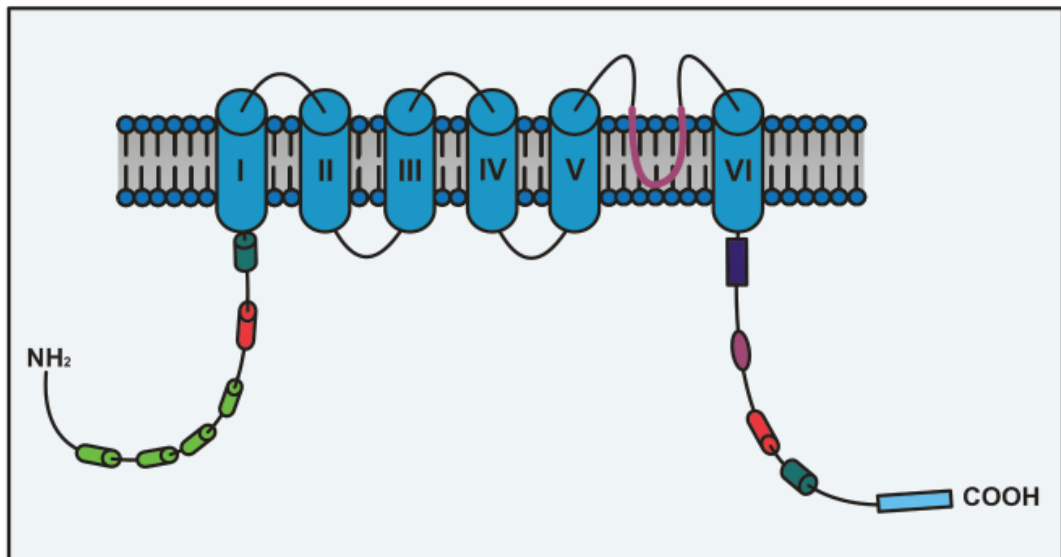


Die Rolle des C-Terminus in der Regulation der TRPC5-Kanäle



von Franziska Maria Pardatscher geb. Trost

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Rolle des C-Terminus in der Regulation der TRPC5-Kanäle

von Franziska Maria Pardatscher geb. Trost

aus Oberndorf a. N.

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Hermann Ammer

Angefertigt am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Mentor: Prof. Dr. rer. nat. Michael Mederos y Schnitzler

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Korreferent: Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Calciumsignalwege	3
1.1.	Intrazelluläre Calciumspeicherung und Calciumtransport aus dem Zytoplasma	3
1.2.	Calciumstrom in das Zytoplasma	4
2.	Die TRP-Überfamilie	9
2.1.	Die TRP-Melastatin-Familie	12
2.2.	Die TRP-Vanilloid-Familie	14
2.3.	Die TRP-Ankyrin-Kanalfamilie	19
2.4.	Die klassischen TRP-Kanäle	20
2.4.1.	TRPC1	23
2.4.2.	TRPC2	24
2.4.3.	TRPC3/6/7	24
2.4.4.	TRPC4/5	27
2.4.4.1.	Vorkommen und physiologische Relevanz des TRPC5	29
2.4.4.2.	Biophysikalische Eigenschaften des TRPC5	30
2.4.4.3.	Die Rolle der PKC und des DAGs	37
3.	Zielsetzung	40
III.	MATERIAL UND METHODEN	42
1.	Zielgerichtete Mutagenese	42
1.1.	Material	45
1.2.	Primerdesign und -herstellung	47
1.3.	Die Polymerase-Kettenreaktion	47
1.4.	DpnI-Verdau	48
2.	Klonierung	48
2.1.	Material	49
2.2.	Durchführung	50
2.2.1.	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA	50

2.2.2.	Extraktion der DNA aus dem Agarosegel	52
2.2.3.	Dephosphorylierung	52
2.2.4.	Ligation	52
3.	Transformation	53
4.	3-ml-Bakterienkultur und DNA-Extraktion	53
5.	Kontrollverdau	53
6.	Agarose-Gelelektrophorese	54
6.1.	Material	54
6.2.	Durchführung	54
7.	Sequenzierung	55
8.	250-ml-Bakterienkultur	56
9.	Zellkultur	56
9.1.	Material	56
9.2.	Kultivierung der humanen Zelllinie HEK293T	56
9.3.	Transfektion	57
10.	Elektrophysiologie	57
10.1.	Material	58
10.2.	Der Messstand	59
10.3.	Das Perfusionssystem mittels Gravitation	60
10.4.	Herstellung der Patchpipette	62
10.5.	Herstellung der Bad- und Pipettenlösungen	62
10.6.	Durchführung der Messung	63
10.6.1.	Auswahl der Zelle	63
10.6.2.	Die Positionierung der Pipette	63
10.6.3.	Die Offset-Korrektur	63
10.6.4.	Das Diffusionspotential	64
10.6.5.	Die Etablierung des „Gigaseals“	64
10.6.6.	Die Ganzzelleleitung	65
10.6.7.	Das Messverfahren	67
10.6.8.	Auswertung der Messungen	67

IV.	ERGEBNISSE	68
1.	Molekularbiologie	68
1.1.	Mutagenese	68
1.2.	Klonierung	70
2.	Elektrophysiologische Untersuchungen zur DAG-Sensitivität des TRPC5 und TRPC6	71
2.1.	Untersuchungen zur DAG-Sensitivität des Wildtyp-mTRPC5	72
2.2.	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972A	80
2.3.	Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972E	81
2.4.	Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A	88
2.5.	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC6-S846G	94
2.6.	Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752D	95
2.7.	Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A-T972E	98
2.8.	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752D-T972A	101
2.9.	Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A-T972A	103
2.10.	Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit von mTRPC5-S752D-T972D	107
2.11.	Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S666A	109
2.12.	Das Verhalten des mTRPC5-E598D auf Lanthanchlorid	111
V.	DISKUSSION	114
1.	Die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 unter Überexpression einer NHERF1-Patientenmutante	114
2.	Die DAG-Aktivierbarkeit unter Rezeptorüberexpression	119
3.	Die Unterdrückung der DAG-Aktivierbarkeit bei NHERF-Überexpression	124
4.	Die regulative Funktion der PKC	125
4.1.	Die Rolle des Serins an der Position 752 des TRPC5-Kanals	128
5.	Die Aktivierbarkeit des TRPC5 durch PIP₂-Depletion	132
5.1.	Der Einfluss von Spektrin auf den TRPC5	133

5.2.	Die Bindung des SESTD1 an den TRPC5	139
6.	Die fehlende Aktivierbarkeit von mTRPC5-S666A	141
7.	Die mTRPC6-S846G-Mutation	142
8.	Physiologische Relevanz und TRPC5-Aktivierungsmodell	142
9.	Die E598D-Mutation	146
10.	Ausblick	150
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	153
VII.	SUMMARY	155
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	155
X.	DANKSAGUNG	192

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Der Calciumsignalweg	S. 6
Abb. 1.2	Die Klassifizierung der Ionenkanäle	S. 8
Abb. 1.3	Der phylogenetische Stammbaum der TRP-Überfamilie	S. 11
Abb. 1.4	Der Öffnungsmechanismus des TRPV1-Kanals	S. 17
Abb. 1.5	Schematischer Aufbau eines TRPC-Kanals	S. 20
Abb. 1.6	Aminosäurevergleich der TRPC-Kanäle	S. 22
Abb. 1.7	Aufbau des TRPC5-Kanals	S. 28
Abb. 1.8	Stromspannungskurve des TRPC5-Kanals	S. 32
Abb. 1.9	Die Synthese und der Abbau von PIP ₂	S. 36
Abb. 1.10	Die Wechselwirkung zwischen DAG/PKC und TRPC3/5	S. 38
Abb. 2.1	Ablauf der ortsspezifischen Mutagenese	S. 44
Abb. 2.2	Der mTRPC5 pcDNA3 Vektor	S. 51
Abb. 2.3	Ergebnis einer Gelelektrophorese	S. 55
Abb. 2.4	Aufbau eines Patch-Clamp-Messstandes	S. 60
Abb. 2.5	Aufbau einer Messkammer	S. 61
Abb. 2.6	Schematische Darstellung der Ganzzell-Konfiguration	S. 65
Abb. 3.1	Vergleich phosphomimetischer Aminosäuren mit Phosphoserin und Phosphothreonin	S. 68
Abb. 3.2	Verwendete nicht phosphorylierbare Aminosäuren	S. 69
Abb. 3.3	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5	S. 73

Abb. 3.4	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5 unter PKC-Inhibition und bei Rezeptorüberexpression	S. 74
Abb. 3.5	Die Auswirkung der Phosphatasehemmung auf die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5	S. 76
Abb. 3.6	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5 unter PIP ₂ -Depletion	S. 77
Abb. 3.7	Der Abbau von PIP ₂ zu PI bewirkt eine DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5	S. 79
Abb. 3.8	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972A	S. 81
Abb. 3.9	Vergleich der DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972E ohne und mit Rezeptorüberexpression	S. 82
Abb. 3.10	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972E unter PKC-Inhibition und NHERF1 E68A Koexpression	S. 84
Abb. 3.11	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972E durch PIP ₂ -Depletion	S. 85
Abb. 3.12	Vergleich der DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972E und -T972D	S. 87
Abb. 3.13	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A ohne und mit Rezeptorüberexpression	S. 89
Abb. 3.14	Die Wirkung endogenen DAGs auf mTRPC5-S752A	S. 90
Abb. 3.15	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A unter PKC-Inhibition und in Koexpression mit NHERF1 E68A	S. 92
Abb. 3.16	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A durch PIP ₂ -Depletion	S. 93
Abb. 3.17	MTRPC6 ist DAG-sensitiv	S. 95

Abb. 3.18	Das Wildtyp-ähnliche Verhalten des mTRPC5-S752D ohne und mit Rezeptorüberexpression in Bezug auf die DAG-Aktivierbarkeit	S. 96
Abb. 3.19	Das Wildtyp-ähnliche Verhalten des mTRPC5-S752D unter PKC-Inhibition in Bezug auf die DAG-Aktivierbarkeit	S. 98
Abb. 3.20	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A-T972E ohne und mit Rezeptorüberexpression	S. 99
Abb. 3.21	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A-T972E unter PIP ₂ -Depletion	S. 101
Abb. 3.22	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752D-T972A	S. 102
Abb. 3.23	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A-T972A ohne und mit Rezeptorüberexpression	S. 104
Abb. 3.24	Messungen des mTRPC5-S752A-T972A mit Wortmannin und NHERF1 E68A	S. 106
Abb. 3.25	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752D-T972D ohne und mit Rezeptorüberexpression	S.107
Abb. 3.26	Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752D-T972E	S. 109
Abb. 3.27	Die Funktionalität des mTRPC5 S666A	S. 110
Abb. 3.28	Die Hemmung des mTRPC5-E598D-S752D und -E598D durch LaCl ₃	S. 112
Abb. 4.1	Aufbau von NHERF1	S. 115
Abb. 4.2	Die Deletion des TRL-Motivs verhindert die NHERF1-Bindung im TRPC4	S. 116
Abb. 4.3	Endogenes NHERF1 ist in Anwesenheit eines überexprimierten Rezeptors nicht mehr an mTRPC5	S. 122

	gebunden	
Abb. 4.4	Die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 bei Rezeptorüberexpression	S. 123
Abb. 4.5	NHERF1 beeinflusst die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5	S. 124
Abb. 4.6	Die Inhibition der PKC führt zur DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5	S. 127
Abb. 4.7	Die Rolle der Phosphatasen in der DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5	S. 131
Abb. 4.8	Aufbau eines α - und β -Spektrin-Dimers	S. 134
Abb. 4.9	Serin 752 ist eine kritische Determinante für die Konformationsänderung des C-Terminus	S. 136
Abb. 4.10	Die PIP ₂ -Depletion bewirkt die DAG-Aktivierbarkeit durch Ablösung des Spektrins vom TRPC5	S. 139
Abb. 4.11	Der Aufbau von SESTD1 und dessen Bindestelle im TRPC4 und TRPC5	S. 140
Abb. 4.12	Die Rolle der Phosphatasen im Aktivierungsmechanismus des TRPC5	S. 143
Abb. 4.13	Aktivierungsmodell des TRPC5	S. 145
Abb. 4.14	Vergleich des Aufbaus von Glutamin, Glutamat und Aspartat	S. 147
Abb. 4.15	Die Lokalisation von E543, E595 und E598 im TRPC5	S. 148
Abb. 4.16	Vergleich der Hemmung durch LaCl ₃ von E595Q/E598Q und E598D	S. 149

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1	Herkunft der verwendeten DNA-Vorlagen	S. 45
Tab. 2.2	Parameter zur Erstellung von Mutageneseprimer	S. 47
Tab. 3.1	Benötigte Anlegetemperaturen für die Mutagenesen	S. 70
Tab. 3.2	Übersicht über die durch Klonierung hergestellten Konstrukte	S. 70
Tab. 4.1	Bindungspartner der PDZ1-Domäne von NHERF1	S. 115
Tab. 4.2	Literaturübersicht zu den rezeptor- bzw. speicherregulierten Eigenschaften des TRPC4 und TRPC5	S. 120

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CIRB	Calmodulin/Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor-Bindestelle
DAG	Diacylglycerol
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
NHERF	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher Regulationsfaktor
OAG	1-Oleoyl-2-Acetyl- <i>sn</i> -Glycerol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
SESTD1	Sec14- und Spektrindomänen 1
STIM1	Stromale Interaktionsmolekül 1
TRP	Transient-Rezeptor-Potential
TRPA	Ankyrin-TRP
TRPC	Klassischer TRP
TRPM	Melastatin-TRP
TRPML	Mukolipin-TRP
TRPN	Nicht-Mechanorezeptor-Potential-C-TRP
TRPP	Polycystin TRP
TRPV	Vanilloid-Rezeptor-TRP

I. EINLEITUNG

Die Überfamilie der Transient-Rezeptor-Potential-(TRP)-Kationenkanäle besteht aus sieben Familien, die in vielen verschiedenen zellulären Prozessen, in der Zellkontraktion, in der Proliferation, in der Perzeption und Transduktion von äußeren oder körpereigenen Reizen sowie beim Zelltod eine wichtige Rolle spielen. Die Diversität und Bedeutung dieser TRP-Überfamilie im Organismus hat diese Überfamilie in den letzten beiden Jahrzehnten zu einem wichtigen Forschungsobjekt gemacht. So verschieden die physiologischen Funktionen dieser Kationenkanäle im Organismus sind, so verschieden sind auch ihre Aktivierungsmechanismen. Einige werden durch äußere Reize wie Hitze, Kälte oder Druck aktiviert, andere durch chemische Reize oder den Anstieg von intrazellulärem Calcium. Manche Mitglieder, wie beispielsweise der Vanilloid-Rezeptor-TRP-Kanal 5, haben eine hohe Selektivität für Calcium, während andere unspezifisch Kationen leiten. Bei manchen TRP-Kanälen wiederum ist der genaue Aktivierungsmechanismus noch nicht bekannt.

Zu diesen Kanälen zählt auch der klassische TRP-Kanal 5, welcher in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Die klassische TRP-(TRPC)-Familie erhielt ihren Namen aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu den *Drosophila*-TRP-Kanälen, welche als erstes entdeckt wurden. Es handelt sich um einen nichtselektiven Kationenkanal, der vor allem im Gehirn exprimiert wird (Riccio et al. 2002). Er beeinflusst dort die Länge und den Umfang der Wachstumskegel und die Gefäßpermeabilität (Tirupathi et al. 2002b; Greka et al. 2003). Außerdem zeigten TRPC5-gendefiziente Mäuse ein reduziertes Angstverhalten (Riccio et al. 2009).

Der TRPC5 wird in Abhängigkeit von der Phospholipase C (PLC) durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Eine Aktivierung der PLC führt zu einer Spaltung des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphats (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃). Es ist bekannt, dass DAG die TRPC-Kanäle 3,6 und 7 direkt aktivieren kann, nicht jedoch die TRPC-Kanäle 4 und 5 (Venkatachalam et al. 2003). IP₃ hingegen bewirkt die Entleerung von intrazellulären Calciumspeichern. Es herrschen Kontroversen darüber, ob der TRPC5 durch den Anstieg von intrazellulärem Calcium aktiviert werden kann oder nicht (Ma et al. 2008; Saleh et al. 2008; Zhu et al. 2005; Schaefer et al. 2000). Dieser mögliche

Aktivierungsmechanismus scheint jedoch eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dadurch stellt sich die Frage nach dem Signalweg, der zur TRPC5-Kanalaktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren führt.

Die Aufklärung des genauen Aktivierungsmechanismus ist wichtig für ein tieferes Verständnis der Funktion des TRPC5-Kanals im Säugetierorganismus. Da der nahverwandte TRPC4-Kanal vermutlich auf die gleiche Weise aktiviert wird, ist dieses Wissen auch für den TRPC4-Kanal von Bedeutung.

Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob und unter welchen Bedingungen der TRPC5-Kanal durch den sekundären Botenstoff DAG, der durch die Spaltung von PIP_2 entsteht, aktivierbar ist.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Calciumsignalwege

Calciumionen spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Mechanismen. So regulieren sie beispielsweise die Exozytose von Neurotransmittern in Nervenzellen (Miledi 1973; Houy et al. 2013), die Genexpression (Bading et al. 1993) und die Erregbarkeit von glatten Muskelzellen (Berridge et al. 2000). Aufgrund der vielfältigen Aufgaben der Calciumionen muss der zytoplasmatische Calciumhaushalt streng reguliert werden. Im Zytoplasma herrscht eine sehr niedrige freie Calciumkonzentration mit ca. 10 bis 100 nM. Hingegen finden sich mit ca. 1 bis 2 mM deutlich höhere Calciumkonzentrationen im extrazellulären Raum und in den intrazellulären Calciumspeichern wie in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum befindet sich die Calciumkonzentration im mikro- bis milimolaren Bereich (Kendall et al. 1992; Kendall et al. 1996; van der Kant, Rik und Neefjes 2014). Somit herrschen enorme Calciumgradienten zwischen Zytoplasma und Extrazellularraum sowie zwischen Zytoplasma und den intrazellulären Calciumspeichern. Nachfolgend sollen die wichtigsten Mechanismen der zellulären Calciumregulation erläutert werden (Pozzan et al. 1994; Clapham 1995, Meldolesi und Pozzan 1998a, 1998b, Berridge et al. 2000).

