formalin-Fixierung (Kap. IV 3.1) wurden die Gewebeproben mit heißem Paraffinwachs (Paraplast Plus, Carl Roth) durchtränkt. Da Paraffin jedoch nicht wasserlöslich ist, mussten die Proben zuvor in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden. Der Alkohol wurde anschließend durch Xylol verdrängt, welches durch Paraffin ersetzt wurde. Dies wurde im Rechtsmedizinischen Institut der LMU München mit Hilfe eines Gewebefiltrationsautomaten (Leica) unter Leitung von Frau Susanne Ring durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate in ein Gießschälchen gelegt, in heißem Paraffin eingeschlossen und nach Abkühlen als Paraffinblock herausgebrochen, wobei die Einbettkassette den Blockträger bildete. Bis zur Anfertigung der Schnitte wurden diese bei 4°C gelagert.

3.3 Schneiden der Präparate

3.3.1 Gefrierschnitte mit dem Kryotom

Die Gefrierschnitte wurden an einem Kryotom (Leica) durchgeführt. Die eingefrorenen Präparate wurden zunächst auf einen Halter mit dem Gewebeeinbettmedium für Gefrierschnitte aufgebracht. Dann konnten die Proben in dem von oben zugänglichen Gefrierschrank am Kryotom bei -20°C von einem Rotationsmikrotom geschnitten werden und

verblieben während des gesamten Schneidevorganges in diesem gekühlten Bereich. 8 – 12 µm dicke Schnitte wurden auf Objektträgern angeschmolzen und getrocknet. Falls diese nicht sofort für weitere Analysen bearbeitet wurden, erfolgte die weitere Lagerung im -80°C-Gefrierschrank.

3.3.2 Paraffinschnitte mit dem Schlittenmikrotom

An einem Schlittenmikrotom (Leica) wurden 3 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Dabei wurden die gekühlten Paraffin-Blöckchen am Mikrotom eingespannt und in dünne Scheiben geschnitten. Die erhaltenen Schnitte wurden zunächst in einem kalten Wasserbad aufgefangen und mit Hilfe eines Objektträgers (Superfrost Plus; Menzel) auf ein Heißwasserbad (45°C; Leica) überführt. Darin konnten die Präparate vorsichtig geglättet werden und auf Superfrost-Objektträger aufgezogen werden. Die angetrockneten Paraffinschnitte konnten bis zu weiteren histologischen Untersuchungen bei 4°C aufbewahrt werden.

3.4 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie kann unter anderem identifiziert werden, in welchem Gewebe ein bestimmtes Protein vorhanden ist und in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert ist. Dabei nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen bzw. Epitopen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Die Antigen-Antikörperreaktion wird dann mittels Detektionssystemen dargestellt und ist somit der mikroskopischen Analyse zugänglich. Man spricht auch von Immunfluoreszenz, wenn die Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Es gibt zahlreiche Methoden.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden, sowie unterschiedliche Primärantikörper getestet, um eine bestmögliche Detektion des TRPM6-Proteins zu erzielen.

3.4.1 Indirekte Methode (Zwei-Schritt-Methode)

Der Nachweis von Proteinen erfolgt bei der indirekten Methode mit einem zweiten Antikörper (Sekundärantikörper), welcher spezifisch an den ersten Antikörper (Primärantikörper) bindet und selbst mit einem Marker versehen ist (Abb. IV 6). Diese Methode ist sensitiver als die direkte, da mehrere Sekundärantikörper an den primären binden können und somit eine Signalverstärkung hervorrufen. Für verschiedene Primärantikörper kann immer der gleiche Sekundärantikörper verwendet werden.

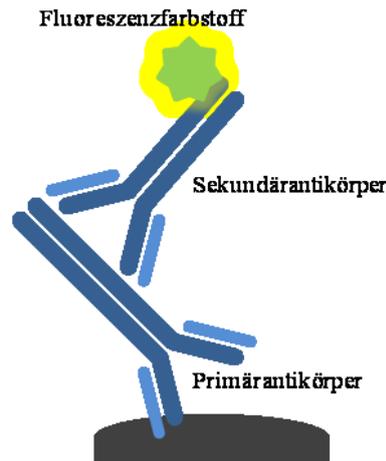


Abb. IV 6: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das zu analysierende Protein (grau). Ein zweiter Antikörper, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist bindet in einem zweiten Schritt an den Primärantikörper.

Immunfluoreszenz an Kryoschnitten

Der Nachweis des TRPM6-Proteins in den jeweiligen Organen der Kontrolltiere bzw. die Abwesenheit in den *Knockout*-Mäusen erfolgte über die Immunfluoreszenzfärbung. Die Färbung erfolgte nach einigen Modulationen nach dem Protokoll von Kaske *et al.* (2007). Zunächst wurden die Gefrierschnitte angetrocknet und mit einem *Dako Pen* (Dako Cytomation) umrandet, um eine hydrophobe Barriere zu schaffen. Die Fixierung mit 2% Paraformaldehyd in 1 x PBS dauerte 20 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Schnitte zwei Mal mit PBS und ein Mal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Das Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte eine Stunde bei Raumtemperatur in 1 x PBS mit 10% Ziegen Serum und 0,5% Triton X 100. Zum Nachweis des Proteins wurden verschieden getestete Primärantikörper (Tabelle IV 8) in 1 x PBS mit 10% Ziegen Serum und 0,5% Triton X 100 verdünnt und auf die Objektträger pipettiert. Anfänglich erfolgte die Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Doch im Zuge von Optimierungsschritten wurde diese geändert und erfolgte über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer. Durch drei Waschschrte mit PBS wurden nicht gebundene Primärantikörper entfernt. Zur Detektion des primären Antikörpers und somit des Proteins wurden die Schnitte in 1 µg/ml des sekundären Antikörpers Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit-IgG für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Überschüssige Sekundärantikörper wurden durch dreimaliges Waschen (zwei Mal mit PBS, ein Mal mit deionisiertem Wasser) entfernt. Anschließend wurden die Präparate mit *Dako Mounting Fluid* (Dako Cytomation) eingedeckt und am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) sowie am Laser Scanning Mikroskop LSM 540 Meta (Zeiss) ausgewertet (Kap. IV 3.5).

Tab. IV 8: Verwendete Primärantikörper und Seren mit deren Konzentrationen und Verdünnungen für die Immunfluoreszenz an Kryoschnitten.

Antikörper/-seren	Konzentration	Verdünnung
Guinea pig anti-mouse serum		1:200; 1:500; 1:1000
Anti-TRPM6 (extrazellulär)	0,9 µg/µl	1; 2; 5 µg/ml
Rabbit anti-mouse TRPM6 125		1:500; 1:1000; 1:2000
Rabbit anti-mouse TRPM6 126		1:1000; 1:2000
Rabbit anti-phospho-mouse 62		1:500; 1:1000; 1:2000
Rabbit anti-phospho-mouse 63		1:500; 1:1000; 1:2000
Phospho-TRPM6	0,075 µg/µl	0,75; 1,5 µg/ml
Non-Phospho-TRPM6	2 µg/µl	0,5; 1; 2; 5 µg/ml
Rabbit anti-mouse TRPM6 512		1:1000; 1:2000
Rabbit anti-mouse TRPM6 513		1:1000; 1:2000
Ab 75a anti-TRPM6 *	1,6 µg/µl	0,5; 1; 2 µg/ml
Ab 75b anti-TRPM6 *	3,5 µg/µl	0,5; 1; 1,5; 2 µg/ml
Ab 76 anti-TRPM6	0,76 µg/µl	0,5; 1; 2 µg/ml

Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten

Da die Strukturhaltung der Gewebe in Paraffinschnitten deutlich besser ist und die Lokalisation des zu untersuchenden Proteins besser erkennbar ist, erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung ebenfalls an Paraffinschnitten. Wie auch schon bei der Paraffineinbettung benötigen Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Organe eine spezielle Vorbehandlung, damit der Nachweis mittels Immunfluoreszenz gelingt.

Im ersten Schritt wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydriert, um den wasserlöslichen Antikörpern Zugang zu ihrem Epitop zu gewähren. Dazu wurden die Objektträger im Xylol-Ersatz Rotihistol und der nachfolgenden absteigenden Alkoholreihe inkubiert:

Rotihistol I 10 min
 Rotihistol II 10 min
 Ethanol 100% I 5min
 Ethanol 100% II 5 min
 Ethanol 80% 5 min
 Ethanol 70% 5 min
 Deionisiertes Wasser 5 min
 Deionisiertes Wasser 5 min

Anschließend mussten die Formalin-bedingten Proteinvernetzungen wieder aufgebrochen werden, da diese die Antigene demaskieren können. Durch eine Mikrowellenbehandlung erfolgte die Demaskierung. Dazu wurden die Schnitte in ein offenes, mikrowellene geeignetes Gefäß mit getesteten Puffern (Zitronensäurepuffer, Natriumcitratpuffer, EDTA-Puffer, Tris-EDTA-Puffer) gestellt und in der Mikrowelle 10 min gekocht. Später erfolgte die Antigenmaskierung allein mit dem Zitronensäurepuffer. Nachdem die Präparate abgekühlt waren, wurden sie kurz mit deionisiertem Wasser gespült und mit einem *Dako Pen* umrandet. Dann folgten Blockierung, Inkubation des ersten und zweiten Antikörpers, sowie das Eindecken am Ende (siehe Immunfluoreszenz an Kryoschnitten).

Tab. IV 9: Verwendete Primärantikörper mit deren Konzentrationen und Verdünnungen für die Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten.

Antikörper	Konzentration	Verdünnung
Ab 75b anti-TRPM6	3,5 µg/µl	0,5; 1; 2; 4; 6 µg/ml

3.4.2 Direkte Methode

Die direkte Methode ähnelt der indirekten Methode (Kap. IV 3.4.1). Der Fluoreszenzfarbstoff ist jedoch direkt an dem ersten Antikörper gebunden. Somit wird ein sekundärer Antikörper nicht benötigt.

Um in dieser Arbeit die direkte Methode der Immunfluoreszenz verwenden zu können, musste vorerst der primäre Antikörper Ab 75b anti-TRPM6 mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Dafür wurde das kommerzielle Kit *Mix-n-Stain™ CF™488A Antibody Labeling Kit* von Sigma-Aldrich verwendet und gemäß Herstellerangaben verfahren. Es wurden die Konzentrationen 0,5, 1 und 2 µl/ml des markierten Primärantikörpers an Kryoschnitten getestet.

3.4.3 Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode

Das Grundprinzip dieser Methode beruht auf der hohen Affinität des Streptavidins für Biotin. Doch zunächst bindet der primäre Antikörper an das nachzuweisende Protein bzw. Epitop. Dieser wird durch einen sekundären biotinylierten Antikörper detektiert, an dem sich dann wiederum das fluoreszenzmarkierte Streptavidin bindet und analysiert werden kann. Bei dieser Technik kommt es zu einer Signalverstärkung, da mehrere Streptavidin-Proteine an den Sekundärantikörper bindet können.

Für eine Immunfluoreszenzfärbung mit Streptavidin und Biotin wurden der *Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L)*, das *DyLight®488 Streptavidin* und ein *Streptavidin/Biotin Blocking Kit* von BIOZOL angewandt und nach Herstellerangaben an Kryoschnitten durchgeführt. Der primäre Antikörper Ab 75b anti-TRPM6 wurde mit den Konzentrationen 0, 0,1, 0,2, 0,3 und 0,5 µg/ml eingesetzt.

3.4.4 Peroxidase-Reaktion (Meerrettichperoxidase, *Horseradish peroxidase* HRP)

Die Meerrettichperoxidase (HRP) wird in der Biotechnologie oft als Marker-Enzym eingesetzt. Sie ist am sekundären Antikörper gekoppelt und nach Zugabe eines Substrates, wird dieses fast farblose Chromogen zu einem farbigen Endprodukt oxidiert.

Die Peroxidase-Reaktion wurde mit Hilfe des *TSA™PLUS Fluorescence Kits* von PerkinElmer durchgeführt. Dabei war das Substrat der HRP ein mitgeliefertes Fluorophor markiertes Tyramid-Amplifikationsreagenz. Diese Methode wurde an Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten Geweben angewendet. Der primäre Antikörper Ab 75b anti-TRPM6 wurde mit den Konzentrationen 0,05, 0,25, und 0,5 µg/ml eingesetzt.

3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Proben wurden zunächst an einem Olympus Mikroskop (Model IX71S1F-3, OLYMPUS Cooperation) begutachtet und einer ersten Bewertung unterzogen. Mit einem Laser Scanning Mikroskop LSM 540 Meta (Zeiss) wurden Aufnahmen erstellt. Dafür wurden folgende Einstellungen am konfokalen Mikroskop verwendet:

Objektiv: 20x; 63x/1,4 Öl-Objektiv
Strahlenverteiler: 488 nm dichroitischer Strahlteiler
DBS1: Mirror
DBS2: Mirror
Wellenlänge: 488 nm
Filter: Ch2:LP 505; BP 505-570 IR
Lochblende: Ch2: 400 - 550 µm

Mit dem Programm Zeiss LSM Image Browser Version 4,2 wurden die Aufnahmen am Ende bearbeitet und archiviert.

3.6 *In-Situ*-Hybridisierung

Zur Identifizierung der Genexpression in einem bestimmten Gewebe, gibt es neben der Antikörperlokalisation die Möglichkeit, die zur Translation verfügbare genspezifische mRNA zu lokalisieren. Dabei wird bei der RNA *In-Situ*-Hybridisierung eine künstlich hergestellte Sonde eingesetzt, welche durch komplementäre Basenpaarung an die nachzuweisende mRNA hybridisieren kann. In einem weiteren Schritt nach der Hybridisierung können Antikörper, die gegen einen Marker gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt sind, verwendet werden. Der Nachweis erfolgt dann wie bei der Immunhistologie, mittels eines löslichen, farblosen Substrates, welches durch die Aktivität des Enzyms zu einem farbigen Niederschlag reagiert. Die *In-situ*-Hybridisierung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. David Simmons von der *University of Queensland* in Australien übernommen.

3.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) an Formalin-fixiertem Gewebe stellt eine bewährte Methode zur Übersichtsfärbung dar. Man erhält hierbei ein Überblick über das gesamte Gewebe, die Struktur, die Zellverteilung sowie die Kern-Plasma-Relationen, um etwaige Abnormitäten auffindig machen zu können. Dabei führt die Hämalaunfärbung in erster Linie zur kontrastreichen Darstellung der Zellkerne in blauem oder violetter Farbton, sie ist im Wesentlichen eine Kernfärbung. Daneben färben sich auch Ergastoplasma, Muzin, Bakterien, Kalkeinschlüsse und saure Grundsubstanzen blau. Eosin dagegen färbt Cytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern kräftig rot. Auch Kernstrukturen nehmen den Farbstoff an, wodurch nach vorangegangener Kernfärbung mit Hämalaun das typische rötlich-violette Mischbild entsteht.

Die Paraffinschnitte mussten zunächst endparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert werden:

Rotihistol I 10 min
Rotihistol II 10 min
Ethanol 100% I 5min
Ethanol 100% II 5 min
Ethanol 80% 5 min
Ethanol 70% 5 min
Deionisiertes Wasser 5 min

Dann wurden die Schnitte zur Färbung zunächst in Mayer's Hämalaun-Lösung (Carl Roth) inkubiert und im Anschluss zum Bläuen zehn Minuten in Wasser gewaschen. Die Inkubationszeit betrug nach mehreren Optimierungsschritten am Ende acht Minuten. Die

Plasmafärbung folgte mit einer 0,5% wässrigen Eosin Y-Lösung (Carl Roth) für 13 Minuten. Nach einem kurzen Spülen mit deionisiertem Wasser wurden die Präparate mit folgender aufsteigender Alkoholreihe dehydriert:

Ethanol 70% 5 min

Ethanol 80% 5 min

Ethanol 100% II 5 min

Ethanol 100% I 5min

Rotihistol II 5 min

Rotihistol I 5 min

Am Ende wurde mit Eukitt eingedeckt und die Morphologie der Gewebe mit Hilfe eines Olympus CX41 Mikroskops begutachtet und dokumentiert.

4 Biochemische Methoden

4.1 Stoffwechselkäfig

Um die gesamte Magnesiumbalance im Körper und weitere Metabolite bestimmen zu können, wurden acht Wochen alte, männliche Mäuse für 24 Stunden in Stoffwechselkäfige (*Acme Metal Products*, Chicago, USA, *model No. AC-5262*) gehalten. Diese befanden sich im regulären Tierstall, so dass während der Versuchsdauer der gewohnte Lichtzyklus und Temperaturbedingungen (Kap. IV 1.5) beibehalten werden konnten. Wasser und Futter wurden *ad libitum* angeboten. Während der 24 Stunden wurden Urin und Faeces getrennt aufgefangen. Nach Versuchsende wurden die Versuchstiere gewogen und aus der Gesichtsvene Blut gewonnen. Das Blut wurde anschließend bei 1200 x g für 30 Minuten zentrifugiert, um das Serum zu erhalten.

4.2 Photometrische Analysen

Die Photometrie ist ein klassisches Bestimmungsverfahren im Wellenbereich des ultravioletten und sichtbaren Lichtes. Sie dient dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Elementen und Verbindungen. Das Prinzip beruht auf dem Lambert-Beer-Gesetz: Die Änderung der Intensität eines Lichtstrahls durch ein absorbierendes Medium ändert sich exponentiell mit der Konzentration und Schichtdicke (Beer, 1952). Die Messung selbst erfolgt mit Hilfe von photoelektrischen Messeinrichtungen. Bei einer photometrischen Messung werden von einer Lichtquelle bestimmte Wellenlängen durch einen Filter oder Prismen selektiert. Der Lichtstrahl gelangt zur Küvette, in der sich die zu messende Probe befindet,

und wird von dort zum Strahlungsempfänger geleitet, der an eine Intensitätsanzeige angeschlossen ist.

4.2.1 Proteinbestimmung im Serum

Die quantitative Bestimmung von Proteinen im gewonnenen Serum erfolgte nach der kolorimetrischen Methode nach Bradford (1976). Das Prinzip hierbei beruht auf die Farbänderung des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie Brilliant Blau durch die Bindung an Proteine. Durch diese Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (ungebundene braunrote kationische Form) auf 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form). Die Kolorierung der Messlösung schlägt also in Anwesenheit von Proteinen von Braun in ein kräftiges Dunkelblau um. Durch die Erstellung einer Kalibrierungsgeraden kann die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe quantifiziert werden. Als Standard für die Eichung wird häufig das Rinder-Serum-Albumin (BSA) verwendet.

Mit Hilfe des *Protein Quantification Kit-Rapid* und nach Herstellerangaben (Standard-Assay für das Spektrophotometer) wurde die Proteinkonzentration im murinen Serum bestimmt. Die Proben wurden 1:50 verdünnt und als Triplikate in Plastik-Einweg-Küvetten in einem Photometer (BioPhotometer plus; Eppendorf) gemessen. Die Berechnung der Kalibrierungskurve erfolgte mit der Software *GraphPad Prism* (Version 3.02).

4.2.2 Magnesiumbestimmung mit Eriochromschwarz T

Eriochromschwarz T ist ein Azofarbstoff, welcher als metallochromer Indikator eingesetzt wird (Dirscherl & Breuer, 1952). Im pH-Bereich um 10 zeigen die gebildeten Metall-Indikator-Komplexe eine weinrote Färbung, während der freie Farbstoff in verdünnter Lösung blau gefärbt ist. Sind also Magnesiumionen in einer Lösung, entsteht ein Farbumschlag von blau zu rot. Die Intensität der Färbung wird photometrisch bestimmt.

Da außer Magnesium auch andere Ionen mit Eriochromschwarz T reagieren, wie das Calciumion (Dirscherl & Breuer, 1952), wurde in Vorversuchen die Magnesiumbestimmung von Lösungen, die Calcium und Magnesium in äquimolarer Menge enthielten mit Lösungen, die die gleiche Menge an Magnesium, aber kein Calcium enthielten, verglichen (Dirscherl & Breuer, 1952). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Magnesiumbestimmung durch andere Ionen gestört wird. Zu jedem Versuch wurde eine Kalibrierungskurve aus Lösungen mit äquimolarer Magnesium- und Calciummengen (0 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , 250 μM , 300 μM) erstellt.

Für die Bestimmung der Magnesiumkonzentration in Serum und Urin wurden die Serumproben zunächst 1:10 und die Urinproben 1:100 und teilweise 1:200 verdünnt. Anschließend wurden 50 µl der Proben in Mikroküvetten überführt und mit 500 µl 1 mM Eriochromschwarz T-Lösung, die 1:20 in einem Ammoniak-Ammoniumsalz-Puffer mit pH 10 verdünnt war, versetzt. Die Absorptionen bei 550 nm und 650 nm wurden im Photometer bestimmt. Im Zuge von Optimierungsschritten wurden die Reaktionslösungen auf 96-Lochplatten aufgetragen. Dazu wurden nur noch 20 µl der Proben mit 200 µl 1 mM Eriochromschwarz T-Lösung versetzt und die Absorptionen am FLUOstar Omega (BMG Labtech) gemessen. Die Berechnung der Kalibrierungskurve, welche zur Quantifizierung der Proben diente, erfolgte mit der Software *GraphPad Prism* (Version 3.02).

4.2.3 Calciumbestimmung

Die Calciumkonzentration im Serum und Urin der *Trpm6*-defizienten Mäuse und Kontrolltiere wurde nach dem Protokoll des BioVision's *Colorimetric Calcium Assay Kits* gemessen. Dieses Kit nutzt die Bildung eines chromogenen Komplexes zwischen Calciumionen und Kresolphthalein aus. Serumproben wurden mit einer Verdünnung von 1:25 und Urinproben mit einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Die bei 575 nm im FLUOstar Omega (BMG Labtech) gemessenen Duplikate konnten mit der erstellten Kalibrierungskurve des mitgelieferten Calciumstandards mittels *GraphPad Prism* Version 3.02-Software quantifiziert werden.

4.2.4 Zinkbestimmung

Um eine Veränderung der Zinkkonzentration im Urin feststellen zu können, wurde diese mit dem BioVision's *Colorimetric Zinc Assay Kit* bestimmt. Hierbei handelte es sich um eine kolorimetrische Bestimmung. Die Prozedur wurde nach Herstellerangaben mit unverdünnten Proben durchgeführt und die Absorption bei 560 nm mit dem FLUOstar Omega gemessen. Die weitere Auswertung erfolgte mit der *GraphPad Prism* Version 3.02-Software.

4.2.5 Phosphatbestimmung

Zum Bestimmen der Phosphatmengen im Urin und Serum der mutierten Mausgruppen und deren Kontrollgruppen wurde das *Malachite Green Phosphate Detection Kit* herangezogen und gemäß Herstellerangaben verfahren (Urinproben 1:600 und 1:800 verdünnt; Serumproben 1:100). Das *Assay* basierte auf der Komplexbildung des anorganischen Phosphat mit Molybdat (Fiske & Subbarow, 1925). Der Phosphat-Molybdat-Komplex wurde mit dem Farbstoff

Malachitgrün angefärbt und die entstandene blau-grün Färbung bei einer Absorption von 620 nm am FLUOstar Omega gemessen. Die weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe der *GraphPad Prism* Version 3.02-Software.

4.2.6 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde in dieser Arbeit angewendet, um weitere Spurenelemente und mit anderen Verfahren gemessene Elemente in Serum, Urin, Faeces und Knochen zu bestimmen. Dabei wurde die Technik der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) genutzt. Diese Analysemethode ermöglicht eine Multielementbestimmung im Spuren- und Ultraspurenbereich. Dabei wird das Probenmaterial mit Hilfe eines pneumatischen Zerstäubersystems in ein feines Aerosol überführt und in einem Argon-Plasma bei ca. 5000°C ionisiert. Die Ionen werden in das Vakuum-System des Massenspektrometers geleitet. Durch ein Magnetfeld können die Ionen dann nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis oder Energie/Ladungsverhältnis aufgetrennt und detektiert werden (Houk et al., 1980). Die Gerätesteuerung, Datenerfassung und Auswertung erfolgen mit Hilfe eines PCs.

Die Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ilia Rodushkin von der Firma ALS Scandinavia AB in Schweden durchgeführt.

4.3 ELISA

Als ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) bezeichnet man ein immunologisches Verfahren, bei dem gebundene Antigene oder Antikörper mit Hilfe eines gekoppelten Enzyms, welches eine farblose Substanz in ein farbiges Produkt umwandelt, nachgewiesen werden (Engvall & Perlmann, 1971; Van Weemen & Schuurs, 1971).

Für das Verfahren wird eine Mikrotiterplatte benötigt, welche mit einem Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen der zu quantifizierenden Substanz beschichtet ist. Der Antikörper bindet an das Antigen nach Zugabe der Probe. Der Überstand wird verworfen und in einem Waschschrift werden die nicht und unspezifisch gebundenen Antigene entfernt. Ein zweiter zugefügter Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und bildet ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Das am sekundären Antikörper gekoppelte Enzym aktiviert ein zugegebenes chromogenes Substrat durch Spaltung. Die Intensität des Farbstoffes kann photometrisch erfasst werden und ist proportional zur Menge des gebundenen Zielmoleküls. Die Konzentration wird am Ende anhand einer Kalibrierungskurve berechnet.

4.3.1 IGF-I-Immunoassay

Der Insulinähnliche Wachstumsfaktor I (IGF-I) im murinen Serum wurde über ein Quantikine® ELISA-Kit (*Mouse/Rat IGF-I Immunoassay*, R&D-Systems) bestimmt. Dabei wurde gemäß Herstellerangaben verfahren. Die Serumproben der *Trpm6*-defizienten Mäuse wurden dabei 1:500 verdünnt, während die Proben der Kontrollgruppe mit einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurden. Die Farbintensität wurde am FLUOstar Omega bei einer Absorption von 450 nm gemessen und anschließend mit der *GraphPad Prism* Version 3.02-Software ausgewertet.

4.3.2 Insulin-Bestimmung

Für die Bestimmung des Insulin-Spiegels im murinen Serum wurde ein ELISA-Kit (*Rat/Mouse Insulin*, Millipore) verwendet und gemäß den Instruktionen des Herstellers verfahren. Die Absorption bei 450 nm und 590 nm wurde wiederum mit dem FLUOstar Omega gemessen. Zur Auswertung diente im Anschluss die *GraphPad Prism* Version 3.02-Software.

4.3.3 Somatotropin-Bestimmung (*Growth-Hormone*)

Die GH-Konzentration im Serum von gendefizienten Mäusen und deren Kontrollgruppe wurde mit Hilfe eines ELISA-Kits (*Rat/Mouse growth hormone*, Millipore) bestimmt. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Absorptionen bei 450 nm und 590 nm wurden mit dem FLUOstar Omega gemessen. Die weitere Auswertung erfolgte mit der *GraphPad Prism* Version 3.02-Software.

4.3.4 Oxidativer Stress

Als oxidativer Stress wird das fortwährende Ungleichgewicht zwischen hochreaktiven, aggressiven Oxidanzien einerseits und schützenden Antioxidanzien andererseits bezeichnet. Durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die endogenen wie exogenen Ursprungs sein können, werden zahlreiche Zellstrukturen geschädigt, unter anderem die DNA und RNA (Evans et al., 2004). 8-Hydroxydeoxyguanosin (OHdG) ist einer der am häufigsten detektierten DNA-Schäden. In der vorgelegten Arbeit wurde daher eine 8-OHdG Bestimmung durchgeführt, um Rückschlüsse auf den oxidativen Stress zu ziehen.

4.3.4.1 8-Hydroxydeoxyguanosin-Bestimmung

8-OHdG entsteht durch die Oxidation von Deoxyguanosin in der DNA des Zellkerns und insbesondere der Mitochondrien. Diese Schäden werden von den zahlreichen DNA-Reparatur-Mechanismen, welche sich im Laufe der Zeit entwickelt haben, erkannt und entfernt. 8-OHdG gelangt in den Urin und wird ausgeschieden (Chiou et al., 2003).

Die Bestimmung von 8-OHdG im murinen Urin erfolgte mit dem *DNA Damage EIA Kit* (Enzo) gemäß Herstellerangaben. Die Messung der Absorption bei 450 nm erfolgte mit dem FLUOstar Omega. Die weitere Auswertung erfolgte mit der *GraphPad Prism* Version 3.02-Software.

4.3.5 Zytokin-Bestimmung

Zytokine sind eine Gruppe von Signalproteinen, die in inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielen (Jaffer et al., 2010). Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen zählen der Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und das Interleukin 6 (IL-6).

4.3.5.1 TNF- α -Bestimmung

Um eine Erhöhung des TNF- α im Serum der *Trpm6*-defizienten Mäuse feststellen zu können, wurde dieser mit Hilfe des *Mouse TNF- α ELISA Kit* (U-CyTech) bestimmt. Die Prozedur wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Intensität der Färbung des Endproduktes wurde am FLUOstar Omega bei einer Absorption von 450 nm gemessen und mit der *GraphPad Prism* Version 3.02-Software ausgewertet.

4.3.5.2 Interleukin 6-Bestimmung

Die Bestimmung von IL-6 im Serum erfolgte mit dem *Mouse IL-6 CytoMax ELISA Kit* (U-CyTech) gemäß Herstellerangaben. Die Messung der Absorption bei 450 nm erfolgte mit dem FLUOstar Omega. Die weitere Auswertung erfolgte mit der *GraphPad Prism* Version 3.02-Software.

5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen *GraphPad Prism* Version 3.1 und *Excel 2007* (Microsoft). Wenn nicht anders angegeben, sind die Daten als

Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Für die Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde der zweiseitige studentische t-Test angewendet. Dabei wurden als Signifikanzniveaus die Grenzen $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ und $p \leq 0,001$ angesehen, welche mit *, ** und *** gekennzeichnet sind.

V Ergebnisse

In der vorgelegten Arbeit sollte anhand von Tiermodellen untersucht werden, inwieweit sich der Verlust von TRPM6 auf die Magnesiumhomöostase und die Physiologie auswirkt. Dazu wurden gendefiziente Linien erstellt, welche hinsichtlich ihres Phänotyps charakterisiert wurden. Der funktionellen Charakterisierung der *Trpm6*-defizienten Mauslinien ging eine eingehende Genotypisierung voraus. Im Anschluss wurden die *Trpm6*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu deren Kontrollgeschwistern hinsichtlich ihres Phänotyps mit histologischen und biochemischen Methoden analysiert.

1 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Nachkommen der verschiedenen Mauslinien erfolgte mit Hilfe der PCR. Mittels Immunhistochemie konnte die Abwesenheit des TRPM6 auf Proteinebene in verschiedenen Organen *Trpm6*-defizienter Mäuse nachgewiesen werden, um eine erfolgreiche Deletion zu überprüfen.

1.1 Genotypisierung mittels PCR

Zur Generierung eines konditionalen *knockouts* wurde ein konstruiertes Transgen homolog in das Mausgenom integriert (Kap. IV 1.1) und das *loxP/Cre*-Rekombinase-System verwendet (Kap. IV 1.2), wodurch das Leseraster des TRPM6-Proteins in Exon 17 zerstört wurde. Dabei stand die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle verschiedener Promotoren, um gewebe-spezifische Inaktivierungen generieren zu können. Durch die paternal vererbte *Sox2-Cre*-Rekombinase, welche in Epiblastzellen exprimiert wird (Kap. IV 1.4) (Hayashi et al., 2003), konnte das TRPM6-Protein im gesamten Organismus inaktiviert werden. Für eine intestinal-spezifische Deletion des TRPM6-Kanals wurde der *Villin1*-Promotor genutzt, um eine Expression der *Cre*-Rekombinase im intestinalen Epithel zu gewährleisten (Madison et al., 2002). Die *Ksp1.3-Cre*-Rekombinase wurde dagegen für eine nierenspezifische Deletion des TRPM6-Proteins eingesetzt (Shao et al., 2002).

Die Genotypisierung sollte zeigen, dass die Transkription und Translation von *Trpm6* vollständig oder nur organspezifisch abgeschaltet wurde. In Tabelle V 1 sind die möglichen Genotypen der Nachkommen angegeben.

Tab. V 1: Mögliche Genotypen der Nachkommen heterozygoter Zuchtpaare der verschiedenen Linien. Für jede Linie sind jeweils die Genotypen der Zuchtweibchen und Zuchtmännchen sowie der resultierenden Nachkommen angegeben. WT=Wildtyp-Allel, $\Delta 17$ =konditionales Allel, - =Nullallel

Linie	Weibchen	Männchen	Nachkommen
Globale <i>Trpm6</i>-Defizienz	<i>Trpm6</i> ^{$\Delta 17/\Delta 17$}	<i>Trpm6</i> ^{/WT} ; <i>Sox</i>	<i>Trpm6</i> ^{$\Delta 17/WT$} Kontrolle
			<i>Trpm6</i> ^{-/-} knockout
			<i>Trpm6</i> ^{$\Delta 17/-$} heterozygot
			<i>Trpm6</i> ^{-/WT} heterozygot
intestinalspezifische <i>Trpm6</i>-Defizienz	<i>Trpm6</i> ^{$\Delta 17/\Delta 17$}	<i>Trpm6</i> ^{/WT} ; <i>Vil</i>	<i>Trpm6</i> ^{$\Delta 17/WT$} Kontrolle
			<i>Trpm6</i> ^{-/-} ; <i>Vil</i> knockout
			<i>Trpm6</i> ^{$\Delta 17/-$} heterozygot
			<i>Trpm6</i> ^{-/WT} heterozygot
nierenspezifische <i>Trpm6</i>-Defizienz	<i>Trpm6</i> ^{$\Delta 17/\Delta 17$}	<i>Trpm6</i> ^{/WT} ; <i>Ksp</i>	<i>Trpm6</i> ^{$\Delta 17/WT$} Kontrolle
			<i>Trpm6</i> ^{-/-} ; <i>Ksp</i> knockout
			<i>Trpm6</i> ^{$\Delta 17/-$} heterozygot
			<i>Trpm6</i> ^{-/WT} heterozygot

Die Genotypisierung der Nachkommen der heterozygoten Zucht der verschiedenen Mauslinien erfolgte über vier separate PCR-Reaktionen unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Kap. IV 2.2; Tab. IV 3). Die ersten PCRs dienten dem Nachweis des Wildtyp-, konditionalen und des Null-Allels. Anschließend wurde für jede Linie die Expression der *Cre*-Rekombinase mit dem entsprechenden Promotor analysiert. Dazu wurde die *Sox2-Cre*-Rekombinase bei der globalen *Trpm6*-defizienten Mauslinie, die *Villin1-Cre*-Rekombinase bei der intestinalspezifischen *Trpm6*-defizienten und die *Ksp1.3-Cre*-Rekombinase bei der nierenspezifischen *Trpm6*-defizienten Linie amplifiziert. Zusätzlich wurde eine fünfte PCR (WC = Wt- und konditionales Allel) bei der global *Trpm6*-defizienten Mauslinie durchgeführt bei der das Wildtypallel sowie das konditionale Allel nochmals überprüft wurden.

In der folgenden Abbildung sind jeweils Beispiele für mutierte (*Trpm6*^{-/-}), heterozygote (*Trpm6* ^{$\Delta 17/-$}) und Kontrollmäuse (*Trpm6* ^{$\Delta 17/WT$}) der globalen *knockout*-Mauslinien dargestellt (Abb. V 1).

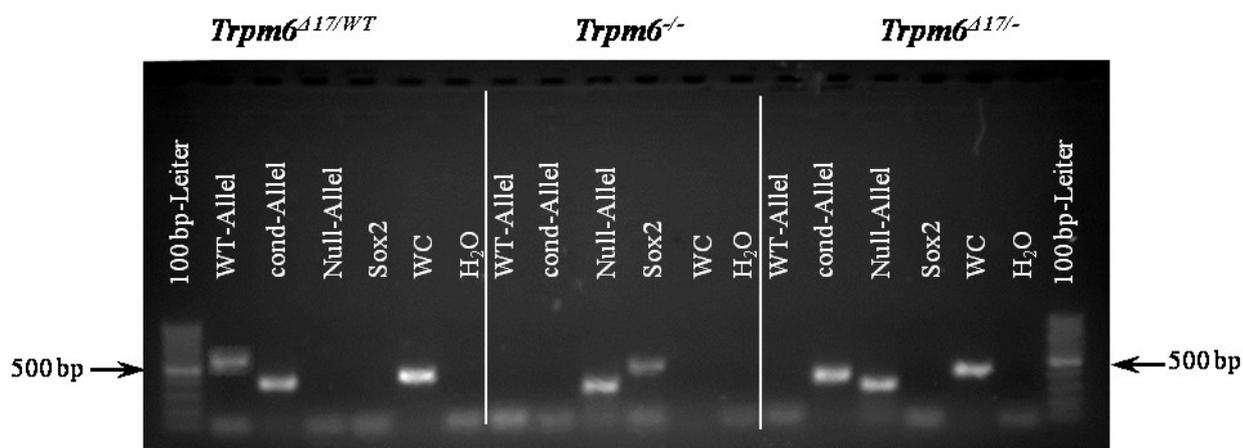


Abb. V 1: Genotypisierung mittels PCR. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte über fünf separate PCR: WT = Wildtypallele, cond = konditionales Allel = $\Delta 17$; Null-Allel = -, Sox2 = *Sox2-Cre*-Rekombinase, WC = WT- und konditionales Allel. *Knockout*-Mäuse (*Trpm6*^{-/-}) zeigen nur eine Nullallel-Bande und sind Träger der *Sox2-Cre*-Rekombinase. Als Negativkontrolle diente Reinstwasser.

Die Kontrollmäuse (*Trpm6* ^{$\Delta 17/WT$}) wiesen ein Wildtyp- und ein konditionales Allel, was sich nicht auf die Translation auswirkt und sich wie ein Wildtypallele verhält, auf. Zusätzlich konnte eine Bande nach der PCR für beide Allele (WC) festgestellt werden. *Knockout*-Mäuse zeigten nur eine Nullallel-Bande und waren Träger der *Sox2-Cre*-Rekombinase. In Abbildung V 1 ist zusätzlich eine heterozygote Maus mit einem konditionalen und einem Nullallel beispielsweise dargestellt.