1.1. Intrazelluläre Calciumspeicherung und Calciumtransport aus dem Zytoplasma

Die Aufrechterhaltung und die Wiederherstellung eines niedrigen Calciumgehalts im Zytosol ist eine entscheidende Voraussetzung, damit calciuminduzierte Mechanismen beendet werden können und die Zelle von neuem durch eine erhöhte freie intrazelluläre Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) stimuliert werden kann. Die intrazelluläre Calciumspeicherung erfolgt vor allem im endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulum, wobei auch andere Zellorganellen zur Calciumspeicherung dienen können, wie z.B. das Mitochondrium, der Golgi-Apparat oder das sekretorische Granulum (Pozzan et al. 1994). Im Zytosol befinden sich calciumbindende Proteine, wie z.B. Calmodulin, Calbindin und Calretinin, welche Calcium binden und bei Bedarf wieder freisetzen können (Faas und Mody 2012). Der

Transport in die Zellorganellen erfolgt durch die sarkoplasmatische Calcium-ATPase (Heilmann et al. 1985; Misquitta et al. 1999). Eine weitere P-Typ-ATPase, die Calciumpumpe in der Plasmamembran, transportiert Calciumionen in den Extrazellularraum (Penniston und Enyedi 1998). P-Typ-ATPasen stellen eine Gruppe unterschiedlicher Ionen- und Phospholipidtransporter dar, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass ihre Affinität für Ionen durch die Autophosphorylierung bzw. -dephosphorylierung eines konservierten Aspartatrestes bestimmt wird (Bublitz et al. 2011). Die Pumpe transportiert nicht nur zytosolische Calciumionen heraus, sondern hemmt zudem die weitere Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum, indem sie PIP_2 reversibel bindet und damit den Abbau durch die PLC zu IP_3 verhindert (Penniston et al. 2014). In der äußeren Zellmembran sowie in der Membran innerer Zellkompartimente nahezu aller Zellen befinden sich Natrium-Calcium-Austauscher, die den Calciumausstrom durch einen passiven Natriumeinstrom im Verhältnis eins zu drei (ein Calciumion gegen drei Natriumionen) ermöglichen (Blaustein und Lederer 1999; Nita et al. 2015). Von Bedeutung ist dieser Natrium-Calcium-Austausch vor allem in erregbaren Zellen wie z.B. Herzmuskelzellen, da der ungleiche Austausch an Ladungen (vier positive rein gegen drei positive raus) zu einer Depolarisation der Zelle führt (Blaustein und Lederer 1999, DiPolo und Beaugé 2006).

1.2. Calciumeinstrom in das Zytoplasma

Calciumeströme in das Zytoplasma finden statt, wenn eine Zelle von einem Ruhezustand in einen erregten Zustand übergeht. Calciumeströme können entweder aus dem Extrazellularraum erfolgen oder aus internen Calciumspeichern. Aus den internen Speicher wird Calcium hauptsächlich über die Ryanodin-Rezeptoren und über die Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptoren (IP_3 -Rezeptoren) transportiert (Striggo und Ehrlich 1996; Xu et al. 1994). Die Ryanodin-Rezeptorfamilie wird in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums exprimiert. Ihren Namen erhielt die Rezeptorfamilie aufgrund des potenten und selektiven Blocks durch das pflanzliche Alkaloid Ryanodin aus dem südamerikanischen Weidengewächs *Ryania speciosa*. Mitglieder dieser Rezeptorfamilie können sowohl durch zyklische ADP-Ribose, Koffein, als auch durch eine erhöhte Calciumkonzentration aktiviert werden. Letzteres wird als calciuminduzierte Calciumfreisetzung bezeichnet (Ozawa 2010). Die IP_3 -Rezeptorfamilie bewirkt die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen

Retikulum. Die Rezeptoren werden durch den intrazellulären Botenstoff IP_3 aktiviert, welcher wiederum durch den Abbau von PIP_2 entsteht (Michikawa et al. 1996).

Die Calciumeinströme aus dem Extrazellularraum erfolgen über calciumleitende Kanäle in der Plasmamembran. Zunächst bindet ein extrazellulärer Ligand an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor oder an eine Rezeptortyrosinkinase, wodurch die PLC_β bzw. PLC_γ aktiviert wird. Die PLC baut das membranständige PIP_2 zu IP_3 und Diacylglycerol (DAG) ab. IP_3 bindet an den IP_3 -Rezeptor und führt zu einer Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche durch Phosphorylierungen die Kanalaktivität von calciumleitenden Kanälen regulieren kann. Die Aktivierung dieser Kanäle bewirkt einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum ins Zytosol (Yang et al. 2013b; Putney und Bird 1993; Patterson et al. 2005). Die calciumleitenden Kanäle können einerseits aufgrund ihrer Aktivierungsmechanismen in spannungs-, liganden-, rezeptor- und speichergesteuerte Kanäle unterteilt und andererseits aufgrund ihrer Calciumpermeation im Vergleich zu ihrer Natriumpermeation charakterisiert werden. Es kann dabei unterschieden werden zwischen nichtselektiven Kationenkanälen, welche sowohl Natrium- als auch Calciumionen leiten, und selektiven Kationenkanälen, welche entweder Natrium- oder Calciumionen selektiv leiten. Die Selektivität eines Kanals wird mit dem Permeabilitätsquotienten $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}}$ angegeben und zeigt, wie viele Calciumionen im Vergleich zu Natriumionen durch den Kanal geleitet werden.

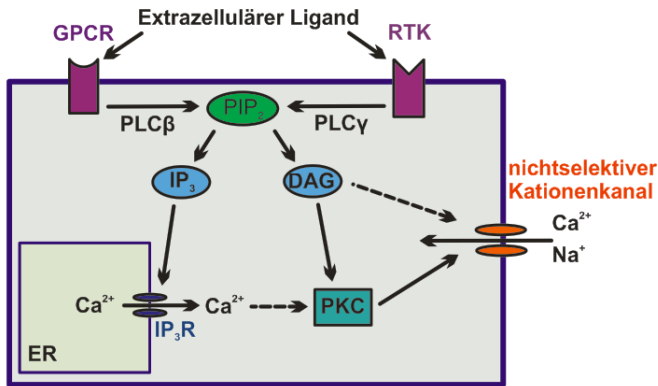


Abbildung 1.1: Der Calciumsignalweg

Nach dem Binden eines extrazellulären Liganden aktivieren die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) bzw. die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) die Phospholipasen PLCβ bzw. PLCγ, welche wiederum PIP₂ in IP₃ und DAG spaltet. IP₃ führt zum Calciumausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) über den IP₃-Rezeptor (IP₃-R). DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC, Aktivierung durch Pfeil dargestellt), welche die Aktivierbarkeit von nichtselektiven Kationenkanälen in der Membran beeinflussen kann. Auch DAG selbst kann nichtselektive Kationenkanäle aktivieren (gestrichelter Pfeil), wie z.B. den TRPC6-Kanal (s. Kap. 2.4).

Unter spannungsregulierten Ionenkanälen versteht man Ionenkanäle, die über eine Depolarisation der Membran aktiviert werden. Ein Vertreter dieser Familie stellt der L-Typ spannungsgesteuerte Calciumkanal Ca_v1.2 dar, der unter anderem eine große Rolle in T-Lymphozyten, im ZNS, im Herzmuskel und in der glatten vasculären Muskulatur spielt (Hofmann et al. 2014). Wird ein Ionenkanal durch die Bindung eines Liganden aktiviert, bezeichnet man diesen als ligandengesteuert. So wird beispielsweise der ionotropen P₂X₄-Rezeptor durch die Bindung von Adenosin-5'-Triphosphat aktiviert (Samways et al. 2014). Vergleichend dazu bezeichnet man einen Kanal als rezeptorgesteuert, wenn der Kanal durch einen sekundären Botenstoff aktiviert wird, der über eine Rezeptorstimulation freigesetzt wurde. Ein Vertreter dieser Gruppe stellt der klassische, nichtselektive Kationenkanal TRPC6 aus der TRP-

Überfamilie dar, der durch DAG aktiviert wird. Speicherregulierte Ionenkanäle werden wiederum durch die Ausschüttung von Calcium aus intrazellulären Speichern aktiviert (Berridge et al. 2000). Hierbei dient das sogenannte stromale Interaktionsmolekül 1 (STIM1), welches im endoplasmatischen Retikulum exprimiert wird, als Calciumsensor. Dieses Protein besitzt einen calciumsensiblen Teil im N-Terminus, welcher in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums hineinragt und Calcium durch negative Carboxygruppen der Aminosäuren Glutamat und Aspartat bindet. Der lange zytosolische C-Terminus interagiert mit dem durch Calciumfreisetzung aktivierten Calciummodulator in der Plasmamembran, der im Englischen als „Orai“ bezeichnet wird. Sinkt der Calciumgehalt im endoplasmatischen Retikulum, führt dies zu einer Ablösung des gebundenen Calciums am N-Terminus von STIM1, wodurch die Stabilität verloren geht und es zu einer Translokation von STIM1 kommt. STIM1 nähert sich der Plasmamembran, in welcher der durch Calciumfreisetzung aktivierte Calciummodulator vorliegt. Dieser Calciummodulator ist eine Untereinheit der speicherregulierten Ionenkanäle und besitzt vier transmembranäre Domänen, sowie zytosolische N- und C-Termini, welche mit STIM1 interagieren. Durch die Bindung von STIM1 geht der Calciummodulator in eine aktive Form über, welche Calcium 1000fach selektiver leitet als Natrium (Fahrner et al. 2013; Prakriya 2013; Shaw et al. 2013). Eine Kanalfamilie, bei der manche Mitglieder als speicherreguliert beschrieben worden sind, ist die TRP-Überfamilie, auf die nun näher eingegangen werden soll.

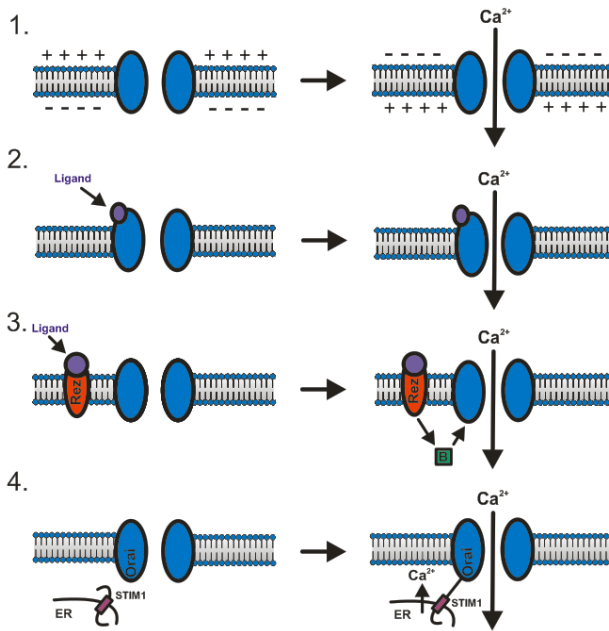


Abbildung 1.2: Die Klassifizierung der Ionenkanäle

Die spannungsgeregulierten Ionenkanäle (1.) werden durch eine Membrandepolarisation der Plasmamembran aktiviert (siehe „+“ und „-“). Ligandengesteuerte Kanäle (2.) werden durch eine direkte Bindung eines Liganden aktiviert. Bindet ein Ligand zunächst an einem Rezeptor („Rez“), dessen intrazellulärer Botenstoff („B“ mit grünem Kästchen) den Kanal aktiviert, bezeichnet man ihn als rezeptorgesteuert (3.). Speichergesteuerte Kanäle (4.) werden durch die Ausschüttung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum („ER“) aktiviert. Ein Calciumkonzentrationsabfall im Endoplasmatischen Retikulum („ER“) bewirkt eine Konformationsänderung des Calciumsensors STIM1, die zu einer direkten und aktivierenden Interaktion mit der Kanaluntereinheit Orai in der Plasmamembran führt.

2. Die TRP-Überfamilie

Die Entdeckung der TRP-Überfamilie begann 1969 bei Untersuchungen zur Taufliege *Drosophila melanogaster* (Cosens und Manning 1969). Bei diesen Untersuchungen fiel auf, dass eine Mutante der Taufliege sich in hellem Licht wie blind verhielt und eine starke Veränderung im Elektoretinogramm aufwies. So führten anhaltende Lichtreize nicht zu den zu erwartenden langanhaltenden, sondern zu transienten retinalen Feldpotentialen. Diese Entdeckung führte später zur Namensgebung „Transient-Receptor-Potential“ (Minke et al. 1975). Weitere Studien, unter anderem die Entdeckung, dass unspezifische Calciumkanalblocker wie dreiwertige Lanthan-Kationen im mikromolaren Konzentrationsbereich zum gleichen Phänotyp führen wie die TRP-Mutante von Cosens und Manning (Suss-Toby et al. 1991), ließen 1992 den Schluss zu, dass es sich beim TRP-Protein um einen calciumleitenden Ionenkanal in der Plasmamembran handelt (Minke und Selinger 1992; Hardie und Minke 1992). In *Drosophila* wurde ein weiterer calciumleitender Ionenkanal entdeckt, welcher aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zum TRP-Kanal als TRP-ähnlich bezeichnet wurde (Phillips et al. 1992; Montell 1997).

1995 wurde mit TRPC1 der erste TRP-Kanal eines Wirbeltiers sequenziert, weitere folgten (Zhu et al. 1995; Wes et al. 1995). Heute sind 28 (Maus) bzw. 27 (Mensch) Gene der TRP-Überfamilie bekannt (s. Abb. 1.3). Die TRP-Überfamilie besteht aus sieben Familien: die klassische bzw. kanonische TRP-Familie (TRPC), die Melastatin-TRP-Familie (TRPM), die Vanilloid-Rezeptor-TRP-Familie (TRPV), die Ankyrin-TRP-Familie (TRPA), die Nicht-Mechanorezeptor-Potential TRP-Familie (TRPN), die Polycystin-TRP-Familie (TRPP) und die Mukolipin-TRP-Familie (TRPML). Die TRPN-Familie ist die einzige, welche nicht in Säugetierzellen vorkommt. In Zebrafischen wird der TRPN-Kanal in sensorischen Haarzellen im Innenohr exprimiert und scheint dort eine wichtige Rolle in der mechanischen Signaltransduktion zu spielen (Sidi et al. 2003). Außerdem ist der Kanal von Bedeutung für die Mechanotransduktion von Vibrationswellen bzw. die Wahrnehmung von Geräuschen in den Larven von *Drosophila melanogaster* (Zhang et al. 2013b). Die TRPP-Familie erhielt ihren Namen dadurch, dass eine Mutation im TRPP-Kanal mit der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung in Verbindung gebracht werden konnte (Mochizuki et al. 1996). Die TRPP-Familie kann in zwei Unterfamilien unterteilt werden: In der Polyzystin-1-Unterfamilie besitzen die

drei Mitglieder jeweils elf Transmembrandomänen und haben somit eine sehr geringe Ähnlichkeit zu den anderen TRP-Kanälen. Die Polyzystin-2-Unterfamilie besteht aus drei Mitgliedern, welche sechs Transmembrandomänen besitzen. Mutationen in beiden Unterfamilien können zur polyzystischen Nierenerkrankung führen. Es wird vermutet, dass die beiden Unterfamilien über ihre C-Termini eine Verbindung eingehen und zusammen einen funktionellen calciumleitenden Kanal bilden (Bertuccio und Caplan 2013). Die TRPML-Familie hat drei Mitglieder, TRPML1-3, und wird vor allem intrazellulär in Endosomen und Lysosomen exprimiert (Grimm et al. 2014). TRPML1 ist mit der Erbkrankheit Mukopolidose Typ IV assoziiert, welche mit motorischen Störungen, Verzögerungen in der mentalen Entwicklung und ophthalmologischen Symptomen wie z. B. Retinadegeneration einhergeht (Venugopal et al. 2007). TRPML2 wird vor allem in Immunzellen wie Lymphozyten exprimiert, während TRPML3 wichtig für den Hör- und Gleichgewichtssinn zu sein scheint, da eine Funktionsverlustmutation in diesem Protein bei Mäusen zu Taubheit und Drehschwindel führt (Grimm et al. 2014).

Allen TRP-Kanälen gemeinsam sind sechs transmembranäre Domänen, zytosolische C- und N-Termini und ihre Kationenpermeabilität (Clapham et al. 2001; Montell 2001; Venkatachalam und Montell 2007b). Die Kristallstruktur eines TRP-Mitgliedes, des TRPV1-Kanals, konnte bereits entschlüsselt werden. TRPV1-Kanäle bilden Tetramere mit einer porenbildenden Region zwischen den Transmembrandomänen V und VI (Liao et al. 2013a). Es kann vermutet werden, dass alle Mitglieder der TRP-Überfamilie einen ähnlichen Aufbau aufweisen. In den folgenden Kapiteln soll auf die Mitglieder nun näher eingegangen werden.

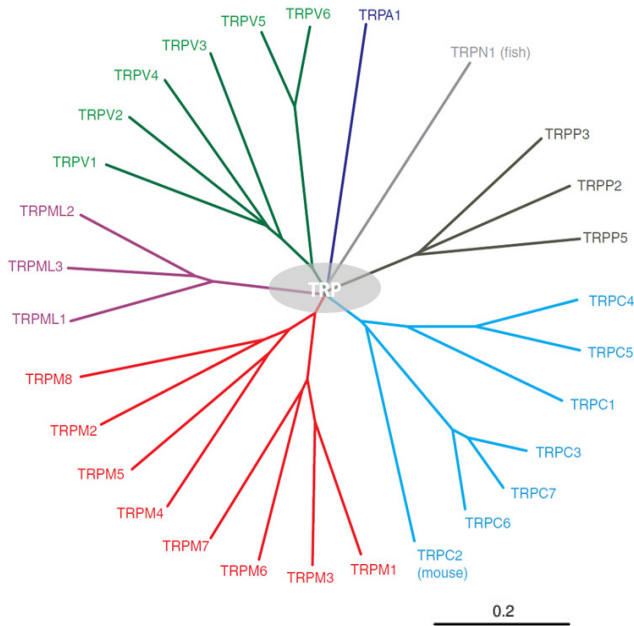


Abbildung 1.3: Der phylogenetische Stammbaum der TRP-Familie

Mit Hilfe eines Aminosäurevergleichs der porenbildenden Kanaluntereinheiten wird die TRP-Überfamilie in sieben Familien unterteilt: Sechs Vanilloid-Rezeptor-Kanalproteine bilden die TRPV-Familie (grün). Das Ankyrin-Kanalprotein stellt die TRPA-Familie (dunkelblau, „TRPA1“) und das Nicht-Mechanorezeptor-Potential-C-Kanalprotein die TRPN-Familie (grau, „TRPN1“) dar. Die drei Polycystin-Kanalproteine bilden die TRPP-Familie (olivgrün). Die sieben klassischen oder kanonischen Kanalproteine bilden die TRPC-Familie (hellblau). Die acht Melastatin-Kanalproteine bilden die TRPM-Familie (rot) und die drei Mucolipin-Kanalproteine die TRPML-Familie (violett). TRPN1 kommen nicht in Säugetierzellen vor. Exemplarisch wird hier TRPN1 vom Fisch dargestellt. Die Skala rechts unten gibt die phylogenetische Distanz von 0,2 Substitutionen pro 100 Aminosäuren wieder. Quelle: Nilius und Owsianik (2011).

2.1. Die TRP-Melastatin-Familie

Diese Familie besitzt acht Kanalprotein-Mitglieder und lässt sich aufgrund von Sequenzhomologien in vier Unterfamilien unterteilen: TRPM1/3, TRPM2/8, TRPM6/7. Sie ist gekennzeichnet durch lange C- und N-Termini, eine TRPM-Homologiedomäne im N-Terminus und eine TRP-Domäne nahe der Transmembrandomäne VI am C-Terminus (Fleig und Penner 2004; Harteneck 2005; Pedersen et al. 2005; Venkatachalam und Montell 2007a).