Bei der intestinalspezifischen *Trpm6*-defizienten Mauslinie wurde statt der *Sox2-Cre*-Rekombinase, *Villin1-Cre* und bei der nierenspezifischen Deletion, *Ksp1.3-Cre* auf ein positives Amplifikationsereignis untersucht (Abb. VIII 1). Da sich die Genotypisierung mittels PCR nur auf Schwanzbiopsien beschränkte und nicht auf betreffende Organe, wiesen diese gewebespezifischen *knockout*-Mäuse zusätzlich ein konditionales Allel auf. Aus diesem Grund wurde die Inaktivierung des TRPM6-Proteins mit Hilfe der Immunhistochemie nochmals überprüft.

1.2 Defiziensnachweis mittels Immunhistochemie

Nach der Genotypisierung mittels PCR, wurde die *Trpm6*-Expression auf Proteinebene begutachtet. Zum Nachweis des TRPM6-Proteins bzw. Abwesenheit in *Trpm6*-defizienten Mäusen wurden immunhistochemische Analysen an verschiedenen Geweben mutierter Mäuse sowie deren Kontrollgeschwistern durchgeführt. Bei einer spezifischen Bindung der Antikörper an TRPM6 sollte demnach im Gewebe der gendefizienten Tiere keine Immunmarkierung detektierbar sein.

1.2.1 Immunhistochemischer Spezifitätstest von TRPM6-Antikörpern

Um die Expression des *Trpm6*-Gens in einem bestimmten Gewebe zu identifizieren, wurde unter anderem eine Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender Antikörperlokalisation durchgeführt. Dabei binden spezifische TRPM6-Primärantikörper an das Protein, die direkt oder indirekt markiert sind und am Ende am Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können. Jedoch sind nur wenige Antikörper, welche spezifisch am murinen TRPM6 binden, kommerziell erhältlich. Der Antikörper Anti-TRPM6 (extrazellulär) wurde von der Firma Alomone Labs (Jerusalem) hergestellt und das *guinea pig anti mouse*-Antiserum von der Firma abcam® (Cambridge). Alle weiteren Antiseren und Antikörper wurden bei Eurogentec (Belgien) mit Hilfe synthetischer Peptide hergestellt. Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit sieben Seren und fünf Antikörper getestet (Kap. IV 3; Tab. IV 8). Die Spezifität der einzelnen Antikörper wurde zunächst am Gewebe der Niere geprüft, da bereits eine hohe Expression des TRPM6-Proteins in der Niere beschrieben wurde (Schlingmann et al., 2002).

Mit den kommerziellen Antikörpern und Antiseren sowie mit den meisten hergestellten Antikörpern konnten keine spezifischen Signale beobachtet werden (Tab. VIII 1). Lediglich mit dem Antikörper Ab75 anti-TRPM6 (a und b) war das TRPM6-Protein spezifisch detektierbar. In Abbildung V 2 des nachstehenden Kapitels ist die Immunfluoreszenz exemplarisch gezeigt.

Nachdem der Ab75 anti-TRPM6-Antikörper positiv getestet wurde, konnte die Expressionsanalyse des TRPM6 auf Proteinebene analysiert werden und zeitgleich die Abwesenheit des TRPM6-Proteins in gendefizienten Geweben untersucht werden.

1.2.2 Immunhistochemischer Nachweis des TRPM6-Proteins in der Maus

Die Gewebespezifität der TRPM6-Expression wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es besteht allerdings die vorherrschende Meinung, dass sich die Expression hauptsächlich auf den Intestinaltrakt und die Niere beschränkt (Schlingmann et al., 2002; Chubanov et al., 2004; Voets et al., 2004).

Für die Expressionsanalyse der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Organe von mehreren Kontrollmäusen präpariert, in Paraffinblöcke eingeschlossen und einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Desweiteren wurden dieselben Gewebe von *Trpm6*^{-/-}-Mäusen auf eine Immunmarkierung bzw. deren Abwesenheit überprüft, um eine erfolgreiche Deletion des TRPM6-Proteins zu gewährleisten.

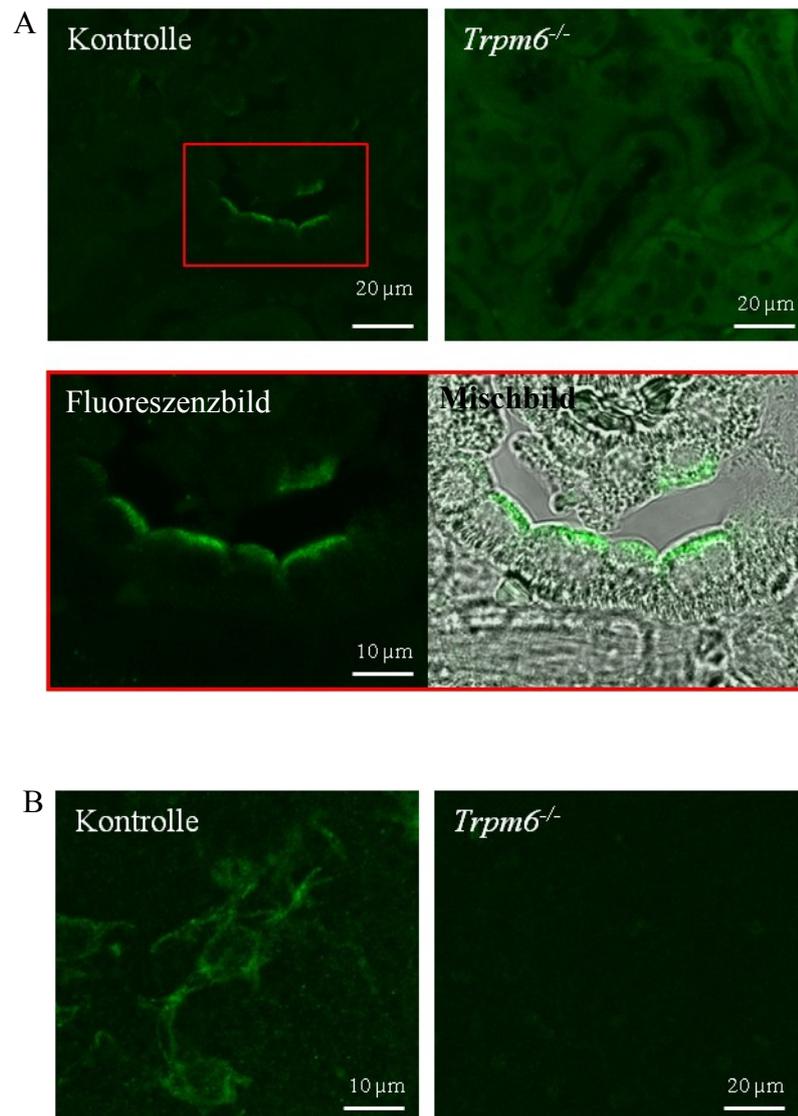


Abb. V 2: **A:** Nachweis des TRPM6-Proteins in Epithelialzellen der Niere bei Kontrollmäusen (*Trpm6*^{Δ17/WT}) mittels Immunfluoreszenzfärbung (Vergrößerung des Fluoreszenzbildes und zusätzlichem Mischbild sind rot umrandet) unter Verwendung des Ab75 anti-TRPM6-Antikörpers. Im *Trpm6*^{-/-}-Gewebe ist keine Immunmarkierung detektierbar. **B:** Nachweis des TRPM6-Proteins im Thymusgewebe bei Kontrollmäusen. Im *Trpm6*^{-/-}-Gewebe ist keine Immunmarkierung detektierbar.

In der Niere war eine spezifische Immunreaktivität in den Epithelialzellen einzelner Tubuli zu beobachten (Abb. V 2A). Diese Immunfärbung war auf der apikalen Seite lokalisiert, was aufgrund der Transporteigenschaft des TRPM6 vom Lumen in die Zelle zu erwarten war. Desweiteren konnte im Thymus eine Markierung durch den Antikörper detektiert werden. Aufgrund der Morphologie ist das Signal wiederum in Epithelzellen lokalisiert.

Die Expressionsanalysen bzw. der immunhistochemische Nachweis des TRPM6-Proteins in der Maus wies daraufhin, dass sich die Expression nicht nur auf Organe wie Niere und Intestinaltrakt (Kap. V 1.2.3) beschränkt, welche die Magnesiumhomöostase kontrollieren.

Eine Immunfluoreszenzmarkierung wurde auch im Thymusgewebe beobachtet (Abb. V 2B). In *Trpm6*^{-/-}-Gewebe konnte keine Immunmarkierung detektiert werden, was auf eine erfolgreiche Deletion des TRPM6-Proteins schließen ließ. Es war jedoch nicht möglich eine spezifische TRPM6-Immunmarkierung im Intestinaltrakt zu finden. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zur Expressionsanalyse die *In-Situ*-Hybridisierung durchgeführt.

Die nierenspezifische Deletion des TRPM6-Kanals in *Trpm6*^{-/-}; *Vil*-Mäusen wurde immunhistochemisch untersucht. Es konnte keine Immunfluoreszenzmarkierung in deren Nierentubuli detektiert werden im Gegensatz zu deren Kontrollen (Abb. VIII 2). Daher konnte von einer erfolgreichen Inaktivierung ausgegangen werden.

1.2.3 Nachweis des TRPM6 in der Maus mittels *In-Situ*-Hybridisierung

Die *Trpm6*-Expression wurde zusätzlich mit Hilfe der *In-Situ*-Hybridisierung in verschiedenen Organen geprüft. Diese wurde freundlicherweise von Herrn Dr. David Simmons von der *University of Queensland* in Australien übernommen.

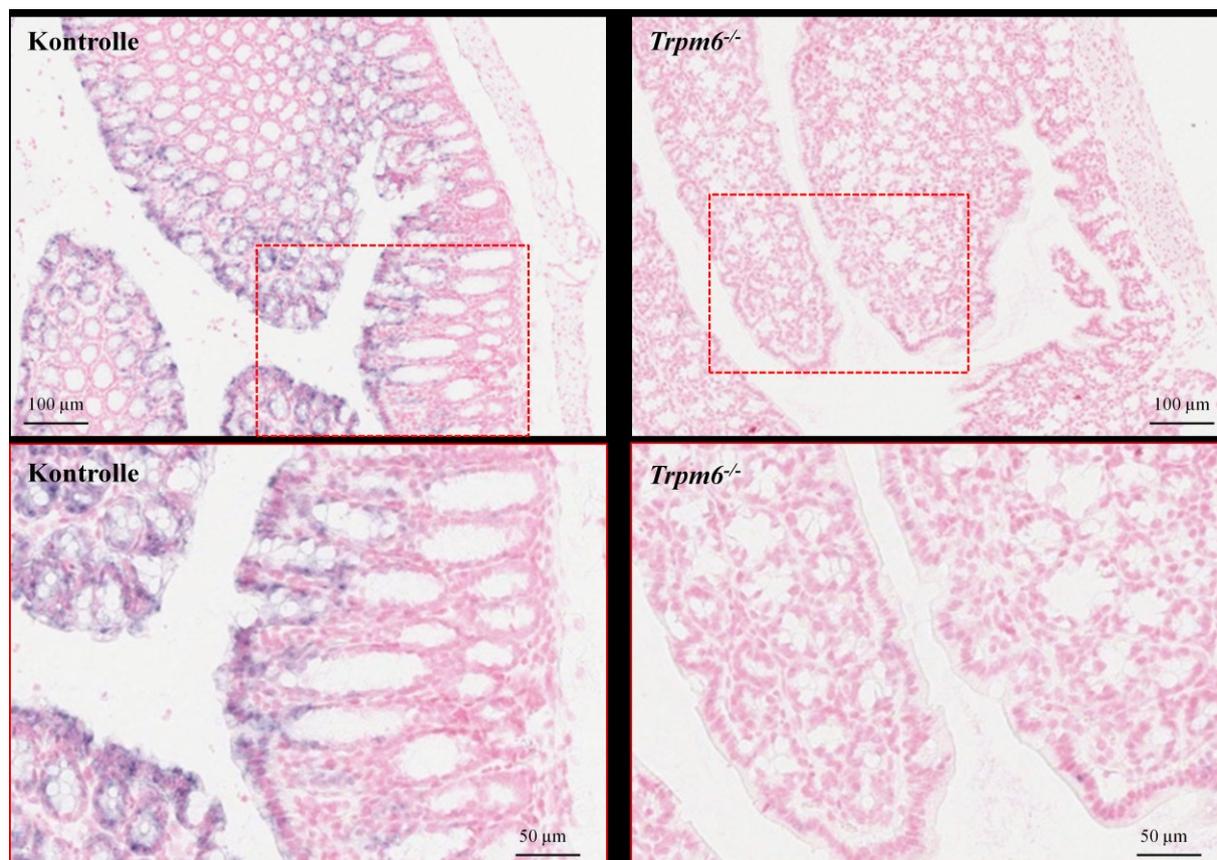


Abb. V 3: *In-Situ*-Hybridisierung im Kolon von Kontrollmäusen und *Trpm6*^{-/-}-Mäusen. Die *Trpm6*-mRNA konnte in Kontrollmäusen in den Epithelzellen des Kolons detektiert werden (positives Signal=dunkelblau). Im *Trpm6*^{-/-}-Gewebe ist keine Markierung detektierbar. Übernommen von Dr. David Simmons.

Vergleichend mit der Immunfluoreszenzfärbung sollte im Kontrolltier die zelluläre Lokalisation von TRPM6 im Kolon untersucht und im *knockout*-Gewebe dessen Abwesenheit bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass *Trpm6* in den Epithelzellen der apikalen Seite nachzuweisen ist (Abb. V 3). Im Kolon der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse konnte dagegen keine Markierung detektiert werden, was auf eine erfolgreiche Deletion des *Trpm6* zurückzuführen ist.

Zusätzlich konnte die mRNA von in weiteren Organen lokalisiert werden, welche in Abbildung V 4 dargestellt sind. Es zeigte sich eine *Trpm6*-Expression im Thalamus des Gehirns und in den Epithelzellen der Lunge. Die Expression in einigen Tubuli der Niere konnte mit der *In-Situ*-Hybridisierung bestätigt werden.

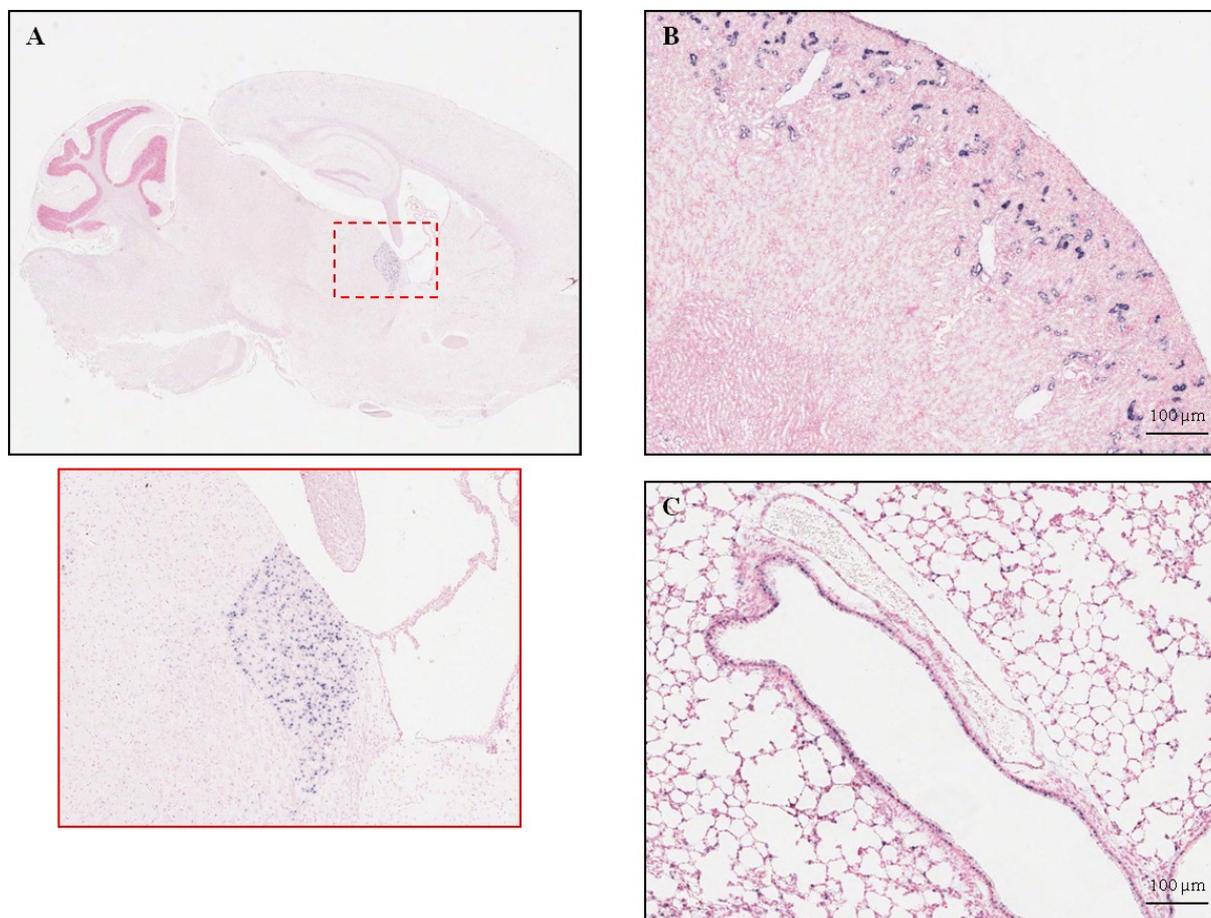


Abb. 4: *In-Situ*-Hybridisierung in Kontrollmäusen zum Nachweis des TRPM6 in verschiedenen Geweben. Der Kanal ist im Thalamus des Gehirns (A; Vergrößerung rot umrandet), in einigen Tubuli der Niere (B) und in den Epithelzellen der Lunge (C) detektierbar. Übernommen von Dr. David Simmons.

Die intestinalspezifische Deletion des TRPM6-Kanals in *Trpm6*^{-/-}; *Ksp*-Mäusen wurde durch die *In-Situ*-Hybridisierung überprüft. Im Kolon der Kontrolltiere war es möglich die mRNA

des *Trpm6* zu detektieren. Im *knockout*-Tier war kein Signal für *Trpm6* nachweisbar (Abb. VIII 3). Daher konnte von einer erfolgreichen Inaktivierung ausgegangen werden.

2 Charakterisierung der globalen *Trpm6*-defizienten Mauslinie

In den vergangenen Jahren wurde eine außerordentliche Anzahl von gendefizienten und transgenen Tier-Modellen entwickelt, die es zulassen, die physiologische Rolle einzelner Proteine *in vivo* zu untersuchen. Durch das Ausschalten oder Inaktivieren mittels gezielter genetischer Manipulation eines bestimmten Gens in der Maus können *knockout*-Mäuse generiert werden, an denen die Auswirkung des Fehlens des Proteins analysiert werden kann. Aufgrund der embryonalen Letalität von konstitutiven *Trpm6-knockout*-Mäusen war es bisher nicht möglich postnatale Analysen dieser Mäuse durchzuführen (Walder et al., 2002; Woudenberg-Vrenken et al., 2011). In der vorgelegten Arbeit wurde eine konditionale *knockout*-Mauslinie generiert, an der die *in vivo* Funktion des TRPM6-Proteins untersucht werden konnte. Durch die Verpaarung von konditionalen Mäusen (*Trpm6*^{Δ17/Δ17}; Kap. IV 1.1) mit *Sox2-Cre*-transgenen Männchen wurden Mäuse generiert, welche die *Cre*-Rekombinase in epiblaststammenden Geweben exprimieren. Dadurch wird in diesen Tieren das *Trpm6*-Gen im gesamten Organismus inaktiviert. Die erstellte *knockout*-Linie wurde nach der Genotypisierung hinsichtlich ihres Phänotyps eingehend charakterisiert.

2.1 Reproduktionsbiologische Analyse von *Trpm6*-defizienten Mäusen

Für die Zucht von *Trpm6*-defizienten Mäusen waren im ersten Schritt zwei Generationen erforderlich. In der ersten Generation wurden homozygote *Trpm6*^{Δ17/Δ17} Mäuse mit *Sox2-Cre*-transgenen Tieren verpaart, um zunächst heterozygote Männchen (*Trpm6*^{WT/Sox}), welche das *Sox2-Cre*-Transgen trugen, zu erhalten. In der zweiten Generation wurden diese Tiere mit homozygoten *Trpm6*^{Δ17/Δ17} Weibchen verpaart, deren Nachkommen statistisch zu 25 % den *Trpm6*-defizienten Genotyp *Trpm6*^{-/-} tragen sollten. Desweiteren konnten durch dieses Zuchtschema Kontrollgeschwister (*Trpm6*^{Δ17/WT}) generiert werden, welche sich zum Vergleich der *Trpm6*^{-/-} Mäuse eigneten.

Um die Frage zu klären, inwieweit die *Trpm6*-Deletion Einfluss auf das Reproduktionsverhalten bei Mäusen hat, wurden heterozygote Zuchtpaare (*Trpm6*^{Δ17/Δ17} × *Trpm6*^{WT/Sox}) und auch homozygote Zuchtpaare (*Trpm6*^{-/-} × *Trpm6*^{-/-}) auf ihren Zuchterfolg analysiert. Dazu wurde die Anzahl der Nachkommen pro Wurf protokolliert. Zusätzlich wurde die Genotyp-Verteilung mit der zu erwartenden Mendelschen Verteilung verglichen.

2.1.1 Zuchterfolg

Der Reproduktionserfolg wurde bei allen Verpaarungen anhand der Anzahl der Nachkommen bestimmt.

Aus der heterozygoten Zucht ($Trpm6^{\Delta17/\Delta17} \times Trpm6^{WT}; Sox$) wurden zehn Anpaarungen analysiert. Diese erbrachten insgesamt 713 lebende Tiere, welche das Absetzalter von drei Wochen erreichten. Es wurden 345 (48%) Weibchen und 368 (52%) Männchen geboren. Die durchschnittliche Anzahl der Nachkommen betrug pro Wurf 5,53 Tiere, was der normalen Wurfgröße entspricht. Heterozygote $Trpm6^{WT}; Sox$ Männchen sind daher in ihrer Fertilität unbeeinträchtigt.

Im nächsten Schritt wurden sieben homozygote *knockout*-Verpaarung $Trpm6^{-/-} \times Trpm6^{-/-}$ auf ihren Reproduktionserfolg untersucht. Jedoch wurde kein einziges Tier geboren. Daher wurde in einer weiteren Zucht geprüft, ob die erfolglose Reproduktion durch eine verminderte Fruchtbarkeit der $Trpm6$ -defizienten Männchen hervorgerufen wird. Dazu wurde ein $Trpm6$ -defizientes Männchen ($Trpm6^{-/-}$) mit einem homozygoten $Trpm6^{\Delta17/\Delta17}$ Weibchen verpaart. Aus dieser Verpaarung ging nach vier Wochen die erste Nachkommenschaft hervor. Drei Tiere wurden geboren, was darauf schließen ließ, dass keine Infertilität bei $Trpm6^{-/-}$ -Männchen besteht. Wie auch die Nachkommen der heterozygoten Zucht auf ihren Genotyp untersucht wurden, wurden ebenfalls die Jungtiere dieser Zucht genotypisiert (Kap. V 2.1.2). Eine umgekehrte Verpaarung bei der das Weibchen den $Trpm6^{-/-}$ -Genotyp trug und das Männchen ein Kontrolltier war, konnte ebenso eine erfolgreiche Reproduktion nachweisen. Nach drei Wochen wurden sechs Tiere geboren, bei denen die Genotyp-Verteilung analysiert wurde (Kap. V 2.1.2).

2.1.2 Genotyp-Verteilung

Aus den zehn heterozygoten Zuchtpaarungen wurden 368 männliche Nachkommen genotypisiert und analysiert. Diese konnten vier verschiedene Genotypen aufweisen: den $Trpm6$ -defizienten $Trpm6^{-/-}$ -Genotyp, die Kontrolle $Trpm6^{\Delta17/WT}$ und zwei heterozygote Genotypen mit jeweils einem mutierten Allel ($Trpm6^{\Delta17/-}$, $Trpm6^{-/WT}$). Tabelle V 2 zeigt die Verteilung der Genotypen, welche weitgehend der zu erwartenden Mendelschen Verteilung entspricht. 21,74 % der Nachkommen wiesen den $Trpm6$ -defizienten Genotyp $Trpm6^{-/-}$ auf, so dass nicht von einer embryonalen Letalität des Phänotyps auszugehen ist.

Tab. V 2: Verteilung der Genotypen der männlichen Nachkommen der heterozygoten Zucht ($Trpm6^{\Delta17/\Delta17} \times Trpm6^{-/WT}; Sox$). Angegeben sind jeweils die Anzahl der Nachkommen sowie deren Anteil in %. WT=Wildtyp-Allel, $\Delta17$ =konditionales Allel, -=Nullallel

Zuchtpaar	Genotyp Nachkommen	Anzahl	Anteil
♀ $Trpm6^{\Delta17/\Delta17}$	$Trpm6^{\Delta17/WT}$	98	26,63%
♂ $Trpm6^{-/WT}; Sox$	$Trpm6^{\Delta17/-}, Trpm6^{-/WT}$	190	51,63%
	$Trpm6^{-/-}$	80	21,74%

Die Zuchtpaare, bei denen jeweils ein Elterntier $Trpm6$ -defizient war, waren ebenfalls erfolgreich in ihrer Reproduktion. Jedoch konnte kein $Trpm6^{-/-}$ -Tier identifiziert werden (Tab. V 3, V 4).

Tab. V 3: Verteilung der Genotypen der Nachkommen der $Trpm6^{\Delta17/\Delta17} \times Trpm6^{-/-}$ -Verpaarung. Angegeben sind jeweils die Anzahl der Nachkommen sowie deren Anteil in %. WT=Wildtyp-Allel, $\Delta17$ =konditionales Allel, -=Nullallel

Zuchtpaar	Genotyp Nachkommen	Anzahl	Anteil
♀ $Trpm6^{\Delta17/\Delta17}$	$Trpm6^{\Delta17/-}$	3	100%
♂ $Trpm6^{-/-}$	$Trpm6^{-/-}$	0	0%

Tab. V 4: Verteilung der Genotypen der Nachkommen der $Trpm6^{-/-} \times Trpm6^{\Delta17/WT}$ -Verpaarung. Angegeben sind jeweils die Anzahl der Nachkommen sowie deren Anteil in %. WT=Wildtyp-Allel, $\Delta17$ =konditionales Allel, -=Nullallel

Zuchtpaar	Genotyp Nachkommen	Anzahl	Anteil
♀ $Trpm6^{-/-}$	$Trpm6^{-/WT}$	2	33,33%
♂ $Trpm6^{\Delta17/WT}$	$Trpm6^{-/WT}; Sox$	4	66,67%
	$Trpm6^{-/-}$	0	0%

2.2 Äußere Merkmale der $Trpm6$ -defizienten männlichen Mäuse

Nach der erfolgreichen Zucht von männlichen $Trpm6^{-/-}$ -Mäusen wurden diese zusammen mit ihren Kontrollbrüdern beobachtet und auf somatische Fehlbildungen untersucht. Dabei wurde der Frage des Körperwachstums nachgegangen sowie der Überlebenszeit. Im Anschluss wurden weitere makroskopische Analysen durchgeführt und auffällige Merkmale festgehalten.

2.2.1 Körpergewichtsentwicklung

Das Körpergewicht der *Trpm6*-defizienten Mäuse sowie deren Kontrollgruppen wurde ab der vierten Lebenswoche in einem wöchentlichen Rhythmus bestimmt und festgehalten. Diese Gewichtsentwicklung ist in Abbildung V 5 graphisch dargestellt.

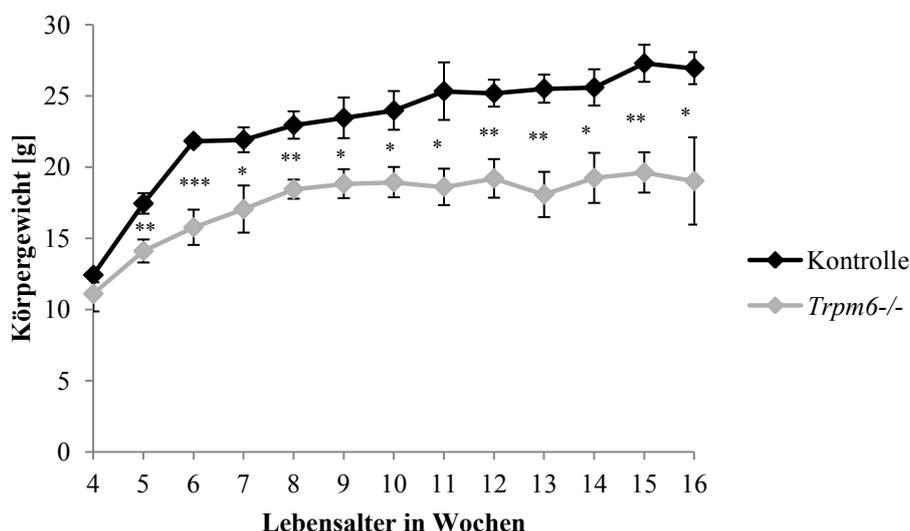


Abb. V 5: Die Körpergewichtsentwicklung von männlichen *knockout*-Mäusen (graue Raute) sowie deren Kontrollgeschwistern (schwarze Raute). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm mittlerer Standardfehler (senkrechte Linien). Die signifikanten Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. Je $n=8$

In den ersten drei bis vier Lebenswochen der Mäuse war kein Gewichtsunterschied der mutierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern erkennbar. Wie auch in der Abbildung V 5 dargestellt ist, liegen die Wachstumskurven in der vierten Lebenswoche eng beieinander und die Gewichtsentwicklung der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse schien bis dahin normal zu verlaufen. Erst danach verringerte sich die Gewichtszunahme der *knockout*-Mäuse gegenüber den Kontrolltieren. Der weitere Verlauf der Wachstumskurven der beiden Gruppen war signifikant verschieden. Während die Kontrolltiere stetig an Gewicht zunahmten und in der 16. Lebenswoche etwa 27 g wogen, erreichten *Trpm6*-defiziente Mäuse nur ein Gewicht von 19 g. So wiesen männliche *Trpm6*^{-/-}-Mäuse bis zu 30% weniger Körpergewicht auf.

Entsprechend der Körpergewichtsentwicklung wiesen die *knockout*-Mäuse auch eine geringere Körpergröße auf (Abb. V 6). Nach einer kurzen Wachstumsphase war keine nennenswerte Größenzunahme erkennbar und sie blieben kleinwüchsig.



Abb. V 6: Größenvergleich von Geschwistern im Alter von acht Wochen. Rechts ist die *Trpm6*^{-/-}-Maus zu sehen und links das Kontrolltier mit einem deutlichen Größenunterschied.

2.2.2 Überlebensrate

Die Überlebensrate wurde nach dem Absetzen von den Elterntieren für die ersten 16 Lebenswochen ermittelt und setzte voraus, dass keines dieser Tiere für Versuchszwecke getötet wurde. Abbildung V 7 gibt eine schematische Darstellung an.

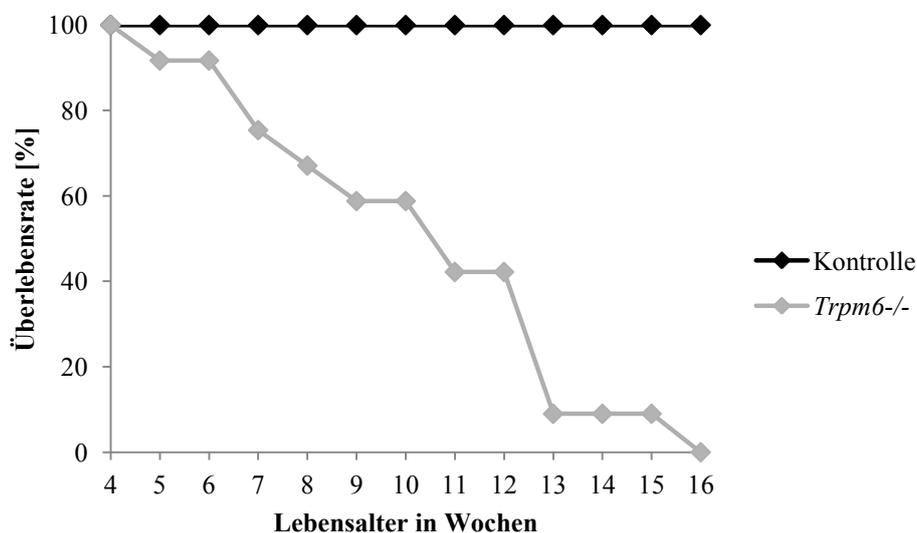


Abb. V 7: Die Überlebensrate von männlichen *knockout*-Mäusen (graue Raute) sowie deren Kontrollgeschwistern (schwarze Raute) in Lebenswochen. Je n=12

Ein Großteil der männlichen *Trpm6*^{-/-}-Mäuse verstarb in den ersten Lebenswochen. Nach nur neun Wochen hat etwa die Hälfte der *Trpm6*-defizienten Mäuse überlebt. In der 16.

Lebenswoche waren alle mutierten Mäuse gestorben, während alle gesunden Kontrollgeschwister noch lebten.

Aufgrund dieser deutlich verkürzten Lebensspanne der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse wurden weitere analytische Versuche an acht Wochen alten Männchen durchgeführt, wenn nicht anders angegeben.

2.2.3 Erscheinungsbild und Verhalten

Bei einigen *Trpm6*^{-/-}-Tieren fiel auf, dass das Fell teilweise gestäubt und ungepflegt erschien, was auf physischen oder auch psychischen Stress hindeuten kann. Desweiteren konnte teilweise ein vorzeitiges Ergrauen der Fellfarbe beobachtet werden.

Weitere Anzeichen für Stress oder ein vermindertes Wohlbefinden der *Trpm6*-defizienten Mäuse war eine vorwiegend zusammen gekauerte Körperhaltung in einer versteckten Ecke des Käfigs. Das Fressverhalten der mutierten Tiere war unauffällig. Es gab keine Probleme mit der Nahrungsaufnahme. *Trpm6*^{-/-}-Mäuse waren genauso häufig am Fressnapf anzutreffen wie die gesunden Geschwister.

2.2.4 Skelettanomalien

Ein besonders auffälliges Merkmal bei männlichen *Trpm6*^{-/-}-Mäusen war eine zunehmende Wirbelsäulenverkrümmung, welche dorsal konvex verlief. Diese Kyphose kann auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. Zum Einen kann es sich hierbei um eine angeborene Form handeln, welche zumeist durch eine Fehlbildung verursacht wird. Zum Anderen sind mehrere erworbene Formen der Kyphose bekannt. Dabei können Fehlhaltung und eine muskuläre Insuffizienz ursächlich sein. Auch degenerative und entzündliche Prozesse wie Osteoporose oder Arthritis tragen zur Entstehung einer Kyphose bei.

Da sich die Kyphose erst im Laufe der Zeit bei *Trpm6*-defizienten Männchen entwickelte, konnte eine angeborene Form ausgeschlossen werden.

Um die Fehlstellung der Wirbelsäule zu verdeutlichen, wurden *Trpm6*^{-/-}-Mäuse verschiedener Altersgruppen sowie gleichaltrige Kontrollmäuse radiographiert. Abbildung V 8 zeigt repräsentativ die starke Verkrümmung der Wirbelsäule der mutierten Tiere im Gegensatz zu den gesunden Mäusen.

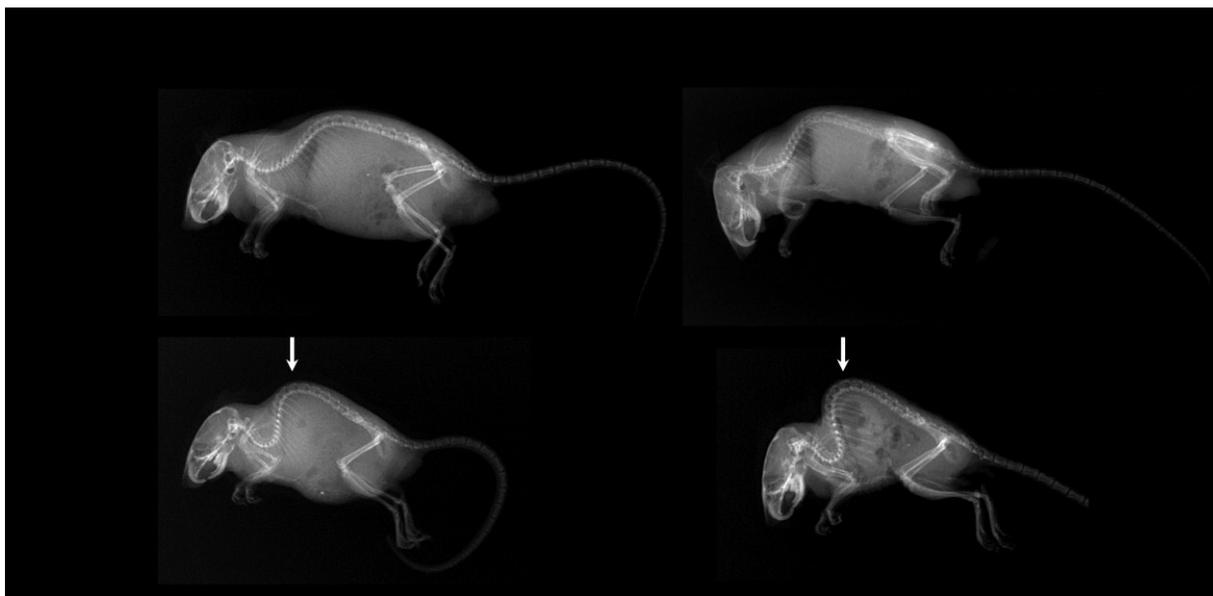


Abb. V 8: Röntgenbilder von Kontrollmäusen (oben) und *Trpm6*^{-/-}-Mäusen (unten). Die mutierten Tiere weisen eine Verkrümmung der Wirbelsäule (Kyphose; Pfeile) auf, welche sich mit zunehmendem Alter verstärkt.

Die Krümmung der Wirbelsäule verstärkte sich mit zunehmendem Alter der *Trpm6*-defizienten Mäuse. Wie aus Abbildung V 8 zu entnehmen ist, wiesen zehn Wochen alte *Trpm6*^{-/-}-Mäuse eine Kyphose auf, welche bei älteren Mäusen sogar noch ausgeprägter war.

2.2.5 Organentwicklung

Da das Gesamtkörpergewicht der gendefizienten Tiere signifikant niedriger war als bei den Kontrollmäusen, stellte sich die Frage, ob einzelne Organe von dieser Gewichtsverminderung überproportional betroffen sind. So fiel bei der Präparation der Organe der verschiedenen Mäuse auf, dass die Organe der mutierten Mäuse gegenüber denen der Kontrollgeschwister stark verkleinert waren. Um eine verminderte Entwicklung der Organe auszuschließen, wurden die Organgewichte ermittelt und auf das Körpergewicht der Mäuse bezogen.

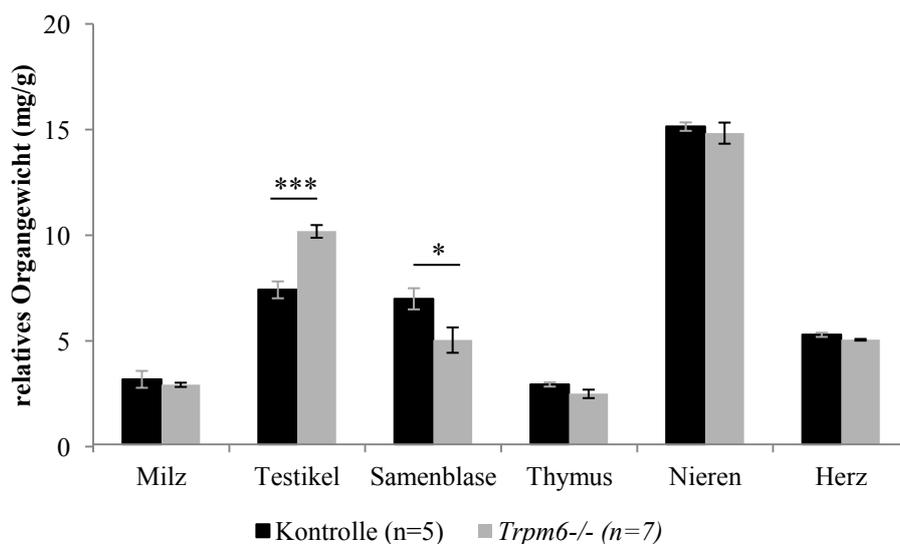


Abb. V 9: Relative, auf das Körpergewicht bezogene Organgewichte von *knockout*-Mäusen (grau) und deren Kontrollgeschwister (schwarz). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm mittlerer Standardfehler (senkrechte Linien). Die signifikanten Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Die Organe der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse waren proportional zur geringen Körpergröße entsprechend kleiner (Abb. V 9). Auffällig bei mutierten Tieren war jedoch ein sehr hageres und instabiles Bauchfell (*Peritoneum*). Darüber hinaus konnte eine deutliche Fettreduktion festgestellt werden. Bei einigen *Trpm6*^{-/-}-Tieren war nur sehr wenig bis fast gar kein viszerales Fettgewebe zu finden, was in Abbildung V 10 dargestellt ist. Ebenso war subkutanes Fettgewebe deutlich verringert. Das Muskelgewebe war im Vergleich zu den Kontrollgeschwistern schwächer ausgebildet. Zusätzlich fiel regelmäßig bei den gendefizienten Mäusen eine gelbliche Verfärbung der Leber auf.



Abb. V 10: Reduktion des viszeralen Fettgewebes. Die Pfeile deuten im Kontrolltier auf das vorhandene Gewebe, welches bei der *Trpm6*^{-/-}-Maus fehlt.

2.3 Morphologische Untersuchung verschiedener Gewebe von *Trpm6*-defizienten männlichen Mäusen

Um mögliche Fehlbildungen innerhalb der Organe zu identifizieren, wurden die Organe einer Übersichtsfärbung unterzogen und morphologisch untersucht.

2.3.1 Übersichtsfärbung histologischer Präparate

Für die histologische Charakterisierung von möglichen Dysmorphien wurden verschiedene Organe präpariert, in Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet (Kap. IV 3.1-3.2). Es wurden mehrere Tiere im Alter von 8 und 13 Wochen ausgewählt und mit gleichaltrigen Geschwistern verglichen. Beim Schneiden der Präparate wurden mehrere Schnittebenen berücksichtigt, um eine Beurteilung von mehreren Ausschnitten zu gewährleisten und Fehlschlüsse zu vermeiden.

0,3 µm dicke Schnitte von Paraffin-eingebettetem Gewebe wurden einer HE-Färbung unterzogen. Dabei färbten sich Zellkerne und saure Grundsubstanzen durch eine erste Hämalaunfärbung blau. Andere Strukturen wie Bindegewebe, Kollagenfasern, Muskelfibrillen und Erythrozyten nahmen durch Eosin eine rötliche Färbung an.

Die folgenden Abbildungen (V 11-V 20) zeigen repräsentative Ausschnitte der HE-gefärbten Organe von 13 Wochen alten Tieren. Dabei wurden verschiedene Vergrößerungen (2x, 2,5x, 3,2x, 8x, 10x, 20x) gewählt, um bestimmte Elemente optimal aufzuzeigen und hervorzuheben.

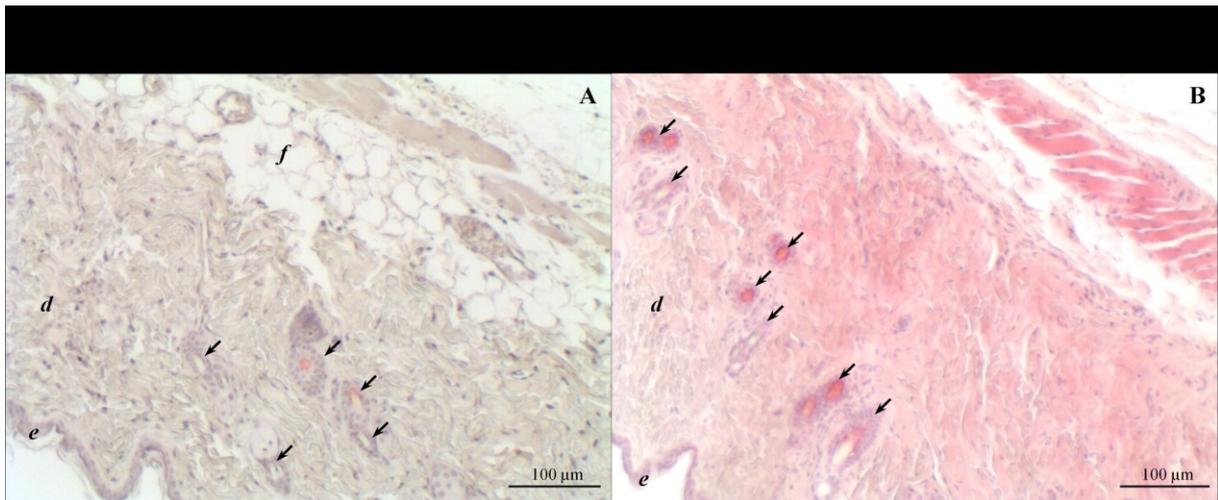


Abb. V 11: Schichten der Hautdecke. **A** entspricht der Kontrollmaus und **B** repräsentiert *Trpm6*^{-/-}-Mäuse. Gezeigt ist die Kutis, welche aus Epidermis (*e*) und Dermis (*d*) besteht. Danach folgt die Subkutis mit dem subkutanen Fettgewebe (*f*), welches in der *knockout*-Maus komplett fehlt. Die Haarfollikel (Pfeile) sind in die Dermis eingelagert.

Epidermis, Dermis und Subkutis bilden die verschiedenen Schichten der Hautdecke. Dabei ist die Epidermis die eigentliche Deckschicht und dient als Schutzschicht vor zahlreichen schädigenden Einflüssen der Außenwelt. Die bindegewebige Dermis dagegen ist für die mechanische Widerstandsfähigkeit verantwortlich und enthält eine Vielzahl von Blut- und Lymphgefäßen sowie Hautdrüsen und Haarfollikel. Diese beiden Schichtungen werden zusammengefasst als Kutis bezeichnet. Die Verbindung zwischen Kutis und tiefer liegenden Strukturen stellt die Subkutis her. Diese besteht aus lockerem Bindegewebe und enthält teilweise große Anteile von Fettgewebe. Das Fettgewebe dient dabei je nach Körperregion als Druckpolster oder als Energiespeicher und Wärmeisolator.

Der Vergleich der Morphologie der Rückenhaut von *Trpm6*^{-/-}-Mäusen mit den Kontrolltieren zeigte in den obersten Schichten (Epidermis, Dermis) keinen Unterschied. Sie sind bei beiden Gruppen gut ausgeprägt und auch bei den Haarfollikeln waren keine Auffälligkeiten festzustellen. Jedoch fiel in der Subkutis auf, dass bei *Trpm6*-defizienten Mäusen das dort eingelagerte Fettgewebe deutlich reduziert war. In einigen Bereichen waren wenige Fettzellen erkennbar, in anderen dagegen war kein Fettgewebe mehr aufzufinden. Eine Fettreduktion konnte schon makroskopisch festgestellt werden (Kap. V 2.2.5). Aus diesem Grund wurde viszerales und subkutanes Fettgewebe histologisch begutachtet.

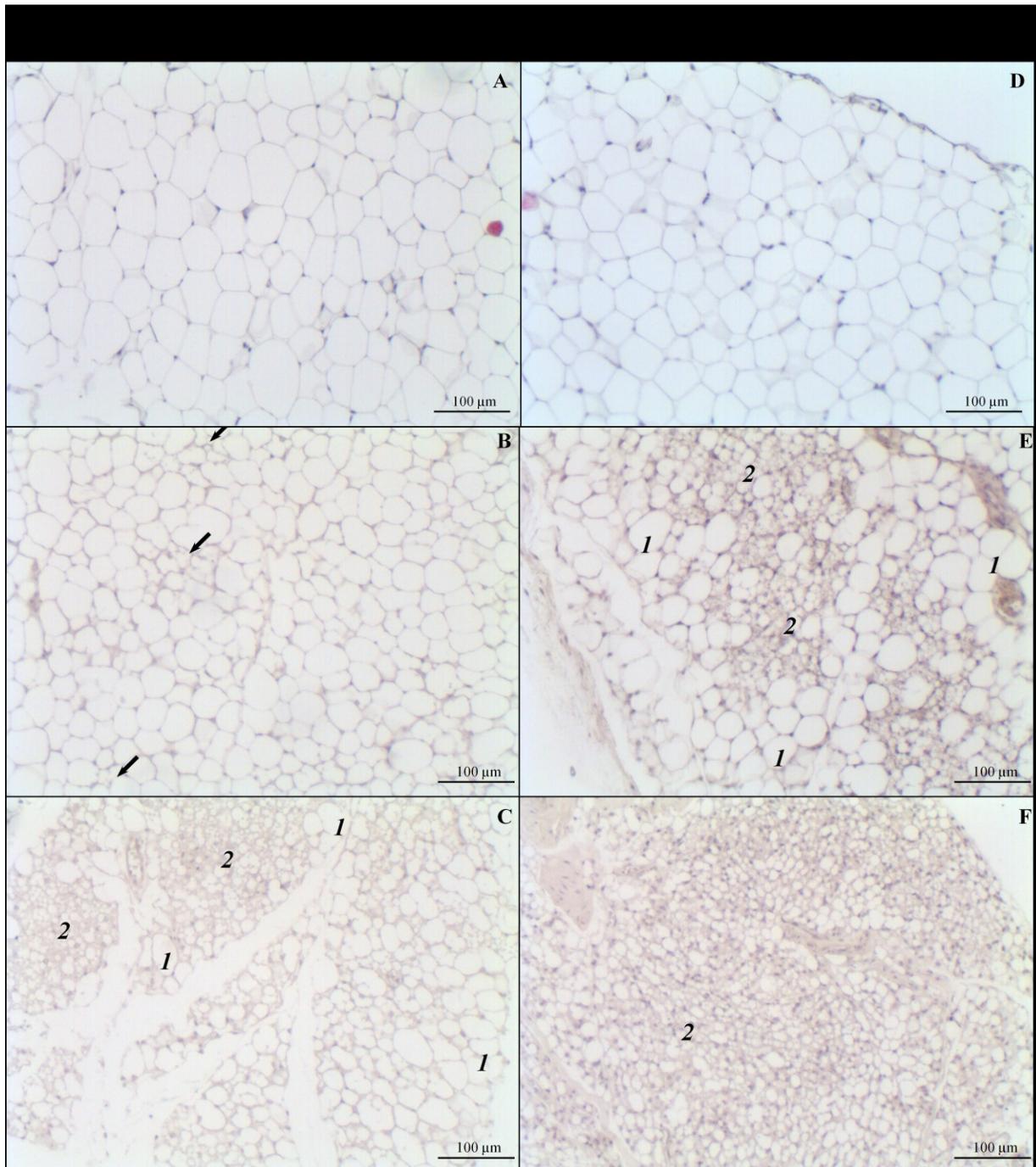


Abb. V 12: Viszerales und subkutanes Fettgewebe. **A, B, C** repräsentieren jeweils Kontrollmäuse, während **D, E, F** *Trpm6*^{-/-}-Mäuse entsprechen. **A, D:** weiße Fettzellen des viszeralen Fettgewebes. Die Zellen der *knockout*-Mäuse scheinen etwas kleiner zu sein. **B, C, E, F:** subkutanes Fettgewebe besteht aus weißen (*1*) und braunen (*2*; Peile) Fettzellen. In den *knockout*-Mäusen sind überwiegend braune Fettzellen zu finden im Gegensatz zu deren Kontrollgeschwistern.

Fettgewebe lässt sich in zwei Formen unterteilen, welche nach ihrer histologischen Erscheinung als weißes und braunes Fettgewebe bezeichnet werden. Weißes Fettgewebe kann fast überall im Körper in lockeres Bindegewebe eingelagert sein und dient als Energiespeicher sowie als Druckpolster. Das braune Fettgewebe dagegen ist beim erwachsenen Menschen nur

selten vertreten. Es kommt aber vermehrt bei Säuglingen und Winterschlaf haltenden Tieren vor, wo es durch die Fettverbrennung Wärme produziert und eine wichtige Rolle für die Thermoregulation spielt.

Im histologischen Präparat sind weiße Fettzellen durch ihre große Vakuole, die den gesamten Zellraum einnimmt, gekennzeichnet. Braunes Fettgewebe enthält an Stelle einer großen Fettkugel kleine Fettröpfchen (Cinti, 2001). Bei der Paraffin-Einbettung wird jedoch das Fett durch die Einwirkung von Ethanol und Xylol vollständig herausgelöst, so dass in den HE-gefärbten Präparaten meist nur Hohlräume zu sehen sind.

In Abbildung V 12 ist der Vergleich von viszeralem (A, D) und subkutanem Fettgewebe (B, C, E, F) der gendefizienten Mäuse gegenüber der Kontrollgeschwister dargestellt. Viszerales Fettgewebe war bei *Trpm6*^{-/-}-Mäusen reduziert. Die histologische Übersichtfärbung zeigte auf den ersten Blick keine großen Veränderungen. Es schien jedoch, dass die weißen Fettzellen im gendefizienten Gewebe kleiner waren als diejenigen im Kontrollgewebe. Dies sollte nachfolgend mit der morphometrischen Analyse geklärt werden (Kap. V 2.3.2). Im subkutanen Fettgewebe waren die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen deutlicher erkennbar (Abb. V 12 B, C, E, F). Bei beiden Gruppen waren braune und weiße Fettzellen zu finden, wobei bei *Trpm6*^{-/-}-Mäusen überwiegend braunes Fettgewebe vorhanden war. Bei einer gendefizienten Maus konnte fast keine weiße Fettzelle mehr detektiert werden.

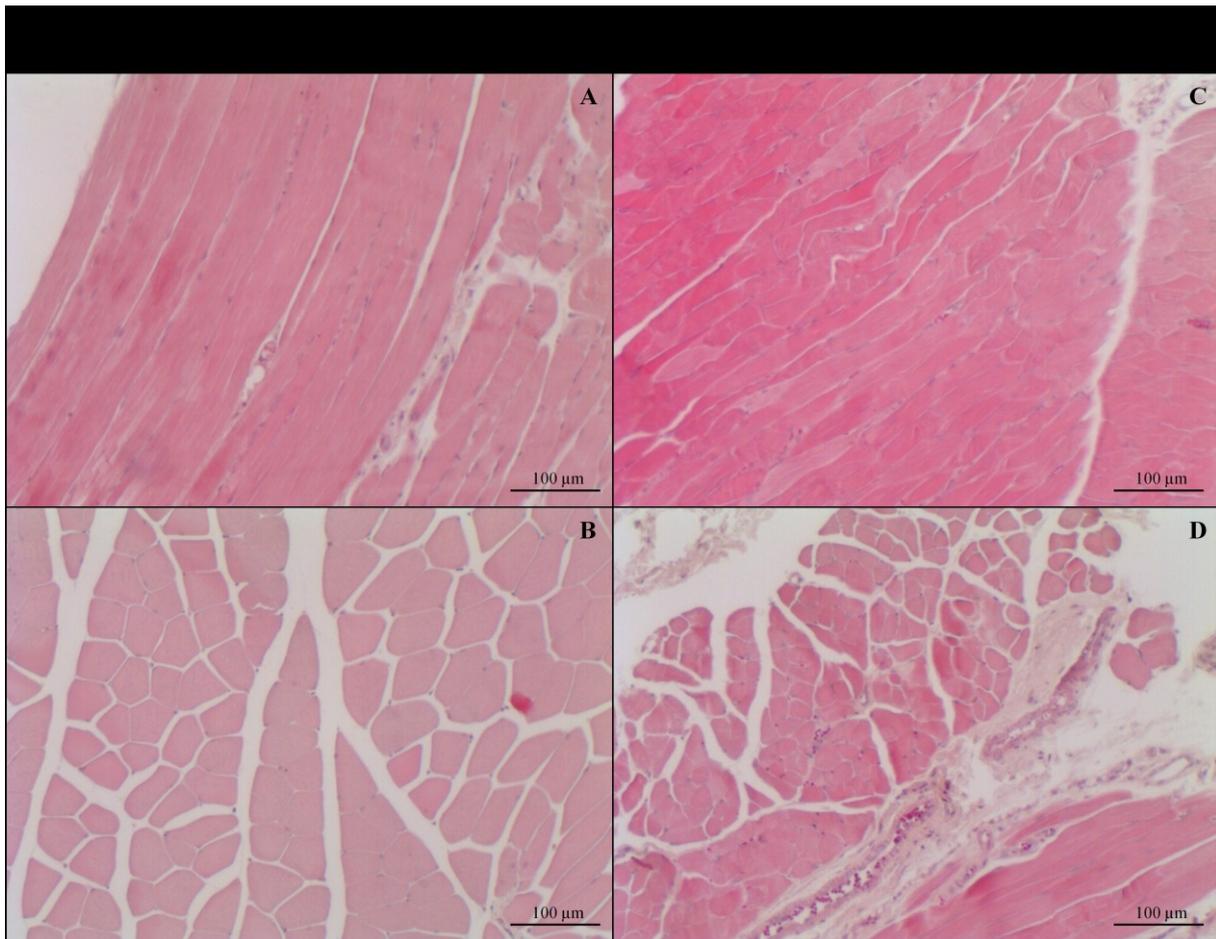


Abb. V 13: Skelettmuskulatur (*Musculus gastrocnemius*) von Kontrolltieren (**A, B**) und *Trpm6*^{-/-}-Mäusen (**C, D**). In den längs geschnittenen Muskelfasern (**A, C**) ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Im Bild der querschnittenen Muskelfasern der gendefizienten Maus (**D**) erscheint der Durchmesser der einzelnen Faser sehr klein im Gegensatz zum Kontrolltier (**B**).

Die Skelettmuskulatur zeigt eine mikroskopisch sichtbare Querstreifung aufgrund der regelmäßigen Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente zu Sarkomeren und zählt daher zur quergestreiften Muskulatur. Sie besteht aus langen, vielkernigen Muskelfasern, welche durch die Fusion einkerniger Myoblasten entstehen.

In Abbildung V 13 sind Längsschnitte (**A, C**) und Querschnitte (**B, D**) der Skelettmuskulatur von *Trpm6*^{-/-}-Mäusen und deren Kontrollgeschwistern zu sehen. Die Querschnitte der Muskelfasern der gendefizienten Mäuse unterschieden sich eindeutig von denen der Kontrolltiere. Der Durchmesser der einzelnen Muskelfasern war augenscheinlich verkleinert. Die Skelettmuskulatur der *knockout*-Mäuse erschien ausgedünnt, was auf eine Muskelatrophie oder -dysplasie schließen ließ. Eine anschließende morphometrische Analyse sollte dies unterstützen (Kap. V 2.3.2).

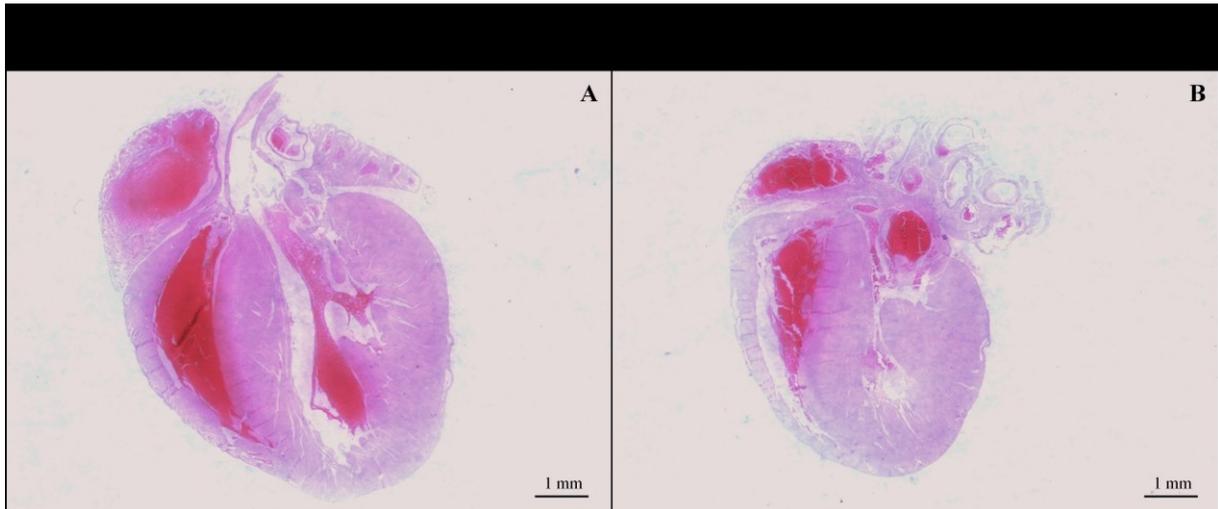


Abb V 14: Herzschnitte von Kontrolltieren (**A**) und *Trpm6*^{-/-}-Mäusen (**B**). Das Herz der mutierten Mäuse ist proportional zur Körpergröße verkleinert, die Dicke des Myokards ist dagegen sehr ausgeprägt und weist keinen großen Unterschied zum Kontrollherzen auf, was zu einer Verkleinerung des Ventrikellumens führt.

Wie die Skelettmuskulatur zählt die Herzmuskulatur zur quergestreiften Muskulatur. Sie besteht aus verzweigten, meist einkernigen Kardiomyozyten, welche durch End-zu-End-Kontakte faserartige synzytiale Strukturen bilden.

Bei der Begutachtung der histologischen Präparate des Herzens fiel eine Verkleinerung der Herzkammern auf, was auf eine Herzmuskelhypertrophie schließen ließ. Bei einer andauernden Druckbelastung vergrößern sich die vorhandenen Kardiomyozyten und es kommt zu einer konzentrischen Dickenzunahme des Myokards nach innen, was die Verkleinerung des Ventrikellumens erklärt.

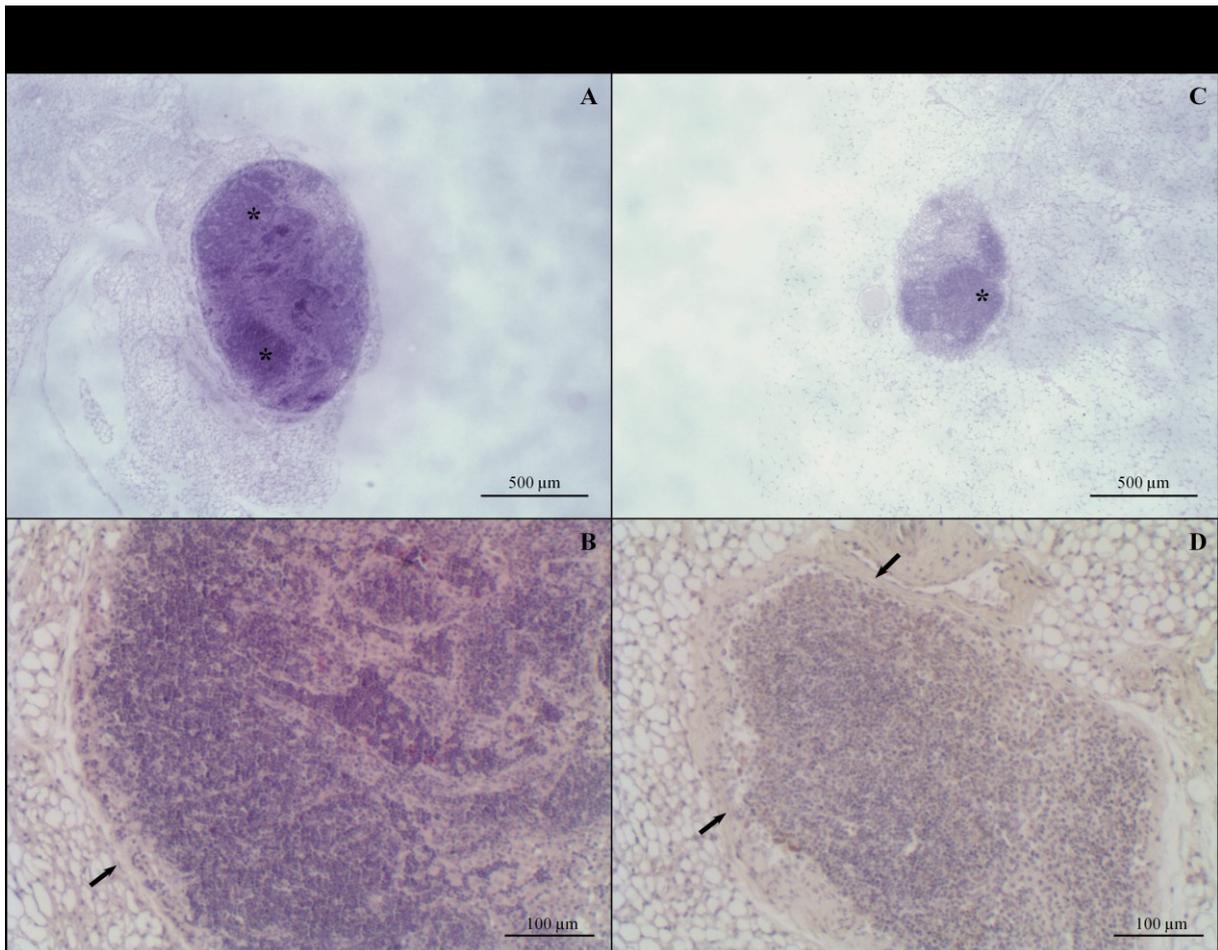


Abb. V 15: Periphere Lymphknoten (inguinal) von Kontrolltieren (**A, B**) und *Trpm6*^{-/-}-Mäusen (**C, D**). Sie sind von einer Bindegewebekapsel umgeben (Pfeile). Die lymphozytenreiche Lymphfollikel sind mit einem * gekennzeichnet. Die Lymphknoten in mutierten Tieren (**C, D**) sind hypomorph und auch hypozellulär im Vergleich zu den Kontroll-Lymphknoten.

Für die histologische Betrachtung der Lymphknoten wurden periphere Lymphknoten der Leistengegend (inguinal) präpariert und HE-gefärbt. Histologisch kann ein Lymphknoten in Rinde, Parakortikalzone und Mark gegliedert werden.

Nach genauer Betrachtung der Präparate konnten ebenfalls im Lymphknoten der gendefizienten Mäuse einige Unterschiede festgestellt werden. Die häufig in *Trpm6*^{-/-}-Tieren gefundene Hypomorphie der Lymphknoten ist in Abbildung V 15 C dargestellt. Desweiteren waren in den *Trpm6*^{-/-}-Lymphknoten die Lymphfollikel weniger ausgeprägt als in den Kontrollgeweben. Es zeigte sich darüber hinaus eine teilweise geringere Zelldichte.

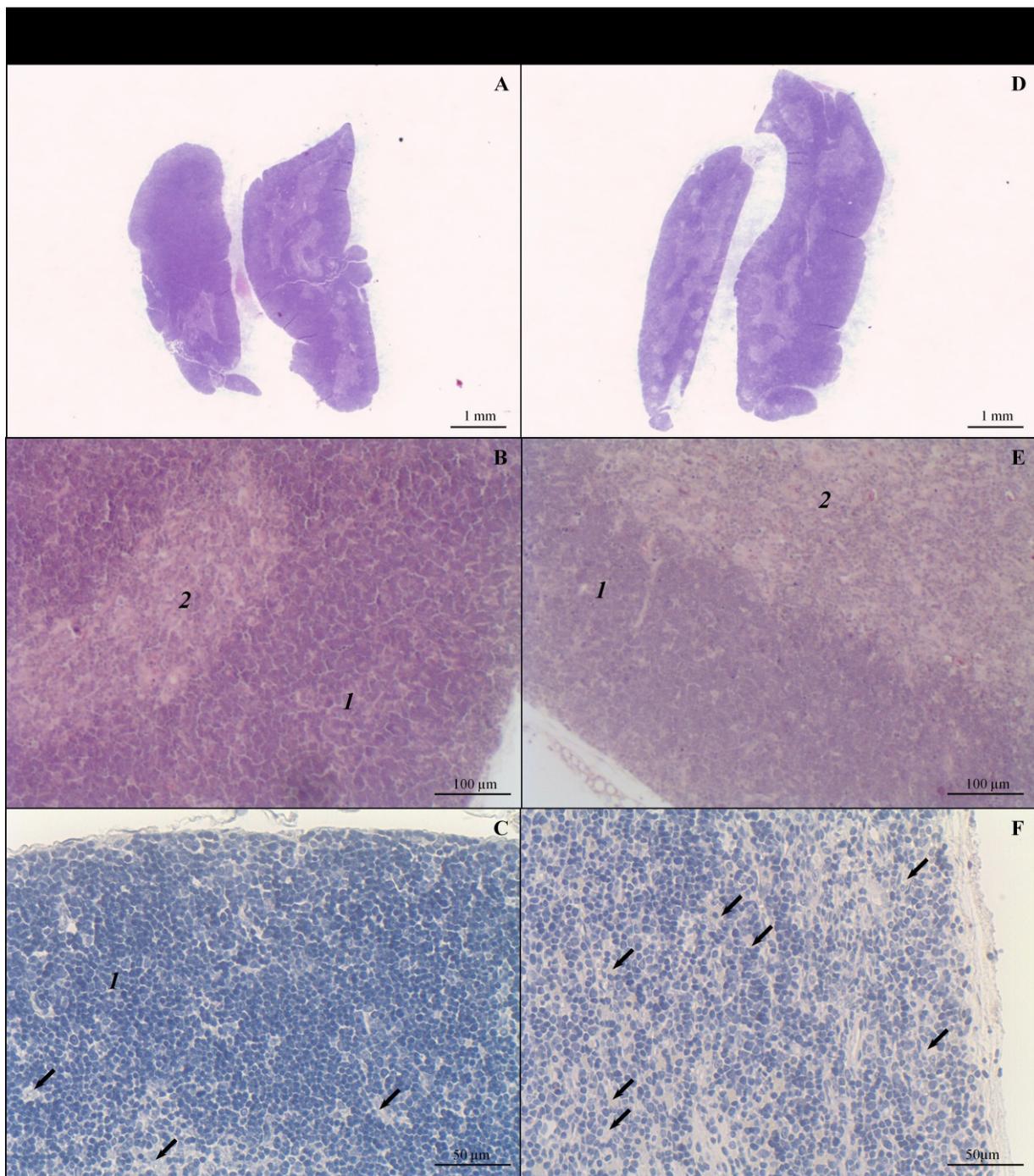


Abb. V 16: Thymus von gesunden Kontrollgeschwistern (A, B, C) und *Trpm6*^{-/-}-Mäusen (D, E, F). A, B, D, E: Der Aufbau des Thymus erscheint unverändert. Rinde (1) und Mark (2) liegen in normalen Anteilen vor und sind klar voneinander abgegrenzt. C, F: Der Thymus einer einzelnen *knockout*-Maus (C*) zeigt jedoch eine geringere Zelldichte und die Rinde ist nicht mehr zu identifizieren. Bei dieser Vergrößerung sind die helleren Zellen des retikulären Bindegewebes (Pfeile) erkennbar.

Der Thymus ist das primäre lymphatische Organ des T-Zell-Systems. Während der Reifung der Thymozyten zu T-Lymphozyten, welche unter Kontrolle der Thymusepithelzellen erfolgt, wandern die Thymozyten von der Rinde ins Mark. Der Thymus besteht aus paarigen Lappen, die in der Mediane bindegewebig miteinander verwachsen sind. In histologischen Präparaten lässt sich das Thymusparenchym in Rinde und Mark gliedern. Dabei erscheint die Rinde

dunkel blauviolett gefärbt, da sich dort dicht gepackt eine Vielzahl von Lymphozyten befinden. Das Mark dagegen erscheint heller. Diese Architektur des Thymus war in *Trpm6*^{-/-}-Mäusen zumeist unverändert. Die Rindenzone ließ sich bei beiden Gruppen gut vom Mark unterscheiden. Bei einer einzelnen Maus jedoch war die Rindenzone nicht mehr zu erkennen und die Thymophozytendichte sah stark verringert aus (Abb. V 16 F). Die Thymi aller anderen *knockout*-Tiere waren unauffällig.

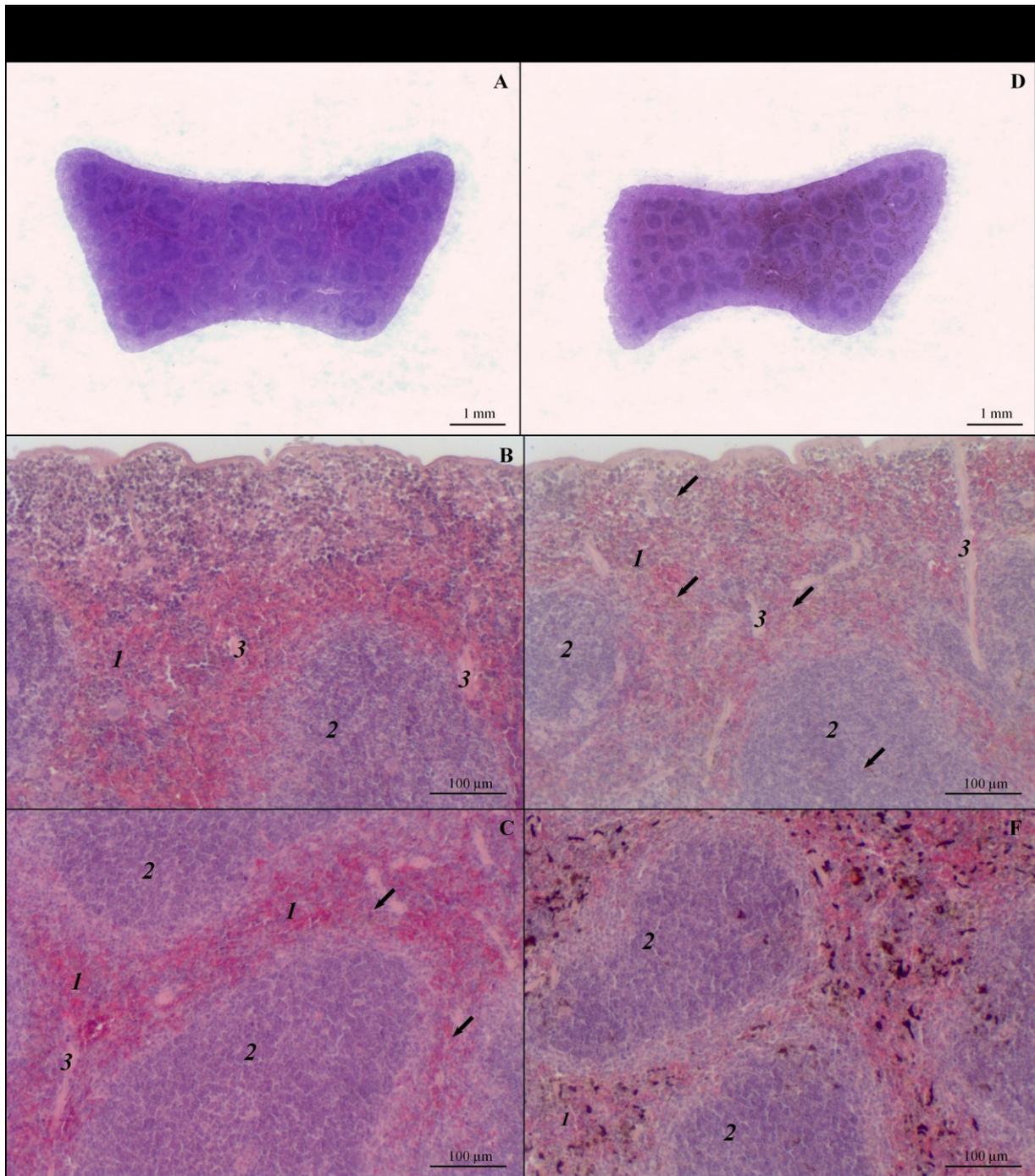


Abb. V 17: Milz der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse (**D, E, F**) und deren Kontrollgeschwistern (**A, B, C**). Der allgemeine Aufbau der Milz ist in gendefizienten Tieren nicht verändert. Die rote Pulpa (**1**) lässt sich von der lymphozytenreichen weißen Pulpa (**2**) unterscheiden und einige Milztrabekel (**3**) durchziehen das Parenchym. Zusätzlich befinden sich vereinzelt Makrophagen (Pfeile) in der Milz, die durch Pigmenteinschlüsse aus abgebauten Erythrozyten bräunlich gefärbt sind. Jedoch treten diese massiv verstärkt im mutierten Gewebe auf.