Die Gruppe ist benannt nach seinem ersten Vertreter, Melastatin1, welcher in Melanozyten und bipolaren Zellen der Retina exprimiert wird (Oancea et al. 2009; Koike et al. 2010). Melastatin1 wird als Tumormarker bei Melanomen verwendet, da die Tendenz zu Metastasen mit steigender Expressionsrate des TRPM1 sinkt (Duncan et al. 1998). Pferde mit dem Tigerschecken-Komplex, sog. Appaloosa-Pferde, exprimieren weniger Melastatin1 in den Melanozyten, was darauf hindeutet, dass Melastatin1 wichtig für die Melanogenese ist (Bellone et al. 2010). In den retinalen Bipolarzellen wird Melastatin1 negativ reguliert durch den metabotropen Glutamatrezeptor. In der Dunkelheit bewirkt die Bindung von Glutamat an den metabotropen Glutamatrezeptor eine Aktivierung von G_o-gekoppelten Rezeptoren. Die Aktivierung der G_o-gekoppelten Rezeptoren hemmt den Melastatin1-Ionenkanal, auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist. Bei Lichteinfall entfällt dieser hemmende Effekt und der Melastatin1-Kanal ist offen (Shen et al. 2012). Mutationen im humanen Melastatin1-Kanal bewirken die kongenitale, stationäre Nachtblindheit (Audo et al. 2009). Der zweite Vertreter, TRPM2, hat als Besonderheit die enzymatisch aktive Adenosindiphosphat-Ribose-Pyrophosphatase am C-Terminus. Durch dieses Enzym wird Adenosindiphosphat-Ribose phosphoryliert und der TRPM2-Kanal aktiviert (Perraud et al. 2001). Eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration verstärkt die Sensitivität des TRPM2 gegenüber Adenosindiphosphat-Ribose, wobei intrazelluläres Calcium auch unabhängig von der Adenosindiphosphat-Ribose den TRPM2-Kanal aktivieren kann (McHugh et al. 2003). Weitere Aktivatoren stellen reaktive, sauerstoffhaltige Substanzen wie H₂O₂ dar, welche durch TRPM2 zum Zelltod führen können (Eisfeld und Lückhoff 2007; Lange et al. 2009; Jiang et al. 2010). Es wird vermutet, dass die Aktivierung des TRPM2 an der Entstehung von Morbus Alzheimer sowie an der Entstehung von Nierenschäden durch Minderdurchblutung beteiligt ist (Gao et al. 2014; Ovey und

Naziroğlu 2014). Der TRPM3-Kanal hat eine Vielfalt an verschiedenen Isoformen, die hauptsächlich durch alternatives Spleißen entstehen (Oberwinkler und Philipp 2007). Es sind noch nicht alle Spleißvarianten untersucht, jedoch konnte bereits festgestellt werden, dass sich die biophysikalischen Eigenschaften zwischen den Varianten sehr unterscheiden können. Die Spleißvarianten TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 beispielsweise, welche sich in der porenbildenden Region unterscheiden, zeigen eine unterschiedliche Selektivität für Ionen: TRPM3 α 1 ist kaum durchlässig für divalente Ionen, TRPM3 α 2 dagegen ist für Calcium und Magnesium durchlässig und wird von monovalenten Ionen geblockt (Oberwinkler et al. 2005). Eine weitere Spleißvariante zeigt keine Ionenströme, macht jedoch bis zu 15% der exprimierten TRPM3 aus, wodurch eine regulative Funktion dieser Variante vermutet wird (Frühwald et al. 2012). Die Spleißvarianten unterscheiden sich auch im Aktivierungsmechanismus: Die Spleißvariante TRPM3₁₃₂₅ (1325 Basenpaare lang) ist mechanosensitiv und kann durch Sphingosine aktiviert werden, während der heterolog exprimierte TRPM3 α sowohl speicher- als auch rezeptorreguliert ist (Lee et al. 2003; Oberwinkler et al. 2005). Eine Mutation im TRPM3, von der es zwei Spleißvarianten gibt, resultiert vermutlich in ein erbliches Glaukom und einen erblichen Katarakt (Bennett et al. 2014). Neben einer Rolle in der Entwicklung des Auges, ist der TRPM3-Kanal wichtig für die Insulinsekretion in Pankreaszellen, der Wahrnehmung von schadhafter Hitze und dem Calciumeintritt bei Zellschwellung (Harteneck 2007; Vriens et al. 2011; Thiel et al. 2013). Der TRPM4-Kanal ist zusammen mit dem TRPM5-Kanal ebenfalls wichtig für die Insulinsekretion. Eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration in den B-Zellen der Pankreas führt zu einer Depolarisation durch TRPM4- und TRPM5-Ströme, welche dann zu einer Insulinsekretion führt (Cheng et al. 2007; Brixel et al. 2010). Beide Kanäle, TRPM4 und TRPM5, können durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert werden, sowie ausschließlich durch extrazelluläre, monovalente Kationen wie z.B. Natrium (Liman 2007). Im Gegensatz zu TRPM5, welcher nur in der Zunge, dem Dünndarm und dem Magen in größeren Mengen vorkommt, wird der TRPM4 in vielen Geweben exprimiert, unter anderem im Herz, der Prostata, dem Darm und der Pankreas. Zwei Mutationen im TRPM4 sind mit erblichen Herzkrankheiten assoziiert (Kruse und Pongs 2014). Der TRPM4 ist wichtig für die elektrische Erregungsleitung im Herzen, sowie für die Insulinsekretion in Pankreaszellen, die Regulation der Mastzellaktivität, die Konstriktion von Zerebralarterien und die Regulation der respiratorischen

Aktivität (Mironov 2008; Shimizu et al. 2009; Li et al. 2014; Kruse und Pongs 2014). Der TRPM5-Kanal ist in den Geschmacksknospen der Zunge essentiell für die Geschmackswahrnehmung von bitterem, süßem und umami Geschmack sowie im Magen für die chemosensorische Wahrnehmung von Essen (Liman 2007; Widmayer et al. 2012). Im Dünndarm reguliert er die Speichelsekretion durch die Becherzellen (Mitrovic et al. 2013). TRPM6 und TRPM7 sind im Gegensatz zu den anderen TRPM-Kanälen weniger für den Calciumhaushalt wichtig als vielmehr für den Magnesiumhaushalt. So führt eine Mutation im TRPM6-Gen zu einer Hypomagnesämie und sekundär auch zu einer Hypocalcämie. Der Grund dafür ist wahrscheinlich eine mangelnde Resorption in Darm und Niere. TRPM6-gendefiziente Mäuse sterben pränatal oder zeigen eine verzögerte Entwicklung (Voets et al. 2004; Chubanov und Gudermann 2014). TRPM7-gendefiziente Mäuse sterben sogar im frühen Embryonalstadium, was auf eine wichtige Rolle in der frühembryonalen Entwicklung hindeutet (Bates-Withers et al. 2011). Sah et al. (2013) stellten u.a. fest, dass die Entfernung von TRPM7 aus dem embryonalen Herzen vor Tag 9 zu einem kongestivem Herzfehler führt und die Embryonen nur bis zum Tag 11-12 überleben. Beiden Kanälen, TRPM6 und TRPM7, ist gemeinsam, dass sie eine Serin-Threonin-Protein-Kinase-Domäne am C-Terminus besitzen. Es wird vermutet, dass in einem heteromeren Verband von TRPM6 und TRPM7 die Kinase die Sensitivität des Verbands gegenüber Magnesium und Adenosintriphosphat reguliert (Zhang et al. 2014). Der TRPM8-Kanal wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert und scheint für das Kälteempfinden von größerer Bedeutung zu sein. In den Endothelzellen der Kornea konnte festgestellt werden, dass niedrige Temperaturen den TRPM8-Kanal aktivieren und zu Tränenfluss führen, um die Hydratation des Kornea zu gewährleisten (Robbins et al. 2012). TRPM8 ist somit der einzige TRPM-Kanal, welcher durch Kälte stimuliert werden kann, sowie durch Substanzen, welche ein Kältegefühl auslösen können wie z.B. Menthol und Icilin (Bautista et al. 2007; Colburn et al. 2007; Dhaka et al. 2007).

2.2. Die TRP-Vanilloid-Familie

Die TRPV-Familie erhielt ihren Namen aufgrund der Entdeckung des ersten Mitglieds, des TRPV1-Kanals, welcher im Gegensatz zu den restlichen Mitgliedern durch Vanilloide aktiviert werden kann (Van Der Stelt 2004). Aufgrund der Struktur und Funktionen kann die Familie in vier Gruppen eingeteilt werden: TRPV1/2,

TRPV3, TRPV4 und TRPV5/6 (Venkatachalam und Montell 2007c).

Der TRPV1-Kanal ist der erste TRP-Kanal, dessen Kristallstruktur bekannt ist. Liao et al. (2013b) stellten mittels elektrischer Kryomikroskopie fest, dass der TRPV1-Kanal als homotetramerer Kanal vorkommt. Wie bei den spannungsabhängigen Kaliumkanälen ordnen sich die vier Kanalproteine so an, dass in der Mitte aus den Transmembrandomänen V und VI und der Porenschleife eine Kanalpore gebildet wird. Die Porenschleife wiederum besteht aus einer Porenhelix und einem Selektivitätsfilter für mono- und divalente Kationen. Nach außen, der Lipidschicht entgegen, befinden sich die Transmembrandomänen I bis IV. Die Transmembrandomänen V und VI sind über eine Helix an die Transmembrandomänen I bis IV gekoppelt. In der Transmembrandomäne IV unterscheiden sich die spannungsabhängigen Kaliumkanäle vom TRPV1: Die Kaliumkanäle besitzen in der Transmembrandomäne IV viele positiv geladene Aminosäuren, Arginin und Lysin, und zusammen mit der C-terminalen Helix der Transmembrandomäne III bildet die Transmembrandomäne IV ein „Paddel“, das sich bei der Aktivierung des Kanals als Einheit bewegt (Butterwick und MacKinnon 2010). Dem TRPV1-Kanal fehlen die positiven Ladungen in der Transmembrandomäne IV und besitzt stattdessen Aminosäuren mit aromatischen Enden. Werden diese aromatischen Aminosäuren durch nicht-aromatische ersetzt, können keine auswertbaren Ionenströme gemessen werden (Jordt et al. 2000; Chung et al. 2008). Die zentrale Kanalpore wird bei allen Ionenkanälen von extrazellulär nach intrazellulär in drei Abschnitte unterteilt: die äußere Kanalpore, der Selektivitätsfilter und die innere Kanalpore. Die Kanalpore der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle besitzt im Querschnitt eine flaschenförmige Figur: Die äußere Pore stellt die Flaschenöffnung dar und der Selektivitätsfilter (TVGYG) den Flaschenhals, der mit 3 Å relativ schmal ausfällt. Die Carboxylgruppen des Tyrosins und Glyzins sind dabei so angeordnet, dass sie die Hydrathülle eines Kaliumions perfekt ersetzen, nicht aber die eines anderen Ions, wodurch die hohe Selektivität der Kaliumkanäle zustande kommt (Valiyaveetil et al. 2006). Der Flaschenbauch wird unterhalb des Selektivitätsfilters durch einen mit Wasser gefüllten Hohlraum gebildet, welcher am Boden von der inneren Pore begrenzt wird. Im Gegensatz dazu ist die Kanalpore des TRPV1-Kanals im Querschnitt trichterförmig ausgebildet: Die äußere Kanalpore weist einen Durchmesser von 5,9 Å auf. Der Selektivitätsfilter ist mit 4,6 Å deutlich weiter als der Filter der spannungsabhängigen Kaliumkanäle und besteht aus nur vier Aminosäuren (Aminosäuren₆₄₃₋₆₄₆ GMGD).

Außerdem liegt der Selektivitätsfilter im Vergleich zum Selektivitätsfilter der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle tiefer in der Kanalpore, also weiter entfernt von der äußeren Pore. TRPV5 und TRPV6 haben eine andere Sequenz als Selektivitätsfilter (TVID bei TRPV5 bzw. TIID bei TRPV6), was ein Grund für die hohe Calciumselektivität dieser beiden Kanäle im Vergleich zu den anderen TRPV-Mitgliedern sein könnte (Vennekens et al. 2000). Die untere Öffnung des Trichters wird von der inneren Pore gebildet. Nicht nur der Aufbau der Kanalpore und der Transmembrandomäne IV unterscheidet sich zwischen TRPV1 und den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen, sondern auch ihr Aktivierungsmechanismus: Die Öffnung der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle findet über die Bewegung der positiv geladenen „Paddel“ statt. Die Paddel bewegen sich bei Depolarisation zur extrazellulären Seite hin und rotieren um 180° . Da die Paddel über eine Helix mit den Transmembrandomänen V und VI verbunden sind, ziehen sie diese in der Bewegung mit und öffnen dadurch die innere Pore. Der Durchmesser der äußeren Pore und des Selektivitätsfilters bleiben unverändert (Grizel et al. 2014). Für die Öffnung des TRPV1-Kanals ist hingegen nicht die Bewegung der Transmembrandomäne IV von Bedeutung, vielmehr bildet diese mit den Transmembrandomänen I bis III einen statischen Komplex (s. Abb. 1.4) (Cao et al. 2013). Stattdessen bewegt sich die Porenhelix vom Zentrum der Pore weg nach außen, wodurch sich der Selektivitätsfilter um 3 \AA auf $7,6 \text{ \AA}$ weitet. Diese Bewegung hat die Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen E600 und Y653 und D654 zur Folge, wodurch die Aufweitung der äußeren Kanalpore und des Selektivitätsfilters erleichtert wird. Die Helix zwischen den Transmembrandomänen IV und V bewegt sich radial nach außen und führt damit zur Aufweitung der inneren Pore von $5,3 \text{ \AA}$ auf $7,6 \text{ \AA}$. Dabei erfolgt eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Helix, die die Transmembrandomänen IV und V verbindet, und der Transmembrandomäne VI, so dass sich die Transmembrandomäne VI und die sich anschließende TRP-Bindungsdomäne ebenfalls radial nach außen bewegen und zur Öffnung der inneren Kanalpore beitragen. Aufgrund der Weitung der inneren Kanalpore weicht außerdem die hydrophobe Aminosäure Isoleucin-679 aus dem Zentrum, wodurch der Ionenfluss erleichtert wird (s. Abb. 1.4).

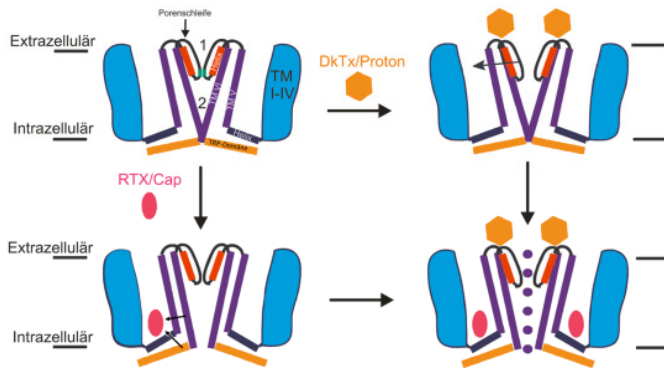


Abbildung 1.4: Der Öffnungsmechanismus des TRPV1-Kanals

Links oben: Im geschlossenen Zustand blockieren die äußere Kanalpore (1) mit dem Selektivitätsfilter (grün) für mono- und divalente Kationen und die innere Kanalpore (2) die Kationen-Permeation. Rechts oben: Einige Aktivatoren, wie z.B. Protonen und das „Doppelknoten-Toxin“ (DkTx) der Vogelspinne *Ornithoctonus huwena* binden an die äußere Pore, um die Wandlung des Selektivitätsfilters in eine leitfähige Konformation zu erzielen oder diese Konformation zu stabilisieren. Wahrscheinlich bindet dabei der Selektivitätsfilter an Transmembrandomäne V (Pfeil). Links unten: Kleine Liganden der Vanilloid-Familie, wie z.B. das Resiniferatoxin (RTX) oder Capsaicin (Cap), binden in einer hydrophoben Tasche, welche durch die Verbindung zwischen den Transmembrandomänen III und IV, zwischen IV und V und dem äußeren Anteil der porenbildenden Region gebildet wird. Die Bindung führt zu einer Konformationsänderung der inneren Pore. Die Pfeile deuten die Bewegung der Transmembrandomänen IV und V und die Bewegung der Transmembrandomäne VI und der TRP-Bindungsdomäne an. Rechts unten: Wenn sowohl die äußere als auch die innere Pore geöffnet sind, wird die höchste Leitfähigkeit erreicht. Quelle: Modifiziert nach Cao et al. (2013)

TRPV1-4 zählen mit TRPM5, TRPM8 und TRPA1 zu den thermosensitiven TRPs, welche durch unterschiedliche Temperaturen aktiviert werden können: Temperaturen $\geq 42^{\circ}\text{C}$ aktivieren TRPV1, $> 52^{\circ}\text{C}$ TRPV2, Temperaturen zwischen 33 und 35°C

aktivieren TRPV3 und TRPV4 werden zwischen 25 und 34°C aktiviert (Benham et al. 2003; Patapoutian et al. 2003). Gemeinsam ist ihnen auch, dass sie im Gegensatz zu TRPV5 und 6 nicht selektiv gegenüber Calcium sind. Nachdem TRPV1-4 im peripheren Nervengewebe exprimiert werden, ist es naheliegend, dass sie eine wichtige Funktion in der thermischen und chemischen Reizwahrnehmung haben (Caterina et al. 1999; Voets et al. 2005). Der TRPV1-Kanal scheint wichtig in der Schmerz Wahrnehmung zu sein. Schließlich wird er durch Vanilloid-Verbindungen wie das Capsaicin, das u.a. in Chili und Cayenne Pfeffer vorkommt, und dem Vogelspinnengift Vanillotoxin aktiviert, sowie durch einen sauren pH-Wert unter 5,5 (Vriens et al. 2005; Starowicz et al. 2007; Szallasi et al. 2007). Des Weiteren sind TRPV1, 2 und 4 als mechanosensitiv beschrieben worden. So zeigten TRPV1-gendefiziente Mäuse auf den Dehnungsreiz einer gefüllten Blase eine reduzierte ATP-Freisetzung und die afferenten Neuronen des Jejunums reagierten geringer auf einen erhöhten Wanddruck (Birder et al. 2002; Rong et al. 2004). Der TRPV2-Kanal wird in Myozyten von Mäusen durch Zellschwellung aktiviert und ist an der Entstehung der dystrophischen Kardiomyopathie beteiligt (Muraki et al. 2003). Außerdem stellten Lo et al. (2014) fest, dass die vorzeitige Vergreisung, das sog. Hutchinson-Gillford-Progeria-Syndrom, vermutlich durch eine erhöhte Expression des TRPV2-Kanals und der damit einhergehenden höheren Mechanosensitivität bewirkt wird. So konnten sie zeigen, dass in pluripotenten Stammzellen von Patienten der erhöhte Calciumstrom durch ein hypotones Milieu mit dem spezifischen TRPV2-Inhibitor Tranilast verhindert werden konnte. Für den TRPV4 konnte nachgewiesen werden, dass er eine Rolle in der peripheren Wahrnehmung und mechanischer Schmerzüberempfindlichkeit spielt, sowie in der osmotischen Homöostase (Strotmann et al. 2003; Liedtke und Friedman 2003; Grant et al. 2007; Thodeti et al. 2009). Der TRPV3-Kanal wird vor allem in Keratinozyten der Haut und in Epithelzellen von Mund und Nase exprimiert und ist hier wichtig für die Wahrnehmung von Wärme und für das Haarwachstum (Moqrich et al. 2005; Imura et al. 2007). Der Kanal kann durch mehrere Gewürzkomponenten, wie Carvacrol, Eugenol, Thymol und Menthol, aktiviert werden (Vriens et al. 2005; Vogt-Eisele et al. 2007). Im Gegensatz zu TRPV1, 2, 3 und 4 haben TRPV5 und TRPV6 eine hohe Selektivität für Calcium mit $P_{Ca}/P_{Na} > 100$. Sie stellen eine wichtige Komponente in der Vitamin D3-induzierten Calciumresorption aus dem Darm und der Calciumrückresorption in der Niere dar (Owsianik et al. 2006; Wissenbach und Niemeyer 2007). TRPV6-gendefiziente,

männliche Mäuse sind infertil aufgrund einer geringeren Motilität und Vitalität der Spermien und einer mangelnden Calciumaufnahme durch das Nebenhodenepithel (Weissgerber et al. 2012). Darüber hinaus wird TRPV6 besonders stark in einigen Tumoren, wie z.B. Brust- und Prostatakrebs, exprimiert und kann als ein prognostischer Faktor dienen, da die Expressionsrate mit der Aggressivität des Tumors korreliert (Santoni et al. 2011; Fan et al. 2014).