Die Milz ist das größte Lymphorgan und eine in das Blutgefäßsystem eingeschaltete Filterstation. Sie ist von einer dünnen Bindegewebskapsel umgeben von der aus sogenannte Milztrabekel in das Parenchym ziehen. Diese enthalten eine Vielzahl von Blutgefäßen. Das eigentliche Parenchym besteht aus zwei Kompartimenten, die rote und die weiße Pulpa. Die rote Pulpa besteht aus retikulärem Bindegewebe, welches von zahlreichen Blutgefäßen durchsetzt wird. Sie dient unter anderem der Aussonderung alter und veränderter Blutzellen, die dann von Makrophagen abgebaut werden. In der roten Pulpa sind in histologischen Schnitten dunkelblau gefärbte Milzknötchen sichtbar, deren Gesamtheit die weiße Pulpa bildet. Dabei handelt es sich um lymphozytenreiches Gewebe bzw. Lymphfollikel, die der Immunabwehr dient und das durchströmende Blut auf Antigene und Toxine prüft.

Der Aufbau der Milz erschien in *Trpm6*^{-/-}-Mäusen unverändert. Bei beiden Gruppen waren die rote und weiße Pulpa klar voneinander abgegrenzt. Jedoch waren verstärkt Makrophagen im Gewebe der gendefizienten Mäuse erkennbar, welche unterschiedlich braun-schwarze Partikel phagozytiert haben. Diese Partikel wurden als ausgesonderte Erythrozyten identifiziert. Die verstärkte Phagozytose durch Makrophagen kann zu einer hämolytischen Anämie führen.

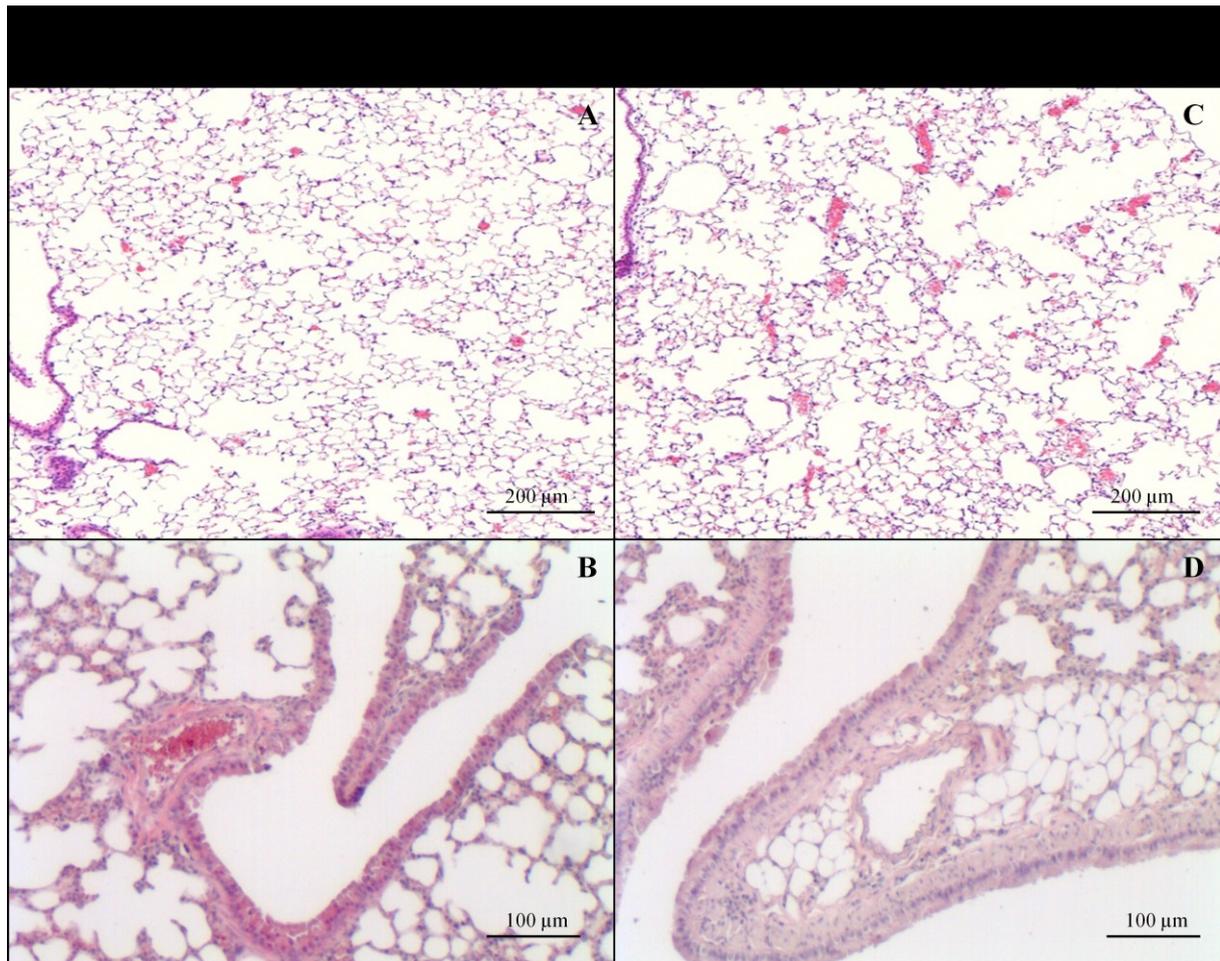


Abb. V 18: Lunge von gesunden Kontrollgeschwistern (**A, B**) und *Trpm6*^{-/-}-Mäusen (**C, D**). **C:** Die Alveolarräume sind im *Trpm6*^{-/-}-Gewebe Emphysem-ähnlich dilatiert. **D:** Zusätzlich befinden sich kleine Fettnester in der Lunge mutierter Tiere.

Die Lunge kann in einem luftführenden Teil, den Bronchien, und in einen Teil, indem der tatsächliche Gasaustausch stattfindet, den Alveolen, gegliedert werden.

In den Lungen der mutierten Tiere konnten häufig Emphyseme identifiziert werden, welche mit der Vergrößerung der Lufträume einhergeht. Dadurch werden das Gefäßbett und die Gasaustauschfläche vermindert. In den *Trpm6*^{-/-}-Lungen konnten Fettzellansammlungen lokalisiert werden (Abb. V 18 D), was als Lipid-Pneumonie bezeichnet wird. Da davon auszugehen ist, dass die Tiere in der Tierhaltung keine öl- oder paraffinhaltigen Inhalationsstoffe ausgesetzt waren, handelte es sich wahrscheinlich um eine endogene Variante, bei der endogenes Cholesterin abgelagert wird. Die Ursache ist noch nicht geklärt.

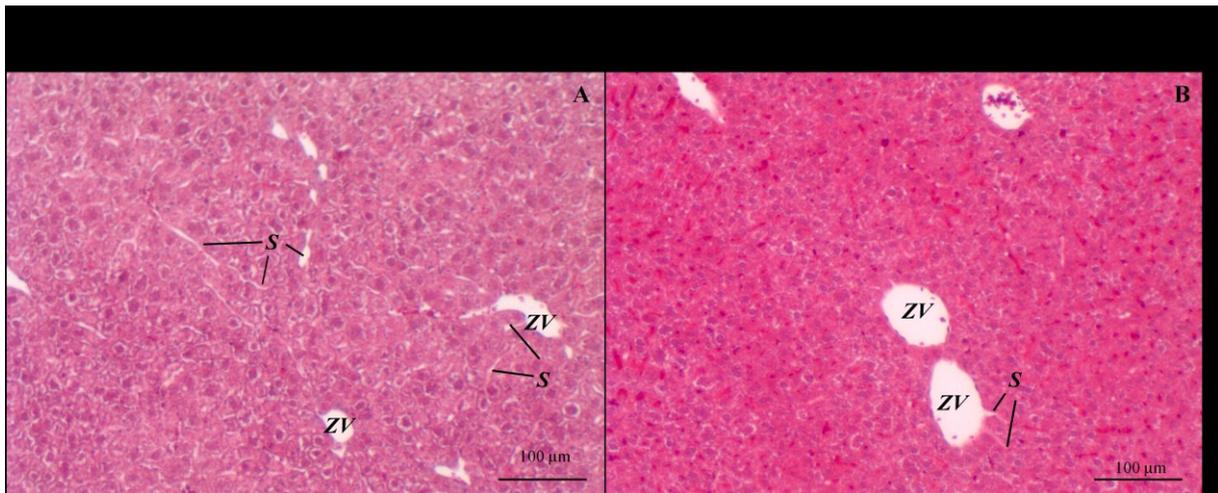


Abb. V 19: Schnitt durch die Leber von gesunden Kontrollgeschwistern (A) und *Trpm6*^{-/-}-Mäusen (B). Dargestellt sind die Hepatozyten und Sinusoide (S), die speichenförmig auf die Zentralvene (ZV) ausgerichtet sind. Die Sinusoide bei mutierten Tieren (B) scheinen in einer geringeren Anzahl vertreten zu sein.

Die Leber ist das zentrale Organ des Stoffwechsels. Sie ist für den Abbau und der Entgiftung vieler körpereigener und körperfremder Stoffe verantwortlich, deren Metaboliten zum Teil in die Galle abgegeben werden. Zusätzlich sezerniert sie zahlreiche Syntheseprodukte und lebenswichtige Eiweißstoffe.

Die Leber ist von einer bindegewebigen Kapsel (Glisson-Kapsel) umgeben, von der Ausläufer ins Innere des Organs einstrahlen und die Leber in Portalfelder unterteilt. Als histologische Einheit gilt das Leberläppchen (Lobulus). Es enthält die Hepatozyten, die Sinusoide und eine Zentralvene. Dabei verlaufen die Hepatozyten, die sich zu Zellbalken anordnen, radiär auf die Zentralvene zu. Zwischen ihnen liegen die zahlreichen Leberkapillaren (Sinusoide).

Der allgemeine strukturelle Aufbau der Leber war in *Trpm6*-defizienten Mäusen unauffällig. Ein gründlicher Vergleich zwischen Kontroll- und mutiertem Gewebe zeigte allenfalls leichte Veränderungen in der *Trpm6*^{-/-}-Leber. Die Sinusoide waren verkleinert und in einer geringeren Anzahl vorhanden. Dadurch schienen die Hepatozyten kompakter aneinander zu liegen.

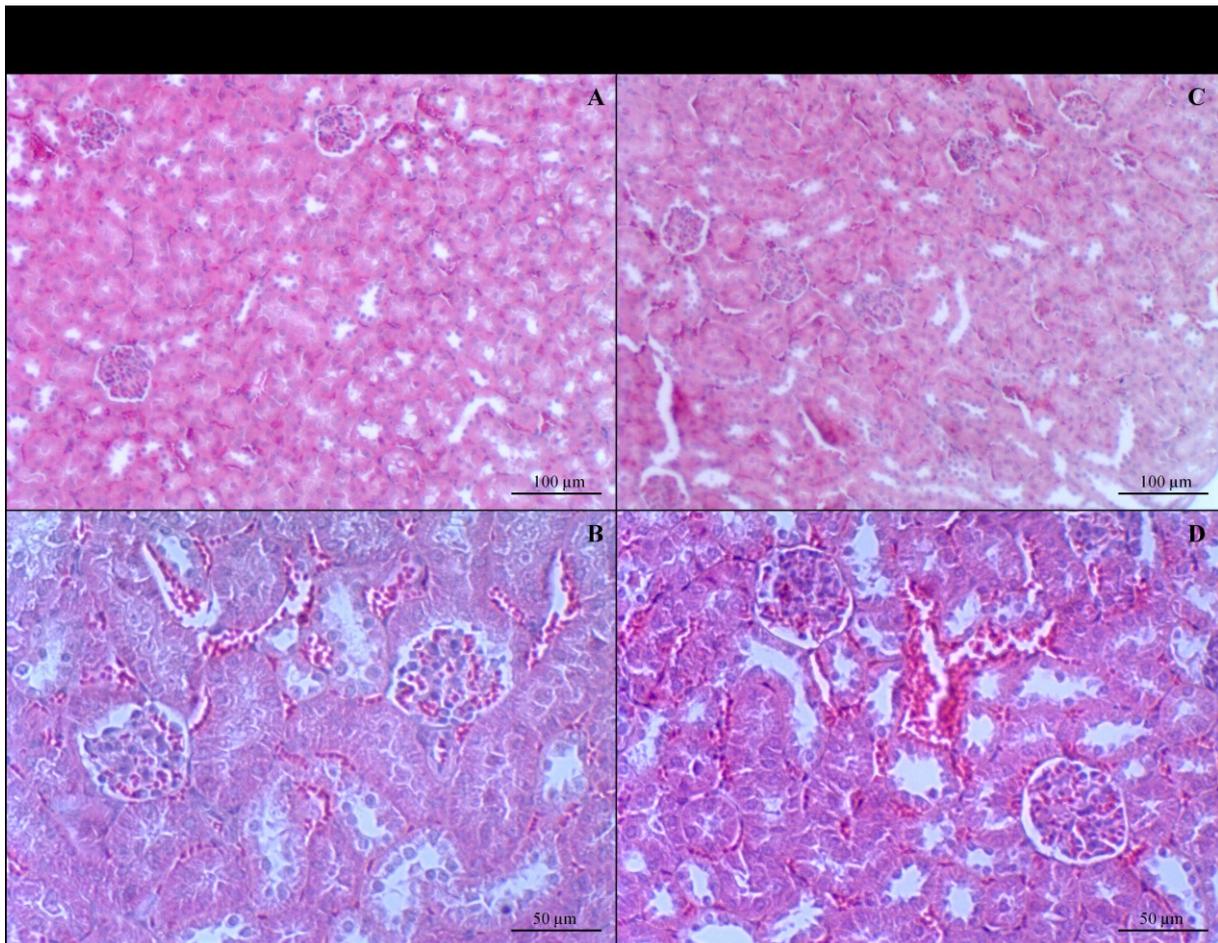


Abb. V 19: Schnitt durch die Niere von gesunden Kontrollgeschwistern (**A, B**) und *Trpm6*^{-/-}-Mäusen (**C, D**). Dargestellt ist die Nierenrinde, die bei beiden Gruppen normal aufgebaut ist. Sie setzt sich aus dem Tubulussystem und den dazwischenliegenden Glomerula zusammen.

Die Niere ist in erster Linie ein lebenswichtiges Ausscheidungsorgan. Zugleich ist sie wesentlich an der Regulation des Salz- und Wasser- sowie des Säure-Basen-Haushaltes beteiligt.

Die Funktionseinheit der Niere ist das Nephron, welches in zwei Abschnitte eingeteilt werden kann: das Nierenkörperchen (Glomerulus und Bowman-Kapsel), welches als Filtervorrichtung fungiert, und das Nierenkanälchen, welches ein langes Epithelrohr mit verschiedenen Segmenten darstellt und für Resorption von Wasser und Elektrolyten verantwortlich ist.

Die topographische Verteilung der Elemente der Niere in *Trpm6*^{-/-}-Tieren war nicht auffällig und sonstige Veränderungen waren ebenfalls nicht auszumachen.

In vielen *Trpm6*^{-/-}-Organen waren morphologische Veränderungen erkennbar. Die gravierendsten Dysmorphien konnten im Fett- und Muskelgewebe, sowie im Herzen und in der Lunge identifiziert werden. Leichte Veränderungen waren in der Leber, den Lymphknoten und der Milz zu verzeichnen. An den übrigen Organen der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse konnten anhand der HE-Färbung keine besonderen Auffälligkeiten festgestellt werden.

2.3.2 Morphometrische Analyse

Um eine exakte Aussage zu Zellgrößenveränderungen treffen zu können wurden zusätzlich an HE-gefärbten Schnitten des viszeralen Fettgewebes und der Skelettmuskulatur morphometrische Analysen durchgeführt. Dazu wurden mit Hilfe der cell*A-Software (Version 3.1) von OLYMPUS der Umfang und die Fläche einzelner Zellen ermittelt. Aus Präparaten drei verschiedener Tiere jedes Genotyps wurden jeweils drei repräsentative Ausschnitte ausgewertet. Die ausführliche Auswertung ist in Tabelle V 5 dargestellt. In *Trpm6*^{-/-}-Tieren war die mittlere Fläche der weißen Fettzellen um 28,43% reduziert und die der Skelettmuskelfasern sogar um 44,25%.

Tab. V 5: Zellenumfang und Zellenfläche der weißen Fettzellen aus viszeralem Fettgewebe und der Skelettmuskelzellen. Die Werte sind jeweils als Mittelwert ± mittlerer Standardfehler (senkrechte Linien) angegeben. Die signifikanten Unterschiede sind mit *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Gewebe	Genotyp	Zellenumfang	Zellenfläche	Signifikanz
Viszerales Fett	Kontrolle	182,23 ± 3,09 µm	2001,33 ± 72 µm ²	***
	<i>Trpm6</i> ^{-/-}	153,91 ± 1,94 µm	1432,33 ± 40 µm ²	
Skelettmuskel	Kontrolle	186,95 ± 2,16 µm	2011,54 ± 40,09 µm ²	***
	<i>Trpm6</i> ^{-/-}	139,51 ± 3,67 µm	1121,48 ± 50,78 µm ²	

2.4 Biochemische Analyse von *Trpm6*-defizienten männlichen Mäusen

Nachdem *Trpm6*^{-/-}-Mäuse auf ihre makroskopischen Veränderungen sowie deren Organe auf Morphologieveränderungen untersucht wurden, wurde im Anschluss eine eingehende biochemische Analytik durchgeführt, um hämatologische Änderungen sowie Fehlfunktionen verschiedener Organsysteme, metabolische Störungen und Änderungen der Homöostase des Elektrolythaushalts zu bestimmen. Dabei konnten allgemeine Mangelzustände und Imbalancen identifiziert werden. Alle biochemischen Parameter wurden, wenn nicht anders angegeben, bei männlichen Mäusen im Alter von acht Wochen erhoben.

2.4.1 Elektrolythaushalt der *Trpm6*-defizienten männlichen Mäuse

Um mögliche Elektrolytstörungen zu identifizieren, wurden gendefiziente Mäuse und deren Kontrollgeschwister 24 Stunden in Stoffwechsellkäfigen gehalten. Dabei konnten Urin und Faeces getrennt gesammelt werden und anschließend Blut aus der Gesichtsvene entnommen werden. Die gemessenen Serumwerte, renale und intestinale Elektrolytausscheidungen sind in

den nachstehenden Kapiteln aufgeführt. Die gesammelten Urin- und Faecesvolumina unterschieden sich nicht voneinander.

2.4.1.1 Magnesiumhomöostase

Zunächst wurde überprüft, ob die Inaktivierung des TRPM6-Proteins die physiologische Magnesiumbalance stört und eine zu erwartende Hypomagnesiämie eintritt. Hierzu wurden die Magnesiumkonzentrationen im Serum, Knochen, Urin und Faeces bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen in Abbildung V 21 gezeigt.

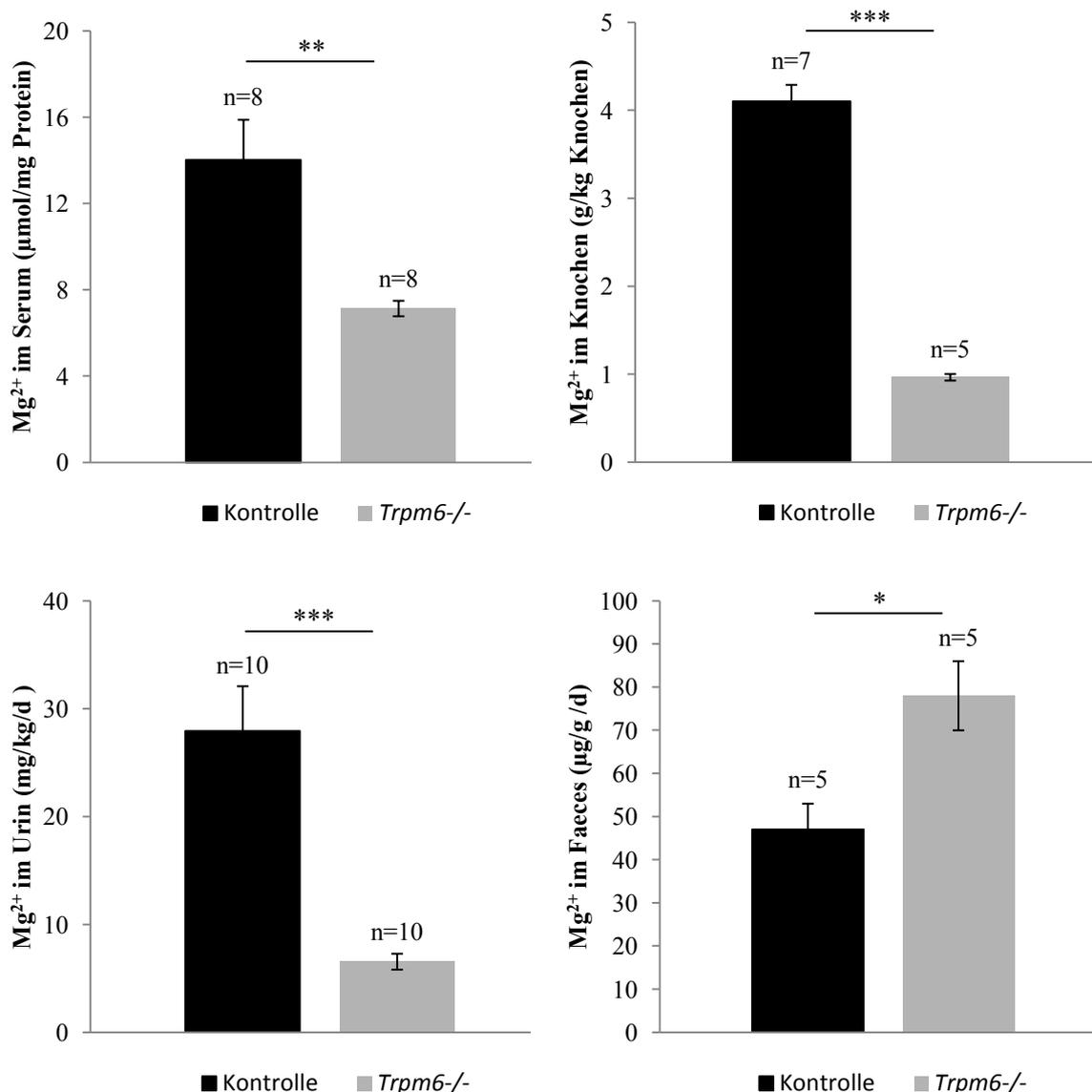


Abb. V 21: Magnesiumbalance der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse sowie deren Kontrollgeschwister. Dargestellt sind die Magnesiumspiegel in Serum, Knochen, Urin und Faeces. Die signifikanten Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Der Serummagnesiumspiegel war in *Trpm6*^{-/-}-Mäusen mit 7,14 µmol/mg Protein um deutliche 50% verringert. Ebenso war die Magnesiumkonzentration in den Knochen, welche den Hauptspeicherort von Magnesium darstellen, drastisch erniedrigt. Es wurde ein durchschnittlicher Magnesiumgehalt von 4,1 g/kg Knochen bei den Kontrolltieren gemessen, der um den Faktor 4 bei gendefizienten Mäusen reduziert war. Die *knockout*-Tiere entwickelten somit einen tiefen Magnesiummangel. Zur Abklärung der Ursache wurde die renale und intestinale Ausscheidung bestimmt. Erstaunlicherweise war die renale Magnesiumausscheidung bei *Trpm6*^{-/-}-Mäusen sehr gering. Daher lag die Vermutung nahe, dass Gegenregulationsmechanismen die Magnesiumausscheidung drosseln und der gestörten

Magnesiumhomöostase entgegenwirken. Die Ausscheidung des Magnesiums mit den Faeces dagegen war signifikant erhöht, so dass eine verminderte intestinale Magnesiumaufnahme für den Magnesiummangel verantwortlich ist.

Trpm6-defiziente Mäuse wiesen eine beträchtliche Störung der Magnesiumhomöostase auf und litten an einer ausgeprägten chronischen Hypomagnesiämie. Dieser Befund entspricht den klinischen Befunden von HSH-Patienten.

2.4.1.2 Calcium-, Zink-, und Phosphatbestimmung

Im Anschluss wurden weitere Elektrolyte in *Trpm6*-defizienten Mäusen sowie deren Kontrollgeschwistern analysiert, um zusätzliche Störungen in anderen Ionenhomöostasen zu identifizieren. In der folgenden Abbildung V 22 sind diese dargestellt.

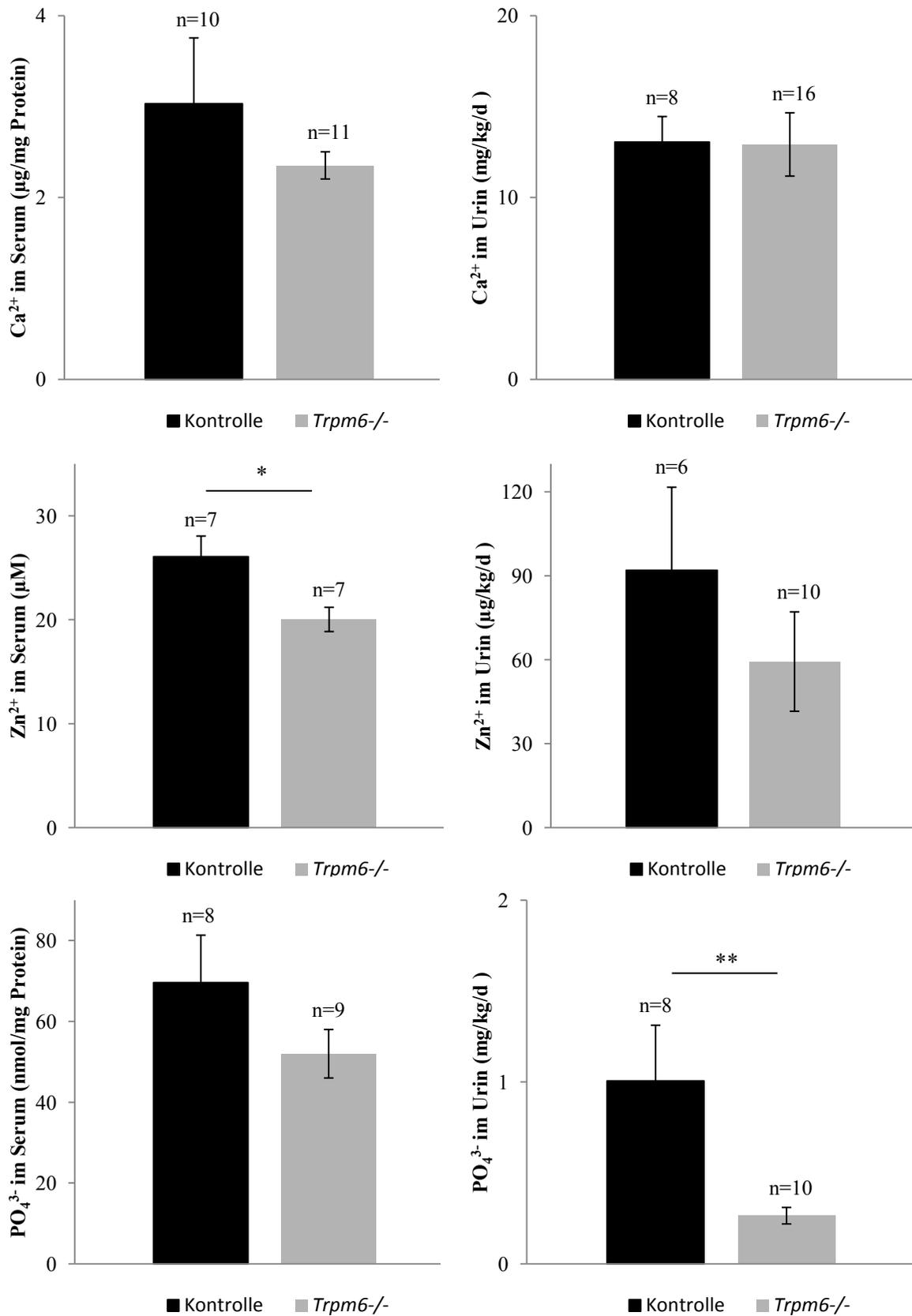


Abb. V 22: Homöostase der bivalenten Kationen Calcium und Zink sowie von Phosphat. Dargestellt sind die jeweiligen ermittelten Konzentrationen in Serum und Urin (Mittelwert ± mittlerer Standardfehler). Die signifikanten Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Trpm6^{-/-}-Tiere wiesen tendenziell niedrige Calciumwerte im Serum auf, die jedoch keine Signifikanz ergaben. Die renale Calciumausscheidung zeigte keine Veränderung. Eine Hypocalcämie lag bei den *knockout*-Mäusen nicht vor.

Die Zinkkonzentration im Serum der gendefizienten Tiere war dagegen im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert. Ebenso konnte eine leicht verminderte Ausscheidung von Zink im Urin gezeigt werden, die allerdings nicht signifikant war. Das Ausmaß dieser Veränderung in der Zinkhomöostase war jedoch nicht so drastisch wie die Magnesiumdefizienz.

Die Phosphatanalysen ergaben eine verminderte Phosphatausscheidung. Eine Hypophosphatämie lag bei den mutierten Mäusen jedoch nicht vor.

2.4.1.3 Haupt- und Spurenelementbestimmung mittels Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnten die gemessenen Konzentrationen einiger Elektrolyte und damit verbundene Mangelzustände bestätigt werden. Außerdem wurden weitere Haupt- und Spurenelemente im Serum, Knochen, Urin und Faeces analysiert. In der folgenden Abbildung V 23 sind die Hauptelemente aufgezeigt. Einige Spurenelemente sind der Tabelle V 6 zu entnehmen.

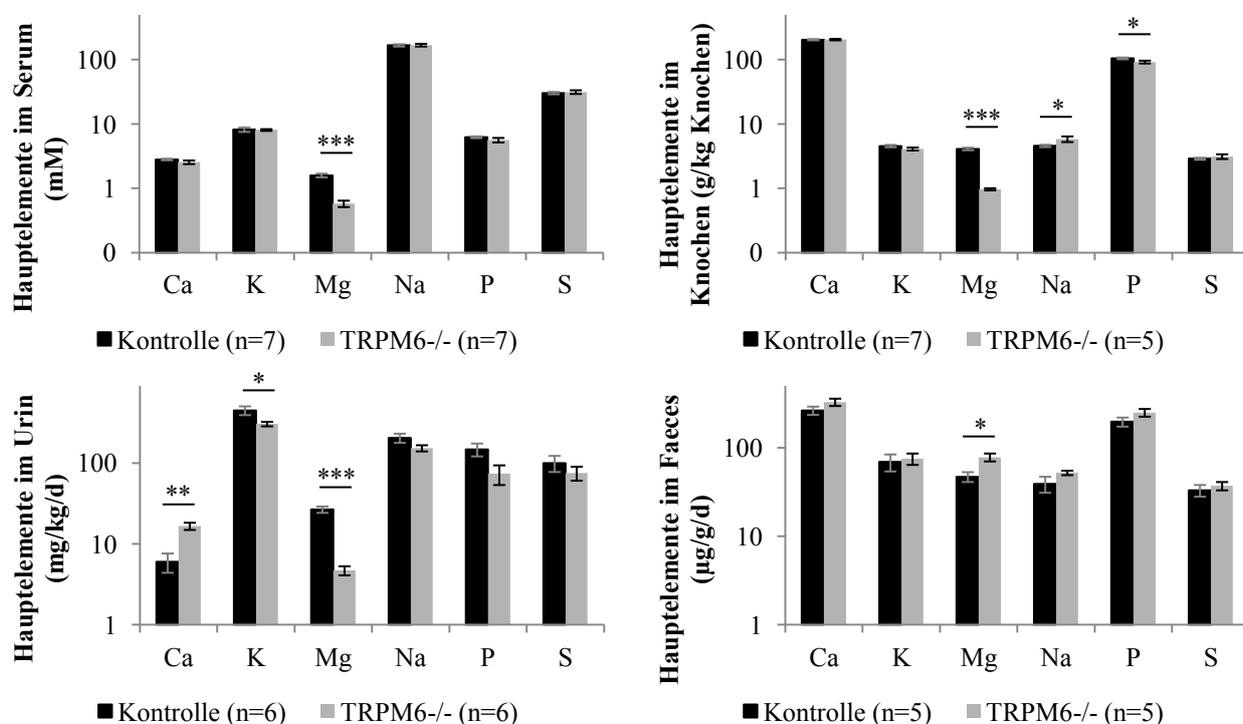


Abb. V 23: Hauptelemente der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse sowie deren Kontrollgeschwister in Serum, Knochen, Urin und Faeces. Die signifikanten Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Die vergleichenden Haupt- und Spurenelementanalysen bestätigten die beträchtliche Hypomagnesiämie der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse und eine verminderte Zinkkonzentration im Serum. Weitere Parameter im Serum zeigten bei gendefizienten Tieren im Vergleich zu deren Kontrolltieren keine signifikante Abweichung.

Im Knochen ergab die Bestimmung der Elektrolyte mit Hilfe der Massenspektrometrie eine übermäßig erniedrigte Magnesiumkonzentration. Darüber hinaus konnten verminderte Phosphor- und Zinkwerte sowie erhöhte Natrium- und Molybdänkonzentrationen gezeigt werden. Eine abschließende Einschätzung, ob diese Veränderungen das Ergebnis von Kompensationsvorgängen sind, kann anhand der erhobenen Daten nicht getroffen werden.

Mit dem Urin schieden mutierte Mäuse signifikant weniger Magnesium aus. Auch für Kalium konnte eine verminderte Ausscheidung gezeigt werden, welche jedoch nicht den drastischen Wert wie für Magnesium annahm. Dagegen wurde eine verstärkte Calciumausscheidung mit dem Urin festgestellt. Eine Hypocalcämie konnte allerdings nicht identifiziert werden.

Die Analyse der Faecesproben ergab, dass bei *Trpm6*^{-/-}-Tieren Magnesium verstärkt, alle anderen Elemente dagegen unverändert ausgeschieden wurden.

Der Gesamtbefund deutet auf einen stark veränderten Magnesiumstoffwechsel in *Trpm6*^{-/-}-Mäusen hin, welcher allerdings nicht durch einen renalen Reabsorptionsdefekt wie zuvor angenommen, sondern durch einen Absorptionsdefekt im Intestinaltrakt hervorgerufen wird. Die zusätzlich veränderten Ausscheidungsparameter im Urin könnten das Ergebnis von Kompensationsmechanismen sein.

Tab. V 6: Gemessene Spurenelemente der Kontroll- und mutierten Mäuse in Serum, Knochen, Urin und Faeces. Die Werte sind jeweils als Mittelwert \pm mittlerer Standardfehler angegeben. Die signifikanten Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. n.s = nicht signifikant

Spurenelement	Kontrolltier	<i>Trpm6</i> ^{-/-}	Signifikanz
<u>Serum</u>			
Cu (μM)	9,44 \pm 1,11	8,27 \pm 0,63	n.s
Fe (μM)	76,10 \pm 12,54	117,2 \pm 15,42	n.s
Mn (μM)	0,53 \pm 0,13	0,70 \pm 0,55	n.s
Mo (μM)	0,21 \pm 0,03	0,18 \pm 0,03	n.s
Ni (μM)	0,19 \pm 0,05	0,19 \pm 0,07	n.s
Sr (μM)	0,43 \pm 0,06	0,39 \pm 0,03	n.s
Zn (μM)	26,06 \pm 2,00	20,05 \pm 1,17	**
<u>Knochen</u>			
Cu (mg/kg)	1,08 \pm 0,03	1,29 \pm 0,12	n.s
Fe (mg/kg)	116,04 \pm 12,53	140,49 \pm 5,47	n.s
Mn (mg/kg)	1,03 \pm 0,12	1,12 \pm 0,07	n.s
Mo ($\mu\text{g/kg}$)	0,16 \pm 0,008	0,20 \pm 0,012	*
Ni ($\mu\text{g/kg}$)	36,07 \pm 8,45	63,96 \pm 21,20	n.s
Sr (mg/kg)	53,27 \pm 2,13	56,23 \pm 2,80	n.s
Zn (mg/kg)	162,59 \pm 4,90	143,22 \pm 5,60	*
<u>Urin</u>			
Cu ($\mu\text{g/kg/d}$)	20,58 \pm 6,84	16,40 \pm 4,62	n.s
Fe ($\mu\text{g/kg/d}$)	27,32 \pm 6,41	53,61 \pm 19,75	n.s
Mn ($\mu\text{g/kg/d}$)	2,31 \pm 0,73	8,77 \pm 5,53	n.s
Mo ($\mu\text{g/kg/d}$)	33,80 \pm 4,33	29,86 \pm 2,99	n.s
Ni ($\mu\text{g/kg/d}$)	5,00 \pm 1,97	5,88 \pm 2,75	n.s
Sr ($\mu\text{g/kg/d}$)	23,29 \pm 2,78	23,40 \pm 2,42	n.s
Zn ($\mu\text{g/kg/d}$)	41,71 \pm 14,16	45,24 \pm 9,07	n.s
<u>Faeces</u>			
Cu (mg/kg)	45,25 \pm 3,98	35,71 \pm 3,48	n.s
Fe (mg/kg)	952,91 \pm 140,55	782,75 \pm 36,85	n.s
Mn (mg/kg)	348,52 \pm 36,31	322,95 \pm 21,06	n.s
Sr (mg/kg)	44,65 \pm 3,93	38,80 \pm 2,19	n.s
Zn (mg/kg)	376,73 \pm 59,85	270,35 \pm 10,05	n.s

2.4.2 Oxidativer Stress

Trpm6^{-/-}-Mäuse wurden im nächsten Schritt auf systemische Defekte untersucht, welche den beobachteten Phänotypen erklären würden und eventuell durch einen Magnesiummangel hervorgerufen werden. Da Magnesium in zahlreichen physiologischen Prozessen involviert ist und unter anderem als Antioxidans gilt (Rayssiguier et al., 1993; Hans et al., 2003), wurde untersucht, ob *Trpm6*^{-/-}-Tiere einem größeren oxidativen Stress ausgesetzt sind. Als Biomarker wurde das 8-OHdG herangezogen und gemessen. Die oxidierte Form des Guanosins war signifikant erhöht im Urin der mutierten Mäuse, was für einen gesteigerten oxidativen Stress sprechen würde.