2.3. Die TRP-Ankyrin-Kanalfamilie

Die TRPA-Familie besteht aus einem Mitglied, dem TRPA1-Kanal (García-Añoveros und Nagata 2007). Er wurde zunächst als ein Protein in mesenchymalen Tumorzellen beschrieben und konnte schließlich über eine Fibroblastenkultur identifiziert werden (Schenker und Trueb 1998; Jaquemar et al. 1999). Exprimiert wird TRPA1 in Haarzellen, hier vor allem im Innenohr, und in den meisten Nozizeptoren (Nagata et al. 2005). Das auffallendste strukturelle Merkmal sind die 14 bis 17 Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen am N-Terminus, welche vermutlich als die beweglichsten Strukturen des Kanals mit anderen Proteinen interagieren können. In den Wiederholungen befindet sich eine Calciumbindestelle, welche eine regulative Funktion auf die Kanaloffenwahrscheinlichkeit ausübt, indem die Bindung von Calcium die Kanaloffenwahrscheinlichkeit reduziert (Zayats et al. 2013). Wie TRPM8 wird auch TRPA1 durch Kälte bei unter $< 17^{\circ}\text{C}$, Incilin und Menthol aktiviert (McKemy et al. 2002; Story et al. 2003). Da scharfe Gewürzkomponenten wie Allicin aus der Zwiebel des Knoblauchs, Isothiocyanate aus den Samenkörner vom weißen, braunen und schwarzen Senf und Zimtaldehyd aus der Rinde vom echten und Ceylon-Zimtbaum den Kanal aktivieren, scheint der TRPA1-Kanal wichtig für die Schmerzwahrnehmung zu sein (Nagata et al. 2005). In Nozizeptoren mit kleinem Durchmesser konnte bereits festgestellt werden, dass die mechanische Stimulation geringer ausfällt, wenn TRPA1 nicht exprimiert wird (Brierley et al. 2011). TRPA1-gendefiziente Mäuse zeigten, dass ohne TRPA1 die Erregung von sensorischen Nervenzellen durch das Entzündungsprotein Bradykinin reduziert ist, sowie die Hyperalgesie (Bautista et al. 2006). Auch andere Entzündungsmediatoren wie z.B. Nitrofettsäuren und Produkte der Lipidperoxidation aktivieren den TRPA1-Kanal und führen so zum Schmerz bei Entzündungsreaktionen (Bautista et al. 2013), wobei TRPA1 auch mit Schmerzen anderer Ursache, wie z.B. Migräne, assoziiert wird (Benemei et al. 2013).

2.4. Die klassischen TRP-Kanäle

Die klassischen TRP-Kanäle erhielten ihren Namen durch ihre hohe Sequenzähnlichkeit zu den *Drosophila*-TRP-Kanälen und können phylogenetisch in vier Unterfamilien eingeteilt werden: TRPC1, TRPC2, TRPC4/5 und TRPC3/6/7.

Wie alle Mitglieder der TRP-Kanäle besitzen sie sechs transmembranäre Domänen, eine porenbildende Region zwischen den Transmembrandomänen V und VI und zytosolische C- und N-Termini. Des Weiteren haben sie zwei bis vier Ankyrin-ähnliche Wiederholungen und eine Doppelwendel-Domäne (im Englischen sog. „Coiled-Coil“-Domäne) am N-Terminus, eine Calmodulin/Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor-Bindestelle (CIRB), eine TRP-Box mit dem konservierten Motiv EWKFAR und eine prolinreiche Sequenz am C-Terminus (s. Abb. 1.5) (Clapham et al. 2001; Trost et al. 2001; Minke und Cook 2002; Zhu 2005).

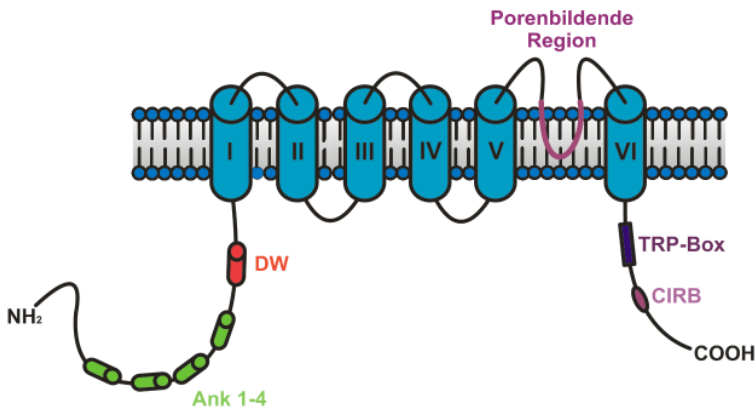


Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau eines TRPC-Kanals

TRPC-Kanäle besitzen sechs Transmembrandomänen (I-VI) mit einer porenbildenden Region zwischen den Transmembrandomänen V und VI (violett). Am N-Terminus befinden sich zwei bis vier Ankyrin-ähnliche Wiederholungen (grün) und eine Doppelwendel-Region (DW, orange). Am C-Terminus befinden sich die TRP-Box (dunkellila) mit dem konservierten Motiv EWKFAR, die prolinreiche Sequenz (PS, dunkelgelb) und die Calmodulin/Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor-Bindestelle (CIRB, lila).

Der Aminosäuresequenzvergleich aller TRPC-Kanalproteine der Spezies *Mus musculus* (s. Abb. 1.6) zeigt, dass mTRPC2 die geringste Ähnlichkeit zu den anderen TRPC-Kanälen aufweist und dass TRPC4 und TRPC5 neben CIRB über eine weitere Calmodulinbindestelle am C-Terminus verfügen (Ordaz et al. 2005).

TRPC-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, welche vor allem Calcium und Natrium leiten. Sie können sowohl als homo- als auch heterotetramere Kanalproteine vorkommen. Die Bildung von Heterotetrameren findet nicht nur mit Mitgliedern der TRPC-Familie statt, sondern auch mit TRPV4 und TRPP2 (Tsiokas 2009; Ma et al. 2010).

2.4.1. TRPC1

Der TRPC1-Kanal bildet mit den anderen TRPC-Kanälen sowie mit TRPP2 und TRPV4 Heterotetramere und stellt somit das einzige TRPC-Kanalprotein dar, welches auch mit Mitgliedern außerhalb seiner Unterfamilie einen funktionellen Kanal bilden kann (Hofmann et al. 2002; Bai et al. 2008; Tsiokas 2009; Ma et al. 2010). Ein funktioneller homotetramerer Kanalkomplex aus TRPC1-Proteine konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Storch et al. 2012). Die mRNA des TRPC1-Kanals lässt sich in allen Säugetierzellen nachweisen, besonders hoch ist jedoch die Expression in Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Hoden und Ovarien (Wes et al. 1995; Rychkov und Barritt 2011). Kontroverse Meinungen herrschen darüber, ob es sich bei diesem Kanal um einen speicherregulierten Kanal handelt oder nicht. Für eine Beteiligung im speicherregulierten Calciumeintritt spricht zum einen, dass die intrazelluläre Gabe von IP_3 oder dem Calcium-ATPase Inhibitor Thapsigargin zu einer Erhöhung von Kationenströmen führt (Zitt et al. 1996; Zhu et al. 1996). Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass die Stärke der Thapsigargin-induzierten Calciumströme mit der Expressionsstärke von TRPC1 korreliert und dass TRPC1 Antisense-Oligonukleotide in verschiedenen Zelltypen zu einer Reduktion der Thapsigargin-induzierten Calciumströme führten (Brough et al. 2001; Liu et al. 2000; Liu et al. 2003). Auf der anderen Seite konnten diese speicherregulierten Eigenschaften nicht von jeder Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. So konnte in zwei Arbeitsgruppen keine Stromerhöhung nach Applikation von Thapsigargin gezeigt werden (Sinkins et al. 1998; Lintschinger et al. 2000). Außerdem zeigten glatte Muskelzellen aus TRPC-gendefizienten Mäusen einen ähnlichen, durch Thapsigargin-induzierten Calciumstrom wie die Zellen der Wildtypmäuse (Dietrich et al. 2007). Yuan et al. (2007) stellten fest, dass die speicherregulierten Eigenschaften der TRPC-Kanäle von der STIM1-Bindung abhängig sind. Die Bindung an den TRPC1-Kanal ist essentiell für die TRPC1-Aktivierung durch einen Agonisten und STIM1 bewirkt die Bildung eines Heterotetramers von TRPC1 mit TRPC3, wodurch auch der TRPC3-Kanal durch den Calciumspeicher reguliert wird. Die Heterotetramerbildung, sei es mit TRPC3 oder einem anderen TRPC-Kanal, führt hingegen laut Storch et al. (2012) zu einer reduzierten Calciumpermeabilität, da der TRPC1-Kanal an der Porenbildung beteiligt ist, und nicht zu einem speicherregulierten Calciumeinstrom. Diese gegenteilige Befunde bezüglich der speicherregulierten Eigenschaften können auf die unterschiedlichen Zellmodelle beruhen - Yuan et al. (2007) verwendeten HEK293-

Zellen, Storch et al. (2012) Gonadoliberin-Nervenzellen - und darauf, dass die Regulation der TRPC1-Kanalfunktion sehr komplex ist und je nach Expression und Zellart stark variieren kann.

2.4.2. TRPC2

Bei dem TRPC2-Kanal handelt es sich um ein Kanalprotein, das als sog. Pseudogen im menschlichen Organismus angelegt ist, aber nicht exprimiert wird. In der Maus wird der Kanal im Vomeronasalorgan exprimiert und durch zwei Untersuchungen konnte auch eine geringe Expression im Hauptriechsystem nachgewiesen werden (Liman et al. 1999; Zhang et al. 2010; Pascarella et al. 2014). Im Vomeronasalorgan kommt der Kanal vor allem in den sensorischen Mikrovilli vor, welche chemischen Signale wahrnehmen können (Liman et al. 1999; Menco et al. 2001). Des Weiteren wird der TRPC2-Kanal in Mausspermium im Rahmen der Akrosomreaktion aktiviert (Jungnickel et al. 2001). Während im Vomeronasalorgan die Aktivierung über DAG stattfindet, wird der TRPC2-Kanal im Spermium durch Entleerung von Speichern aktiviert. Es wird vermutet, dass die speicherregulierte Aktivierung durch eine Interaktion des C-Terminus mit IP_3 und dem IP_3 -assoziierten Protein Junktat bewerkstelligt wird (Stambouliau et al. 2005). Für die Bindung besitzt der TRPC2-Kanal sowohl zwei Calmodulin- IP_3 -Bindestellen als auch eine Junktatbindestelle. Da TRPC2-gendefiziente Mäuse keine Infertilität zeigen, wird vermutet, dass der TRPC1 und TRPC5, welche ebenfalls im Akrosom des Spermiums exprimiert werden, die Funktion des TRPC2-Kanals übernehmen können (Stowers et al. 2002; Sutton et al. 2004). Allerdings konnte eine Junktatbindung nur am TRPC5, nicht am TRPC1, nachgewiesen werden (Stambouliau et al. 2005).

2.4.3. TRPC3/6/7

TRPC3, TRPC6 und TRPC7 formen eine Unterfamilie der TRPC-Kanäle aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit von 70 bis 80% und aufgrund ihrer gemeinsamen DAG-Sensitivität (Hofmann et al. 1999; Okada et al. 1999). Alle drei Kanäle werden in der glatten Muskelzelle, in der Endothelzelle, in der Lunge und im Gehirn exprimiert. TRPC6 kommt darüber hinaus auch in Plazenta, Ovarien, Hoden, Thrombozyten, Niere und Milz vor, während TRPC7 zusätzlich in der Milz und im Auge zu finden ist (Dietrich et al. 2005; Eder und Groschner 2008). TRPC3 ist der häufigste TRPC-Kanal im Gehirn und scheint zusammen mit TRPC6 eine wichtige Rolle in der

Signalkaskade des vom Gehirn stammenden Wachstumsfaktors BDNF zu spielen (Li et al. 1999; Li et al. 2005), sowie bei der Konstriktion von Cerebralarterien (Reading et al. 2005). Da das Photopigment Melanopsin den TRPC3-Kanal aktivieren kann, wird ebenso eine Funktion in den photosensitiven, retinalen Ganglionzellen des Säugetierauges vermutet (Panda et al. 2005). Da jedoch sowohl TRPC3- als auch TRPC6- und TRPC7-gendefiziente Mäuse die gleiche Lichtsensitivität wie nicht-gendefiziente Mäuse zeigten, scheint nicht ein TRPC-Kanal alleine für die Lichtsensitivität verantwortlich zu sein (Perez-Leighton et al. 2011). Es liegen unterschiedliche Daten vor, ob der TRPC3 speicher- oder rezeptorreguliert ist. In B-Lymphozyten einer Hühnerzelllinie wurde nachgewiesen, dass die Regulation vom Expressionsgrad abhängig ist: Bei niedriger Expressionsrate reagierte TRPC3 auf die Entleerung von Calciumspeicher, bei hoher Expressionsrate wurde er durch Rezeptorstimulation aktiviert (Vazquez et al. 2001; Vazquez et al. 2003). Ähnlich unklar ist, ob TRPC7 speicherregulierte Eigenschaften hat oder nicht. So führte die stabile Expression in HEK293 Zellen zu einem speicher- und rezeptorregulierten Verhalten, während die transiente Expression nur zu einer rein rezeptorregulierten Aktivierung führte (Riccio et al. 2002; Lièvremonet et al. 2004). In B-Lymphozyten wiederum zeigten die TRPC7-gendefizienten Zellen die gleichen speicherregulierten Calciumströme wie die Wildtypzellen, während die Antwort auf Rezeptorstimulation im Gegensatz zu den Wildtypzellen fehlte (Lievremont et al. 2005). Dies lässt zum einen darauf schließen, dass es sich bei TRPC7 um einen rezeptorregulierten Kanal handelt und zum anderen, dass der Kanal eine wichtige Rolle in B-Lymphozyten zu spielen scheint. Im Gegensatz zu TRPC3 und TRPC7 wird der TRPC6 klar als rezeptorreguliert definiert (Boulay et al. 1997; Hofmann et al. 1999). Wie auch TRPC3 und TRPC7 wird TRPC6 unabhängig von der PKC durch DAG aktiviert, wobei die Bindestelle von DAG bisher noch nicht bekannt ist (Hofmann et al. 1999; Dietrich und Gudermaun 2014). Zwar wurde eine Variation von TRPC6 mit 54 fehlenden Aminosäuren am N-Terminus (3-56) generiert, welche in Fura-2-Messungen keine Aktivierung durch das DAG-Analogon 1-Oleoyl-2-Acetyl-*sn*-Glycerol (OAG) zeigte (Zhang und Saffen 2001). Mit elektrophysiologischen Messungen konnte dieses Ergebnis jedoch nicht reproduziert werden (Zhang und Saffen 2001; Jung et al. 2003). Interessant ist auch, dass die DAG-Aktivierung zwar unabhängig von der PKC erfolgt, eine Inhibition des TRPC6 mit einer gesteigerten PKC-Aktivität aber möglich ist. So führte die Hemmung der PKC durch den PKC-

Inhibitor GF1 zu einer gesteigerten Agonistenantwort, während die Aktivierung der PKC durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat zu einer Hemmung führte. Ein Grund könnte sein, dass die PKC den TRPC6 zu phosphorylieren scheint, nachdem eine PKC-Inhibition die Carbachol-induzierte TRPC6-Phosphorylierung verhindert (Bousquet et al. 2010). Einen stimulierenden Effekt scheint Calmodulin zu haben, da dessen Hemmung zu einer geringeren rezeptorregulierten Antwort führt (Boulay 2002). Es stellte sich auch heraus, dass die Aktivierung des TRPC6 durch extrazelluläres Calcium wahrscheinlich durch die Calmodulin-abhängige Kinase II vermittelt wird (Shi et al. 2004). Eine Zunahme der Calciumströme konnte bisher in Mutationen des TRPC6-Kanals festgestellt werden, welche zur fokalen, segmentalen Glomerulosklerosis führen. Insgesamt wurden bisher zwölf Mutationen direkt mit der fokalen, segmentalen Glomerulosklerosis assoziiert und vier weitere Mutationen sporadisch im Zusammenhang mit dieser Erkrankung festgestellt (Winn et al. 2006; Büscher et al. 2010; Heeringa et al. 2009; Santín et al. 2009; Gigante et al. 2011; Mir et al. 2012; Hofstra et al. 2013). Die meisten dieser Patientenmutationen führen zu einer erhöhten freien intrazellulären Calciumkonzentration, welche unter Umständen das Aktinskelett der Zelle beeinflusst. Die Mutationen liegen hauptsächlich in den Ankyrin-Wiederholungen und der Doppelwendel-Sequenz, was die Bedeutung dieser TRPC6-Abschnitte für die Kanalfunktion unterstreicht. Der pathophysiologische Mechanismus ist noch nicht geklärt, es wird aber vermutet, dass die Mutationen im TRPC6 zu einer erhöhten Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 führt (Chiluiza et al. 2013). Diese Serin/Threonin-Kinasen konnten bereits mit einigen Nephropathien, wie beispielsweise der diabetischen Nephropathie oder der passiven Heymann-Nephritis, in Verbindung gebracht werden (Pippin et al. 2003; Toyoda et al. 2004). Eine weitere Erkrankung, welche mit TRPC6 (und TRPC3) assoziiert wird, ist die idiopathische pulmonäre Hypertension (Yu et al. 2003; Yu et al. 2004). Die Krankheit entsteht, wenn eine Überexpression von TRPC3 und TRPC6 in den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien vorliegt. Sauerstoffmangel führt zu einer durch TRPC6-iniizierten Vasokonstriktion der peripheren Pulmonalarterien, um einen besseren Gasaustausch im Zentrum zu gewährleisten (Fuchs et al. 2011). Bei der idiopathischen pulmonären Hypertension liegt diese Vasokonstriktion durch eine Proliferation der Pulmonalarterien vor, welche durch einen gesteigerten Calciumstrom verursacht wird (Yu et al. 2004). In der Peripherie des Körpers wird TRPC6 ebenfalls in den Arterien exprimiert und ist dort für die reflektorische

Vasokonstriktion aufgrund eines steigenden Drucks verantwortlich, dem sog. Bayliss-Effekt (Welsh et al. 2002).