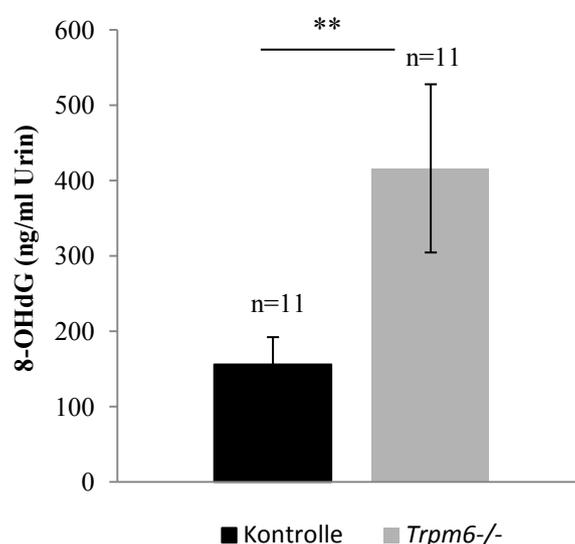


Abb. V 24: Renale 8-OHdG Ausscheidung bei *Trpm6*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu deren Kontrollgeschwistern. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen mittleren Standardfehlern (senkrechte Linie). Der signifikante Unterschied ist mit * ($p \leq 0,01$) gekennzeichnet.

2.4.3 Inflammatorischer Stress

Mit dem oxidativen Stress ist oft ein zusätzlicher inflammatorischer Stress verbunden (Zhang & Kaufman, 2008; Zhang, 2010). Um Aussagen dieser Parameter treffen zu können, wurden die proinflammatorischen Proteine TNF- α und IL-6 im Serum bestimmt. Jedoch waren die Konzentrationen der beiden Proteine extrem niedrig und teilweise nicht nachweisbar, so dass eine Auswertung nicht möglich war (Daten nicht gezeigt).

2.4.4 IGF-System

Das IGF-I-Protein ist in vielen physiologischen und metabolischen Prozessen involviert und gilt daher als Biomarker, der den metabolischen Status reflektiert (Annunziata et al., 2011).

Aufgrund einiger Pathologien in den Geweben der *Trpm6*-defizienten Mäuse, vor allem in der Skelettmuskulatur, und einem erhöhten oxidativen Stress, wurden die Konzentrationen von IGF-I, dem Wachstumshormon (GH) und Insulin im Serum gemessen und analysiert.

Der IGF-I-Serumspiegel war signifikant niedriger als bei den Kontrollgeschwistern. Das GH, welches mit IGF-I einen negativen Rückkopplungsmechanismus bildet, war in *Trpm6*^{-/-}-Mäusen tendenziell erhöht, jedoch ohne Signifikanz. Die Insulinwerte im Serum zeigten keine Veränderungen und lagen im Normbereich (Daten nicht gezeigt).

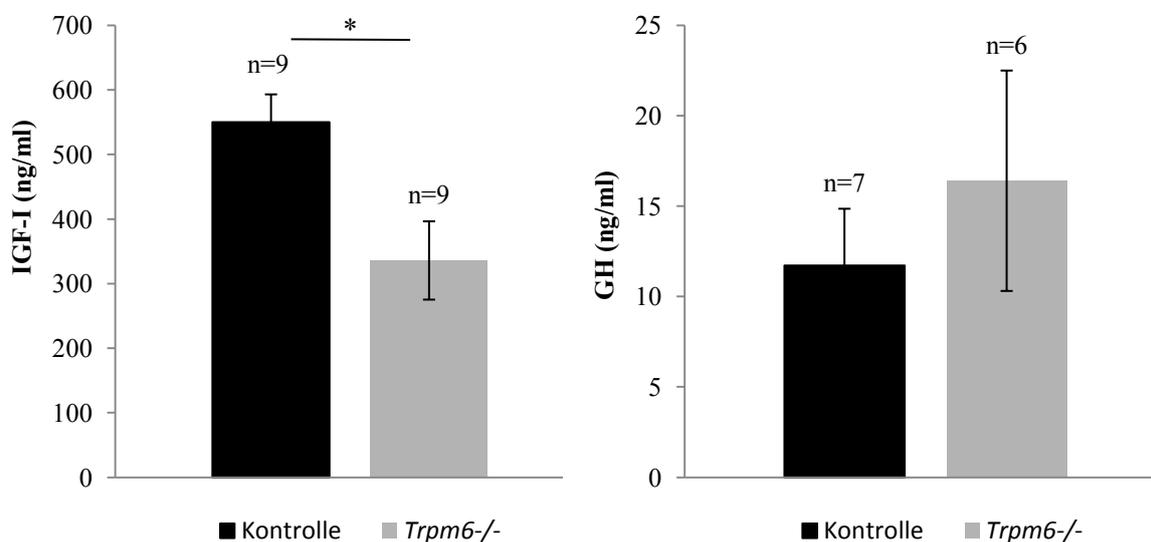


Abb. V 25: IGF-I- und GH-Konzentrationen im Serum von *Trpm6*^{-/-}-Mäusen und Kontrolltieren. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen mittleren Standardfehlern (senkrechte Linie). Der signifikante Unterschied ist mit * ($p \leq 0,05$) gekennzeichnet.

2.5 Magnesium-Supplementierung bei der *Trpm6*-defizienten Mauslinie

Mit einer Magnesium-Supplementierung sollte überprüft werden, ob die Hypomagnesiämie in *Trpm6*-defizienten Mäusen kompensiert werden kann, sich die mutierten Tiere normal entwickeln und die Überlebensrate wieder steigt. Dies würde die Vermutung nahe legen, dass der Magnesiumverlust die primäre Ursache ist. Um eine kontinuierliche Magnesiumaufnahme zu gewährleisten, wurde gendefizienten Mäusen und Kontrolltieren Magnesiumangereichertes Futter (0,75%) angeboten.

2.5.1 Reproduktionsbiologische Analyse von *Trpm6*-defizienten Mäusen mit einer Magnesium-Supplementierung

Um die Frage zu klären, ob eine Magnesium-Supplementierung den Reproduktionserfolg bei homozygoten Zuchtpaaren (*Trpm6*^{-/-} x *Trpm6*^{-/-}) positiv beeinflusst, wurden insgesamt sechs dieser Zuchtpaare mit Magnesium-reichem (0,75%) Futter gehalten und der Zuchterfolg kontrolliert. Dazu sollte die Anzahl der Nachkommen pro Wurf protokolliert werden. Jedoch ging aus den Verpaarungen kein einziges lebendes Tier hervor, das untersucht werden konnte. Aus diesem Grund wurden wiederum heterozygote Zuchtpaare herangezogen, um lebensfähige *knockout*-Tiere zu erhalten, denen Magnesium angereichertes Futter angeboten wurde.

2.5.2 Äußere Merkmale der *Trpm6*-defizienten männlichen Mäuse mit einer Magnesium-Supplementierung

Zunächst sollte überprüft werden, wie sich eine erhöhte Magnesiumzufuhr auf das Wachstum und auf die Überlebensrate der mutierten Mäuse auswirkt. Dazu wurden *Trpm6*^{-/-}-Mäuse zusammen mit ihren Kontrollgeschwistern beobachtet, gewogen und die Lebensspanne analysiert.

2.5.2.1 Körpergewichtsentwicklung

Das Körpergewicht der *Trpm6*-defizienten Mäuse und der Kontrollgeschwister wurde alle vier Wochen ab der vierten Lebenswoche gewogen und festgehalten. Aus den erhobenen Daten konnte die Gewichtsentwicklung der Tiere verfolgt werden, welche in Abbildung V 26 graphisch dargestellt ist.

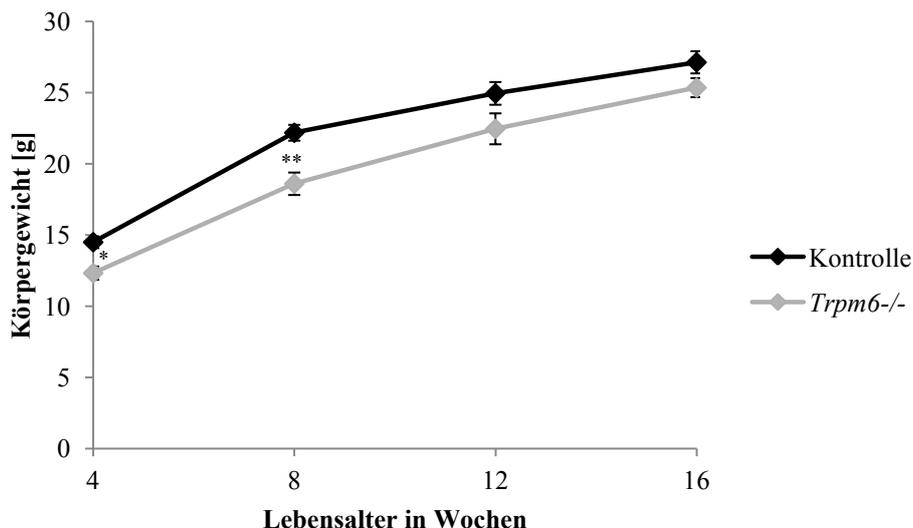


Abb. V 26: Die Körpergewichtsentwicklung von männlichen *knockout*-Mäusen (graue Raute) sowie deren Kontrollgeschwistern (schwarze Raute) mit einer Magnesium-Supplementierung. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm mittlerer Standardfehler (senkrechte Linien). Die signifikanten Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$) und ** ($p \leq 0,01$) gekennzeichnet. Je $n=7$

Die Wachstumskurven der beiden Gruppen verliefen parallel nebeneinander (Abb. V 26). In den ersten acht Wochen waren zwar noch kleine Unterschiede zu verzeichnen und die Gewichtszunahme der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse blieb hinter der Gewichtsentwicklung der Kontrollgeschwister zurück. In den nächsten Wochen nahmen jedoch die mutierten Tiere verstärkt zu und konnten den Unterschied ausgleichen. Ab der 12. Woche war keine signifikante Differenz zwischen den beiden Gruppen zu verzeichnen.

2.5.2.2 Überlebensrate

Für eine Untersuchung der Überlebensrate wurden *Trpm6*^{-/-}-Mäuse und deren Kontrollgeschwister, denen eine erhöhte Dosis an Magnesium über das Futter verabreicht wurde, analysiert. Nach dem Absetzen von den Elterntieren wurde das Lebensalter der Mäuse für die ersten 16 Lebenswochen ermittelt. Dies setzte voraus, dass keines dieser Tiere für Versuchszwecke getötet wurde.

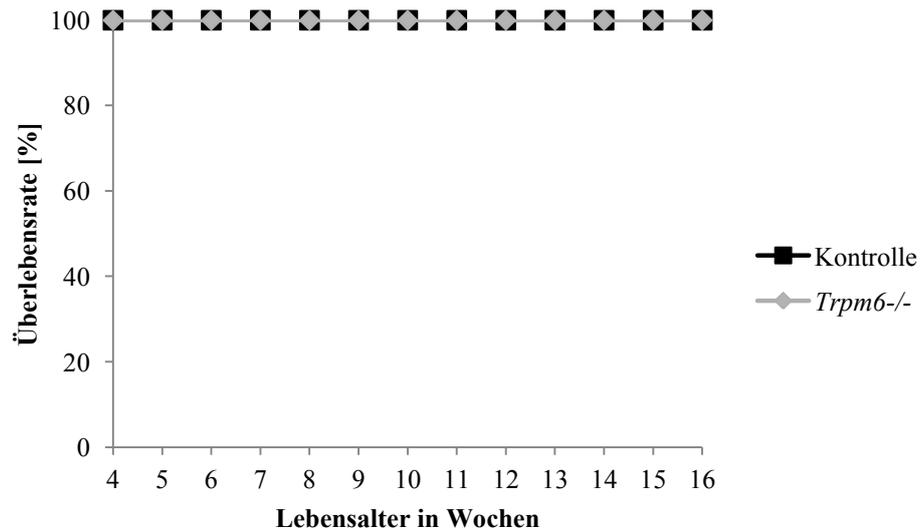


Abb. V 27: Die Überlebensrate in Lebenswochen von männlichen *knockout*-Mäusen (graue Raute) sowie deren Kontrollgeschwistern (schwarze Raute) mit einer Magnesium-Supplementierung. Je n=7

Keines der Tiere, weder Kontrollmäuse noch gendefiziente, ist während dieser Untersuchung gestorben. Durch die Magnesium-Supplementierung über das Futter konnte die Lebensspanne der mutierten Tiere verlängert werden. Dies sollte mit einem zusätzlichen Versuch unterstützt werden. Dazu wurde das Magnesium-reiche (0,75%) Futter der Tiere mit Normalfutter (0,22%) ausgetauscht und das Überleben weitere 14 Wochen beobachtet.

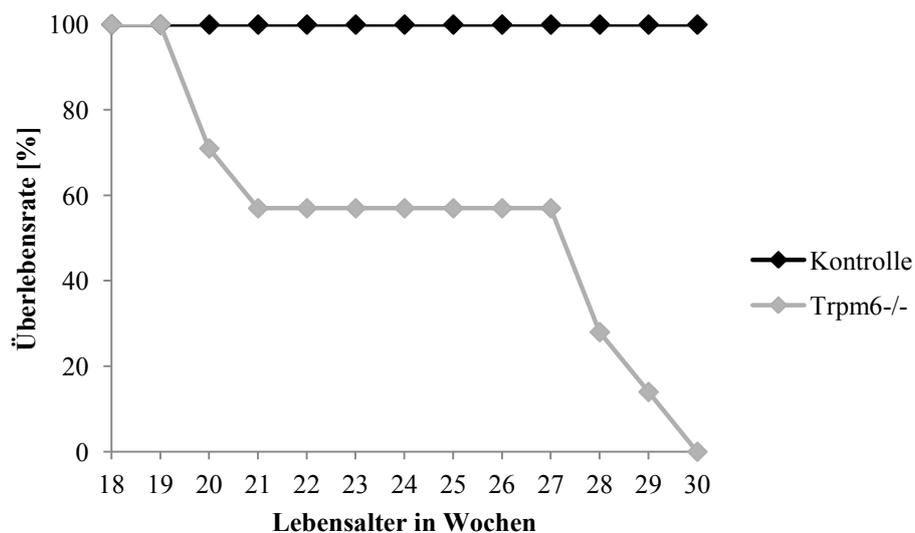


Abb. V 28: Die Überlebensrate in Wochen von männlichen *knockout*-Mäusen (graue Raute) sowie deren Kontrollgeschwistern (schwarze Raute) nachdem das Magnesium angereicherte Futter mit Normalfutter ausgetauscht wurde. Je n=7

Nachdem den Tieren nur noch Normalfutter angeboten wurde und die zusätzliche Magnesiumzufuhr damit unterbunden war, überlebten zunächst alle Mäuse die ersten drei Wochen. Nach vier Wochen waren schon 30% der mutierten Tiere gestorben. Im Verlauf der 14 Wochen verstarben alle gendefizienten Mäuse, während alle Kontrolltiere weiter lebten. Ohne eine erhöhte Magnesiumdosis waren *Trpm6*^{-/-}-Mäuse nicht fähig lange zu überleben.

2.5.3 Magnesiumhomöostase von *Trpm6*-defizienten männlichen Mäusen mit einer Magnesium-Supplementierung

Das gestörte Gleichgewicht der Magnesiumhomöostase bei *Trpm6*^{-/-}-Mäusen sollte durch die Magnesium-Supplementierung über das Futter ausgeglichen werden. Um dies zu prüfen, wurde aus der Gesichtsvene der Mäuse Blut gewonnen und die Magnesiumkonzentration im Serum bestimmt.

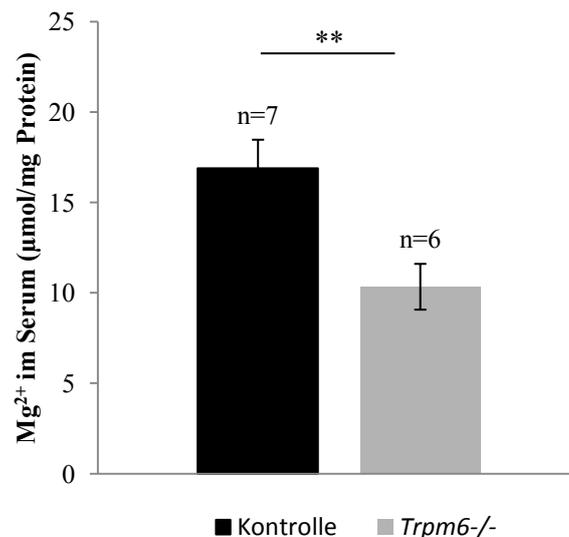


Abb. V 29: Serum-Magnesiumspiegel in *Trpm6*^{-/-}-Mäusen und Kontrolltieren mit einer Magnesium-Supplementierung. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen mittleren Standardfehlern (senkrechte Linie). Der signifikante Unterschied ist mit ** ($p \leq 0,01$) gekennzeichnet.

Der Serum-Magnesiumspiegel war in *Trpm6*^{-/-}-Mäusen auch nach einer Magnesium-Supplementierung signifikant erniedrigt. Der Unterschied zur gemessenen Konzentration in den Kontrolltieren betrug 39%. Ein zusätzlicher Vergleich mit den Magnesiumwerten der *Trpm6*^{-/-}-Tiere ohne angereichertes Futter (Kap. V 2.4.1.1; V 21) zeigte jedoch eine deutliche Erhöhung der Magnesiumkonzentration in mutierten Mäusen mit Magnesiumzufuhr. Der Serumspiegel konnte von 7,13 μmol Mg²⁺ pro mg Protein auf 10,3 μmol Mg²⁺ pro mg Protein

gesteigert werden. Ebenso war diese Konzentrationszunahme in Kontrollmäusen zu beobachten. Eine Supplementierung dieses Elements reichte aus, um die Werte im Serum von *Trpm6*^{-/-}-Mäusen zu erhöhen und auf die Normalkonzentration anzunähern.

3 Charakterisierung der intestinalspezifischen *Trpm6*-defizienten Mauslinie

Es galt die Frage zu klären, ob tatsächlich eine insuffiziente Magnesiumaufnahme über den Darm ausschlaggebend für den Magnesiumverlust ist. Aus diesem Grund wurde eine Mauslinie generiert, in der TRPM6 intestinalspezifisch inaktiviert wurde. Um TRPM6 ausschließlich in intestinalen Epithelzellen zu inaktivieren wurden konditionale Weibchen (*Trpm6*^{Δ17/Δ17}; Kap. IV 1.1) mit *Villin1-Cre*-transgenen *Trpm6*^{/WT} Männchen verpaart, da die Cre-Rekombinase nur in Enterozyten exprimiert wird. Die mutierten Tiere waren lebensfähig und konnten hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht werden.

3.1 Äußere Merkmale der intestinalspezifischen *Trpm6*-defizienten männlichen Mäuse

Zunächst wurde untersucht, ob intestinalspezifisch gendefiziente Mäuse Auffälligkeiten hinsichtlich ihrer Größe und Körpergewicht aufweisen. Ferner wurde ihre Lebensspanne analysiert.

3.1.1 Körpergewichtsentwicklung

Um die Körpergewichtsentwicklung zu untersuchen, wurden *Trpm6*^{-/-}; *Vil*-Mäuse und deren Kontrollgeschwister ab der vierten Lebenswoche in einem wöchentlichen Rhythmus gewogen. In Abbildung V 30 sind die jeweiligen Gewichte graphisch dargestellt.

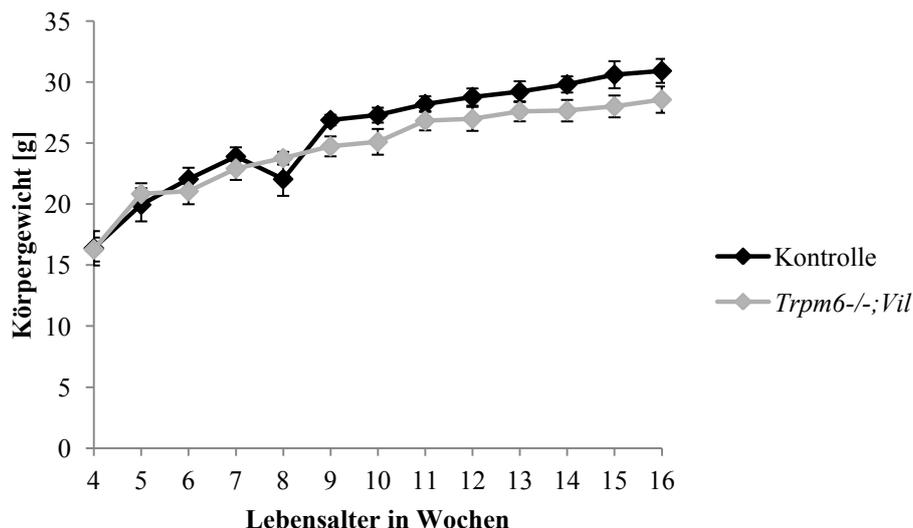


Abb. V 30: Die Körpergewichtsentwicklung von männlichen intestinalspezifischen *Trpm6*^{-/-}; *Vil*-Mäusen (graue Raute; n=8) sowie deren Kontrollgeschwistern (schwarze Raute; n=5). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± mittlerer Standardfehler (senkrechte Linien).

Die Körpergewichtsentwicklung von intestinalspezifischen *Trpm6*-defizienten Mäusen und deren Kontrollgeschwistern unterschieden sich kaum voneinander. Es konnten weder auffällige Entwicklungsstörungen noch signifikante Unterschiede im Gewicht festgestellt werden.

3.1.2 Überlebensrate

Die Überlebensrate wurde nach dem Absetzen von den Elterntieren für die ersten 16 Lebenswochen ermittelt. Dazu wurde keines dieser Tiere vorzeitig für Versuchszwecke getötet. Abbildung V 31 stellt die Überlebensrate dar.

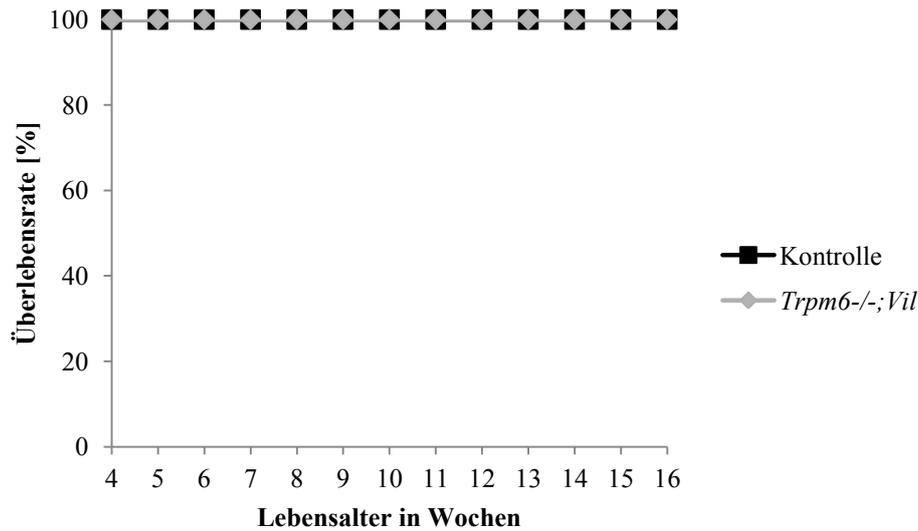


Abb. V 31: Die Überlebensrate von männlichen *Trpm6^{-/-}; Vil*-Mäusen (graue Raute) sowie deren Kontrollgeschwistern (schwarze Raute) in Lebenswochen. n=11

Beide Gruppen, *Trpm6^{-/-}; Vil*-Mäuse und gesunde Wurfgeschwister, überlebten die ersten 16 Lebenswochen. Keines der Tiere starb vorzeitig und auch später nicht. Die intestinalspezifische Deletion des *Trpm6* wirkte sich somit nicht auf die Lebensspanne der Mäuse aus.

3.2 Magnesiumbalance von intestinalspezifischen *Trpm6*-defizienten männlichen Mäusen

Für die Identifizierung einer möglichen Störung in der Magnesiumbalance in *Trpm6^{-/-}; Vil*-Mäusen, wurden diese zusammen mit ihren gesunden Wurfgeschwistern 24 Stunden in Stoffwechsellkäfigen gehalten. Anschließend konnte die Magnesiumkonzentration in den gesammelten Urin- und Serumproben bestimmt werden.

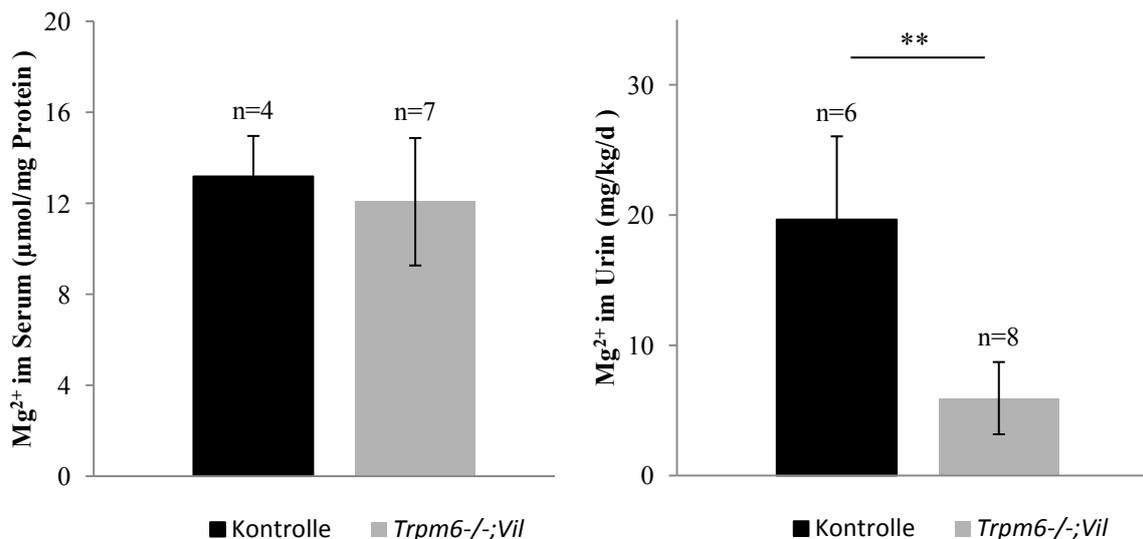


Abb. V 32: Serum-Magnesiumspiegel und Magnesiumausscheidung mit dem Urin in *Trpm6*^{-/-}; *Vil*-Mäusen und Kontrolltieren. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen mittleren Standardfehlern (senkrechte Linie). Der signifikante Unterschied ist mit ** ($p \leq 0,01$) gekennzeichnet.

Die Analyse der Urinproben zeigte, dass Magnesium stark vermindert mit dem Urin ausgeschieden wurde. Die ermittelten Konzentrationen in *Trpm6*^{-/-}; *Vil*-Tieren waren mehr als dreifach erniedrigt. Dieser Befund deutet auf einen veränderten Magnesiumstoffwechsel in intestinalspezifischen *knockout*-Mäusen hin. Eine Hypomagnesiämie lag bei diesen mutierten Tieren jedoch noch nicht vor. Die Werte im Serum lagen bei beiden Gruppen im Normbereich. Daher kam der Verdacht auf, dass eine Hypomagnesiämie in diesem Tiermodell erst später auftritt. Um diesen Gedanken zu verfolgen, wurden einige Tiere, bis sie ein Alter von einem Jahr bis 1 ½ Jahren erreicht haben, im Tierstall gehalten und anschließend nochmals deren Urin- und Serumproben analysiert.

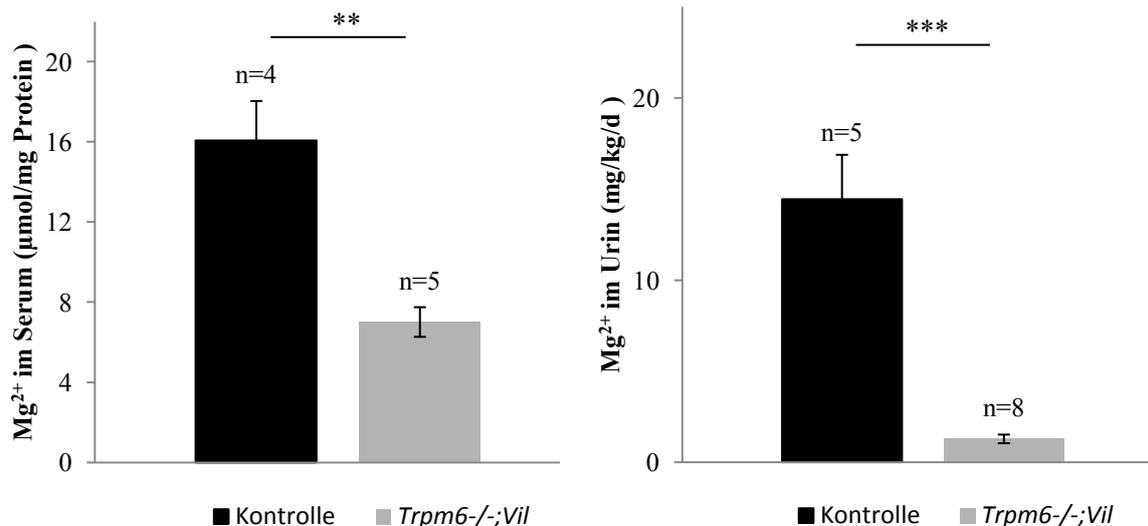


Abb. V 33: Serum-Magnesiumspiegel und Magnesiumausscheidung mit dem Urin in älteren (1-1,5 Jahre alt) *Trpm6*^{-/-};*Vil*-Mäusen und Kontrolltieren. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen mittleren Standardfehlern (senkrechte Linie). Die signifikanten Unterschiede sind mit ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Die Urinanalysen in älteren Tieren konnten eine verminderte Magnesiumausscheidung bei den mutierten Mäusen bestätigen. Die veränderte Ausscheidung war mit einer elffachen Verringerung noch gravierender als bei jüngeren Tieren beobachtet wurde. Zudem war ebenfalls der Magnesium-Serumspiegel der *Trpm6*^{-/-};*Vil*-Mäuse signifikant unter dem Normalbereich.

Offenbar nimmt der Phänotyp der Hypomagnesiämie in juvenilen (sechs bis acht Wochen alt) Tieren nicht den Schweregrad an wie in adulten Mäusen. Eine Magnesiumdefizienz entwickelte sich bei intestinalspezifischen *knockout*-Mäusen langsamer und trat erst im höheren Alter auf.

4 Charakterisierung der nierenspezifischen *Trpm6*-defizienten Mauslinie

Neben der Inaktivierung speziell in intestinalen Epithelialzellen wurde zusätzlich eine Mauslinie generiert, deren TRPM6-Inaktivierung sich auf die Epithelialzellen der Niere beschränkte, um die bisher wenig verstandenen Zusammenhänge der Niere bei der Regulierung der Magnesiumbalance zu untersuchen. Für eine Deletion des *Trpm6* in der Niere wurden konditionale Weibchen (*Trpm6* ^{$\Delta 17/\Delta 17$} ; Kap. IV 1.1) mit *Trpm6*^{*WT*} Männchen verpaart, die *Ksp1.3-Cre* Träger waren. Das *Ksp1.3-Cre* Transgen steuert die Expression der Rekombinase im sich entwickelnden Nephron.

Die mutierten Tiere waren lebensfähig und konnten hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht werden.

4.1 Äußere Merkmale der nierenspezifischen *Trpm6*-defizienten männlichen Mäuse

Wie auch die vorgehenden Linien wurde die nierenspezifische gendefiziente Mauslinie auf Auffälligkeiten untersucht. Dazu wurden zunächst das Körpergewicht und ihre Lebenserwartung analysiert.

4.1.1 Körpergewichtsentwicklung

Trpm6^{*-/-*}; *Ksp*-Mäuse und die Kontrollgruppe wurden ab der vierten Lebenswoche in einem wöchentlichen Rhythmus gewogen. Anhand der gemittelten Daten konnte die Körpergewichtsentwicklung erstellt werden, welche in Abbildung V 34 zu sehen ist.

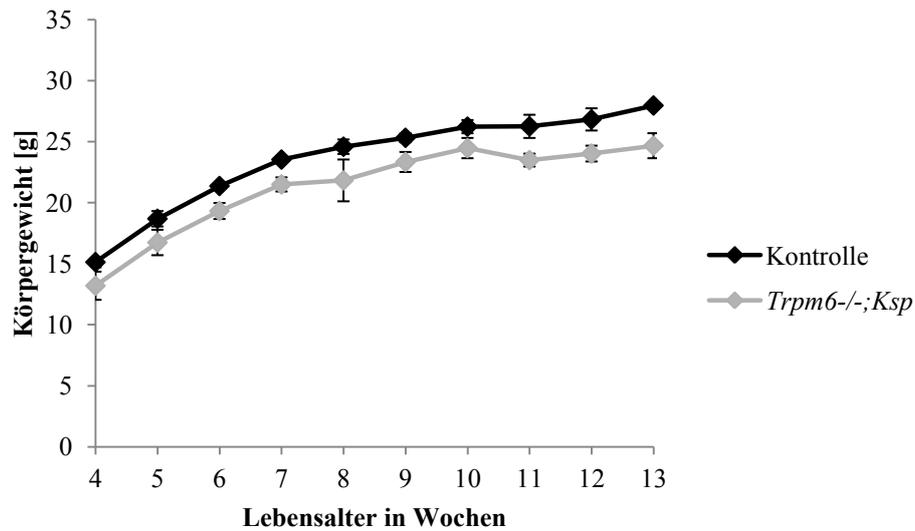


Abb. V 34: Die Körpergewichtsentwicklung von männlichen nierenspezifischen *Trpm6*^{-/-}; *Ksp*-Mäusen (graue Raute; n=5) sowie deren Kontrollgeschwistern (schwarze Raute; n=3). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± mittlerer Standardfehler (senkrechte Linien).

Wie in der intestinalspezifischen *knockout*-Linie konnte keine Entwicklungsstörung oder signifikanten Unterschiede im Gewicht bei den nierenspezifisch mutierten Mäusen im Vergleich zu den gesunden Kontrollgeschwistern festgestellt werden. *Trpm6*^{-/-}; *Ksp*-Mäuse entwickelten sich wie die Kontrollgruppe und nahmen kontinuierlich an Gewicht zu.

4.1.2 Überlebensrate

Die Überlebensrate wurde mit den gleichen Bedingungen wie bei den anderen Mauslinien ermittelt. Jedes Tier, was nach dem Absetzen von den Elterntieren während der ersten 16 Lebenswochen verstarb, wurde protokolliert und die Lebenserwartung berechnet. Keines dieser Tiere wurde dazu vorzeitig für Versuchszwecke getötet.

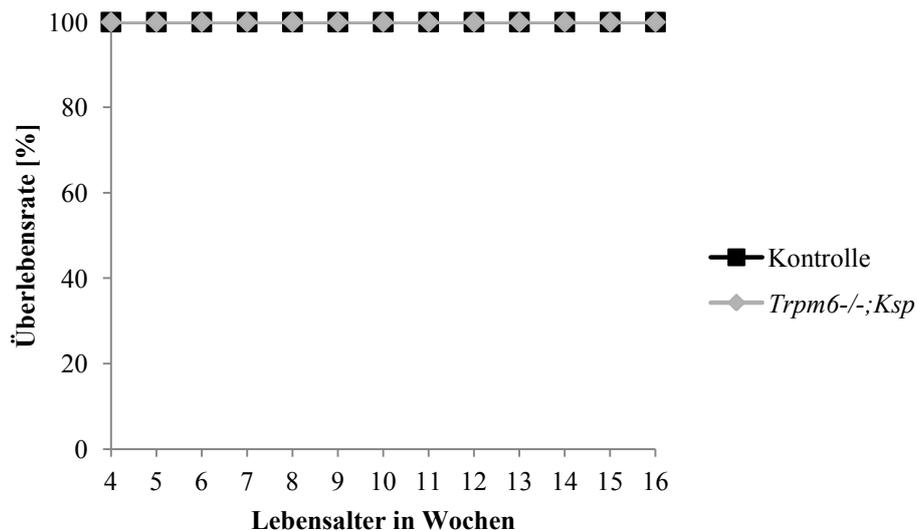


Abb. V 35: Die Überlebensrate von männlichen *Trpm6*^{-/-}; *Ksp*-Mäusen (graue Raute) sowie deren Kontrollgeschwistern (schwarze Raute) in Lebenswochen. n=5

Die Abbildung V 35 zeigt die Überlebensrate der *Trpm6*^{-/-}; *Ksp*-Mäuse und der Kontrollgruppe. Während der ersten 16 Wochen war keines der Tiere gestorben. Die nierenspezifische Deletion des *Trpm6* wirkte sich somit nicht auf die Lebensspanne der Mäuse aus.

4.2 Biochemische Analyse von nierenspezifischen *Trpm6*-defizienten männlichen Mäusen

4.2.1. Magnesiumbalance

In dieser Mauslinie wurden ebenfalls Magnesiumbestimmungen in Serum und Urin durchgeführt, um mögliche Veränderungen im Ionenhaushalt zu identifizieren. Dazu mussten *Trpm6*^{-/-}; *Ksp*-Mäuse und deren Kontrollgeschwister 24 Stunden in Stoffwechsellkäfigen gehalten werden. Die gemessenen Magnesiumkonzentrationen sind in der folgenden Abbildung V 36 dargestellt.

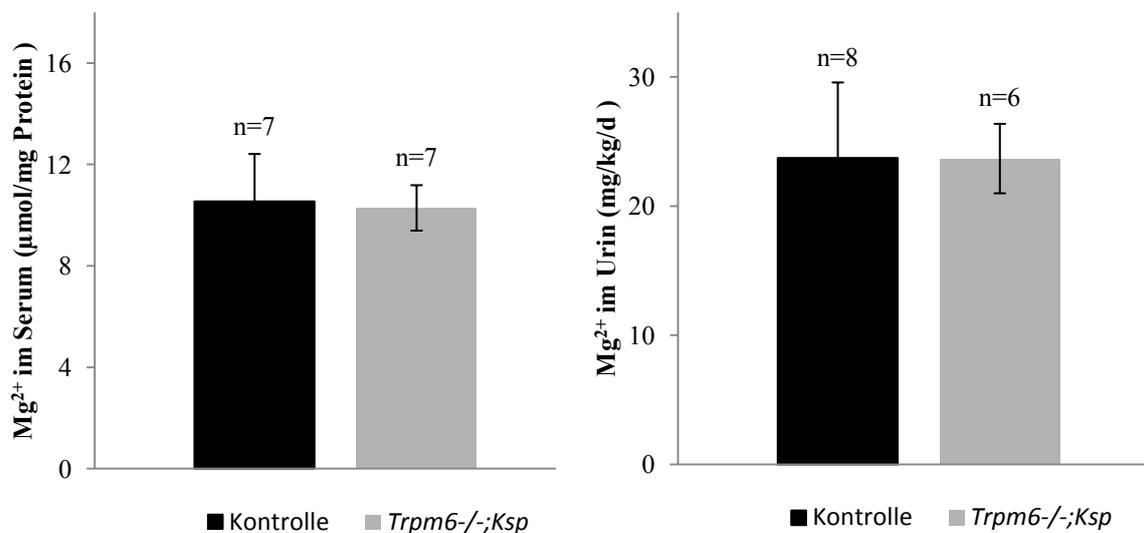


Abb. V 36: Serum-Magnesiumspiegel und Magnesiumausscheidung mit dem Urin in *Trpm6*^{-/-}; *Ksp*-Mäusen und Kontrolltieren. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen mittleren Standardfehlern (senkrechte Linie).

Die untersuchten Magnesiumwerte in mutierten Tieren wiesen keine Veränderungen im Vergleich zu den gesunden Geschwistertieren auf. Wie die Magnesiumkonzentration im Serum war auch der Ausscheidungsparameter mit dem Urin im Normalbereich.

Um jedoch eine später auftretende Hypomagnesiämie aufzudecken, wurden die Magnesium-Serumspiegel und die Ausscheidung im Urin nochmals bei älteren (1 - 1½ Jahr) Tieren analysiert.

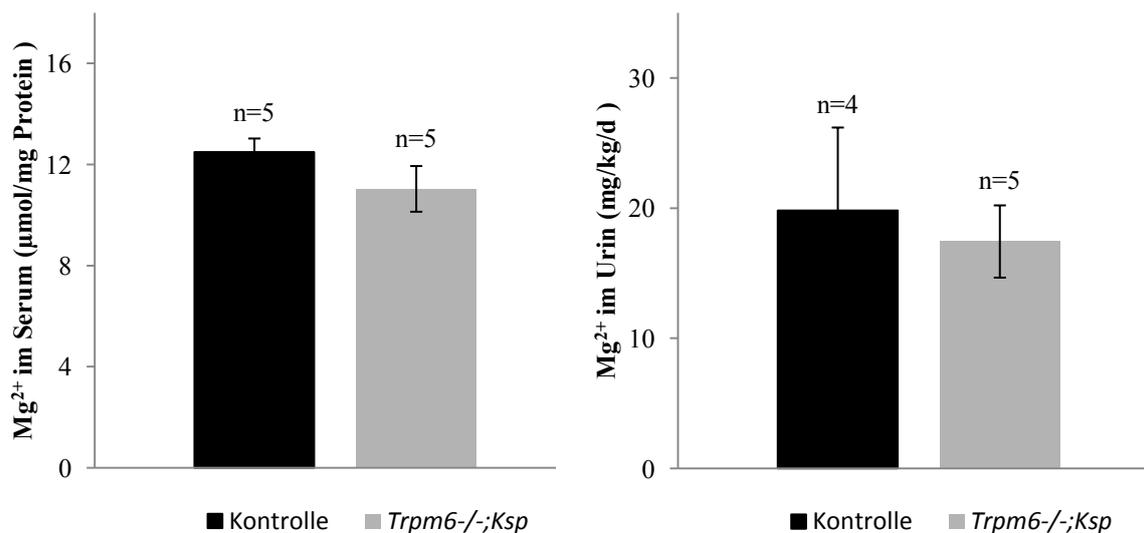


Abb. V 37: Serum-Magnesiumspiegel und Magnesiumausscheidung mit dem Urin in älteren (1-1,5 Jahre alt) *Trpm6*^{-/-}; *Ksp*-Mäusen und Kontrolltieren. Angegeben sind die Mittelwerte mit den jeweiligen mittleren Standardfehlern (senkrechte Linie). Die signifikanten Unterschiede sind mit ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Auch bei älteren *Trpm6*^{-/-}; *Ksp*-Mäusen konnten keine Veränderungen des Magnesiumhaushalts festgestellt werden.

VI Diskussion

Im Laufe der Zeit wurden über 5000 verschiedene *knockout*-Mausmodelle etabliert, von denen mehr als 500 Tiermodelle für die Analyse menschlicher Erkrankungen herangezogen werden können (Goldstein, 2001). Jedoch ist die konventionelle *knockout*-Strategie in vieler Hinsicht limitiert, da die Inaktivierung von Genen im gesamten Organismus zum frühzeitigen Tod der Tiere im Embryonalstadium führen kann. Eine umfassende phänotypische Analyse hinsichtlich der Funktionalität bestimmter Proteine ist daher unmöglich (Peschon et al., 1998; Hartmann et al., 2002). So war auch die konstitutive Inaktivierung des TRPM6-Proteins mit dem Leben nicht vereinbar (Walder et al., 2009; Woudenberg-Vrenken et al., 2011). Aus diesem Grund wurde in der vorgelegten Arbeit eine konditionale *knockout*-Mauslinie generiert, an der die *in vivo* Funktion des TRPM6-Proteins untersucht werden konnte.

TRPM6 stellt ein Mitglied von Kanalproteinen dar, die am transzellulären Magnesiumtransport beteiligt und somit in der Magnesiumhomöostase involviert sind. Bisher war jedoch wenig über die Regulationsvorgänge bekannt sowie über die funktionelle Beteiligung des TRPM6-Proteins. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRPM6 eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Magnesiumbalance spielt. Die TRPM6 Inaktivierung im Mausorganismus führte aufgrund eines Magnesiummangels zu einer Reihe von pathologischen Veränderungen, welche im Folgenden diskutiert werden.

1 Genotypisierung und Reproduktionsanalyse

Das durch zwei *loxP*-Sequenzen flankierte Exon17 des *Trpm6* Gens sollte durch die *Cre*-Rekombinase aus dem Genom entfernt werden und in spezifischen Geweben einen *Trpm6-knockout* herstellen.

Durch Verpaaren der geflochten Mäuse mit einer *Sox2-Cre* Mauslinie konnte durch die Exzision des *loxP*-flankierten Genabschnitts ein keimbahngängiges Nullallel im gesamten Organismus erzeugt werden. Mittels dieses *loxP/Cre*-Rekombinase-Systems wurden zusätzliche gewebespezifische (intestinal- und nierenspezifisch) Mauslinien generiert unter Verwendung verschiedener Promotoren, welche die *Cre*-Rekombinase steuern. Nur in den Zellen, in denen das *Cre*-Enzym aktiv ist, kann eine Rekombination des geflochten bzw. konditionalen *Trpm6* Allels zum Null-Allel stattfinden. In den nicht *Cre*-exprimierenden Geweben bleibt das geflochte Gen und damit das TRPM6-Protein erhalten.

Der Nachweis des Null-Allels und damit die Abwesenheit des TRPM6-Proteins der Nachkommen der verschiedenen Mauslinien erfolgte zunächst klassisch mit Hilfe der PCR und zusätzlich mittels Immunhistochemie. In *Trpm6*^{-/-}-Mäusen war weder ein Wildtyp-Allel

oder konditionales Allel nach der PCR noch ein intaktes TRPM6-Protein in Gewebeschnitten nachweisbar (Kap. V 1). In den gewebespezifischen *knockout*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass das TRPM6 Protein nur im gewünschten Gewebe inaktiviert wurde, in den anderen Organen war es detektierbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die *Cre*-vermittelte Rekombination des *Trpm6* Allels ein Null-Allel entsteht, von welchem kein funktionelles TRPM6 exprimiert wird, außer in Zellen in denen die *Cre*-Rekombinase nicht aktiv ist. Somit war eine wichtige Voraussetzung für die Generierung konditionaler *Trpm6*-defizienter Mäuse erfüllt.

Eine anschließende Analyse der Genotypverteilung heterozygoter Anpaarungen sollte Aufschluss über die Vererbung liefern. Es konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Genotypen der Nachkommen der heterozygoten Zucht den Regeln der Mendelschen Vererbung entspricht und keine Auffälligkeiten zeigt (Tab. V 2). Somit war es möglich lebensfähige *Trpm6*^{-/-}-Mäuse durch die konditionale Mutagenese zu generieren.

Die Frage, ob sich eine TRPM6-Inaktivierung in Mäusen auf deren Reproduktionserfolg auswirkt, wurde mit mehreren Zuchtstrategien geklärt. So konnte gezeigt werden, dass aus den homozygoten *knockout*-Verpaarungen (*Trpm6*^{-/-} x *Trpm6*^{-/-}) kein einziger Wurf hervorging, was auf zwei Begründungen zurückzuführen sein kann. Entweder sind *Trpm6*^{-/-}-Mäuse infertil oder aber die komplette Inaktivierung des TRPM6-Proteins sowohl im embryonalen wie auch im extra-embryonalen Gewebe führt zu einer embryonalen Letalität. Dies sollte mit Verpaarungen, in denen nur ein Elterntier, Weibchen oder Männchen, den mutierten Genotyp trug, aufgeklärt werden. Die Verpaarungen mit jeweils einem mutierten Elterntier waren tatsächlich fähig Nachkommen zu produzieren. *Trpm6*^{-/-}-Mäuse waren daher nicht infertil, sondern in der Lage sich zu reproduzieren. Jedoch konnte kein einziges lebendes *knockout*-Tier unter den Nachkommen identifiziert werden, was für eine embryonale Letalität sprechen würde. Nach den Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits postuliert werden, dass die embryonale Letalität bei konstitutiv *Trpm6*-defizienten Mäusen sekundär auf einen Defekt der Plazenta zurückzuführen ist, da *Trpm6* während der Embryogenese ausschließlich im extra-embryonalem Gewebe exprimiert wird. Im Fall von homozygoten *knockout*-Verpaarungen ist das TRPM6-Protein im embryonalen und extra-embryonalen Gewebe inaktiviert. Dies könnte eine erschwerte Implantation der Embryonen und eine gestörte Plazentabildung zur Folge haben, was die Mangelversorgung und Aborte gendefizienter Embryonen erklären würde.

2 Expression von *Trpm6* in der Maus

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit konnte durch den Einsatz verschiedener immunhistologischer Nachweismethoden gezeigt werden, dass das *Trpm6* in verschiedenen Organen exprimiert wird. Mit der Immunlokalisation des TRPM6 unter Verwendung eines

polyklonalen TRPM6-spezifischen Antikörpers konnte die Expression des Proteins an der apikalen Oberfläche von distalen Tubulus-Zellen (DCT) in der Niere nachgewiesen werden (Abb. V 2A). Dieses Expressionsmuster wurde zuvor auch in anderen Arbeitsgruppen beobachtet und konnte somit bestätigt werden (Schlingmann et al., 2002; Voets et al., 2004). Die Immunfluoreszenzfärbung erbrachte überraschend, erstmals Hinweise auf eine *Trpm6*-Expression im Thymusgewebe (Abb. V 2B). Jedoch konnte mit diesem Antikörper keine TRPM6-Immunmarkierung im Intestinaltrakt detektiert werden. Möglicherweise durch eine verminderte *Trpm6*-Expression im Darm.

Zusätzlich wurde das Expressionsmuster mittels *in situ* Hybridisierung charakterisiert und das TRPM6-Protein konnte in weiteren Organen identifiziert werden, z.B. in den Epithelialzellen des Kolons und des Rektums. Eine solche Expression entlang des Intestinaltraktes wurde bereits in anderen Studien gezeigt (Schlingmann et al., 2002; Voets et al., 2004). Die Gruppe um Walder war in der Lage TRPM6 in der Lunge nachzuweisen (Walder et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die *Trpm6*-Expression in bronchialen Epithelzellen bestätigt werden. Darüber hinaus gelang es, die *Trpm6*-mRNA im Thalamus des Gehirns zu detektieren. Im Jahre 2012 wurde eine Basalganglienverkalkung als neues Symptom bei HSH-Patienten entdeckt, was mit der Rolle des TRPM6 im Gehirn zusammen hängen könnte (Habebe et al., 2012).

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von *Trpm6* nicht nur auf Organe wie Niere und Intestinaltrakt beschränkt, welche die Magnesiumhomöostase kontrollieren, sondern auch in neuronalen Zellen und Epithelzellen des Thymus und der Lunge exprimiert wird.

3 Phänotypische Analyse der globalen *Trpm6*-defizienten Mauslinie

Durch die globale Inaktivierung des TRPM6-Proteins war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, ein *in vivo* Mausmodell zu untersuchen, das den Effekt der Eliminierung des TRPM6 im Gesamtorganismus widerspiegelt.

Im humanen *TRPM6*-Gen sind unterschiedliche Mutationen beschrieben worden, die mit der Erkrankung der HSH assoziiert sind (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Diese autosomal rezessiv vererbte Erkrankung manifestiert sich bereits im Säuglingsalter. Klinische Analysen weisen einen extrem niedrigen Magnesiumspiegel sowie einen sehr niedrigen Calciumspiegel im Serum auf. Betroffene Patienten weisen neuromuskuläre Auffälligkeiten auf, die sich in Muskelkrämpfen, Tetanien und zerebralen Krampfanfällen äußern. Einige Patienten zeigen aber weitere Symptome wie eine geistige Retardierung, Osteoporose, Herzrhythmusstörungen und starke Entwicklungsstörungen (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002; Schlingmann & Gudermann, 2005; Apa et al., 2008; Esteban-Oliva et al., 2009; Guran et al., 2012). Aufgrund der Leitfähigkeit von Magnesiumionen und des

Expressions-musters im Intestinaltrakt und Niere wurde dem TRPM6-Protein eine Beteiligung an der Magnesiumhomöostase zugesprochen.

Ob der TRPM6-Kanal tatsächlich entscheidend an der Magnesiumhomöostase beteiligt ist und dessen Inaktivierung zum Phänotyp von HSH führt, sollte mit der Analyse von konditionalen *knockout*-Mausmodellen geklärt werden. Dabei war zu erwarten, dass sich phänotypische Parallelen zur humanen Erkrankung der HSH ergeben.

Trpm6^{-/-}-Mäuse wiesen einen schwerkranken Phänotyp mit stark ausgeprägten Symptomen auf, die denen der humanen HSH-Patienten ähneln.

Im Wachstum der mutierten Tiere war ein deutlicher Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen. Bereits nach wenigen Wochen konnte ein deutliches Defizit in der postnatalen Entwicklung der gendefizienten Tiere beobachtet werden, das sich zunächst in einer Reduzierung der Körpergröße und Gewichtszunahme verglichen mit den Kontrollgeschwistern äußerte. Somit konnten *Trpm6*^{-/-}-Mäuse aufgrund der verringerten Größe deutlich von ihren gesunden Geschwistern unterschieden werden. Bei den meisten untersuchten relativen Organgewichten konnte dagegen keine Veränderung in ihrer Größe bzw. Gewicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass bei den gendefizienten Mäusen ein proportionierter Minderwuchs vorliegt. Die wachstumshemmenden Faktoren scheinen sich gleichermaßen auf Körpergröße und Organgewichte auszuwirken. Bezogen auf das Körpergewicht wiesen mutante Mäuse jedoch ein signifikant höheres relatives Hodengewicht, aber ein niedriges Samenblasengewicht auf. Dies hatte allerdings keinen Einfluss auf die Reproduktion.

Äußerlich fiel eine mangelnde Fellpflege auf, was möglicherweise physischen und psychischen Stress anzeigen könnte. Die motorischen Fähigkeiten der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse war dagegen nicht eingeschränkt und ihr Verhalten war nicht sonderlich auffällig.

Ein weiteres Merkmal mutierter Mäuse war die Entwicklung einer Kyphose. Da sich die Kyphose im Laufe der Zeit bei *Trpm6*-defizienten Männchen erst entwickelte, konnte eine angeborene Form ausgeschlossen werden. Als mögliche Ursache könnten jedoch eine muskuläre Insuffizienz bzw. die Ausbildung einer Sarkopenie oder degenerative Erkrankungen wie eine Osteoporose in Betracht gezogen werden. Weitere Untersuchungen wie die Analyse der Knochendichte oder Studien zur Sarkopenie waren aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich. Jedoch konnte eine makroskopisch sichtbare Abnahme des Skelettmuskelumfanges in *Trpm6*^{-/-}-Mäuse festgestellt werden. Diese Muskelatrophie wurde durch die histologische Untersuchung bestätigt. Die Volumenabnahme der einzelnen Muskelfasern führte zu einer Verminderung des anatomischen Querschnitts (Abb. V 13). Dieser Befund verstärkt die Annahme einer manifestierten Sarkopenie, welche durch den degenerativen altersbedingten Abbau der Skelettmuskulatur entsteht. Auf zellulärer Ebene waren unter anderem Veränderungen im Bereich der Organisation der motorischen Einheiten und vor allem in den Muskelfasern zu erkennen. Es werden drei Muskelfasertypen unterschieden: die

„langsamen“, myoglobinreichen, oxidativ arbeitenden Fasern (Typ I), die „schnellen“, myoglobinarmen, glykolytisch arbeitenden Fasern (Typ II), welche den größten Muskelfaserquerschnitt aufweisen, und einen intermediären Typen der ersten beiden Varianten (Lang et al., 2010). Der Fasertyp wird vom innervierenden Neuron bestimmt und zusammen werden sie als motorische Einheit bezeichnet.

Der Verlust an Muskelmasse resultiert bei Alterungsprozessen und der Sarkopenie aus dem Verlust beider motorischer Einheiten, wobei sich das Ausmaß der Veränderungen in den verschiedenen Muskelgruppen und Muskelfasern unterscheidet (Bua et al., 2002). Die Muskeleinheiten des Typs II sind von diesen Veränderungen überwiegend betroffen (Jaschinski et al., 1998). Als Ursache werden Schädigungen von Nervenfasern und degenerative Veränderungen an der motorischen Endplatte vermutet. Denervierte Muskelfasern des Typs II werden gelähmt und verändern sich daher grundlegend. Sie werden atrophisch, verlieren ihre strukturelle Organisation und können schließlich völlig degenerieren. Einige dieser Muskelfasern können aber von den verbleibenden Motorneuronen, welche zumeist vom Typ I sind, re-innerviert werden und ändern dementsprechend ihren Muskelfasertyp, was mit einem deutlich reduzierten Muskelquerschnitt einhergeht (Abb. VI 1; (Lexell & Downham, 1991; Lexell et al., 1995; Lang et al., 2010). Im späteren Verlauf der Sarkopenie unterliegen auch Muskelfasern des Typs I der Denervierung und degenerieren.

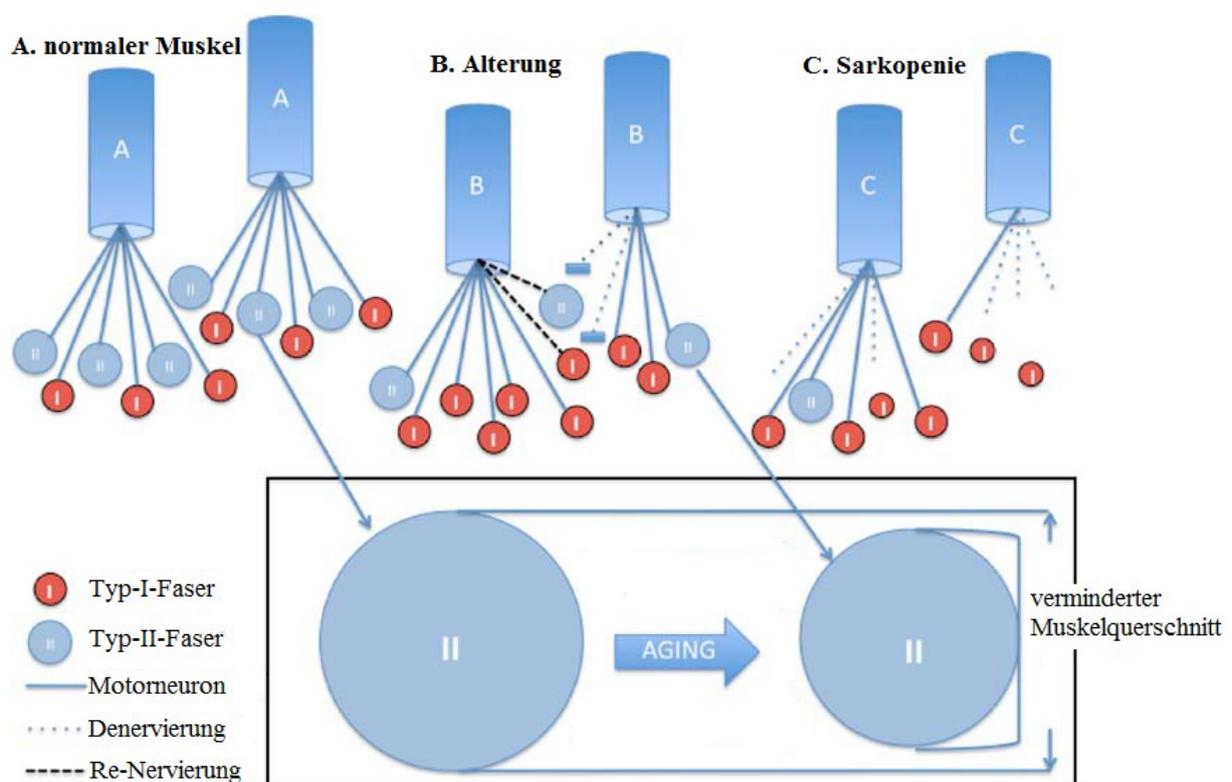


Abb. VI 1: Veränderungen der motorischen Einheiten in der Skelettmuskulatur im Alter und Sarkopenie. Dargestellt ist die Denervierung der Muskelfasern des Typ II. Durch eine Renervierung verbleibender Motorneuronen können die Muskelfasern erhalten bleiben. Sie ändern jedoch dementsprechend ihren

Muskelfasertyp und werden kleiner. Im Fall der Sarkopenie ist die Renervierung nicht mehr möglich und Muskelfasern degenerieren völlig. (modifiziert nach Lang et al., 2010)

Es wurde nicht nur eine Reduktion der Muskelmasse verzeichnet, sondern auch Veränderungen des Fettgewebes sowie eine Reduzierung. So wurde das Fehlen der subkutanen Fettschicht der Haut in *Trpm6*^{-/-}-Mäuse beobachtet (Abb. V 11) und ebenso eine Reduktion des viszeralen Fettgewebes. Desweiteren konnten Veränderungen der Fettzellen an sich und das Verhältnis von braunen und weißen Zellen registriert werden. Weiße Adipozyten waren hypomorph, was eine morphometrische Analyse bestätigte. Außerdem wurden viele kleine Anhäufungen von braunen Fettzellen im Fettgewebe der mutierten Tiere identifiziert. Einer der wichtigsten Funktionen des braunen Fettgewebes ist die Thermogenese, denn es ist ausschließlich für die zitterfreie Wärmezeugung verantwortlich. Die physiologische Notwendigkeit zur Erzeugung von zitterfreier Thermogenese ergibt sich für Winterschläfer, Kleinsäuger und Säuglinge, deren Körpertemperatur unterhalb einer kritischen Außentemperatur nicht mehr durch eigene Stoffwechselwärme aufrechterhalten werden kann (Himms-Hagen, 1984). Äußere Einflüsse können daher die Bildung von braunem Fettgewebe anregen. So konnte gezeigt werden, wenn Nager bei kalten Temperaturen gehalten werden, so bilden sich inmitten des weißen Fettgewebes Nester aus braunen Fettzellen (Vegiopoulos et al., 2010). Bei *Trpm6*^{-/-}-Mäuse wurde festgestellt, dass sie Probleme mit ihrer Thermoregulation haben und eine 2-3°C kältere Körpertemperatur aufweisen (Daten Kooperationspartner). Aufgrund einer möglichen adaptiven Thermogenese waren daher wahrscheinlich überwiegend braune Fettzellen in mutierten Tieren zu verzeichnen.

Für eine eingehende histologische Analyse der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse wurden weitere wichtige Organe präpariert und mit Hilfe von Übersichtsfärbungen beurteilt. Dabei zeigten sich Auffälligkeiten in den Lymphknoten. Die Lymphknoten in gendefizienten Mäusen waren hypomorph und zumeist hypozellulär, was auf ein zusätzliches Problem im Immunsystem hinweisen könnte. Im Milzgewebe waren verstärkt Makrophagen zu finden. Das Myokard des Herzens war verdickt. Bei andauernder Mehrbelastung des Herzmuskels nimmt die Muskelmasse der betroffenen Kammer zu und es kommt zu einer Hypertrophie. Ob eine hypertrophe Kardiomyopathie vorlag sollte mit morphometrischen und weiteren Analysen abgeklärt werden. In der Lunge der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse fielen Emphysem-ähnliche Dilatationen der Alveolarräume auf. Die Architektur und zelluläre Zusammensetzung der übrigen Organe unterschieden sich nicht zwischen den mutierten Tieren und ihren Kontrollgeschwistern, soweit dies anhand der HE-gefärbten Präparate zu beurteilen war. Hochauflösende bildgebende Verfahren könnten weitere morphologische Auffälligkeiten aufdecken.

Da HSH-Patienten eine ausgeprägte Störung im Elektrolythaushalt, vor allem in der Magnesiumhomöostase und zusätzlich im Calciumstoffwechsel, aufweisen, wurde dementsprechend der Elektrolythaushalt in *Trpm6*^{-/-}-Mäusen analysiert. Analog zur HSH-Erkrankung war der Serummagnesiumspiegel in *knockout*-Mäusen extrem niedrig. Um diesen Magnesiumverlust intern auszugleichen, wurde die Mobilisierung von Magnesiumionen aus

dem Knochen, welcher das größte Speicherorgan ist, angeregt, da in gendefizienten Tieren ein drastischer Magnesiummangel im Knochen zu verzeichnen war. Jedoch beschränkte sich der Verlust durch eine gestörte intestinale Absorption und nicht zusätzlich durch eine renale Ausscheidungssteigerung, wie es beim Menschen beschrieben wurde (Matzkin et al., 1989). Die dramatische Imbalance im Magnesiumhaushalt weist darauf hin, dass TRPM6 ein wichtiger Regulator in der organismischen Homöostase ist, trotz anderer passender Transportproteine.

Die anderen, untersuchten Hauptelemente wiesen dagegen keine Auffälligkeit in ihrer Homöostase auf. Lediglich eine vermehrte Calciumausscheidung mit dem Urin wurde festgestellt. Dieser Befund spricht für eine beginnende Imbalance des Ionenhaushalts, die vorerst noch ausgeglichen werden kann. Möglicherweise tritt eine Hypocalcämie, welche sekundär durch den Magnesiumverlust verursacht wird, später auf.

Die Analyse der Spurenelemente konnte überraschend eine zusätzliche Störung der Zinkhomöostase identifizieren, welche jedoch nicht das Ausmaß des Magnesiummangels einnahm.

Die gesamten physiologischen Veränderungen der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse wirkten sich letztendlich auf deren Lebenserwartung aus. Ihre Lebensdauer war drastisch reduziert. Keines der Tiere wurde älter als 16 Wochen.

Trpm6^{-/-}-Mäuse entwickeln einen schwerwiegenden Phänotypen, der aufgrund einer intestinalen Fehlfunktion durch eine ausgeprägte Hypomagnesiämie charakterisiert ist und zu einer stark verminderten Lebenserwartung führt. Sie sind kleinwüchsig und entwickeln eine Kyphose, Hypothermie, Lipodystrophie, Sarkopenie und Lungenemphyseme. Dieses Mausmodell spiegelt somit einige der Kernmerkmale von HSH-Patienten wider. Dennoch ist ein Vergleich zwischen Mausmodell und Patientenkollektiv mit Problemen behaftet. Zum einen wird der Phänotyp der Maus unter kontrollierten Umweltbedingungen mit definiertem Futter analysiert, zum anderen verbleibt trotz hoher Homologie zwischen Maus- und humanen Genom ein gewisses Maß an Unsicherheit bei der Vorhersage eines Effekts eines spezifischen Knockouts, da dieser durch ein nicht identifiziertes Protein kompensiert werden könnte. Dieses Protein könnte nur in der Maus und nicht im Menschen existieren, was ein zusätzliches Problem für die direkte Übertragung auf den Menschen darstellt.

Zusammenfassend, hat der TRPM6-Verlust einen dramatischen Effekt auf die gesamte Physiologie in Mäusen und auf deren Lebenserwartung. Die genaue Todesursache konnte jedoch mit diesen Analysen bisher nicht identifiziert werden. Es ist allerdings auffällig, dass viele der Symptome charakteristische Kennzeichen einer zunehmenden Alterung sind. Ein Vergleich mit anderen Mausmodellen, welche mit einer vorzeitigen Alterung in Verbindung gebracht wurden, zeigte, dass diese Tiere ebenfalls die Charakteristika der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse aufweisen. So weisen Mäuse mit einem mutierten klotho-Gen eine verkürzte Lebensspanne, einen Wachstumsdefekt, Osteoporose, eine verminderte subkutane Fettschicht und Lungenemphyseme auf, was an die degenerativen Veränderungen in *Trpm6*-defizienten Mäusen

erinnert (Kuro-o et al., 1997). *Fgf-23*^{-/-}-Tiere zeigten dieselben Symptome und eine zusätzliche Kyphose, wie auch *Memo-knockout*-Mäuse (Razzaque et al., 2006; Haenzi et al., 2014). Man darf vermuten, dass eine *Trpm6*-Deletion in altersbedingten Signalwegen eingreift, wie nachfolgend ausführlich diskutiert wird.

4 Rolle von TRPM6 im Alterungsprozess

Trpm6-defiziente Mäuse haben eine deutlich verkürzte Lebensspanne und weisen eine Reihe von Anzeichen einer vorzeitigen Alterung auf. Nicht nur diese phänotypischen Ergebnisse deuten auf eine Rolle des TRPM6-Proteins im Alterungsprozess hin, sondern auch die entstehende primäre Hypomagnesiämie. Mehrere Veränderungen der Magnesiumbalance bei Senioren wurden bereits in einigen Studien identifiziert (Sherwood et al., 1986; Martin et al., 1991; Rayssiguier et al., 1993; Davidovic et al., 2004; Barbagallo et al., 2009). So wurde eine Abnahme des totalen Magnesiumgehalts im Körper mit zunehmendem Alter festgestellt. Die Veränderungen des Metabolismus schließen vor allem eine Reduktion der Magnesiumaufnahme mit der Nahrung und intestinalen Absorption, sowie eine Steigerung der renalen und fäkalen Ausscheidung ein (Barbagallo et al., 2009) (Abb. VI 2). Die Mehrheit dieser Abweichungen des geregelten Metabolismus konnten ebenfalls in *Trpm6*-defizienten Mäusen aufgedeckt werden.

Genomische Instabilität und Oxidativer Stress

Der Alterungsprozess ist vor allem durch den Verlust der Fitness charakterisiert. Dabei wird die Akkumulation von Zellschäden weitgehend als Ursache des Alterns erfasst (Kirkwood, 2005; Vijg & Campisi, 2008; Gems & Partridge, 2013). Darunter ist besonders die genetische Instabilität und ständige genetische Schädigung während der Lebenszeit zu nennen (Moskalev et al., 2013). Die Integrität und Stabilität der DNA wird fortlaufend durch umweltbedingte Mutagene wie physikalische, chemische oder biologische Agenzien, sowie durch endogene Prozesse wie Replikationsfehler, hydrolytische Reaktionen und reaktive Sauerstoffradikale (ROS) beeinträchtigt (Hoeijmakers, 2009). Um daraus entstehende Mutationen und Verluste zu minimieren, hat der Organismus im Laufe der Zeit ein komplexes Netzwerk von DNA-Reparatur-Mechanismen evolviert. Für die korrekte Ausführung dieser Mechanismen und das Entfernen von DNA-Schäden ist jedoch Magnesium unerlässlich (Chien et al., 1999; Hartwig, 2001). Magnesium hat einen stabilisierenden Effekt auf die DNA- und Chromatinstruktur und ist ein essentieller Cofaktor in fast allen enzymatischen Systemen, die in DNA-Prozessen involviert sind.

Oxidativer Stress wurde ebenfalls als grundlegender Mechanismus in vielen altersbedingten Erkrankungen identifiziert, sowie die Beteiligung im Alterungsprozess selbst (Lopez-Otin et al., 2013). Ein Magnesiummangel konnte sowohl in Tiermodellen wie auch in Menschen mit oxidativen Stress assoziiert werden (Weglicki et al., 1996). In einigen Studien wurde dabei eine gesteigerte Produktion von freien Sauerstoffradikalen gezeigt (Rayssiguier et al., 1993; Hans et al., 2003). Die exzessive Generierung dieser Oxidanzien führt letztendlich zum oxidativen Stress, da ROS die DNA, RNA und Proteine oxidativ modifiziert. Zu den häufigsten Oxidationsschäden zählen 8-Hydroxydeoxyguanosin und 8-Hydroxyguanosin, welche als Marker für oxidativen Stress gelten (Cooke et al., 2001; Wu et al., 2004). Der Verlust von TRPM6 führte ebenfalls zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativen Stress, was darauf hinweist, dass das Protein durch den Transport von Magnesium in Reaktionswegen zur Abwehr von oxidativem Stress fungiert.

Der kausale Zusammenhang zwischen genetischen Schädigungen und das Altern wurde in mehreren Studien mit Mausmodellen und an Menschen gezeigt. Sie wiesen nach, dass der Verlust von DNA-Reparatur-Mechanismen ein beschleunigtes Altern in Mäusen zur Folge hat und auch in einigen humanen Progerie-Syndromen zugrunde liegt wie etwa das Werner-Syndrom, Bloom-Syndrom, Xeroderma Pigmentosum, Cockayne-Syndrom oder das Seckel-Syndrom (Hoeijmakers, 2009; Murga et al., 2009; Gregg et al., 2012). Defekte in der nuklearen Architektur, die auch als Laminopathien bezeichnet werden, können eine genomische Instabilität zur Folge haben, welche wiederum in eine vorzeitige Alterung mündet (Worman, 2012; Gordon et al., 2014).

Inwieweit der Magnesiumverlust in *Trpm6*^{-/-}-Mäusen zur nuklearen DNA-Schädigung und Fehlfunktionen der DNA-Reparatur-Mechanismen beiträgt, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden.

IGF-I-Signalweg

Mit einigen Mausmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass der Signalweg der IGF-I und -II Proteine, ihrer Rezeptoren und Bindungsproteine einen essentiellen Faktor in der Wachstumsregulation von Säugetieren darstellt (Efstratiadis, 1998; Lupu et al., 2001). *Trpm6*^{-/-}-Mäuse wiesen eine signifikant erniedrigte IGF-I Konzentration im Serum auf und erreichten nur $\frac{2}{3}$ des Normalgewichts ihrer Kontrollgeschwister. Entsprechende Veränderungen der IGF-I Konzentration zeigte eine Mauslinie, die auf niedriges Körperwachstum selektiert wurde (Hoeflich et al., 1998). Bei Mäusen mit einem IGF-I-*knockout* war das Körpergewicht sogar um 70% reduziert. Zusätzlich zeigten die mutierten Tiere eine Unterentwicklung bzw. Veränderung der Muskulatur auf. Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung des IGF-I für das postnatale Wachstum und die Muskelentwicklung (Hoeflich et al., 2001; Chiao et al., 2002). Jedoch ist bei IGF-I-*knockouts* bereits die intrauterine Entwicklung gestört und das Geburtsgewicht vermindert im Gegensatz zu den *Trpm6*^{-/-}-Mäusen (Liu & LeRoith, 1999). Der veränderte IGF-I Wert würde allerdings einige der phänotypischen Erscheinungen in *Trpm6*-defizienten Tieren erklären. Es bleibt abzuklären, ob bei *Trpm6*^{-/-}-Mäusen das reduzierte Körperwachstum ausschließlich durch eine Störung des IGF-Systems bedingt ist. Zur Abklärung dieser Störung bedarf es aber spezifischer Untersuchungen, wie z.B. der Messung der IGF-Bindeproteine.