2.4.4. TRPC4/5

TRPC4 und TRPC5 unterscheiden sich von den anderen TRPC-Unterfamilien vor allem in ihren Aktivatoren. So werden beide Kanäle durch Lanthan und Gadolinium stimuliert, während die restlichen TRPC-Kanäle durch diese inhibiert werden (Schaefer et al. 2000; Jung et al. 2003). Eine Ansäuerung des extrazellulären Milieus von pH 7,4 auf pH 7,0 aktiviert TRPC4 und TRPC5 und inhibiert im Gegensatz dazu den TRPC6 (Semtner et al. 2007; Kim et al. 2008). TRPC4 und TRPC5 können nicht direkt durch DAG aktiviert werden, was sie von der TRPC3/6/7-Untergruppe unterscheidet (Venkatachalam et al. 2003). Der Aufbau entspricht dem aller TRPC-Kanäle mit sechs transmembranären Domänen, zytosolischen N- und C-Termini, einer C-terminalen TRP-Box und Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen am N-Terminus. Zusätzlich besitzt diese Gruppe eine Proteininteraktionsdomäne, das PDZ-Bindemotiv VTTRL (s. Abb. 1.7). Sie befindet sich am C-terminalen Ende und kann mit Proteinen interagieren, welche die PDZ-Bindestelle enthalten, wie z.B. der Natrium/Wasserstoff-Austauscher Regulationsfaktor (Na^+/H^+ -Exchanger Regulatory Factor = NHERF) (Tang et al. 2000; Obukhov und Nowycky 2004). Das PDZ-Bindemotiv ist benannt nach den ersten drei Proteinen, in denen die PDZ-Bindestelle festgestellt wurde: PSD95/SAP90, DIg und ZO-1 (Woods und Bryant 1991; Cho et al. 1992; Itoh et al. 1993).

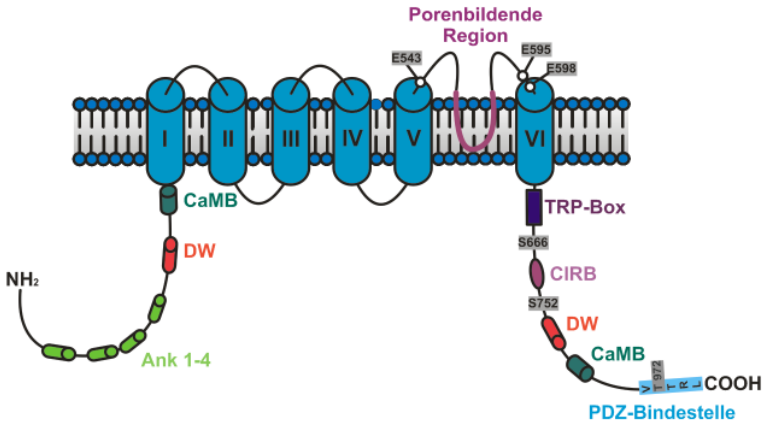


Abbildung 1.7: Aufbau des TRPC5-Kanals

Der TRPC5-Kanal hat vier Ankyrin-ähnliche Wiederholungen (Ank 1-4, grün) am N-Terminus. Sowohl am N- als auch C-Terminus befinden sich eine Calmodulin-Bindestelle (CaMB, dunkelgrün), sowie eine Doppelwendel-Domäne (DW, orange). In der porenbildenden Region befinden sich nahe der Transmembrandomäne V und VI drei potentielle Calciumbindestellen (E543, E595 und E598, s. Kap. 3.2). Nahe der Transmembrandomäne VI liegt C-terminal die TRP-Box (dunkellila), gefolgt von der Calmodulin/Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor-Bindestelle (CIRB, lila). Am Ende des C-Terminus befindet sich die PDZ-Domäne (VTTRL, hellblau). Die Aminosäuren S666, S752 und T972 stellen mögliche PKC-Phosphorylierungsstellen dar (s. Kap. 3.3).

Der TRPC4-Kanal wird überwiegend in Gehirn, Endothel, Niere, Retina, Hoden und Nebennieren exprimiert (Nilius et al. 2003; Freichel et al. 2004; Montell 2005). Agonisten-induzierte Calciumströme sind in den Endothelzellen der Aorta von TRPC4-gendefizienten Mäusen stark reduziert, was zu einer geringeren Regulation des vaskulären Tonus führt (Freichel et al. 2001). Ein ähnlicher Effekt konnte auch im Endothel von neonatalen TRPC4-gendefizienten Lungen festgestellt werden (Tiruppathi et al. 2002a). Außerdem zeigten TRPC4-gendefizienten Mäusen eine stark reduzierte Calcium-induzierte GABA-Ausschüttung in den Interneuronen des

Thalamus (Munsch et al. 2003). Die Regulation der GABA-Ausschüttung über Calciumkanäle ist vermutlich wichtig für die Signaltransduktion im Thalamus in Abhängigkeit vom Tag-Nacht-Rhythmus. So könnte TRPC4 eine Funktion im lichtabhängigen Kontrastsehen spielen oder generell in der visuellen Informationstransduktion (Pape et al. 2004). Möglicherweise gibt es auch einen Zusammenhang von TRPC4 mit Patienten, die unter einer idiopathischen generalisierten Epilepsie mit einer gleichzeitig erhöhte Photosensibilität leiden (Spiczak et al. 2010). So stellten Phelan et al. (2012) fest, dass TRPC1/4-gendefiziente Mäuse keine exozytotoxische Nervenzelldegeneration, sowie kein depolarisierendes Spannungsplateau zeigten, welches bei Epilepsieanfällen auftritt.

2.4.4.1. Vorkommen und physiologische Relevanz des TRPC5

Der TRPC5-Kanal wird in vielen Geweben exprimiert, unter anderem in Niere, Herz, Uterus, Hoden und Leber (Okada et al. 1998; Jiang et al. 2014a). Am höchsten ist seine Expression jedoch im Gehirn (Riccio et al. 2009). Mithilfe einer dominant-negativen TRPC5-Mutante, welche in Neuronen des Hippocampus untersucht wurde, konnte festgestellt werden, dass TRPC5 die Länge und den Umfang der Wachstumskegel beeinflusst. So waren die Neuronen, in welche die TRPC5-Mutante transfiziert wurde, länger und dicker im Vergleich zu Neuronen, welche den Wildtyp TRPC5 exprimierten (Greka et al. 2003). He et al. (2012) fanden heraus, dass die Regulation der Morphologie über Neurotrophin-3 stattfindet, indem dieses den membranständigen Neurotrophin-3 Rezeptor und den TRPC5-Kanal aktiviert. Der folgende Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ führt zur Aktivierung der Calmodulin-Kinase II α , welche das Wachstum der Neuronen inhibiert. In den Endothelzellen von Gehirn- und Herzerterien scheint der TRPC5-Kanal ähnlich wie der TRPC4 die Permeabilität des Gefäßes zu regulieren, indem seine Aktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren zu einem erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ führt (Tiruppathi et al. 2002b; Tiruppathi et al. 2006). Das erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ bewirkt die Bildung von Stickstoffmonoxid, welches zur Erschlaffung der Gefäßmuskulatur führt (McDonald und Murad 1996). Wie auch bei anderen TRPC-Kanälen, so gibt es auch bei TRPC5 Kontroversen darüber, ob es sich um einen speicher- oder rezeptorregulierten Kanal handelt. Studien in Mastzellen stellten fest, dass Thapsigargin einen speicherabhängigen Calciumanstieg bewirkt, welcher ausbleibt, wenn TRPC5-gendefizienten Mastzellen benutzt werden. Genauso

bleibt dieser Anstieg aus, wenn weder Orai1 noch STIM1 vorhanden sind, was auf eine Interaktion dieser drei Proteine hindeutet (Ma et al. 2008). In vaskulären, glatten Muskelzellen beteiligt sich TRPC5 ebenfalls an einem speicherregulierten Kanal, vermutlich zusammen mit anderen TRPC-Kanälen (Saleh et al. 2008). In manchen Experimenten wurden wiederum keine speicherregulierte Ströme nachgewiesen (Schaefer et al. 2000; Zhu et al. 2005). Dies kann an den unterschiedlichen Expressionssystemen liegen, der schwächeren Aktivierung durch Speicherentleerung im Vergleich zu anderen Aktivatoren oder am Expressionsgrad des TRPC5 im jeweiligen System. Sicher ist, dass TRPC5 auch durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren stimuliert werden kann, da Adenosine-5'-Triphosphat, Carbachol, Histamin, Bradykinin und andere Aktivatoren von G-Protein gekoppelten Rezeptoren den TRPC5 aktivieren können (Schaefer et al. 2000; Venkatachalam et al. 2003). Die DAG-Applikation führt zu einer Hemmung des TRPC5-Kanals, womit ausgeschlossen werden kann, dass die Aktivierung durch sekundäre Botenstoffe zustande kommt (Venkatachalam et al. 2003). Rezeptoren aktivieren TRPC5 auch, indem z. B. Wachstumsfaktoren die Fusion von Vesikeln, welche den Kanal enthalten, mit der Plasmamembran hervorrufen, wodurch die Anzahl funktioneller TRPC5-Kanäle rapide steigt. Dieser als rezeptorinduzierte Proteintranslokation bezeichnete Mechanismus ermöglicht unter anderem die morphologische Anpassung von Neuronen an neue Anforderungen (Storch et al. 2012; Bezzerides et al. 2004; Tai et al. 2011; Hong et al. 2012).

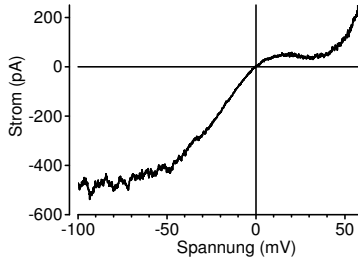
2.4.4.2. Biophysikalische Eigenschaften des TRPC5

Der TRPC5-Kanal ist ein nicht-selektiver, basal-aktiver Kationenkanal mit einem $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}}$ -Verhältnis von 1,8 bis 9,5 (Okada et al. 1998; Schaefer et al. 2000; Yamada et al. 2000; Jung et al. 2003; Storch et al. 2012). Auffallend ist seine Spannungsabhängigkeit, welche er mit TRPC4 teilt. Markus Semtner (2011) zeigten, dass bei hyperpolarisierenden Strömen eine spannungsabhängige Schließung des Kanals stattfindet. Dies äußerte sich in Ganzzellmessungen mit einer Spannungsrampe von -60 mV bis 100 mV, wenn am Beginn und Ende der Histaminapplikation hyperpolarisierende Spannungssprünge (von -60 mV auf -100 mV und von +100 mV auf -60 mV) durchgeführt wurden. Diese Spannungssprünge führten zu sogenannten Schwanzströmen, welche durch einen raschen Abfall auf ein Gleichgewichtsniveau gekennzeichnet und nicht kapazitiv begründet waren (s. Abb. 1.8 B.). Auch unter

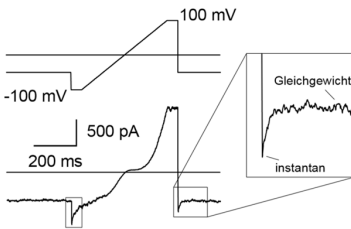
hyperpolarisierenden Sprüngen von -20 mV auf -140, -120, -80, -40 und 0 mV sind die Schwanzströme zu erkennen (s. Abb. 1.8 C.). Außerdem stellte sich heraus, dass die Leitfähigkeit des TRPC5 mit steigender Spannung zunimmt, außer im Bereich zwischen 0 und +60 mV. Dies hängt wahrscheinlich mit dem intrazellulären, magnesiumabhängigen Block zusammen, welcher im Spannungsbereich von 0 und +40 mV zu tragen kommt (Obukhov und Nowycky 2005). Der Block kommt durch eine negativ geladene Aminosäure zwischen der Transmembrandomäne VI und der TRP-Box zustande, das Aspartat an der Aminosäureposition 633. Die vier Aspartate des homotetrameren TRPC5-Kanals bilden vermutlich einen anionischen Ring, welcher bei positiven Spannungen intrazelluläres Magnesium bindet und damit eine Zunahme des Stromflusses verhindert. Es gibt zwei mögliche Erklärungen, warum der Magnesiumblock bei Potentialen über + 40 mV aufgelöst wird: Der erste Erklärungsansatz wäre, dass Magnesium bei sehr hoher Spannung aufgrund der hohen elektrischen Triebkraft den Ionenkanal passieren kann und nicht mehr in der Pore gebunden wird. Die zweite Erklärung wäre, dass Magnesium nicht mehr an den negativ geladenen Rest von D633 binden kann, weil die Bindung durch Kationen, die am angrenzenden inneren Selektivitätsfilter binden, destabilisiert wird (Woodhull 1973; Heginbotham und Kutluay 2004). Möglicherweise spielen beide Mechanismen eine Rolle.

Deutlich wird die Spannungsabhängigkeit des TRPC5 auch in der Stromspannungskurve, wenn der Kanal durch einen Stimulus aktiviert wird: Bei stark negativer Spannung (< -60 mV) ist die Aktivierung gering und der Einwärtsstrom nimmt erst mit steigender Spannung zu. Bei 0 mV liegt das Umkehrpotential, der Nettostrom ist also null. Bei Potentialen über 0 mV fließt ein Auswärtsstrom, wobei zwischen 0 und +40 mV aufgrund des magnesiumabhängigen Blocks keine Stromzunahme stattfindet. Erst bei einer Spannung über +40 mV nimmt der Auswärtsstrom wieder zu (s. Abb. 1.8 A.). Diese charakteristische Stromspannungskurve wird auch als doppelt-rektifizierend bezeichnet, obwohl es sich im physikalisch-technischen Sinne nicht um eine doppelt-rektifizierende Stromspannungskennlinie handelt (Okada et al. 1998; Schaefer et al. 2000; Yamada et al. 2000; Jung et al. 2003).

A.



B.



C.

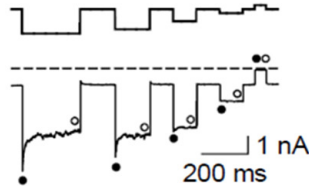


Abbildung 1.8: Stromspannungskurve des TRPC5-Kanals

A. Die abgebildete Stromspannungskurve zeigt eine geringe Stromzunahme im stark negativen Spannungsbereich (≤ -60 mV). Ab einem Potential über -60 mV ist eine höhere Stromzunahme bis zu einem Plateau zwischen 0 und $+40$ mV zu erkennen, auf dem der Strom nicht weiter zunimmt, im Bereich zwischen $+20$ und $+30$ mV sogar leicht abnimmt. Bei einer Spannung über $+40$ mV nimmt der Stromfluss wieder stärker zu. B. Oben: Abgebildet ist die vorgegebene Spannungsrampe. Es finden zwei hyperpolarisierende Spannungssprünge von -60 mV auf -100 mV und von $+100$ mV auf -60 mV statt. Unten: Der zur Spannungsrampe zugehörige Stromzeitverlauf zeigt die spannungsabhängige Schließung des Kanals bei hyperpolarisierenden Strömen als sogenannten Schwanzstrom, welcher durch einen instantanen Stromabfall und der Einstellung eines Gleichgewichtsniveaus gekennzeichnet ist. C: Unter hyperpolarisierenden Sprüngen von -20 mV auf -140 , -120 , -80 , -40 und 0 mV sind ebenfalls die Schwanzströme zu sehen, welche durch eine spannungsabhängige Schließung des Kanals zustande kommen. Quelle der

Abb. B und C: Markus Semtner (2011)

Der heterotetramere TRPC1-TRPC5-Kanal weist nicht den doppelt-rektifizierenden Verlauf auf. Der Auswärtsstrom ist wesentlich größer als der Einwärtsstrom und es ist kein magnesiumabhängiger Block zwischen 0 und +40 mV zu beobachten (Strübing et al. 2003). Des Weiteren fanden Storch et al. (2012) heraus, dass der heterotetramere Kanal eine geringere Calciumpermeabilität besitzt. Dies zeigt, dass sich die biophysikalischen Eigenschaften des TRPC5 ändern können, wenn er mit einem anderen Kanal koexprimiert wird.

Ein weiteres einzigartiges Charakteristikum von TRPC4 und TRPC5 ist ihre Aktivierung durch Lanthan und Gadolinium, während die anderen TRPC-Kanäle durch diese geblockt werden (Schaefer et al. 2000; Jung et al. 2003). Der Gesamtstrom I , welcher in Patch-Clamp-Messungen angezeigt wird, berechnet sich aus dem Produkt von der Anzahl der Ionenkanäle n , der Einzelkanaloffenwahrscheinlichkeit P_o und dem Einzelkanalstrom i . Die Aktivierung des TRPC4 und TRPC5 durch Lanthan und Gadolinium kommt nun nicht durch eine verstärkte Leitfähigkeit $g = 1/\text{Widerstand } R$ und einem daraus resultierenden größeren Einzelkanalstrom zustande. Im Gegenteil, der Widerstand wird durch die Bindung von Lanthan bzw. Gadolinium in der Pore sogar vergrößert. Vielmehr findet eine drastische Erhöhung der Einzelkanaloffenwahrscheinlichkeit P_o statt. Bei höheren Konzentrationen von Lanthan (im mikromolaren Bereich) überwiegt die Verringerung der Leitfähigkeit die erhöhte Einzelkanaloffenwahrscheinlichkeit und der TRPC5-Strom nimmt ab (Jung et al. 2003). Eine Schlüsselrolle spielen wahrscheinlich die drei Glutamatreste E543, E595 und E598, welche sich in der porenbildenden Einheit zwischen den Transmembrandomänen V und VI befinden, wobei E543 nahe der Transmembrandomäne V liegt und E595/598 nahe der Transmembrandomäne VI (s. Abb.1.6). In der Pore, welche aus den porenbildenden Einheiten von vier Kanälen gebildet wird, formen diese Glutamatreste einen negativ geladenen Ring, welcher als extrazelluläre Bindestelle für Lanthan fungiert. Werden diese Glutamatreste zu Glutamin umgewandelt, führt dies zu einer Inhibition der TRPC5-Ströme durch Lanthan. Die Mutationen E595Q/E598Q hemmen vor allem den Einwärtsstrom und die E543Q-Mutation senkte sowohl die Einwärts- als auch die Auswärtsströme (Jung et al. 2003). Auch die Erhöhung von extrazellulärem Calcium konnte mTRPC5 E543Q nicht aktivieren und die Aktivierung von mTRPC5-E595Q-E598Q fand

deutlich langsamer statt. Dies deutet darauf hin, dass diese Aminosäuren auch für Calcium eine entscheidende Rolle spielen, da der Wildtyp-TRPC5-Kanal durch die Erhöhung von extrazellulärem Calcium aktiviert werden kann (Okada et al. 1998). Der Wildtyp-TRPC5 ist auch durch eine Ansäuerung des extrazellulären pH-Werts mit einem Maximum zwischen pH 6,5 und 6,0 stimulierbar. Mit einem pH-Wert unter 4,2 wird der TRPC5 inhibiert (Semtner et al. 2007). Interessanterweise zeigte die E543Q-Mutante keine Aktivierbarkeit durch Protonen, während bei der E595Q-Mutante kein Unterschied zum unveränderten TRPC5-Kanal zu sehen war.

Intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhungen erzeugen ebenfalls TRPC5-Ströme, eine bestimmte Konzentration (10 nM) ist sogar eine Voraussetzung für die Aktivierbarkeit von TRPC5 (Okada et al. 1998; Schaefer et al. 2000). Zunächst ist davon ausgegangen worden, dass Ca^{2+} -bindende Proteine wie z.B. Calmodulin für die Stimulation von TRPC5 durch $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nötig sind. Blair et al. (2009) stellten jedoch fest, dass die Inhibition von Calmodulin keine Auswirkung auf die Aktivierbarkeit durch $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hat. Nichtsdestotrotz bewirkt die Entfernung der Calmodulin/Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor-Bindestelle (CIRB, s. Abb. 1.6) eine Nichtstimulierbarkeit des Kanals durch Rezeptorstimulation, während die Membranexpression erhalten blieb. Ein Effekt, der auch auf die gleichzeitige Entfernung der Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor-Bindestelle zurückzuführen sein könnte. Die Entfernung der zweiten Calmodulin-Bindestelle (s. Abb. 1.6, Aminosäuren 823-849), führt ebenfalls zu einer geringeren Aktivierbarkeit, genauso wie die Hemmung von Calmodulin durch die Antagonisten W-7 und Calmidazolium (Ordaz et al. 2005; Kim et al. 2006). Da die Bindung von Calmodulin von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist -im Vergleich zu anderen TRPCs sind wesentlich höhere Ca^{2+} -Konzentrationen erforderlich-, reguliert Ca^{2+} vermutlich die Rezeptoraktivierbarkeit des Kanals über Calmodulin und andere Ca^{2+} -bindende Proteine wie z.B. das Calcium-bindende Protein 1 und Enkurin (Sutton et al. 2004; Zhu et al. 2005; Kinoshita-Kawada et al. 2005). Weitere Regulatoren stellen Lipide da, hier seien vor allem die Sphingo- und Lysophospholipide genannt, welche TRPC5 aktivieren können (Flemming et al. 2006; Xu et al. 2006). Trebak et al. (2009) studierten die Rolle des Lipids PIP_2 für TRPC5 und fanden heraus, dass PIP_2 sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken kann. Der Abbau von PIP_2 durch den Phosphoinositid-4-Kinase-Inhibitor Wortmannin aktiviert den TRPC5. Die intrazelluläre Applikation von PIP oder PIP_2 über die Pipettenlösung hemmt jedoch

den TRPC5. Möglich wäre daher, dass PIP_2 inhibierend auf TRPC5 wirkt und ein Abbau von PIP_2 die Stimulation des TRPC5 bewirkt. Möglicherweise ist dies auch der Mechanismus, über den Rezeptoren den Kanal aktivieren: Die Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren führt zur Aktivierung der PLC, welche wiederum PIP_2 zu DAG und IP_3 spaltet, also PIP_2 abbaut. Dazu im Gegensatz steht die Tatsache, dass laut Venkatachalam et al. (2003) die Zugabe von PIP_2 in einer zellfreien Patch-Clamp-Ableitung, in der die Innenseite des Membranflecks zur Badlösung zeigt, den Kanal leicht stimuliert. Dies kann jedoch damit erklärt werden, dass die physiologischen Regulationsmechanismen in der zellfreien Ableitkonfiguration bei der die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran nach außen zur Badlösung gerichtet ist, möglicherweise verloren gehen.

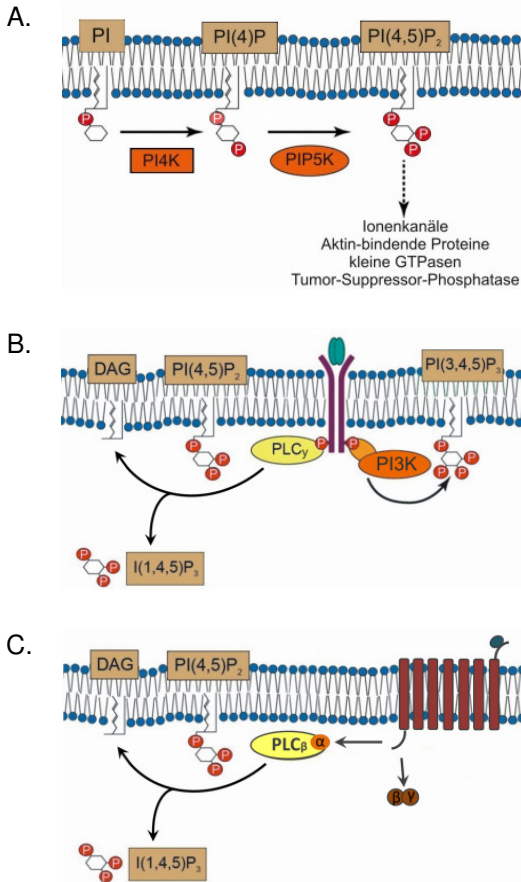


Abbildung 1.9: Die Synthese und der Abbau von PIP₂

A. Die Synthese (von links nach rechts) verläuft in zwei Schritten: Die Phosphoinositid-4-Kinase (PI4K) bildet aus PI PIP, indem es die Bindung eines Phosphats am Ring katalysiert. Die Phosphoinositid-5-Kinase (PIP5K) katalysiert die Bildung von PIP₂ aus PIP und Phosphat. B. Der Abbau durch die Rezeptortyrosinkinase erfolgt entweder durch die PLC_γ, welche PIP₂ in DAG und IP₃ spaltet. Oder er erfolgt durch die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), welche über die Kinasedomäne (orange) an die Rezeptortyrosinkinase gebunden ist. Die PI3K wandelt PIP₂ durch eine Phosphorylierung in PIP₃ um.

C. Der Abbau von PIP_2 durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren wird durch die Aktivierung der PLC β erreicht, welche ebenfalls PIP_2 in DAG und IP_3 spaltet. Modifiziert nach Gericke et al. (2013).

2.4.4.3. Die Rolle der PKC und des DAGs

Wie im Kapitel 1.2 bereits erläutert, aktivieren G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Rezeptortyrosinkinasen die PLC. Diese wiederum spaltet das membranständige PIP_2 in DAG und IP_3 . IP_3 löst über den IP_3 -Rezeptor die Ca^{2+} -Ausschüttung aus internen Speichern aus und DAG aktiviert die PKC, welche durch Phosphorylierungen die Aktivität von membranständigen Kationenkanälen modulieren kann (siehe Abb. 1.1). Des Weiteren kann DAG auch Ionenkanäle direkt aktivieren, unabhängig von der PKC, wie von TRPC3 und TRPC6 bekannt ist (Hofmann et al. 1999). Auffallend ist, dass die TRPC4/5-Gruppe im Gegensatz dazu nicht durch DAG aktiviert werden kann, sondern sogar inhibiert wird. In Patch-Clamp-Experimenten ist die Hemmung sowohl bei Zugabe des exogenen DAG-Analogons OAG als auch bei Erhöhung des endogenen DAGs zu beobachten (Venkatachalam et al. 2003). Die rezeptorinduzierte PLC-Aktivität wird dabei nicht gehemmt, nur die Aktivierung des TRPC5. Die zusätzliche Zugabe eines PKC-Inhibitors jedoch verhinderte die TRPC5-Hemmung, während PKC-Aktivatoren sowohl die TRPC5-Aktivität als auch die rezeptorinduzierte PLC-Aktivität hemmen. Der TRPC4 zeigt ein ähnliches Verhalten. Sogar die TRPC3-Aktivität wird durch PKC-Aktivatoren gehemmt, während die Inhibition der PKC zu einer länger anhaltenden Antwort auf OAG führt (s. Abb. 1.9). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TRPC4 und TRPC5 durch DAG über dessen Aktivierung der PKC inhibiert werden und die PLC-Aktivität davon nicht beeinflusst wird. Der TRPC3-Kanal wird im Gegensatz dazu durch DAG aktiviert, die PKC wirkt jedoch auch inhibierend auf den Kanal. Denkbar wäre, dass die PKC einen negativen Rückkopplungsmechanismus darstellt und die Calciumausschüttung aus internen Speichern und den Einstrom über die Membran negativ reguliert (s. Abb. 1.10). Möglicherweise spielt dieser Rückkopplungsmechanismus vor allem in Heterotetrameren eine Rolle, wenn TRPC4 und TRPC5 mit DAG-sensitiven TRPC-Kanälen assoziiert sind.

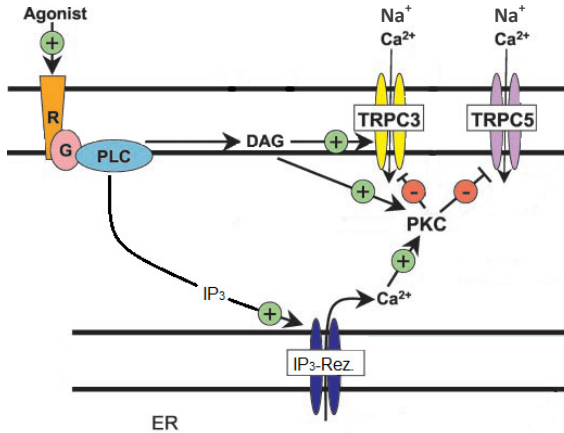


Abbildung 1.10: Die Wechselwirkung zwischen DAG/PKC und TRPC3/5

Die Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (R=Rezeptor, G=G-Protein) führt zur Aktivierung der PLC, welche durch die Spaltung von PIP₂ (nicht abgebildet) DAG und IP₃ bildet. DAG wirkt stimulierend „(+)“ auf TRPC3 und auf die PKC. IP₃ bindet am IP₃-Rezeptor, wodurch Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) ausgeschüttet wird. Dieses Calcium erhöht wie DAG die Aktivität der PKC. Die PKC hemmt „(-)“ sowohl TRPC3 als auch TRPC5. Quelle: modifiziert nach Venkatachalam et al. (2003)

Um die Rolle der PKC näher zu analysieren, untersuchten Zhu et al. (2005) die Stellen im TRPC5, an denen eine Phosphorylierung durch die PKC möglich ist. Es stellte sich heraus, dass die Inaktivierung des TRPC5-Kanals unter dem rezeptorinduzierten Stimulus deutlich langsamer erfolgt, wenn bestimmte Stellen nicht phosphoryliert werden können. Die Arbeitsgruppe mutierte elf potentielle PKC-Phosphorylierungsstellen, wobei sieben Mutationen keinen Effekt hatten. Drei Mutationen – S666A, S752A und S833A – führten zu einer etwas langsameren Inaktivierung unter Rezeptorstimulation, aber mit Abstand am langsamsten erfolgte die Inaktivierung bei der Mutation T972A. Diese mögliche PKC-Phosphorylierungsstelle befindet sich im PDZ-Bindungsmotiv (VTTRL) des TRPC5 (s. Abb. 1.6). Entfernt man das ganze Motiv VTTRL, so führt dies zu einer reduzierten Expression des TRPC5 (Zhu et al. 2005). Außerdem bindet der Na⁺/H⁺-

Austauscher Regulationsfaktor NHERF1 über seine PDZ1-Domäne an diesem Motiv (Tang et al. 2000). Interessanterweise binden die PLC β 1 und PLC β 2 ebenfalls an die PDZ1-Domäne von NHERF. So stellten Tang et al. (2000) mittels Koimmunpräzipitation fest, dass TRPC4, NHERF und PLC β 1 auch in vivo im Gehirn von adulten Mäusen einen Komplex bilden. Die genaue Funktion dieses Komplexes ist noch nicht bekannt, doch Cooley et al. (2014) fanden heraus, dass in Kardiomyozyten die Interaktion von PIP₂, PLC β 1b und TRPC4 α durch einen erhöhten Calciumeinstrom die Hypertrophie der Kardiomyozyten fördert. Da auch TRPC5 über ein PDZ-Bindungsmotiv verfügt, wäre es möglich, dass auch TRPC5 über die Bindung von NHERF mit der PLC interagiert. Nachdem NHERF noch an viele weitere Strukturen binden kann, wie z.B. G-Protein gekoppelte Rezeptoren, das SH₃-Ankyrin-Wiederholungen-Protein 3, die Ezrin-Radixin-Moesin Familie etc., wären aber auch andere regulative Mechanismen möglich (Terawaki et al. 2006; Ardura und Friedman 2011; Cooley et al. 2014).

3. Zielsetzung

Zurzeit sind über 50 Interaktionspartner des TRPC5 bekannt und es werden jährlich weitere entdeckt. Nichtsdestotrotz ist der genaue Aktivierungsmechanismus noch nicht bekannt. Für die speicherregulierten Eigenschaften ist die Interaktion mit STIM1, vermutlich über die Caveolin1-Bindestelle im C-Terminus des TRPC5-Kanals, und dem Calciummodulator „Orai“ wichtig (Ma et al. 2008; Saleh et al. 2008; Zeng et al. 2008). Außerdem vermag TRPC5 das IP₃-assoziierte Protein Junktat zu binden, welches im Spermium für die speicherregulierten Eigenschaften des TRPC2 verantwortlich ist (Stamboulian et al. 2005). Bilden TRPC1- und TRPC5-Kanaluntereinheiten ein Heterotetramer, findet keine Kanalaktivierung durch Speicharentleerung statt (Strübing et al. 2001). Die rezeptorregulierten Eigenschaften werden durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Sowohl Gα_q- als auch Gα_i-gekoppelter Rezeptoren können den TRPC5-Kanal aktivieren (Schaefer et al. 2000; Venkatachalam et al. 2003; Jeon et al. 2012). Die Aktivierung durch Gα_q-gekoppelte Rezeptoren ist PLC-abhängig und unabhängig von IP₃ (Plant und Schaefer 2005; Venkatachalam et al. 2003; Venkatachalam und Montell 2007b; Grisanti et al. 2012). DAG hemmt die Kanalaktivierung von TRPC4 und TRPC5, möglicherweise durch die Aktivierung der PKC (Venkatachalam et al. 2003). Sphingo- und Lysophospholipide können den TRPC5 aktivieren, wobei für das Phospholipid PIP₂ stimulierende als auch inhibitorische Eigenschaften nachgewiesen wurden (Flemming et al. 2006; Xu et al. 2006; Trebak et al. 2009). Am C-Terminus des TRPC5 befinden sich einige Bindestellen für Interaktionspartner, u.a. die CIRB für Calmodulin und IP₃-Rezeptor, eine Bindestelle für das Spec14- und Spektrindomänen 1 Protein (SESTD1), eine Spektrinbindestelle und die PDZ-Domäne, an die das NHERF1-Brückenprotein binden kann (Tang et al. 2000; ; Odell et al. 2008; Blair et al. 2009; Miede et al. 2010). Wie Zhu et al. (2005) bereits feststellten, wird das Threonin an der Position 972 in der PDZ-Bindestelle durch die PKC phosphoryliert und bewirkt dadurch eine Inaktivierung des TRPC5-Kanals unter Rezeptorstimulation. Auch die Serine an den Positionen 666, 752 und 833 sind Ziele der PKC. Serin-666 liegt in der Prolin-reichen Sequenz, Serin-752 in der Spektrinbindestelle, Serin-833 in der zweiten Calmodulinbindestelle und Threonin-972 in der C-terminalen PDZ-Domäne.

Mittels Aminosäureaustausche am TRPC5-Kanal und deren elektrophysiologischen Untersuchungen soll die Rolle des intrazellulären Botenstoffes DAG in der TRPC5-

Kanalaktivierung analysiert werden. Dabei stellen sich folgende Fragen:

- Beeinflussen die PKC-Phosphorylierungsstellen Serin-666, Serin-752 und Threonin-972 die Kanalaktivierung?
- Welchen Einfluss hat die Bindung von NHERF1-Brückenproteinen auf die Kanalaktivierung?
- Wie beeinflusst eine PIP₂-Depletion den TRPC5-Kanal?

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete oder ortsspezifische Mutagenese ist eine molekularbiologische Methode, durch die eine oder mehrere spezifische Mutationen gezielt in einer DNA vorgenommen werden kann (Carrigan et al. 2011; Braman et al. 1996). Es können dabei einzelne oder mehrere Basen ausgetauscht, entfernt oder hinzugefügt werden. In der vorliegenden Arbeit kam diese Methode zum Einsatz, um einzelne Basen an genau-definierten Stellen in der DNA des mTRPC5 und TRPPC6 auszutauschen. Da bestimmte Basen ausgetauscht werden mussten, eigneten sich ungerichtete Mutagenesemethoden nicht für diese Arbeit. Die gerichtete Primer-Extensions-Mutagenese kam für dieses Projekt nicht in Betracht, da die Effizienz im Vergleich zu anderen Methoden sehr gering ist (Gabrowski 2005). Der Grund dafür liegt darin, dass bei der Primer-Extensions-Mutagenese thermolabile Polymerasen zum Einsatz kommen, welche die DNA von den Primer ausgehend nur vervollständigen, aber die DNA nicht vervielfältigen können. Unter einem Primer versteht man ein Oligonukleotid, das als Startpunkt für die DNA-Polymerase dient. Für die Kassettenmutagenese, bei der ein synthetisiertes Oligonukleotid mit der gewünschten Mutation in ein zuvor geschnittenes Plasmid eingefügt wird, wären zwei Schnittstellen in beiden Richtungen nahe der Mutationsstelle nötig gewesen. Da aber in den verwendeten Plasmiden keine solcher Schnittstellen vorhanden sind und auch der Aufwand mit Restriktionsenzymverdau und anschließender Ligation größer ist, kam diese Methode ebenfalls nicht in Frage. Die Gapped-Duplex-Mutagenese kam auch nicht in Betracht, da diese Methode in der Selektion von mutierter von nicht-mutierter DNA sehr aufwendig ist und einen zusätzlichen Ligationsschritt benötigt (Gabrowski 2005). In dieser Arbeit wurde die QuickChange-Methode angewandt. Bei dieser Methode werden zwei Primer entworfen, einer in der 3'-5'- und einer in der 5'-3'-Laufrichtung, die beide an der gewünschten Stelle die Mutationen bzw. die Basenveränderungen enthalten. In ein Reaktionsgefäß werden die Primer, die *Pyrococcus furiosus* (Pfu)-DNA-Polymerase, eine Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mischung, sogenannte dNTP, bestehend aus Desoxyadenosintriphosphat, Desoxycytidintriphosphat, Desoxyguanosintriphosphat und

Desoxythymidintriphosphat, und die Ursprungs-DNA gegeben, welche verändert werden soll. Die Pfu-DNA-Polymerase wird verwendet, da sie zum einen thermostabil ist und zum anderen, da sie eine Korrekturlesefunktion besitzt, wodurch weniger unerwünschte Mutationen erzeugt werden als mit Polymerasen ohne diese Funktion (Greagg et al. 1999). Während der Polymerasen-Kettenreaktion wird die zu mutierende DNA bei 95°C denaturiert, es entstehen dabei zwei Einzelstränge. Dabei handelt es sich hierbei stets um die DNA eines zirkulären Expressionsvektors mit einem Cytomegalovirus- und einem Simian Virus 40-Promoter, der die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen ermöglicht. Zwei Antibiotikaresistenzen sind vorhanden, die eine für die Replikation des Vektors in Bakterien und die andere für die Herstellung einer stabil exprimierenden eukaryotischen Zelllinie. Im Anschluss wird die Temperatur gesenkt, die Primer binden an die DNA. Hierbei ist die sogenannte Anlege-Temperatur, die meistens im Bereich zwischen 50 bis 65°C liegt, entscheidend. Wird die Temperatur zu hoch eingestellt, kann der Primer nicht binden. Ist die Temperatur zu niedrig, bindet der Primer nicht spezifisch an der gewünschten Stelle, wodurch zusätzliche, nicht zielgerichtete Mutationen entstehen können. Anschließend wird die Temperatur auf 72°C angehoben, damit das Enzym, die Pfu-DNA-Polymerase, die komplementäre Einzelstrang-DNA mit Nukleotiden vervollständigen kann. Die Dauer dieser Elongationsphase hängt von der Länge des zu vervollständigenden komplementären DNA-Einzelstrangs ab. Die verwendete Pfu-DNA-Polymerase benötigt etwas eine Minute, um 1000 Basenpaare zu vervollständigen. Man erhält zwei neue komplementäre DNA-Einzelstränge, die die Mutation enthalten. Im nächsten Schritt werden diese beiden Doppelstränge wieder denaturiert, die Primer binden wieder an die vier Einzelstränge und werden zu insgesamt vier Doppelsträngen vervollständigt. Dieser Zyklus wiederholt sich 30 Mal und man erhält neben der nicht veränderten Ursprungs-DNA vorwiegend mutierte DNA. Damit die nicht-mutierte DNA in den weiteren Schritten nicht mitverarbeitet wird, wird ein DpnI-Restriktionsenzymverdau angewendet. Das DpnI-Enzym schneidet im Basen-Motiv GATC, aber nur wenn die Base Adenin methyliert vorliegt. Da die Ursprungs-DNA in einer *E. coli*-Bakterienkultur vervielfältigt wurde, hat die Desoxyadenosin-Methylase von *E. coli* die zu mutierende Ursprungs-DNA methyliert und sie wird im DpnI-Restriktionsenzym zerschnitten. Die mutierte, nicht geschnittene DNA wird im Anschluss in einer DH5 α -*E. coli*-Bakterienkultur vervielfältigt und zur Kontrolle sequenziert. Die Bakterienkultur erhielt seinen Namen

durch dessen Entwickler, Doug Hanahan, dessen fünfter Bakterienstamm die DH5 α -E.coli-Bakterien darstellten (Hanahan 1983).

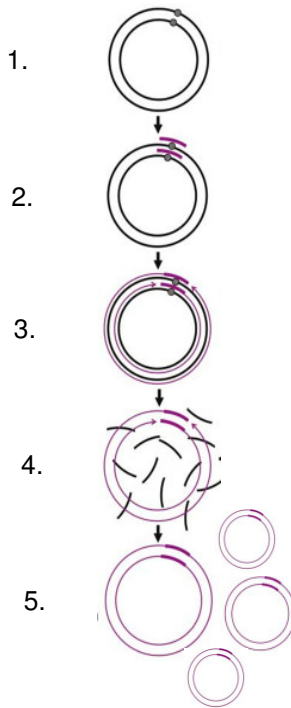


Abbildung 2.1: Ablauf der ortsspezifischen Mutagenese

1. Dargestellt ist das Plasmid mit beiden DNA-Einzelsträngen (schwarze Kreise) mit der zu mutierenden Stelle (graue Punkte). 2. Während der PCR legen sich die Primer mit der enthaltenden Mutation (violette Kreisbögen) jeweils an die zirkulären Plasmid-DNA-Einzelstränge (schwarze Kreise). 3. Bei 72°C synthetisiert die Pfu-DNA-Polymerase zwei neue zirkuläre Stränge (violette Kreise), so dass vier zirkuläre Einzelstränge vorhanden sind (zwei violette und zwei schwarze). Diese Synthese wird auch gegenläufige Polymerase-Kettenreaktion bezeichnet. 4. Nach der PCR wird die Probe einem DpnI-Restriktionsenzymverdau unterzogen, in welchem die methylierte, nicht mutierte Ursprungs-DNA zerschnitten wird (schwarze

Kreisbogenstücke). 5. Im letzten Schritt wird die DNA in DH5 α -E. coli Bakterien transformiert, welche die DNA-Reste der geschnittenen DNA abbauen und die mutierte zirkulär vorliegende DNA vervielfältigen.

Quelle: <http://www.laborjournal.de/rubric/tricks/tricks/trick126.lasso>, abgerufen am 16.04.2014

1.1. Material

Pfu-DNA-Polymerase (2,5 unit/ μ l)	#EP0502, Fermentas, St. Leon-Roth
dNTP Mix	#R0192, Fermentas, St. Leon-Roth
FastDigest DpnI 100 Reaktionen	#FD1704, Fermentas, St. Leon-Roth
Mutageneseprimer	Metabion, Martinsried

DNA-Vorlage:	
mTRPC5	Akzessionsnr.: NM_009428
mTRPC6	Akzessionsnr.: NM_004621
mTRPC5-S752A	Walther-Straub-Institut (Arbeitsgruppe Mederos)
mTRPC5-T972A	Walther-Straub-Institut (Arbeitsgruppe Mederos)

Tabelle 2.1: Herkunft der verwendeten DNA-Vorlagen

Übersicht der verwendeten Primer mit entsprechender Laufrichtung:

mTRPC6-S846G-HA-pIRES-EGFP:

5'-aaggagctcagaagattatcatttaaat**G**gtttcagtaaccctcc-3'
 3'-ggagggttactgaaac**C**attttaatgataatcttctgagctcctt-5'

mTRPC6-G872D-HA pIRES-EGFP:

5'-gcaggccag**A**ttgataaggagagcgatg-3'
 3'-catcgctctccttatcaa**T**ctgggctgc-5'

mTRPC5-E598D-pIRES-EGFP:

5'-cgacatgagttcactga**T**tttgtgggagctacgat-3'
 3'-gctgtactcaagtgact**A**aaacaccctcgatgcta-5'

mTRPC5-S752D-pcDNA3("A752D"):

5'-cagctgggcgtcatccatg**A**ctgtgaaattgcg-3'
 3'-cgcaatttcacag**T**catggatgacgccagctg-5'

mTRPC5-T972E-pIRES-EGFP („A972E“):

5'-atggggtgatggacaggaagaacaagttg**A**aactcggctctaagtc-
 3'
 3'-taccctactacctgtccttcttgttcaac**T**ctgagccgagattcag-
 5'

mTRPC5-T972D-pIRES-EGFP („E972D“):

5'-gatggacaggaagaacaagttga**T**actcggctctaa-3'
 3'-ttagagccgagt**A**tcaacttgttcttctgtccatc-5'

1.2. Primerdesign und -herstellung

Das Design erfolgte über das Programm „QuickChange Primer Design“¹ von Agilent Technologies. Es wurde hierbei darauf geachtet, dass folgende Parameter eingehalten wurden:

Schmelztemperatur	55-80°C
GC-Gehalt	40% - 60%
Länge	18-30 Basen
Lokalisation der Mutation	ungefähr in der Mitte mit mindestens 10 korrekten Basen zu jeder Seite hin

Tabelle 2.2: Parameter zur Erstellung von Mutageneseprimer.

Die Sequenzen wurden anschließend mittels Festphasen-Phosphoramidit-Oligonukleotidsynthese synthetisiert und hochleistungsflüssigkeits-chromatographisch aufgereinigt (Metabion, Martinsried).

1.3. Die Polymerase-Kettenreaktion

Es wurden 10 ng des Ausgangs-Templates für eine Mutagenese verwendet. Des Weiteren wurden 0,5 µl Pfu-DNA-Polymerase, 2,5 µl Pfu-DNA-Polymerase Puffer, 1 µl dNTP-Mix und jeweils 1 µl eines Mutageneseprimers in der 3'-5'- und eines in der 5'-3'-Laufriichtung hinzugefügt und mit Reinstwasser auf 25 µl aufgefüllt.

Der Ansatz durchlief dann folgendes PCR-Programm:

1. Deckelheizung: 110°C
2. Denaturierung: 95°C 3 min
3. 30 Zyklen:

Denaturierung:	95°C 30 sec
Primeranlegung:	30 sec bei 50 bis 65°C

¹<https://www.genomics.agilent.com/loginRegister.jsp> , letzter Zugriff am 15.04.2014

	Verlängerung:	72°C 10 min
4. Kettenverlängerung:		72°C 20 min
5. Endverlängerung:		72°C 10 min

1.4. DpnI-Verdau

Nach dem PCR-Programm wurde jedem Ansatz 1 µl DpnI hinzugefügt und vier Stunden bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurde die DNA in DH5 α -E. coli Bakterien überführt (siehe Kapitel 3 „Transformation“), am nächsten Tag vervielfältigt (siehe Kapitel 4 „3-ml-Bakterienkulturivierung und DNA-Extraktion“), extrahiert und zum Sequenzieren eingeschickt (siehe Kapitel 7 „Sequenzierung“).

2. Klonierung

Der Begriff der Klonierung bezeichnet in der vorliegenden Arbeit eine molekularbiologische Methode, mit der ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Vektor eingebracht und vervielfältigt wird. In der vorliegenden Arbeit kam diese Methode zum Einsatz, um Mutationen aus zwei verschiedenen Vektoren in einem Vektor zusammenzuführen oder um eine Mutation aus einem Vektor in einen anderen zu übertragen. So wurden Mutationen, welche in einen Vektor ohne die kodierende Region für ein fluoreszierendes Protein eingebaut waren, in einen Vektor mit dieser kodierenden Region umkloniert, damit das Produkt später unter fluoreszierendem Licht leuchtet. Dies ist in Patch-Clamp-Messungen von großer Bedeutung, da so vor der Messung kontrolliert werden kann, welche Zellen das gewünschte Plasmid aufgenommen haben und welche nicht. In den meisten Fällen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Vektor mit einer zusätzlichen internen, ribosomalen Eintrittsseite (IRES) verwendet, die eine weitere Translation des verbesserten, grün-fluoreszierenden Proteins (EGFP, vom englischen „enhanced green fluorescent protein“) ermöglicht (Rees et al. 1996; Thompson 2012). Das EGFP ist eine optimierte Variante des GFP, mit einer helleren Fluoreszenz und einer höheren Expressionsrate in Säugetierzellen (Cormack et al. 1996). Für die Rapamycin-Versuche wurde ein rot-fluoreszierendes Protein -das sogenannte „mCherry“- eingesetzt, das sich C-terminal

am FK506-Rapamycin bindenden Protein befindet. eingesetzt Dieser Rapamycin-Expressionsvektor wurde mit dem TRPC5-kodierenden pIRES2-EGFP-Vektor kotransfiziert.

Um den mutierten DNA-Abschnitt aus einem Expressionsvektor in einen anderen zu integrieren, wurde der Ziel-Vektor mittels Restriktionsendonukleasen an den zwei Stellen geschnitten, zwischen denen der mutierte DNA-Abschnitt eingebaut werden sollte. Danach wurde der geschnittene Vektor auf ein präparatives Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die Bande mit einem sterilen Einweg-Skalpell präzise herausgeschnitten. Diese Bande stellte den Vektor dar, welcher das neue DNA-Stück aufnehmen sollte. Nach der Extraktion aus dem Gel (GenJET Gel Extraction Kit, #K0691, Fermentas, St. Leon-Roth) wurden mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, #EF0654, Fermentas, St. Leon-Roth) die Phosphorylierungen an den Enden der DNA entfernt. Denn diese Phosphorylierungen erlauben, dass der aufgeschnittene Vektor sich mit sich selbst verbinden kann – sogenannte unerwünschte Religation. Das einzubauende DNA-Stück wurde auch mittels Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid ausgeschnitten, auf ein Gel aufgetragen und das daraus gewonnene Stück mit Hilfe des Enzyms Ligase mit dem aufgeschnittenen, dephosphorylierten Ziel-Vektor verbunden.

2.1. Material

FastDigest BbsI (BpiI) 40 Reaktionen	#FD1014 , Fermentas, St. Leon-Roth
FastDigest EcoNI (XagI) 100 rxn	#FD1304, Fermentas, St. Leon-Roth
FastDigest EcoRV (Eco32I) 200 rxn	#FD0303, Fermentas, St. Leon-Roth
FastDigest NheI 100 rxn	#FD0974, Fermentas, St. Leon-Roth
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase 1000 units (1 unit/ μ l)	#EF0651, Fermentas, St. Leon-Roth
T4 DNA Ligase 200 units (2,5 units/ μ l)	#EL0014, Fermentas, St. Leon-Roth

DNA-Vorlagen:

mTRPC5	NM_009428
mTRPC6	NM_004621
mTRPC5 S752A	Walther-Straub-Institut
mTRPC5 T972A	Walther-Straub-Institut
mTRPC5 T972E	Walther-Straub-Institut

2.2. Durchführung**2.2.1. Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA**

Für die restriktionsenzymatische Spaltung wurden in einem Gefäß 1 µg DNA, 2 µl FastDigest Green Buffer und jeweils 0,5 µl der verwendeten Restriktionsenzyme auf 20 µl Reinstwasser aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und danach auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen.

Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme, um folgende Stellen auszuschneiden:

mTRPC5-S752(A/D)	FastDigest NheI und EcoNI
mTRPC5-T972(A/E)	FastDigest EcoNI und EcoRV
mTRPC5-S752(A/D)-T972(A/D/E)	FastDigest NheI und EcoRV
mTRPC5-S752D aus mTRPC5-E598D-S752D-pIRES-EGFP	FastDigest BbsI

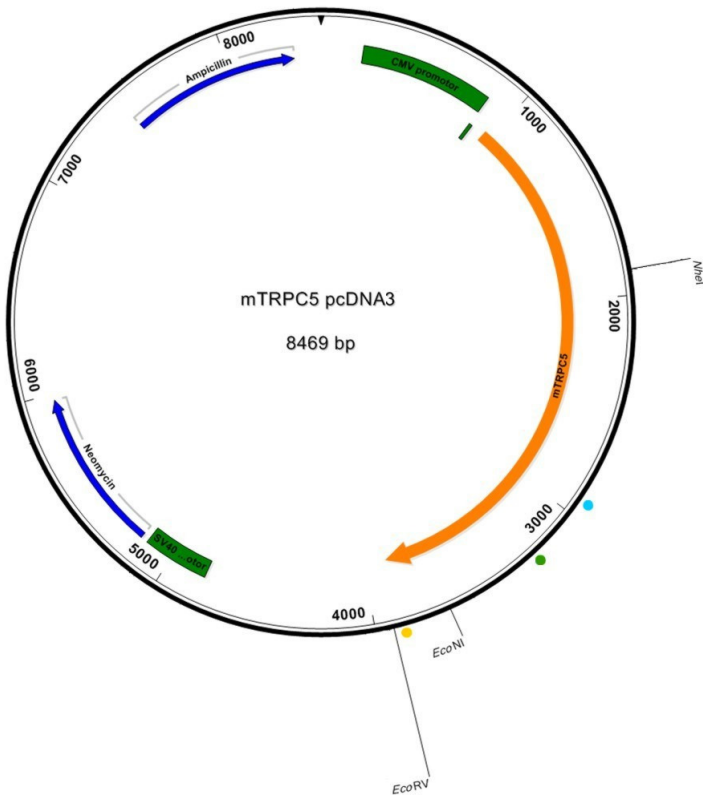


Abb. 2.2: Der mTRPC5 pcDNA3 Vektor

Dargestellt ist der pcDNA3 Expressionsvektor für Säugetierzellen mit der kodierenden cDNA-Sequenz von mTRPC5 (oranger Pfeil). Dieser für die Klonierung verwendete mTRPC5-Expressionsvektor hat eine Größe von 8469 Basenpaare und wurde für die Klonierung als Vektor eingesetzt. Der Vektor besitzt eine Neomycin- (blauer Pfeil, unten) und eine Ampicillin-Resistenz (blauer Pfeil, oben), sowie einen Cytomegalovirus- und einen SV40-Promoter (grüne Kreisbögen). Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme NheI, EcoNI und EcoRV sind eingezeichnet. Bei BbsI handelt es sich um eine Schnittstelle, welche zwei Mal im Vektor vorkommt. Die farbigen Punkte deuten die Positionen der entsprechenden Mutationen an: [S666](#), [S752](#) und [T972](#).

2.2.2. Extraktion der DNA aus dem Agarosegel

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurden DNA-Banden gezielt aus dem Gel isoliert und für Klonierungen verwendet. Dazu wurden die DNA-Fragmente unter 254 nm kurzwelligem UV-Licht sichtbar gemacht, die entsprechenden Bande mit einem Skalpell präzise ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die DNA mit einem handelsüblichen Kit (Gene Jet Gel Extraction Kit, Thermo Scientific, #K0691) nach Herstellerangaben aus den Gelstückchen isoliert.

2.2.3. Dephosphorylierung

Vektoren, welche mit dem Restriktionsenzym FastDigest EcoNI geschnitten wurden, hatten keine klebrigen, sondern glatte Enden, weshalb sie sich mit sich selbst verbinden könnten. Um dies zu vermeiden, wurden diese Vektoren dephosphoryliert. Dazu wurden 1 µg Vektor, 2 µl 10facher alkalischer Phosphatase Puffer und 2 µl einer 1:10 verdünnten alkalischen Phosphatase in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für 30 min bei 17°C inkubiert. Anschließend wurden weitere 2 µl alkalische Phosphatase Puffer und 2 µl einer 1:10 verdünnten alkalischen Phosphatase hinzu pipettiert und der Ansatz für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.4. Ligation

Für die Ligation wurden 1 µl T4-DNA-Ligase und 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer verwendet. Des Weiteren wurden in jedem Ansatz 1 µl des Vektors und jeweils 0 µl (als Negativ-Kontrolle), 1 µl, 3 µl und 5 µl des einzufügenden DNA-Stücks hinzu pipettiert. Bei Raumtemperatur ligierte der Ansatz 30 Minuten bis eine Stunde lang, bevor er in DH5α-Bakterien transformiert wurde (siehe Kapitel 3 „Transformation“), Anschließend wurde die DNA in einer Bakterienkultur vervielfältigt, extrahiert (siehe Kapitel 4 „3-ml-Bakterienkulturivierung und DNA-Extraktion“), und das Produkt in einem Kontrollverdau untersucht (siehe Kapitel 5 „Kontrollverdau“ und Kapitel 6 „Agarose-Gelelektrophorese“). Fiel der Kontrollverdau positiv aus, wurde die Probe zum Sequenzieren eingeschickt (siehe Kapitel 7 „Sequenzierung“).