Der Befund des niedrigen IGF-I-Serumspiegels ist jedoch interessant, da der IGF-I/Insulin Signalweg eine entscheidende Rolle im Alterungsprozess von *C. elegans* spielt (Tissenbaum & Guarente, 2001). Störungen in diesem Signalweg wurden ebenfalls mit Veränderungen in der Alterungsrate in multizellulären Organismen verbunden (Kenyon, 2005). So wurden einige Mausmodelle mit vorzeitiger Alterung mit einem niedrigen IGF-I-Serumspiegel assoziiert, wie ATM- und Klotho-defiziente Mäuse (Mori et al., 2000; Peretz et al., 2001). Desweiteren konnten reduzierte IGF-I-Konzentrationen im Serum von älteren Menschen beobachtet werden (Lombardi et al., 2005). Interessanterweise haben einige Minerale, vor allem auch Magnesium, einen positiven Effekt auf die IGF-I Konzentration (Maggio et al., 2011). Den Zusammenhang zwischen Magnesium und IGF-I erbrachten Maggio und Kollegen in der InCHIANTI Studie (Maggio et al., 2011). Ein Mineralmangel, wie er bei *Trpm6*^{-/-}-Mäusen auftritt, könnte die altersbedingte Abnahme des IGF-I verstärken. TRPM6 könnte eine Rolle im IGF-I-Signalweg spielen oder zumindest Einfluss darauf ausüben. Es ist jedoch unklar, ob die niedrige IGF-I Konzentration der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse direkt zum

alterungsähnlichen Phänotyp führt oder alternativ ein kompensatorisches Phänomen reflektiert.

Darüber hinaus weisen einige experimentale Aussagen darauf hin, dass eine optimale IGF-I Konzentration mit der Reduktion des oxidativen Stresses assoziiert werden kann (Fernandez et al., 2007; Maggio et al., 2013). Sowohl Magnesium wie auch IGF-I wird eine Rolle als Antioxidans zugeschrieben. Der IGF-I Mangel in *Trpm6*-defizienten Tieren könnte sich zusätzlich auf die erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress auswirken und zur beschleunigten Alterung der mutierten Tiere beitragen.

Vergleichbare Veränderungen der Physiologie in Mäusen konnte im *SIRT6*^{-/-}-Mausmodell gezeigt werden, welche ebenfalls mit einer vorzeitigen Alterung in Verbindung gebracht wurde (Mostoslavsky et al., 2006).

All diese Mausmodelle mit multiplen Phänotypen, welche der humanen Alterung ähneln, können zum Verständnis der Mechanismen degenerativer Veränderungen beitragen und der Suche nach Maßnahmen zur Verbesserung der Lebensqualität bis ins hohe Alter eine neue Richtung geben.

5 Magnesium-Supplementierung

Patienten mit der Erkrankung HSH zeigen unter lebenslanger oraler Magnesiumzugabe eine Verbesserung des Serum-Magnesiumspiegels und ihrer Symptome. Die tägliche Dosis übersteigt den Normalbedarf teilweise um das 16-fache (Cole & Quamme, 2000). Aufgrund der extrem gestörten Magnesiumhomöostase in *Trpm6*-defizienten Mäusen erhielten diese in Analogie zu den HSH-Betroffenen eine orale Magnesiumzugabe. Diese Supplementierung hat ergeben, dass die entstehende Hypomagnesiämie in *Trpm6*-defizienten Tieren diätisch kompensiert werden kann. Die Magnesiumkonzentration im Serum mutierter Mäuse mit einer Supplementierung war im Vergleich zu den Werten der *Trpm6*^{-/-}-Tiere ohne angereichertes Futter signifikant erhöht. Der Serum-Magnesiumspiegel konnte bereits mit einer dreifach erhöhten Dosis gesteigert werden. Der Normalwert wurde dabei zwar nicht erreicht, jedoch war die Steigerung ausreichend, um eine Normalisierung der physiologischen Prozesse und somit eine normale Körperfunktion zu gewährleisten. Bei den betroffenen Patienten kann der Serum-Magnesiumspiegel ebenfalls nicht vollständig normalisiert werden (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002; Konrad et al., 2004). Die kausale Beziehung zwischen der Verbesserung des Gesundheitszustands und der Magnesium-Behandlung zeigte sich auch darin, dass bereits nach 14 Wochen nach Absetzen der Magnesium-Supplementierung alle mutierten Tiere verstorben waren. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass der Magnesiummangel in *Trpm6*^{-/-}-Mäusen der primäre Mechanismus ist, der diesem Phänotypen zugrunde liegt.

Ob ein anderer Kanal oder Transporter durch die unphysiologischen Magnesiumkonzentrationen hoch reguliert wird und den Magnesiumtransport vermittelt, ist nach dem derzeitigen Kenntnisstand unklar. Wahrscheinlich wäre eine gesteigerte parazelluläre Absorption. Durch die Magnesium-Supplementierung wird die intraluminal Magnesiumkonzentration erhöht, was eine Kompensierung des defekten transzellulären Transports bei gesteigerter Magnesiumabsorption via parazellulären Transport ermöglicht (Abb. VI 3). Dieser Mechanismus wurde schon von Konrad und Kollegen postuliert (Konrad et al., 2004).

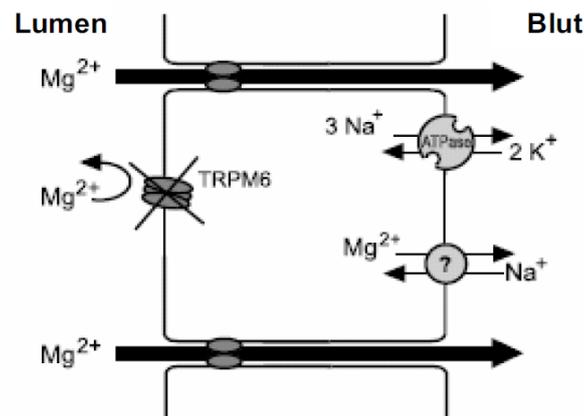


Abb. VI 3: Magnesiumabsorption im Intestinaltrakt der *Trpm6*^{-/-}-Mäuse mit einer Magnesium-Supplementierung. Der aktive transzelluläre Transportweg ist aufgrund defekter TRPM6-Kanäle gehindert. Durch die orale Magnesiumzugabe wird die intraluminal Magnesiumkonzentration erhöht und der parazelluläre Transportweg verstärkt. An der basolateralen Membran befinden sich Natrium-Kalium-Pumpen sowie vermutlich Magnesium-Natrium-Austauscher. (modifiziert nach Konrad et al., 2004)

Trpm6^{-/-}-Mäuse entwickelten aufgrund einer Hypomagnesiämie einen Phänotyp mit vorzeitiger Alterung, welcher durch eine Magnesium-Supplementierung verbessert werden konnte. Dies lässt zusätzlich die Vermutung zu, dass eine progressive Alterung und Magnesiummangel eng zusammen hängen.

6 Phänotypische Analyse der intestinalspezifischen *Trpm6*-defizienten Mauslinie

Ob ein Defekt der Magnesiumabsorption im Intestinaltrakt der entscheidende Faktor für die Störung der Magnesiumhomöostase ist und zu einer Hypomagnesiämie führt, sollte durch einen intestinalspezifischen *knockout* des TRPM6-Proteins untersucht werden. Um die Linie mit einer intestinalspezifischen Deletion zu generieren, wurden homozygote konditionale Weibchen (*Trpm6*^{Δ17/Δ17}) mit *Villin1-Cre*-Mäusen verpaart.

Zur Überprüfung der Deletion des *Trpm6* im Intestinaltrakt in *Trpm6^{-/-}; Vil*-Mäuse wurde die *In Situ* Hybridisierung angewandt. Dabei konnte kein spezifisches Signal der *Trpm6*-mRNA nachgewiesen werden. In dem untersuchten Nierengewebe hingegen wurde das TRPM6-Protein detektiert, was auf die gegebene Spezifität der *Villin1* gesteuerten *Cre*-Rekombinase hinweist. Somit kann von einer spezifischen Ausschaltung von TRPM6 im Intestinaltrakt ausgegangen werden.

Mutierte Tiere zeigten zunächst keine phänotypischen Auffälligkeiten. Alle *Trpm6^{-/-}; Vil*-Mäuse überlebten die ersten 16 Lebenswochen und keines der Tiere ist vorzeitig verstorben. Die Lebensspanne der mutierten Tiere wird durch eine intestinalspezifische *Trpm6*-Deletion somit nicht verkürzt. Auch hinsichtlich ihrer Größe, Gewicht, Anatomie und Organentwicklung zeigten gendefiziente Tiere gegenüber ihren Kontrollgeschwistern keine Auffälligkeiten. Mit dem Wissen, dass TRPM6 an der Aufrechterhaltung der Magnesiumhomöostase beteiligt ist und die TRPM6-Inaktivierung im gesamten Organismus zu einer drastischen Magnesiumdefizienz führt, ist zu vermuten, dass im intestinalspezifischen *knockout*-Tier eine mildere Form der Hypomagnesiämie entsteht. Jedoch konnte keine Hypomagnesiämie bei acht Wochen alten Tieren festgestellt werden. Im Serum war der Magnesiumgehalt mit dem der Kontrollgeschwister vergleichbar. Die renale Ausscheidung des Magnesiums war dagegen auffällig verringert. Aus diesem Grund wurde der Magnesiumserumspiegel in älteren Tieren nochmals analysiert, der signifikant vermindert war und eine Hypomagnesiämie bei älteren intestinalspezifischen *Trpm6^{-/-}*-Mäusen aufdeckte. Diese Befunde sprechen für eine langsam zunehmende Imbalance der Ionenhomöostase durch die intestinalspezifische TRPM6-Inaktivierung, die einen Magnesiummangel anfänglich renal auszugleichen vermag. Jedoch ist die funktionsfähige Niere mit TRPM6-Kanälen auf langer Sicht nicht in der Lage die intestinale Fehlfunktion zu kompensieren.

7 Phänotypische Analyse der nierenspezifischen *Trpm6*-defizienten Mauslinie

In Analogie zu der intestinalspezifischen *Trpm6*-defizienten Mauslinie wurde eine nierenspezifische *knockout* Mauslinie generiert. Dazu wurden homozygote konditionale Weibchen (*Trpm6^{Δ17/Δ17}*) mit *Ksp1.3-Cre*-Mäusen verpaart.

Vor der Untersuchung des Phänotyps war es ebenso in dieser Mauslinie wichtig festzustellen, ob die Inaktivierung des TRPM6-Proteins im gewünschten Gewebe, wie hier in der Niere, nachweisbar war. Dies konnte durch immunhistochemische Analysen bestätigt werden. Eine spezifische Ausschaltung von TRPM6 in der Niere war somit gewährleistet.

Analog zu Untersuchungen im *Trpm6^{-/-}; Vil*-Tier, wurden *Trpm6^{-/-}; Ksp*-Mäuse auf ihre Entwicklung und Lebenserwartung analysiert. Zusätzlich wurde überprüft, ob eine *Trpm6*-Deletion in der Niere zu einer Hypomagnesiämie führt. Mäuse mit einer nierenspezifischen

Deletion von *Trpm6* waren jedoch phänotypisch unauffällig. Es konnten keine Auffälligkeiten bezüglich ihrer Entwicklung oder eine verkürzte Lebensspanne festgestellt werden. Sie entwickelten keine Hypomagnesiämie, was nahe legt, dass die Magnesium-absorption im Intestinaltrakt für die Aufrechterhaltung der Homöostase dieses Elements ausschlaggebend ist. Eine zusätzliche Rolle des renalen Magnesiumverlustes in der Pathogenese der HSH wie er unter anderem von Cole und Quamme beschrieben wurde, konnte mit diesem nierenspezifischen Mausmodell nicht bestätigt werden (Cole & Quamme, 2000). Die Reabsorption in der Niere scheint kaum eine Rolle zu spielen, im Gegensatz wie es in den klassischen Lehrbüchern beschrieben ist.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die konditionale *Trpm6-knockout* Mauslinie stellt ein neues Tiermodell für die Untersuchung der Magnesiumhomöostase dar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass der mutante Phänotyp aufgrund eines intestinalen Absorptionsdefekts und der resultierenden chronischen Hypomagnesiämie zustande kommt (Abb. VI 4). TRPM6 ist ein wichtiger Regulator der Magnesiumhomöostase und *Trpm6*-gendifiziente Mäuse bieten ein interessantes Modell für die HSH und andere erbare oder erworbene Erkrankungen, die mit einem Magnesiummangel assoziiert werden. Insbesondere zur Identifikation von molekularen Mechanismen, die in Menschen nicht untersucht werden können, stellen *Trpm6*^{-/-}-Tiere ein potentiell Hilsmittel dar. Sie zeigen neben den bisher klinisch beobachteten Hauptsymptomen weitere Auffälligkeiten. TRPM6 ist offenbar nicht nur für den Erhalt der physiologischen Gesundheit, sondern auch für die Prävention altersabhängiger Pathologien notwendig. Daher könnten *Trpm6*-defiziente Mäuse für die Entschlüsselung von weiteren Proteinen und Signalwegen, welche die Entwicklung von vorzeitigen Alterungssymptomen beeinflussen, von Bedeutung sein. Weitere Analysen werden das Verständnis des Phänotyps komplettieren.

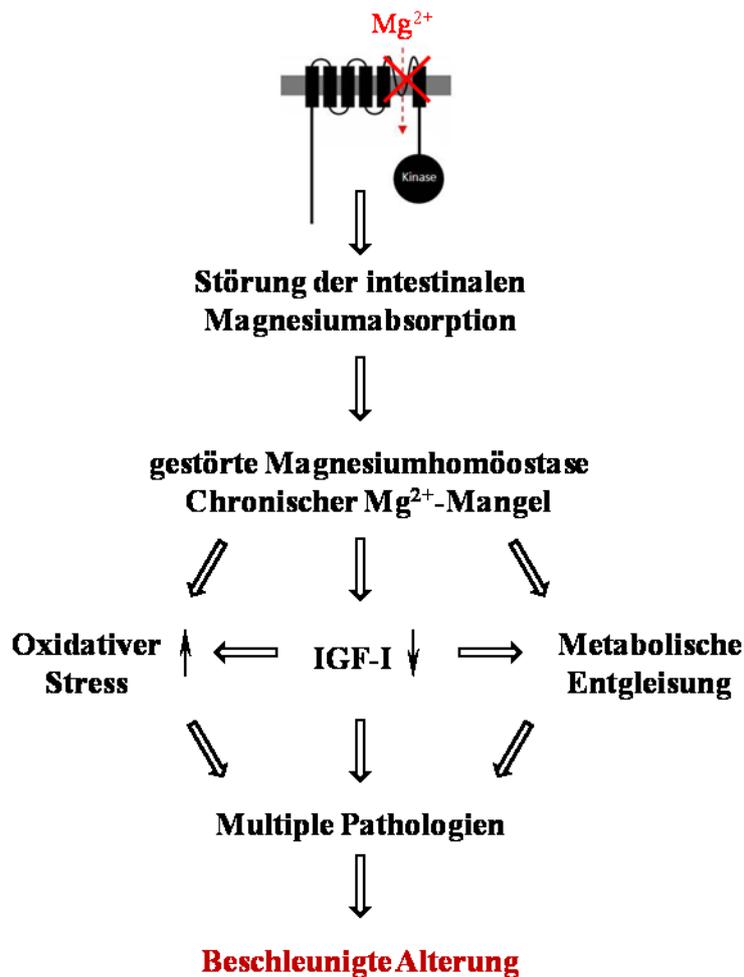


Abb. VI 4: Die Inaktivierung des TRPM6-Kanals im gesamten Organismus führt zunächst zu einem intestinalen Magnesiumabsorptionsdefekt, welcher zu einer chronischen Hypomagnesiämie führt. Aufgrund des starken Magnesiummangels steigt der oxidative Stress, die IGF-I Konzentration fällt und viele metabolische Prozesse sind beeinträchtigt. Diese Parameter können sich gegenseitig beeinflussen und führen zu degenerativen Pathologien. Letztendlich kann eine *Trpm6*-Deletion mit einem beschleunigten Alterungsprozess assoziiert werden.

Geplante Microarray-Transkriptomanalysen könnten Aufschluss über weitere Proteine geben, die eine kompensatorische Rolle in der parazellulären Magnesiumabsorption übernehmen. Dabei nehmen die Claudin-Proteine eine besondere Stellung ein, da sie für die Ausbildung der parazellulären Tight Junction-Barriere verantwortlich sind und somit die Schlüsselstellung hinsichtlich der Ionen-Permeabilität einzelner Epithelien haben. Interessanterweise zeigen Claudin-16 und -19-defiziente Mäuse ähnliche Störungen im Elektrolythaushalt (Hou et al., 2009; Will et al., 2010). Microarray-Analysen ergaben, dass *Trpm6* in diesen Mäusen transkriptionell hochreguliert war und weisen auf eine kompensatorische transzelluläre Magnesiumabsorption hin (Will et al., 2010). Zukünftige Vergleiche dieser Mauslinien mit der konditionalen *Trpm6-knockout* Mauslinie könnten eine Einschätzung des Stellenwertes dieser Gene in der Magnesiumhomöostase ermöglichen.

Man darf erwarten, dass weitere Gene lokalisiert werden, deren Genprodukte an der Regulation der Magnesiumhomöostase beteiligt sind. Das gemeinsame Ziel könnte dabei die Entwicklung spezifischer Substanzen sein, die selektiv an Magnesiumkanälen und Magnesiumtransportproteinen angreifen und eine therapeutische Wirkung entfalten.

VII Literaturverzeichnis

- Abremski, K., and Gottesman, S.** (1981). Site-specific recombination Xis-independent excisive recombination of bacteriophage lambda. *Journal of molecular biology* 153, 67-78.
- Alcock, N.W., and Shils, M.E.** (1974). Comparison of magnesium deficiency in the rat and mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 146, 137-141.
- Altarescu, G., Sun, M., Moore, D.F., Smith, J.A., Wiggs, E.A., Solomon, B.I., Patronas, N.J., Frei, K.P., Gupta, S., Kaneshki, C.R., et al.** (2002). The neurogenetics of mucopolidosis type IV. *Neurology* 59, 306-313.
- Altura, B.M., and Altura, B.T.** (1996). Role of magnesium in patho-physiological processes and the clinical utility of magnesium ion selective electrodes. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum* 224, 211-234.
- Anast, C.S., Mohs, J.M., Kaplan, S.L., and Burns, T.W.** (1972). Evidence for parathyroid failure in magnesium deficiency. *Science* 177, 606-608.
- Annunziata, M., Granata, R., and Ghigo, E.** (2011). The IGF system. *Acta diabetologica* 48, 1-9.
- Apa, H., Kayserili, E., Agin, H., Hizarcioglu, M., Gulez, P., and Berdeli, A.** (2008). A case of hypomagnesemia with secondary hypocalcemia caused by Trpm6 gene mutation. *Indian journal of pediatrics* 75, 632-634.
- Arniges, M., Fernandez-Fernandez, J.M., Albrecht, N., Schaefer, M., and Valverde, M.A.** (2006). Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *The journal of biological chemistry* 281, 1580-1586.
- Audo, I., Kohl, S., Leroy, B.P., Munier, F.L., Guillonneau, X., Mohand-Said, S., Bujakowska, K., Nandrot, E.F., Lorenz, B., Preising, M., et al.** (2009). TRPM1 is mutated in patients with autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *American journal of human genetics* 85, 720-729.
- Bai, J.P., Hausman, E., Lionberger, R., and Zhang, X.** (2012). Modeling and simulation of the effect of proton pump inhibitors on magnesium homeostasis. 1. Oral absorption of magnesium. *Molecular pharmaceutics* 9, 3495-3505.
- Bapty, B.W., Dai, L.J., Ritchie, G., Canaff, L., Hendy, G.N., and Quamme, G.A.** (1998). Mg²⁺/Ca²⁺ sensing inhibits hormone-stimulated Mg²⁺ uptake in mouse distal convoluted tubule cells. *The American journal of physiology* 275, F353-360.
- Barbagallo, M., Belvedere, M., and Dominguez, L.J.** (2009). Magnesium homeostasis and aging. *Magnesium research : official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium* 22, 235-246.
- Barrera, N.P., Shaifta, Y., McFadzean, I., Ward, J.P., Henderson, R.M., and Edwardson, J.M.** (2007). AFM imaging reveals the tetrameric structure of the TRPC1 channel. *Biochemical and biophysical research communications* 358, 1086-1090.
- Bassi, M.T., Manzoni, M., Monti, E., Pizzo, M.T., Ballabio, A., and Borsani, G.** (2000). Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucopolidin-and

identification of the two major founder mutations causing mucopolidosis type IV. *American journal of human genetics* 67, 1110-1120.

Beer, A. (1952). Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. In: *Annalen der Physik und Chemie* Bd 86, Erstes Stück, 78–88.

Bengele, H.H., Alexander, E.A., and Lechene, C.P. (1980). Calcium and magnesium transport along the inner medullary collecting duct of the rat. *The American journal of physiology* 239, F24-29.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256.

Brannan, P.G., Vergne-Marini, P., Pak, C.Y., Hull, A.R., and Fordtran, J.S. (1976). Magnesium absorption in the human small intestine. Results in normal subjects, patients with chronic renal disease, and patients with absorptive hypercalciuria. *The journal of clinical investigation* 57, 1412-1418.

Brunette, M.G., Vigneault, N., and Carriere, S. (1978). Magnesium handling by the papilla of the young rat. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 373, 229-235.

Bua, E.A., McKiernan, S.H., Wanagat, J., McKenzie, D., and Aiken, J.M. (2002). Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985) 92, 2617-2624.

Cahalan, M.D. (2001). Cell biology. Channels as enzymes. *Nature* 411, 542-543.

Cao, G., Lee, K.P., van der Wijst, J., de Graaf, M., van der Kemp, A., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. (2010). Methionine sulfoxide reductase B1 (MsrB1) recovers TRPM6 channel activity during oxidative stress. *The journal of biological chemistry* 285, 26081-26087.

Cao, G., Thebault, S., van der Wijst, J., van der Kemp, A., Lasonder, E., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. (2008). RACK1 inhibits TRPM6 activity via phosphorylation of the fused alpha-kinase domain. *Current biology : CB* 18, 168-176.

Cao, G., van der Wijst, J., van der Kemp, A., van Zeeland, F., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. (2009). Regulation of the epithelial Mg²⁺ channel TRPM6 by estrogen and the associated repressor protein of estrogen receptor activity (REA). *The journal of biological chemistry* 284, 14788-14795.

Capecchi, M.R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288-1292.

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

Chery, M., Biancalana, V., Philippe, C., Malpuech, G., Carla, H., Gilgenkrantz, S., Mandel, J.L., and Hanauer, A. (1994). Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia in a female with balanced X:9 translocation: mapping of the Xp22 chromosome breakpoint. *Human genetics* 93, 587-591.

- Chiao, E., Fisher, P., Crisponi, L., Deiana, M., Dragatsis, I., Schlessinger, D., Pilia, G., and Efstratiadis, A.** (2002). Overgrowth of a mouse model of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome is independent of IGF signaling. *Developmental biology* 243, 185-206.
- Chien, M.M., Zahradka, K.E., Newell, M.K., and Freed, J.H.** (1999). Fas-induced B cell apoptosis requires an increase in free cytosolic magnesium as an early event. *The journal of biological chemistry* 274, 7059-7066.
- Chiou, C.C., Chang, P.Y., Chan, E.C., Wu, T.L., Tsao, K.C., and Wu, J.T.** (2003). Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 334, 87-94.
- Chubanov, V., Schlingmann, K.P., Waring, J., Heinzinger, J., Kaske, S., Waldegger, S., Mederos y Schnitzler, M., and Gudermann, T.** (2007). Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia due to a missense mutation in the putative pore-forming region of TRPM6. *The journal of biological chemistry* 282, 7656-7667.
- Chubanov, V., Waldegger, S., Mederos y Schnitzler, M., Vitzthum, H., Sassen, M.C., Seyberth, H.W., Konrad, M., and Gudermann, T.** (2004). Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2894-2899.
- Cinti, S.** (2001). The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *The Proceedings of the Nutrition Society* 60, 319-328.
- Clapham, D.E.** (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524.
- Clapham, D.E., Julius, D., Montell, C., and Schultz, G.** (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacological reviews* 57, 427-450.
- Clapham, D.E., Runnels, L.W., and Strubing, C.** (2001). The TRP ion channel family. *Nature reviews Neuroscience* 2, 387-396.
- Clark, K., Langeslag, M., van Leeuwen, B., Ran, L., Ryazanov, A.G., Figdor, C.G., Moolenaar, W.H., Jalink, K., and van Leeuwen, F.N.** (2006). TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *The EMBO journal* 25, 290-301.
- Clark, K., Middelbeek, J., Lasonder, E., Dulyaninova, N.G., Morrice, N.A., Ryazanov, A.G., Bresnick, A.R., Figdor, C.G., and van Leeuwen, F.N.** (2008a). TRPM7 regulates myosin IIA filament stability and protein localization by heavy chain phosphorylation. *Journal of molecular biology* 378, 790-803.
- Clark, K., Middelbeek, J., Morrice, N.A., Figdor, C.G., Lasonder, E., and van Leeuwen, F.N.** (2008b). Massive autophosphorylation of the Ser/Thr-rich domain controls protein kinase activity of TRPM6 and TRPM7. *PloS one* 3, e1876.
- Cole, D.E., and Quamme, G.A.** (2000). Inherited disorders of renal magnesium handling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 11, 1937-1947.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Burd, R.M., Patel, K., Barnard, A., Lunec, J., and Hutchinson, P.E.** (2001). Induction and excretion of ultraviolet-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine and thymine dimers in vivo: implications for PUVA. *The journal of investigative dermatology* 116, 281-285.
- Coudray, C., Feillet-Coudray, C., Rambeau, M., Mazur, A., and Rayssiguier, Y.** (2005). Stable isotopes in studies of intestinal absorption, exchangeable pools and mineral status: the

example of magnesium. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* 19, 97-103.

Coudray, C., Gaumet, N., Bellanger, J., Coxam, V., Barlet, J.P., and Rayssiguier, Y. (1999). Influence of age and hormonal treatment on intestinal absorption of magnesium in ovariectomised rats. *Magnesium research : official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium* 12, 109-114.

da Silva, C.A., de Braganca, A.C., Shimizu, M.H., Sanches, T.R., Fortes, M.A., Giorgi, R.R., Andrade, L., and Seguro, A.C. (2009). Rosiglitazone prevents sirolimus-induced hypomagnesemia, hypokalemia, and downregulation of NKCC2 protein expression. *American journal of physiology Renal physiology* 297, F916-922.

Dai, L.J., Raymond, L., Friedman, P.A., and Quamme, G.A. (1997). Mechanisms of amiloride stimulation of Mg²⁺ uptake in immortalized mouse distal convoluted tubule cells. *The American journal of physiology* 272, F249-256.

Dai, L.J., Ritchie, G., Kerstan, D., Kang, H.S., Cole, D.E., and Quamme, G.A. (2001). Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. *Physiological reviews* 81, 51-84.

Davidovic, M., Trailov, D., Milosevic, D., Radosavljevic, B., Milanovic, P., Djurica, S., Loncar-Stevanovic, H., and Stevic, R. (2004). Magnesium, aging, and the elderly patient. *TheScientificWorldJournal* 4, 544-550.

Deason-Towne, F., Perraud, A.L., and Schmitz, C. (2012). Identification of Ser/Thr phosphorylation sites in the C2-domain of phospholipase C gamma2 (PLCgamma2) using TRPM7-kinase. *Cellular signalling* 24, 2070-2075.

Demeuse, P., Penner, R., and Fleig, A. (2006). TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain. *The journal of general physiology* 127, 421-434.

Devi, S., Kedlaya, R., Maddodi, N., Bhat, K.M., Weber, C.S., Valdivia, H., and Setaluri, V. (2009). Calcium homeostasis in human melanocytes: role of transient receptor potential melastatin 1 (TRPM1) and its regulation by ultraviolet light. *American journal of physiology Cell physiology* 297, C679-687.

Dimke, H., van der Wijst, J., Alexander, T.R., Meijer, I.M., Mulder, G.M., van Goor, H., Tejpar, S., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J. (2010). Effects of the EGFR Inhibitor Erlotinib on Magnesium Handling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21, 1309-1316.

Dirscherl, W., and Breuer, H. (1952). Eine einfache Methode zur photometrischen Bestimmung von Magnesium mit Eriochromschwarz T. *Mikrochimica acta* 40, 322-331.

Dorovkov, M.V., and Ryazanov, A.G. (2004). Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *The journal of biological chemistry* 279, 50643-50646.

Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.

Drennan, D., and Ryazanov, A.G. (2004). Alpha-kinases: analysis of the family and comparison with conventional protein kinases. *Progress in biophysics and molecular biology* 85, 1-32.

Dufour, J.P., Boutry, M., and Goffeau, A. (1980). Plasma membrane ATPase of yeast. Comparative inhibition studies of the purified and membrane-bound enzymes. *The journal of biological chemistry* 255, 5735-5741.

- Duncan, L.M., Deeds, J., Cronin, F.E., Donovan, M., Sober, A.J., Kauffman, M., and McCarthy, J.J.** (2001). Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19, 568-576.
- Duncan, L.M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L.M., Woolf, E.A., Tepper, R.I., and Shyjan, A.W.** (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer research* 58, 1515-1520.
- Durlach, J.** (1988). Magnesium research: a brief historical account. *Magnesium research : official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium* 1, 91-95.
- Efstratiadis, A.** (1998). Genetics of mouse growth. *The International journal of developmental biology* 42, 955-976.
- Engvall, E., and Perlmann, P.** (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.
- Erler, I., Al-Ansary, D.M., Wissenbach, U., Wagner, T.F., Flockerzi, V., and Niemeyer, B.A.** (2006). Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *The journal of biological chemistry* 281, 38396-38404.
- Erler, I., Hirnet, D., Wissenbach, U., Flockerzi, V., and Niemeyer, B.A.** (2004). Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *The journal of biological chemistry* 279, 34456-34463.
- Esteban-Oliva, D., Pintos-Morell, G., and Konrad, M.** (2009). Long-term follow-up of a patient with primary hypomagnesaemia and secondary hypocalcaemia due to a novel TRPM6 mutation. *European journal of pediatrics* 168, 439-442.
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Cooke, M.S.** (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation research* 567, 1-61.
- Fahim, F.A., Morcos, N.Y., and Esmat, A.Y.** (1990). Effects of dietary magnesium and/or manganese variables on the growth rate and metabolism of mice. *Annals of nutrition & metabolism* 34, 183-192.
- Famularo, G., Gasbarrone, L., and Minisola, G.** (2013). Hypomagnesemia and proton-pump inhibitors. *Expert opinion on drug safety* 12, 709-716.
- Fang, D., and Setaluri, V.** (2000). Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 279, 53-61.
- Fernandez, S., Fernandez, A.M., Lopez-Lopez, C., and Torres-Aleman, I.** (2007). Emerging roles of insulin-like growth factor-I in the adult brain. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 17, 89-95.
- Fine, K.D., Santa Ana, C.A., Porter, J.L., and Fordtran, J.S.** (1991). Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *The journal of clinical investigation* 88, 396-402.
- Fiske, C.H., and Subbarow, Y.** (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *The journal of biological chemistry* LXVI, 375-400.
- Gems, D., and Partridge, L.** (2013). Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Annual review of physiology* 75, 621-644.

- Glaudemans, B., Knoers, N.V., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J.** (2010). New molecular players facilitating Mg(2+) reabsorption in the distal convoluted tubule. *Kidney international* 77, 17-22.
- Goel, M., Sinkins, W.G., and Schilling, W.P.** (2002). Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *The journal of biological chemistry* 277, 48303-48310.
- Goldstein, A.L.** (2001). Report on the Third Annual Walker's Cay colloquium on cancer vaccines. *Vaccine* 19, 4342-4346.
- Gordon, L.B., Rothman, F.G., Lopez-Otin, C., and Misteli, T.** (2014). Progeria: a paradigm for translational medicine. *Cell* 156, 400-407.
- Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E., and Kemler, R.** (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 9065-9069.
- Gouadon, E., Lecerf, F., and German-Fattal, M.** (2012). Differential effects of cyclosporin A and tacrolimus on magnesium influx in Caco2 cells. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 15, 389-398.
- Gregg, S.Q., Gutierrez, V., Robinson, A.R., Woodell, T., Nakao, A., Ross, M.A., Michalopoulos, G.K., Rigatti, L., Rothermel, C.E., Kamileri, I., et al.** (2012). A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology* 55, 609-621.
- Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G., and Harteneck, C.** (2003). Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *The journal of biological chemistry* 278, 21493-21501.
- Guilbert, A., Gautier, M., Dhennin-Duthille, I., Haren, N., Sevestre, H., and Ouadid-Ahidouch, H.** (2009). Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *American journal of physiology Cell physiology* 297, C493-502.
- Gunther, T.** (1993). Mechanisms and regulation of Mg2+ efflux and Mg2+ influx. *Mineral and electrolyte metabolism* 19, 259-265.
- Guran, T., Akcay, T., Bereket, A., Atay, Z., Turan, S., Haisch, L., Konrad, M., and Schlingmann, K.P.** (2012). Clinical and molecular characterization of Turkish patients with familial hypomagnesaemia: novel mutations in TRPM6 and CLDN16 genes. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 27, 667-673.
- Habeb, A.M., Al-Harbi, H., and Schlingmann, K.P.** (2012). Resolving basal ganglia calcification in hereditary hypomagnesemia with secondary hypocalcemia due to a novel TRPM6 gene mutation. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* 23, 1038-1042.
- Haenzi, B., Bonny, O., Masson, R., Lienhard, S., Dey, J.H., Kuro-o, M., and Hynes, N.E.** (2014). Loss of Memo, a novel FGFR regulator, results in reduced lifespan. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28, 327-336.
- Hans, C.P., Chaudhary, D.P., and Bansal, D.D.** (2003). Effect of magnesium supplementation on oxidative stress in alloxanic diabetic rats. *Magnesium research : official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium* 16, 13-19.

- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., et al.** (2002). LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular cell* 9, 163-173.
- Hardie, R.C., and Minke, B.** (1992). The *trp* gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8, 643-651.
- Hartmann, G., Cheung, A.K., and Piquette-Miller, M.** (2002). Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 303, 273-281.
- Hartwig, A.** (2001). Role of magnesium in genomic stability. *Mutation research* 475, 113-121.
- Hayashi, S., Tenzen, T., and McMahon, A.P.** (2003). Maternal inheritance of Cre activity in a Sox2Cre deleter strain. *Genesis* 37, 51-53.
- Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., and Schaefer, M.** (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *Journal of cell science* 118, 917-928.
- Himms-Hagen, J.** (1984). Thermogenesis in brown adipose tissue as an energy buffer. Implications for obesity. *The New England journal of medicine* 311, 1549-1558.
- Hoeflich, A., Nedbal, S., Blum, W.F., Erhard, M., Lahm, H., Brem, G., Kolb, H.J., Wanke, R., and Wolf, E.** (2001). Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* 142, 1889-1898.
- Hoeflich, A., Schmidt, P., Foll, J., Rottmann, O., Weber, M.M., Kolb, H.J., Pirchner, F., and Wolf, E.** (1998). Altered growth of mice divergently selected for body weight is associated with complex changes in the growth hormone/insulin-like growth factor system. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 8, 113-123.
- Hoeijmakers, J.H.** (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine* 361, 1475-1485.
- Hoenderop, J.G., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B., and Bindels, R.J.** (2003). Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *The EMBO journal* 22, 776-785.
- Hofmann, T., Chubanov, V., Gudermann, T., and Montell, C.** (2003). TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Current biology : CB* 13, 1153-1158.
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T.** (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7461-7466.
- Hou, J., Renigunta, A., Gomes, A.S., Hou, M., Paul, D.L., Waldegger, S., and Goodenough, D.A.** (2009). Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 15350-15355.
- Houk, R.S., Fassel, V.A., Flesch, G.D., Gray, A.L., and Taylor, E.** (1980). Inductively Coupled Argon Plasma for Mass Spectrometric Determination of Trace Elements. *Analytical Chemistry* 52, 2283.

- Hsu, Y.J., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J.** (2007). TRP channels in kidney disease. *Biochimica et biophysica acta* 1772, 928-936.
- Hunter, J.J., Shao, J., Smutko, J.S., Dussault, B.J., Nagle, D.L., Woolf, E.A., Holmgren, L.M., Moore, K.J., and Shyjan, A.W.** (1998). Chromosomal localization and genomic characterization of the mouse melastatin gene (*Mln1*). *Genomics* 54, 116-123.
- Jaffer, U., Wade, R.G., and Gourlay, T.** (2010). Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR proceedings in intensive care & cardiovascular anesthesia* 2, 161-175.
- Jaquemar, D., Schenker, T., and Trueb, B.** (1999). An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *The journal of biological chemistry* 274, 7325-7333.
- Jaschinski, F., Schuler, M., Peuker, H., and Pette, D.** (1998). Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms of rat muscle during forced contractile activity. *The American journal of physiology* 274, C365-370.
- Jung, D.W., Apel, L., and Brierley, G.P.** (1990). Matrix free Mg²⁺ changes with metabolic state in isolated heart mitochondria. *Biochemistry* 29, 4121-4128.
- Karbach, U., and Feldmeier, H.** (1991). New clinical and experimental aspects of intestinal magnesium transport. *Magnesium research : official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium* 4, 9-22.
- Kaske, S., Krasteva, G., Konig, P., Kummer, W., Hofmann, T., Gudermann, T., and Chubanov, V.** (2007). TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC neuroscience* 8, 49.
- Kenyon, C.** (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120, 449-460.
- Kerstan, D., and Quamme, G.A.** (2002). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption of magnesium. In: *Calcium in Internal Medicine*, edited by S G Massry, H Morii, und Y Nishizawa; Springer-Verlag, 171-183.
- Kirkwood, T.B.** (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell* 120, 437-447.
- Kobori, T., Smith, G.D., Sandford, R., and Edwardson, J.M.** (2009). The transient receptor potential channels TRPP2 and TRPC1 form a heterotetramer with a 2:2 stoichiometry and an alternating subunit arrangement. *The journal of biological chemistry* 284, 35507-35513.
- Kohlmeier, M., Thefeld, W., Stelte, W., Grimm, R., Häussler, A., Hünchen, K., Reuter, U., Saupe, J., Schek, A., and Kübler, W.** (1995). Versorgung Erwachsener mit Mineralstoffen und Spurenelementen in der Bundesrepublik Deutschland. In: Kübler, W, Andersen, H J, Heeschen, W (Hsrg) *Vera-Schriftenreihe Band V, Wissenschaftlicher Fachverlag Dr Fleck*.
- Konrad, M., Schlingmann, K.P., and Gudermann, T.** (2004). Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *American journal of physiology Renal physiology* 286, F599-605.
- Koseoglu, E., Talaslioglu, A., Gonul, A.S., and Kula, M.** (2008). The effects of magnesium prophylaxis in migraine without aura. *Magnesium research : official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium* 21, 101-108.

- Kuhn, F.J., and Luckhoff, A.** (2004). Sites of the NUDT9-H domain critical for ADP-ribose activation of the cation channel TRPM2. *The journal of biological chemistry* 279, 46431-46437.
- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., et al.** (1997). Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45-51.
- Lameris, A.L., Hess, M.W., van Kruijsbergen, I., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J.** (2013). Omeprazole enhances the colonic expression of the Mg(2+) transporter TRPM6. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 465, 1613-1620.
- Landouere, G., Zdebik, A.A., Martinez, T.L., Burnett, B.G., Stanescu, H.C., Inada, H., Shi, Y., Taye, A.A., Kong, L., Munns, C.H., et al.** (2010). Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nature genetics* 42, 170-174.
- Lang, T., Streeper, T., Cawthon, P., Baldwin, K., Taaffe, D.R., and Harris, T.B.** (2010). Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 21, 543-559.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A.L., Scharenberg, A.M., Penner, R., and Kinet, J.P.** (2002). TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109, 397-407.
- Ledeganck, K.J., Boulet, G.A., Bogers, J.J., Verpooten, G.A., and De Winter, B.Y.** (2013). The TRPM6/EGF pathway is downregulated in a rat model of cisplatin nephrotoxicity. *PLoS one* 8, e57016.
- Lee, N., Chen, J., Sun, L., Wu, S., Gray, K.R., Rich, A., Huang, M., Lin, J.H., Feder, J.N., Janovitz, E.B., et al.** (2003). Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *The journal of biological chemistry* 278, 20890-20897.
- Lexell, J., and Downham, D.Y.** (1991). The occurrence of fibre-type grouping in healthy human muscle: a quantitative study of cross-sections of whole vastus lateralis from men between 15 and 83 years. *Acta neuropathologica* 81, 377-381.
- Lexell, J., Downham, D.Y., Larsson, Y., Bruhn, E., and Morsing, B.** (1995). Heavy-resistance training in older Scandinavian men and women: short- and long-term effects on arm and leg muscles. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 5, 329-341.
- Li, M., Jiang, J., and Yue, L.** (2006). Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *The journal of general physiology* 127, 525-537.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D., and Cheng, Y.** (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107-112.
- Liman, E.R., Tytgat, J., and Hess, P.** (1992). Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9, 861-871.
- Liu, J.L., and LeRoith, D.** (1999). Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology* 140, 5178-5184.
- Lombardi, G., Di Somma, C., Rota, F., and Colao, A.** (2005). Associated hormonal decline in aging: is there a role for GH therapy in aging men? *Journal of endocrinological investigation* 28, 99-108.

- Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G.** (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217.
- Lum, G.** (1992). Hypomagnesemia in acute and chronic care patient populations. *American journal of clinical pathology* 97, 827-830.
- Lupu, F., Terwilliger, J.D., Lee, K., Segre, G.V., and Efstratiadis, A.** (2001). Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Developmental biology* 229, 141-162.
- Madison, B.B., Dunbar, L., Qiao, X.T., Braunstein, K., Braunstein, E., and Gumucio, D.L.** (2002). Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *The journal of biological chemistry* 277, 33275-33283.
- Maggio, M., Ceda, G.P., Lauretani, F., Cattabiani, C., Avantageggiato, E., Morganti, S., Ablondi, F., Bandinelli, S., Dominguez, L.J., Barbagallo, M., et al.** (2011). Magnesium and anabolic hormones in older men. *International journal of andrology* 34, e594-600.
- Maggio, M., De Vita, F., Lauretani, F., Butto, V., Bondi, G., Cattabiani, C., Nouvenne, A., Meschi, T., Dall'Aglio, E., and Ceda, G.P.** (2013). IGF-1, the cross road of the nutritional, inflammatory and hormonal pathways to frailty. *Nutrients* 5, 4184-4205.
- Mandon, B., Siga, E., Roinel, N., and de Rouffignac, C.** (1993). Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺ transport in the cortical and medullary thick ascending limb of the rat nephron: influence of transepithelial voltage. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 424, 558-560.
- Martin, B.J., Black, J., and McLelland, A.S.** (1991). Hypomagnesaemia in elderly hospital admissions: a study of clinical significance. *The Quarterly journal of medicine* 78, 177-184.
- Mason, J.M., and Arndt, K.M.** (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 5, 170-176.
- Matsushita, M., Kozak, J.A., Shimizu, Y., McLachlin, D.T., Yamaguchi, H., Wei, F.Y., Tomizawa, K., Matsui, H., Chait, B.T., Cahalan, M.D., et al.** (2005). Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1. *The journal of biological chemistry* 280, 20793-20803.
- Matzkin, H., Lotan, D., and Boichis, H.** (1989). Primary hypomagnesemia with a probable double magnesium transport defect. *Nephron* 52, 83-86.
- McKemy, D.D., Neuhauser, W.M., and Julius, D.** (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-58.
- Mei, Z.Z., Xia, R., Beech, D.J., and Jiang, L.H.** (2006). Intracellular coiled-coil domain engaged in subunit interaction and assembly of melastatin-related transient receptor potential channel 2. *The journal of biological chemistry* 281, 38748-38756.
- Mensenkamp, A.R., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J.** (2007). TRPV5, the gateway to Ca²⁺ homeostasis. *Handbook of experimental pharmacology*, 207-220.
- Milla, P.J., Aggett, P.J., Wolff, O.H., and Harries, J.T.** (1979). Studies in primary hypomagnesaemia: evidence for defective carrier-mediated small intestinal transport of magnesium. *Gut* 20, 1028-1033.
- Minke, B., Wu, C., and Pak, W.L.** (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258, 84-87.

- Mohler, P.J., Gramolini, A.O., and Bennett, V.** (2002). Ankyrins. *Journal of cell science* *115*, 1565-1566.
- Montell, C.** (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* *2001*, re1.
- Montell, C.** (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* *2005*, re3.
- Montell, C., Birnbaumer, L., and Flockerzi, V.** (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* *108*, 595-598.
- Montell, C., Jones, K., Hafen, E., and Rubin, G.** (1985). Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* *230*, 1040-1043.
- Morgans, C.W., Zhang, J., Jeffrey, B.G., Nelson, S.M., Burke, N.S., Duvoisin, R.M., and Brown, R.L.** (2009). TRPM1 is required for the depolarizing light response in retinal ON-bipolar cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 19174-19178.
- Mori, K., Yahata, K., Mukoyama, M., Suganami, T., Makino, H., Nagae, T., Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sugawara, A., Nabeshima, Y., et al.** (2000). Disruption of *klotho* gene causes an abnormal energy homeostasis in mice. *Biochemical and biophysical research communications* *278*, 665-670.
- Moskalev, A.A., Shaposhnikov, M.V., Plyusnina, E.N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., and Fraifeld, V.E.** (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing research reviews* *12*, 661-684.
- Mostoslavsky, R., Chua, K.F., Lombard, D.B., Pang, W.W., Fischer, M.R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M.M., et al.** (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* *124*, 315-329.
- Murga, M., Bunting, S., Montana, M.F., Soria, R., Mulero, F., Canamero, M., Lee, Y., McKinnon, P.J., Nussenzweig, A., and Fernandez-Capetillo, O.** (2009). A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nature genetics* *41*, 891-898.
- Nadler, M.J., Hermosura, M.C., Inabe, K., Perraud, A.L., Zhu, Q., Stokes, A.J., Kurosaki, T., Kinet, J.P., Penner, R., Scharenberg, A.M., et al.** (2001). LTRPC7 is a Mg²⁺-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* *411*, 590-595.
- Nagy, A.** (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* *26*, 99-109.
- Nakamura, M., Sanuki, R., Yasuma, T.R., Onishi, A., Nishiguchi, K.M., Koike, C., Kadowaki, M., Kondo, M., Miyake, Y., and Furukawa, T.** (2010). TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness. *Molecular vision* *16*, 425-437.
- Naylor, J., Li, J., Milligan, C.J., Zeng, F., Sukumar, P., Hou, B., Sedo, A., Yuldasheva, N., Majeed, Y., Beri, D., et al.** (2010). Pregnenolone sulphate- and cholesterol-regulated TRPM3 channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. *Circulation research* *106*, 1507-1515.
- Newberne, P.M., and Fox, J.G.** (1980). Nutritional adequacy and quality control of rodent diets. *Laboratory animal science* *30*, 352-365.

- Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Vennekens, R., Freichel, M., Wissenbach, U., and Flockerzi, V.** (2003). Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *The journal of biological chemistry* 278, 30813-30820.
- Nilius, B., and Voets, T.** (2005). TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 451, 1-10.
- Oancea, E., Vriens, J., Brauchi, S., Jun, J., Splawski, I., and Clapham, D.E.** (2009). TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes. *Science signaling* 2, ra21.
- Oberwinkler, J., Lis, A., Giehl, K.M., Flockerzi, V., and Philipp, S.E.** (2005). Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *The journal of biological chemistry* 280, 22540-22548.
- Palmer, C.P., Zhou, X.L., Lin, J., Loukin, S.H., Kung, C., and Saimi, Y.** (2001). A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7801-7805.
- Paunier, L., Radde, I.C., Kooh, S.W., Conen, P.E., and Fraser, D.** (1968). Primary hypomagnesemia with secondary hypocalcemia in an infant. *Pediatrics* 41, 385-402.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., et al.** (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705-715.
- Peikert, A., Wilimzig, C., and Kohne-Volland, R.** (1996). Prophylaxis of migraine with oral magnesium: results from a prospective, multi-center, placebo-controlled and double-blind randomized study. *Cephalalgia : an international journal of headache* 16, 257-263.
- Perazella, M.A.** (2013). Proton pump inhibitors and hypomagnesemia: a rare but serious complication. *Kidney international* 83, 553-556.
- Peretz, S., Jensen, R., Baserga, R., and Glazer, P.M.** (2001). ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1676-1681.
- Perez, C.A., Huang, L., Rong, M., Kozak, J.A., Preuss, A.K., Zhang, H., Max, M., and Margolskee, R.F.** (2002). A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nature neuroscience* 5, 1169-1176.
- Perraud, A.L., Fleig, A., Dunn, C.A., Bagley, L.A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A.J., Zhu, Q., Bessman, M.J., Penner, R., et al.** (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411, 595-599.
- Perraud, A.L., Zhao, X., Ryazanov, A.G., and Schmitz, C.** (2011). The channel-kinase TRPM7 regulates phosphorylation of the translational factor eEF2 via eEF2-k. *Cellular signalling* 23, 586-593.
- Peschon, J.J., Torrance, D.S., Stocking, K.L., Glaccum, M.B., Otten, C., Willis, C.R., Charrier, K., Morrissey, P.J., Ware, C.B., and Mohler, K.M.** (1998). TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *Journal of immunology* 160, 943-952.
- Phillips, J.D., Davie, R.J., Keighley, M.R., and Birch, N.J.** (1991). Brief communication: magnesium absorption in human ileum. *Journal of the American College of Nutrition* 10, 200-204.

- Prawitt, D., Enklaar, T., Klemm, G., Gartner, B., Spangenberg, C., Winterpacht, A., Higgins, M., Pelletier, J., and Zabel, B.** (2000). Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Human molecular genetics* 9, 203-216.
- Prawitt, D., Monteilh-Zoller, M.K., Brixel, L., Spangenberg, C., Zabel, B., Fleig, A., and Penner, R.** (2003). TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15166-15171.
- Qian, F., and Noben-Trauth, K.** (2005). Cellular and molecular function of mucolipins (TRPML) and polycystin 2 (TRPP2). *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 451, 277-285.
- Qin, X., Yue, Z., Sun, B., Yang, W., Xie, J., Ni, E., Feng, Y., Mahmood, R., Zhang, Y., and Yue, L.** (2013). Sphingosine and FTY720 are potent inhibitors of the transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. *British journal of pharmacology* 168, 1294-1312.
- Quamme, G.A.** (1982). Effect of hypercalcemia on renal tubular handling of calcium and magnesium. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 60, 1275-1280.
- Quamme, G.A.** (1989). Control of magnesium transport in the thick ascending limb. *The American journal of physiology* 256, F197-210.
- Quamme, G.A.** (1997). Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems. *Kidney international* 52, 1180-1195.
- Ramsey, I.S., Delling, M., and Clapham, D.E.** (2006). An introduction to TRP channels. *Annual review of physiology* 68, 619-647.
- Rayssiguier, Y., Durlach, J., Gueux, E., Rock, E., and Mazur, A.** (1993). Magnesium and ageing. I. Experimental data: importance of oxidative damage. *Magnesium research : official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium* 6, 369-378.
- Razzaque, M.S., Sitara, D., Taguchi, T., St-Arnaud, R., and Lanske, B.** (2006). Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 720-722.
- Reading, S.A., and Brayden, J.E.** (2007). Central role of TRPM4 channels in cerebral blood flow regulation. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38, 2322-2328.
- Reiser, J., Polu, K.R., Moller, C.C., Kenlan, P., Altintas, M.M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., et al.** (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature genetics* 37, 739-744.
- Riazanova, L.V., Pavur, K.S., Petrov, A.N., Dorovkov, M.V., and Riazanov, A.G.** (2001). [Novel type of signaling molecules: protein kinases covalently linked to ion channels]. *Molekuliarnaia biologii* 35, 321-332.
- Rohacs, T., Lopes, C.M., Michailidis, I., and Logothetis, D.E.** (2005). PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nature neuroscience* 8, 626-634.
- Romani, A., and Scarpa, A.** (1992). Regulation of cell magnesium. *Archives of biochemistry and biophysics* 298, 1-12.

- Romani, A.M.** (2007). Magnesium homeostasis in mammalian cells. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* *12*, 308-331.
- Romani, A.M.** (2011). Cellular magnesium homeostasis. *Archives of biochemistry and biophysics* *512*, 1-23.
- Romani, A.M., and Scarpa, A.** (2000). Regulation of cellular magnesium. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* *5*, D720-734.
- Rude, R.K.** (1998). Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* *13*, 749-758.
- Runnels, L.W., Yue, L., and Clapham, D.E.** (2001). TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* *291*, 1043-1047.
- Rutter, G.A., Osbaldeston, N.J., McCormack, J.G., and Denton, R.M.** (1990). Measurement of matrix free Mg²⁺ concentration in rat heart mitochondria by using entrapped fluorescent probes. *The Biochemical journal* *271*, 627-634.
- Ryazanov, A.G.** (2002). Elongation factor-2 kinase and its newly discovered relatives. *FEBS letters* *514*, 26-29.
- Ryazanov, A.G., Shestakova, E.A., and Natapov, P.G.** (1988). Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation. *Nature* *334*, 170-173.
- Rylander, R., Remer, T., Berkemeyer, S., and Vormann, J.** (2006). Acid-base status affects renal magnesium losses in healthy, elderly persons. *The journal of nutrition* *136*, 2374-2377.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350-1354.
- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Yokoi, H., Matsushime, H., and Furuichi, K.** (2001). Immunocyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2. *Science* *293*, 1327-1330.
- Satoh, J., and Romero, M.F.** (2002). Mg²⁺ transport in the kidney. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* *15*, 285-295.
- Sauer, B., and Henderson, N.** (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *85*, 5166-5170.
- Schlingmann, K.P., and Gudermann, T.** (2005). A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport. *The journal of physiology* *566*, 301-308.
- Schlingmann, K.P., Waldegger, S., Konrad, M., Chubanov, V., and Gudermann, T.** (2007). TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochimica et biophysica acta* *1772*, 813-821.
- Schlingmann, K.P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsum, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., et al.** (2002). Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nature genetics* *31*, 166-170.

- Schmitz, C., Dorovkov, M.V., Zhao, X., Davenport, B.J., Ryazanov, A.G., and Perraud, A.L.** (2005). The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant. *The journal of biological chemistry* *280*, 37763-37771.
- Shalev, H., Phillip, M., Galil, A., Carmi, R., and Landau, D.** (1998). Clinical presentation and outcome in primary familial hypomagnesaemia. *Archives of disease in childhood* *78*, 127-130.
- Shao, X., Somlo, S., and Igarashi, P.** (2002). Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* *13*, 1837-1846.
- Sherwood, R.A., Aryanayagam, P., Rocks, B.F., and Mankikar, G.D.** (1986). Hypomagnesium in the elderly. *Gerontology* *32*, 105-109.
- Simon, D.B., Lu, Y., Choate, K.A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., et al.** (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* *285*, 103-106.
- Sinkins, W.G., Goel, M., Estacion, M., and Schilling, W.P.** (2004). Association of immunophilins with mammalian TRPC channels. *The journal of biological chemistry* *279*, 34521-34529.
- Stewart, A.P., Egressy, K., Lim, A., and Edwardson, J.M.** (2010). AFM imaging reveals the tetrameric structure of the TRPM8 channel. *Biochemical and biophysical research communications* *394*, 383-386.
- Sweeney, M., McDaniel, S.S., Platoshyn, O., Zhang, S., Yu, Y., Lapp, B.R., Zhao, Y., Thistlethwaite, P.A., and Yuan, J.X.** (2002). Role of capacitative Ca²⁺ entry in bronchial contraction and remodeling. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* *92*, 1594-1602.
- Talavera, K., Yasumatsu, K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, R.F., and Nilius, B.** (2005). Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* *438*, 1022-1025.
- Tissenbaum, H.A., and Guarente, L.** (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *410*, 227-230.
- Topala, C.N., Groenestege, W.T., Thebault, S., van den Berg, D., Nilius, B., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J.** (2007). Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPM6. *Cell calcium* *41*, 513-523.
- Touyz, R.M., He, Y., Montezano, A.C., Yao, G., Chubanov, V., Gudermann, T., and Callera, G.E.** (2006). Differential regulation of transient receptor potential melastatin 6 and 7 cation channels by ANG II in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *290*, R73-78.
- Tsavalier, L., Shapero, M.H., Morkowski, S., and Laus, R.** (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer research* *61*, 3760-3769.
- Tsuruda, P.R., Julius, D., and Minor, D.L., Jr.** (2006). Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* *51*, 201-212.

- Vainsel, M., Vandeveld, G., Smulders, J., Vosters, M., Hubain, P., and Loeb, H.** (1970). Tetany due to hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia. *Archives of disease in childhood* *45*, 254-258.
- van Angelen, A.A., Glaudemans, B., van der Kemp, A.W., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J.** (2013). Cisplatin-induced injury of the renal distal convoluted tubule is associated with hypomagnesaemia in mice. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* *28*, 879-889.
- Van Weemen, B.K., and Schuurs, A.H.** (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters* *15*, 232-236.
- Vandewauw, I., Owsianik, G., and Voets, T.** (2013). Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. *BMC neuroscience* *14*, 21.
- Vannier, B., Zhu, X., Brown, D., and Birnbaumer, L.** (1998). The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *The journal of biological chemistry* *273*, 8675-8679.
- Vegiopoulos, A., Muller-Decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., Berriel Diaz, M., Rozman, J., Hrabe de Angelis, M., Nusing, R.M., et al.** (2010). Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* *328*, 1158-1161.
- Venkatachalam, K., and Montell, C.** (2007). TRP channels. *Annual review of biochemistry* *76*, 387-417.
- Vennekens, R., Olausson, J., Meissner, M., Bloch, W., Mathar, I., Philipp, S.E., Schmitz, F., Weissgerber, P., Nilius, B., Flockerzi, V., et al.** (2007). Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nature immunology* *8*, 312-320.
- Vennekens, R., Voets, T., Bindels, R.J., Droogmans, G., and Nilius, B.** (2002). Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell calcium* *31*, 253-264.
- Vetter, T., and Lohse, M.J.** (2002). Magnesium and the parathyroid. *Current opinion in nephrology and hypertension* *11*, 403-410.
- Vijg, J., and Campisi, J.** (2008). Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* *454*, 1065-1071.
- Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A.W., Droogmans, G., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G.** (2004). TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *The journal of biological chemistry* *279*, 19-25.
- Vormann, J.** (2010). Physiologie und Pathophysiologie von Magnesium. *Schweizer Zeitschrift für Ernährungsmedizin*, 8-13.
- Wagner, T.F., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Dufer, M., Lis, A., Flockerzi, V., Philipp, S.E., et al.** (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nature cell biology* *10*, 1421-1430.
- Walder, R.Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M.B., Beck, G.E., Englehardt, R.K., Carmi, R., et al.** (2002). Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nature genetics* *31*, 171-174.
- Walder, R.Y., Shalev, H., Brennan, T.M., Carmi, R., Elbedour, K., Scott, D.A., Hanauer, A., Mark, A.L., Patil, S., Stone, E.M., et al.** (1997). Familial hypomagnesemia maps to

chromosome 9q, not to the X chromosome: genetic linkage mapping and analysis of a balanced translocation breakpoint. *Human molecular genetics* 6, 1491-1497.

Walder, R.Y., Yang, B., Stokes, J.B., Kirby, P.A., Cao, X., Shi, P., Searby, C.C., Husted, R.F., and Sheffield, V.C. (2009). Mice defective in *Trpm6* show embryonic mortality and neural tube defects. *Human molecular genetics* 18, 4367-4375.

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

Weglicki, W.B., Mak, I.T., Kramer, J.H., Dickens, B.F., Cassidy, M.M., Stafford, R.E., and Philips, T.M. (1996). Role of free radicals and substance P in magnesium deficiency. *Cardiovascular research* 31, 677-682.

Wehage, E., Eisfeld, J., Heiner, I., Jungling, E., Zitt, C., and Luckhoff, A. (2002). Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *The journal of biological chemistry* 277, 23150-23156.

Will, C., Breiderhoff, T., Thumfart, J., Stuiver, M., Kopplin, K., Sommer, K., Gunzel, D., Querfeld, U., Meij, I.C., Shan, Q., et al. (2010). Targeted deletion of murine *Cldn16* identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca^{2+} and Mg^{2+} wasting. *American journal of physiology Renal physiology* 298, F1152-1161.

Winn, M.P., Conlon, P.J., Lynn, K.L., Farrington, M.K., Creazzo, T., Hawkins, A.F., Daskalakis, N., Kwan, S.Y., Ebersviller, S., Burchette, J.L., et al. (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308, 1801-1804.

Wolf, F.I., and Cittadini, A. (1999). Magnesium in cell proliferation and differentiation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 4, D607-617.

Wolf, F.I., Torsello, A., Fasanella, S., and Cittadini, A. (2003). Cell physiology of magnesium. *Molecular aspects of medicine* 24, 11-26.

Wong, N.L., Quamme, G.A., Sutton, R.A., and Dirks, J.H. (1979). Effects of mannitol on water and electrolyte transport in the dog kidney. *The journal of laboratory and clinical medicine* 94, 683-692.

Wong, V., and Goodenough, D.A. (1999). Paracellular channels! *Science* 285, 62.

Worman, H.J. (2012). Nuclear lamins and laminopathies. *The journal of pathology* 226, 316-325.

Woudenberg-Vrenken, T.E., Sukinta, A., van der Kemp, A.W., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. (2011). Transient receptor potential melastatin 6 knockout mice are lethal whereas heterozygous deletion results in mild hypomagnesemia. *Nephron Physiology* 117, p11-19.

Wu, G., Markowitz, G.S., Li, L., D'Agati, V.D., Factor, S.M., Geng, L., Tibara, S., Tuchman, J., Cai, Y., Park, J.H., et al. (2000). Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in *Pkd2*. *Nature genetics* 24, 75-78.

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

- Wu, L.L., Chiou, C.C., Chang, P.Y., and Wu, J.T.** (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 339, 1-9.
- Xie, J., Sun, B., Du, J., Yang, W., Chen, H.C., Overton, J.D., Runnels, L.W., and Yue, L.** (2011). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) controls magnesium gatekeeper TRPM6 activity. *Scientific reports* 1, 146.
- Xu, X.Z., Li, H.S., Guggino, W.B., and Montell, C.** (1997). Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell* 89, 1155-1164.
- Xu, X.Z., Moebius, F., Gill, D.L., and Montell, C.** (2001). Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10692-10697.
- Yago, M.D., Manas, M., and Singh, J.** (2000). Intracellular magnesium: transport and regulation in epithelial secretory cells. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 5, D602-618.
- Yang, C.Y., Chiu, H.F., Chiu, J.F., Tsai, S.S., and Cheng, M.F.** (1997). Calcium and magnesium in drinking water and risk of death from colon cancer. *Japanese journal of cancer research : Gann* 88, 928-933.
- Yellen, G.** (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419, 35-42.
- Zhang, K.** (2010). Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *International journal of clinical and experimental medicine* 3, 33-40.
- Zhang, K., and Kaufman, R.J.** (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455-462.
- Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S., and Ryba, N.J.** (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112, 293-301.
- Zhuang, L., Peng, J.B., Tou, L., Takanaga, H., Adam, R.M., Hediger, M.A., and Freeman, M.R.** (2002). Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82, 1755-1764.

VIII Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
<i>Cre</i>	<i>Cre</i> -Rekombinase
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
g	Gramm
GH	Somatropin (<i>growth hormone</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HE-Färbung	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HSH	Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalcämie
IGF-I	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I
IgG	Immunglobuline
IL-6	Interleukin 6
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
L	Liter
<i>loxP</i>	<i>locus of X-over of P1</i> -Sequenz
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger</i> RNA)
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
OHdG	Hydroxydeoxyguanosin
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRP	<i>transient receptor potential</i> Kanäle
V	Volt
WT	Wildtyp
x g	Zentrifugalbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

2 PCR-Ergebnisse der gewebespezifischen *Knockout*-Mäuse

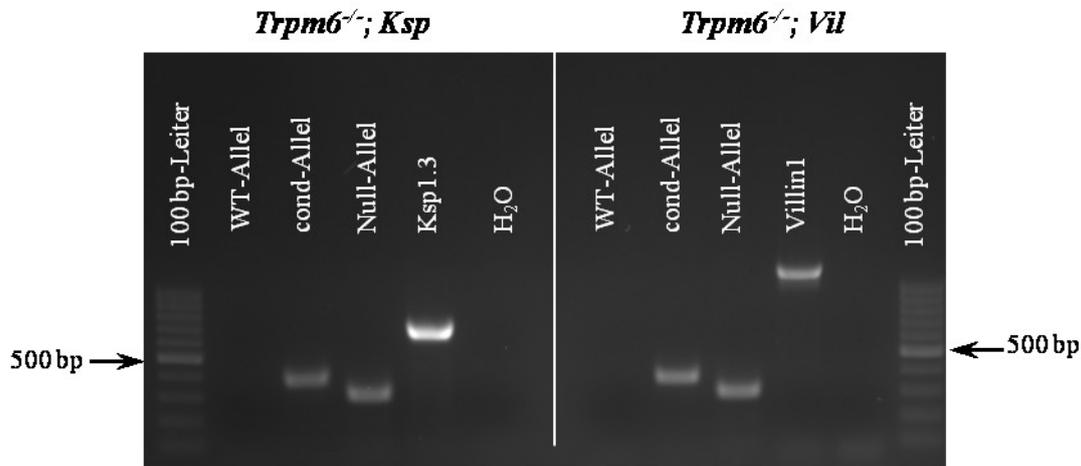


Abb. VIII 1: Genotypisierung nierenspezifischer und intestinalspezifischer *knockout*-Mäuse mittels PCR. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte über vier separate PCRs: WT = Wildtypallel, cond = konditionales Allel; Null-Allel = -, Ksp1.3 = *Ksp1.3-C re*-Rekombinase, Villin1 = *Villin1-Cre*-Rekombinase. Als Negativkontrolle diente Reinswasser.

3 Immunhistochemischer Spezifitätstest von TRPM6-Antikörper

Tab. VIII 1: Getestete Antikörper und -Seren für die Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten der Niere und des Intestinaltraktes. + weist auf ein spezifisches Signal des TRPM6 hin, während - ein negatives Ergebnis anzeigt.

Antikörper/-seren	Spezifisches Signal in der Niere	Spezifisches Signal im Intestinaltrakt
Guinea pig anti-mouse serum	-	-
Anti-TRPM6 (extrazellulär)	-	-
Rabbit anti-mouse TRPM6 125	-	-
Rabbit anti-mouse TRPM6 126	-	-
Rabbit anti-phospho-mouse 62	-	-
Rabbit anti-phospho-mouse 63	-	-
Phospho-TRPM6	-	-
Non-Phospho-TRPM6	-	-
Rabbit anti-mouse TRPM6 512	-	-
Rabbit anti-mouse TRPM6 513	-	-
Ab 75a anti-TRPM6 *	+	-
Ab 75b anti-TRPM6 *	+	-
Ab 76 anti-TRPM6	-	-

4 Immunhistochemischer Nachweis der TRPM6-Deletion in nierenspezifisch-defizienten Mäusen

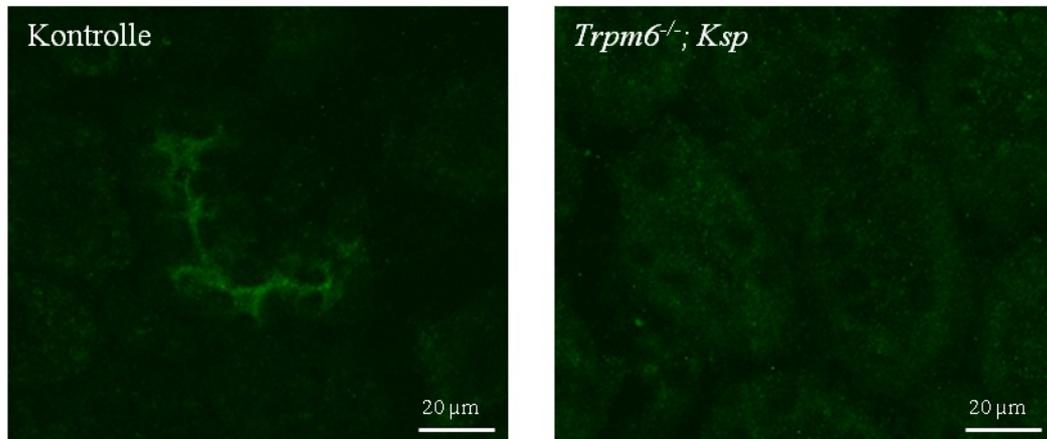


Abb. VIII 2: Nachweis der TRPM6-Deletion in Epithelialzellen der Niere bei nierenspezifischen *knockout*-Mäusen (*Trpm6*^{-/-}; *Ksp*) mittels Immunfluoreszenzfärbung an Kryoschnitten. Im Kontroll-Gewebe ist eine spezifische Immunmarkierung detektierbar, welche in der *Trpm6*^{-/-}; *Ksp*-Niere ausblieb.

5 *In-Situ*-Hybridisierung im Kolon intestinalspezifischer defizienter Mäuse

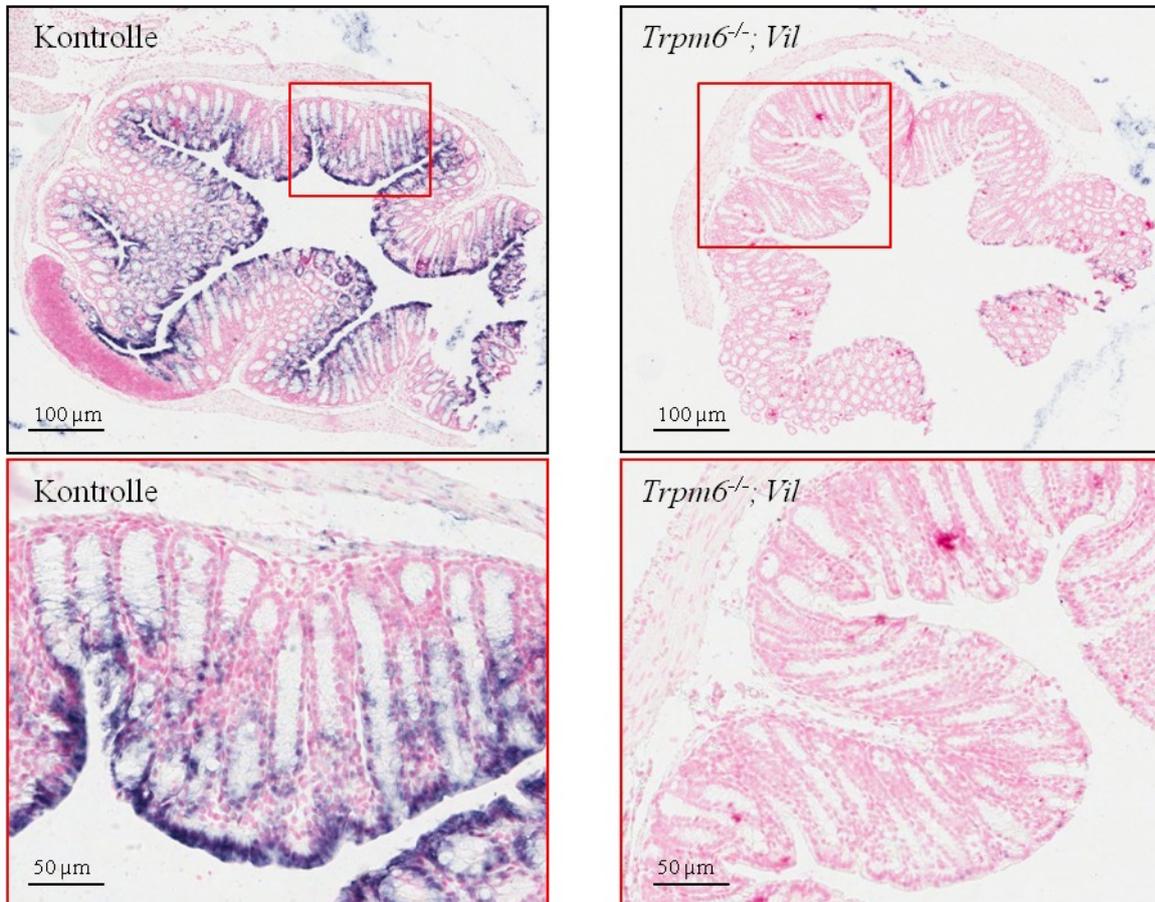


Abb. VIII 3: *In-Situ*-Hybridisierung im Kolon von intestinalspezifischen *knockout*-Mäusen (*Trpm6*^{-/-}; *Vil*) und deren Kontrollmäusen. Das TRPM6-Protein konnte in Kontrollmäusen in den Epithelzellen des Kolons detektiert werden. Im *knockout*-Gewebe ist keine Markierung detektierbar.

IX Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank all den Personen widmen, die das Entstehen dieser Dissertation ermöglicht haben und denjenigen, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben.

Bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß möchte ich mich ganz herzlich für die Möglichkeit der Promotion an der Fakultät für Biologie bedanken und dafür, dass sie die Begutachtung dieser Arbeit übernommen hat.

Für die Möglichkeit meine Dissertation am Walther-Straub-Institut anfertigen zu können und das Überlassen des interessanten Themas möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann ganz herzlich danken.

Herrn Dr. Vladimir Chubarov gilt mein Dank für die außergewöhnliche Betreuung meiner Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich für die große Unterstützung und gute Zusammenarbeit während der gesamten Zeit danken. Besonders Renate Heilmair stand mir jederzeit geduldig mit Rat und Tat zur Seite. Auch Silvia Ferioli möchte ich für ihre allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und Freundschaft danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Dr. Harald Mückter und die „Mückter-Buam“: Johannes Meyer alias Master J, Christian Juretschke, Elias Bekka und Oliver Richter für die lustige und freundschaftliche Zeit im Labor. Nicht nur die lehrreichen Fortbildungen an diversen Stätten, sondern auch die vielen gemeinsamen Abende sowie eure kreativen Ideen waren sehr bereichernd!

Ganz besonders danke ich den Küchenmädels Nele Weber, Elli Arlt, Andrea Wartenberg, Evi Glas und Stefanie Stohr für die schöne Mittagszeit, die wir jeden Tag gemeinsam verbracht haben, die vielen aufmunternden Worte und dass ihr mich so liebevoll in eurer Runde aufgenommen habt.

Ein weiteres dickes Dankeschön geht an alle Korrektur-Leser. Vor allem bei den zwei Humangenetikern Dr. Jens Nagel und Dr. Andreas Zunhammer, die stets ein offenes Ohr für mich hatten, möchte ich mich bedanken. Ich danke euch für die vielen Koch- und Tanz-Abende, die immer eine gelungene Erheiterung darstellten.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Mädels Caroline Lang und Melanie Altner, die all die Jahre eine unglaubliche moralische Unterstützung für mich waren. Seit dem Studium habt ihr mir jederzeit zugehört, mich auf andere Gedanken und zum Lachen gebracht. Danke, dass ihr immer für mich da seid! Auch meiner wöchentlichen Quizrunde gebührt ein ganz großer Dank für ihre Leidenschaft, die vielen Motivationen und Aufheiterungen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Dabei geht ein riesiges Dankeschön an meine Mama, die mich zu jeder Zeit liebevoll unterstützt und mich mit all meinen Macken akzeptiert. Ich danke dir, allen Angehörigen und Freunden für die Sicherheit, dass ich jederzeit nach Hause kommen kann. Danke!

X Kongressbeiträge und Publikationen

A role of TRPM6 in the prenatal development of mice

Wisnowsky A., Ferioli S., Heilmair R., Sytik L., Simmons D., Zierler S., Hofmann T., Gudermann T., Chubanov V.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Volume 386, Supplement 1: S 92

Postervortrag im Rahmen der 79. Jahrestagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Halle/Saale, 2013

Genetic delineation of the kinase and channel functions of TRPM7 in embryonic development and postnatal life of mice

Ferioli S., Wisnowsky A., Sytik L., Heilmair R., Hofmann T., Gudermann T., Chubanov V.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Volume 386, Supplement 1: S 21

Posterbeitrag im Rahmen der 79. Jahrestagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Halle/Saale, 2013

Manuskript der ersten Publikation ist in Arbeit.

XII Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation weder ganz noch in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich weder anderweitig eine Dissertation erfolglos eingereicht, noch mich einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, 25. Mai 2014

Annika Wisnowsky