3. Transformation

Zur Transformation wurden DH5 α -E. coli Bakterien verwendet. Diese Bakterien nehmen besonders effizient Plasmide auf, nachdem sie durch die Hanahan-Methode chemisch kompetent gemacht wurden (Chan et al. 2013). Eine halbe Stunde nach Zugabe der DNA wurden die kompetenten Bakterien bei 42°C für 30 Sekunden erhitzt. Danach wurde 400 μ l LB-Medium (LB vom Englischen lysogeny broth), ein komplexes Nährmedium zur Kultivierung von E. coli-Bakterien, ohne Antibiotikazusatz hinzu pipettiert und der Ansatz bei 37°C und 250 Umdrehungen eine Stunde lang geschüttelt. Der Ausstrich der Zellen erfolgte auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (50 μ g/ml Kanamycin beim pIRES2-EGFP-Vektor und 100 μ g/ml Ampicilin beim pcDNA3-Vektor). Im Anschluss wurden sie für 14 Stunden bei 37°C inkubiert.

4. 3-ml-Bakterienkultur und DNA-Extraktion

Die Klone, die auf den LB-Agarplatten wuchsen, wurden mit einer gelben Pipettenspitze einzeln gepickt und in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum für 14 Stunden bei 37°C und 250 Umdrehungen inkubiert. Die DNA-Extraktion erfolgte nach Anleitung des Präparationsbaukasten (HiYield Plasmid Mini Kit, 30HYPD100, Süd-Laborbedarf, Gauting/Planegg).

5. Kontrollverdau

Zur Kontrolle, ob ein Plasmid enthalten ist, wurde ein Kontrollverdau mit 1 μ l der Probe, 1 μ l FastDigest Green Buffer und jeweils 0,5 μ l der Restriktionsenzyme für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt.

6. Agarose-Gelelektrophorese

6.1. Material

Agarose NEEO Ultra Qualität	2267.3, Roth, Karlsruhe
Gene Ruler 1 kb	#SM0311, Fermentas, St. Leon-Roth
Rotisafe	3865.1, Roth, Karlsruhe

6.2. Durchführung

Die Agarose-Gelelektrophorese wird durchgeführt, um die DNA im elektrischen Feld der Größe nach aufzutrennen. Die Nukleotide sind durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen und wandern zur Anode; dabei bewegen sich kleine DNA-Stränge aufgrund ihrer Größe schneller zur Anode als größere DNA-Stränge. Für die Elektrophorese wurden 0,5-1%ige Agarose-Gele verwendet. Zur Herstellung des Agarose-Gels wurde 0,5-1% Agarose NEEO zu 180 ml eines 1:50 verdünnten TAE-Puffers (50fach: 2 M Tris, 1 M Acetat, 50 mM EDTA, pH 8,5) hinzugefügt. Zusätzlich wurde zur Sichtbarmachung der DNA-Banden unter UV-Licht von 254 nm 10 µl RotiSafe, einem DNA-bindenden Benzimidazol, hinzugefügt und die Mischung in eine 12 x 12 cm große Gelkammer gegossen. Danach wurde ein 16-Zinkenkamm eingesetzt und das Gel zum Aushärten eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem Aushärten konnte der Kamm entfernt und die Kammern befüllt werden. Dies erfolgte mit ca. 20 µl der Probe und 5 µl einer 1-Kilobasen-DNA-Leiter. Bei einer Spannung von 150 V und einer Stromstärke von 1 A wurde die Elektrophorese für eine Stunde durchgeführt. Im Anschluss wurde die DNA unter 254 nm kurzwelliges UV-Licht fotografiert.

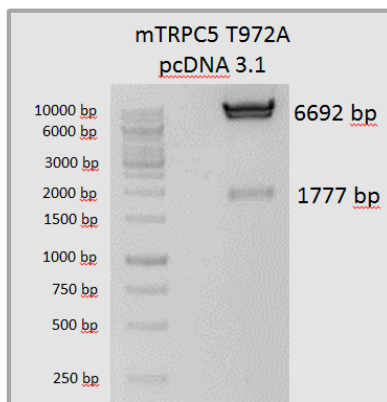


Abbildung 2.3: Ergebnis einer Gelelektrophorese

Die DNA mTRPC5 T972A pcDNA3 wurde mithilfe der Restriktionsenzyme NheI und EcoRV geschnitten. Deutlich sind rechts drei Banden zu erkennen: Die oberste stellt die nicht geschnittene DNA dar. Das unterste, 1777 bp lange Stück enthält die Mutation T972A und die mittlere Bande den 6692 bp langen, geschnittenen Vektor. Links ist die DNA-Leiter dargestellt. Der 1000 bp-Marker gibt eine Menge von 60 ng wieder.

7. Sequenzierung

Um sicher gehen zu können, dass nur die gewünschten Mutationen vorliegen und keine weiteren, wurde das mutierte Plasmid vollständig sequenziert. Hierzu wurden 800-900 ng der Plasmidproben eingesetzt. Die DNA-Sequenzierung beruht auf die Didesoxymethode von Frederick Sanger mit unterschiedlich fluoreszierenden Didesoxynukleosidtriphosphate, wobei die entstehenden komplementären DNA-Kettenabbruchprodukte kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden (GATC Biotech AG, Konstanz).

8. 250-ml-Bakterienkultur

Hat die Sequenzierung ergeben, dass das gewünschte Plasmid vorliegt, wurde dieses nochmals transformiert (s. Kap. 4 „Transformation“). Anschließend wurde mit einer gelben Pipettenspitze ein einzelner Klon gepickt und in 250 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum für 14 Stunden bei 37°C und 250 Umdrehungen inkubiert. Die DNA-Extraktion erfolgte nach Anweisung des Extraktionskits (NucleoBond Xtra Midi, 740410.50, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

9. Zellkultur

9.1. Material

Dulbeccos Phosphat-gepufferte Saline	D8537, Sigma, Steinheim
Earls minimal essentielles Medium	PAA laboratories, Linz, Österreich
Fetales Kälberserum (FCS)	Live Technologies, Carlsbad, USA
Gene Juice [®] Transfektionsreagenz	70967-3, EMD Chemicals, San Diego
Penicillin	PAA laboratories, Linz, Österreich
Streptomycin	PAA laboratories, Linz, Österreich
T75-Kulturflaschen	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Trypsin-EDTA Lösung (1x)	T3924, Sigma, Steinheim

9.2. Kultivierung der humanen Zelllinie HEK293T

Als Expressionssystem wurde in der vorliegenden Arbeit eine HEK293T-Zelllinie verwendet, die eine Fibroblastenzelllinie aus humanen Nierenzellen („human embryonic kidney“) darstellt. Zur Kultivierung diente als Nährmedium das sogenannte Earls minimal essentielles Medium (EMEM). Diesem wurde fetales Kälberserum im Verhältnis 1/10, 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugefügt. Für

ca. drei Monate wurde diese Zelllinie in einem Inkubationsschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% inkubiert. Dabei erfolgte die Kultivierung in 75 ml-Kulturflaschen, wobei die Zellen zwei bis drei Mal wöchentlich verdünnt (1 zu 10 oder 1 zu 20) in eine neue Kulturflasche überführt wurden. Als Waschlösung wurde hierbei Dulbeccos Phosphat-gepufferte Saline verwendet und zur Ablösung der anheftenden Zellen eine 0,5% Trypsin-haltige 0,2% Na₄-EDTA-Lösung. Diese Zelllinie wurde spätestens nach vier Monaten verworfen und eine neue in Kultur genommen.

9.3. Transfektion

Um die Expressionsplasmide in die HEK293T-Zellen hineinzubekommen, wurde zunächst 100 µl Reinstwasser mit Transfektionsmedium, hier das Gene Juice[®] Transfektionsreagenz, fünf Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Es wurde stets die dreifache Menge Transfektionsmedium gegenüber der Expressionsplasmid-DNA-Menge verwendet. Danach wurde der Ansatz zur Expressionsplasmid-DNA hinzupipettiert und die Mischung 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie zu den Zellen hinzu pipettiert wurde.

10. Elektrophysiologie

Die Patch-Clamp-Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt, um die Ionenströme des mTRPC5 und mTRPC6 zu messen. Diese Technik, welche von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt wurde, ermöglicht die hochauflösende Messung von Ionenströmen in der Membran von Zellen mittels zweier Elektroden. Die erste Elektrode stellt eine mit Pipettenlösung gefüllte Patchpipette mit einem chlorierten Silberdraht dar, die einen engen Kontakt zur Zellmembran aufbauen kann. Sie stellt die Ableitelektrode dar. Die zweite Elektrode erdet die Messkammer als Bad- oder Referenzelektrode und ist ein gesinterter Silber-Silberchlorid-Zylinder, so dass ein geschlossener Stromkreislauf ermöglicht wird. Werden nun Kanäle in der Zellmembran aktiviert, findet ein Stromfluss statt. Durch diesen Stromfluss entstehen Abweichungen von der Sollspannung. Um die Sollspannung wiederherzustellen, wird ein Stromfluss über den Operationsverstärker erzeugt. Dieser Stromfluss, welcher zur Wiederherstellung der Sollspannung benötigt wird, wird letztendlich in der Patch-Clamp-Methode gemessen. Mit dieser Methode können in Ganzzellmessungen

Ionenkanälen im zwei- bis dreistelligen Picoamperebereich aufgelöst werden. Des Weiteren können die Ionenkanäle über die Wahl der Pipetten- und Badlösung und die Gabe von diversen Kanalblockern ausgewählt und genauestens charakterisiert werden.

Die Messungen in der vorliegenden Arbeit fanden 48 (TRPC6) bis 72 Stunden (TRPC5) nach der Transfektion statt. Um die anhaftenden Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurden die HEK293T-Zellen vier Stunden vor Beginn der Messungen mit 0,5‰ Trypsin-haltige 0,2‰ Na₄-EDTA-Lösung behandelt, zur Vereinzelung auf- und abpipettiert und in einzelne 33-mm-Kulturschalen überführt. Alle Messungen fanden bei einer Raumtemperatur von 20-23°C statt.

10.1. Material

Pharmaka:

Bisindolylmaleimide I	203290, Calbiochem/Mereck, Darmstadt
Carbachol	212385, Calbiochem/Mereck, Darmstadt
Lanthanchlorid	449830, Sigma, Steinheim
1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol	495414, Calbiochem/Mereck, Darmstadt
Rapamycin	FO-10-1104.20, Biomol, Hamburg
RHC-80267	554994, Calbiochem/Mereck, Darmstadt
Staurosporin	SS4400, Sigma, Steinheim
Wortmannin	W1628, Sigma, Steinheim

Weitere Substanzen:

BAPTA (1,2-Bis(aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	A4926, Sigma, Steinheim
Rinderserumalbumin	A7030, Sigma, Steinheim

CaCl ₂	C5080, Sigma, Steinheim
CsCl	C3032, Sigma, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	D8418, Sigma, Steinheim
HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piper-azin] ethansulfonsäure)	H3375, Sigma, Steinheim
KCl	K9333, Sigma, Steinheim
MgCl ₂	M2670, Sigma, Steinheim
NaCl	N31434, Sigma, Steinheim

10.2. Der Messstand

Die Messvorrichtung besteht aus folgenden Komponenten: einem schwingungsgedämpften Tisch (Kinetic Systems, Inc., Roslindale, MA, USA), einem inversen Mikroskop (Olympus IX 70, Hamburg), drei Mikromanipulatoren (Ln mini/combi, Luigs und Neumann, Ratingen), einem Vorverstärker mit Pipettenhalter (EPC 10, HEKA Electronics, Dr. Schulz GmbH, Lambrecht, Deutschland, der Pipettenhalter ist ein Eigenbau aus Polycarbonat), einem Patch-Clamp-Verstärker (EPC 10, HEKA Electronics, Dr. Schulz GmbH, Lambrecht), einer Kamera (EHD KamPro 02 CCD-Kamera, EHD Imaging GmbH, Damme) und einem Monitor. Abgeschirmt wird die Messvorrichtung durch einen Faradayschen Käfig (Eigenbau aus rostfreiem Stahl, Feinmechanik-Werkstatt, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, Marburg, Deutschland).

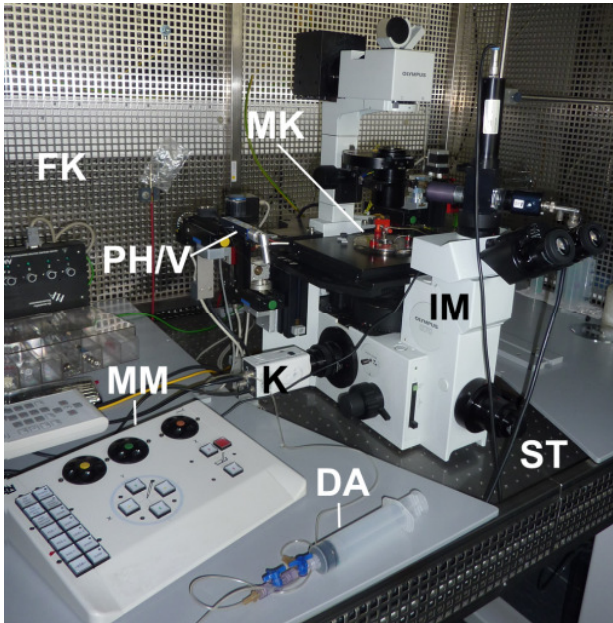


Abbildung 2.4: Aufbau eines Patch-Clamp-Messtisches

DA=Druckapplikator; FK=Faradayscher Käfig; IM=Inverses Mikroskop;
K=Videokamera; MK=Messkammer; MM=Schaltpult der Mikromanipulatoren;
PH/V=Pipettenhalter mit Verstärker; ST=Schwingungsgedämpfter Tisch

10.3. Das Perfusionssystem mittels Gravitation

Die Badlösungen werden in 50-ml-Spritzen (Original Perfusor Spitzen, Braun, Homberg/Efze) gefüllt, welche über ein Schlauchsystem mit der Messkammer verbunden sind. Die Schläuche (1,6 mm Innendurchmesser, 20004451, Saint-Gobain Ceramics & Plastics Inc., Courbevoie, Frankreich) enden in einem gemeinsamen Y-förmigen Endstück, an welches sich ein schmalere Schlauch anfügt. Dieser sorgt durch seinen reduzierten Durchmesser (0,25 mm Innendurchmesser, 27148, Reichelt Chemietechnik GmbH + Co., Heidelberg) für eine langsamere Flussgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute. Der Perfusionsschlauch endet in einer 180 µl kleinen Perfusionsskammer (32 x 23 x 12 mm) aus Plexiglas (Feinmechanik-Werkstatt, Institut

für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg) in eine dafür vorgesehene Bohrung. Diese Perfusionskammer lässt sich in eine 33-mm-Kulturschale (Nunclon™ Delta Surface, 153066, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) mit Befestigungsklemmen aus Federstahl fest einbauen. Die Perfusionskammer besitzt eine Öffnung für den Perfusionsschlauch und eine für die Referenzelektrode. In der Mitte befindet sich eine breite Aussparung, in welcher die Messungen durchgeführt werden. Die Badlösung wird über eine Vakuumpumpe abgesaugt (ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA).

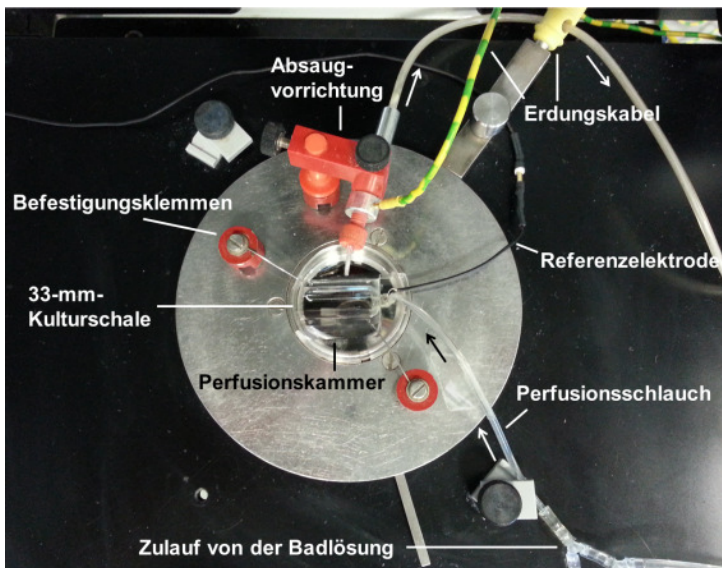


Abbildung 2.5: Aufbau einer Messkammer

Über ein Y-Verbindungsstück und einem englumigen Perfusionsschlauch fließt die Badlösung (Fließrichtung ist mit schwarzem Pfeil angegeben) über eine vertikale Bohrung in die Perfusionskammer aus Plexiglas, die sich in der 33-mm-Kulturschale befindet. Die Perfusionskammer wird über Befestigungsklemmen in Position gehalten. Eine weitere vertikale Bohrung in der Perfusionskammer ermöglicht den Kontakt der Referenzelektrode mit der Badlösung. Die Absaugvorrichtung sorgt für den Abfluss der Badlösung (Fließrichtung ist mit weißen Pfeilen angegeben), ohne dass es zu starken

Pegelschwankungen innerhalb der Perfusionsmesskammer kommt. Sowohl der nicht-rostende Edelstahlhalter für die Perfusionsmesskammer als auch die Absaugvorrichtung selbst sind jeweils durch ein Kabel direkt und sternförmig (nicht dargestellt) geerdet.

10.4. Herstellung der Patchpipette

Zur Herstellung der Patchpipetten wurden dünnwandige Borosilikatglaskapillaren mit einem Glasfilament (GB 150TF-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) herangezogen. Zum Ziehen der Pipetten wurde ein horizontales Pipettenziehgerät (DMZ-Universal-Puller, Zeitz Instrumente, München, Deutschland) verwendet. Dabei wird die Glaskapillare horizontal in das Gerät eingespannt und durch ein rot bis gelb glühendes Heizfilament in der Kapillarmitte zweimal erwärmt und auseinander gezogen. In einem dritten Erhitzungsschritt wird die Kapillare an der dünnsten Stelle auseinander gezogen und man erhält zwei noch unpolierte Patchpipetten. Entscheidend für den Pipettenwiderstand sind hierbei die Parameter Heiztemperatur, Zugkraft und Zeitpunkt des Einsetzens der Zugkraft. Für die Ganzzelleableitungen in der vorliegenden Arbeit wurde ein Pipettenwiderstand zwischen 2,5 bis 4,5 M Ω verwendet, um einen niedrigen Zugriffswiderstand mit einer guten Sealbildung zu erhalten. Die Patchpipetten wurden anschließend mit dem Pipettenziehgerät hitzepoliert ohne dass sich der Pipettenwiderstand verändert. Anschließend wurde die Pipette mit einer Pipettenlösung befüllt und in den Pipettenhalter (Eigenbau aus Polycarbonat) eingespannt.

10.5. Herstellung der Bad- und Pipettenlösungen

Für die Ganzzelleableitung wurde eine 297 milliosmolare (mOsmol) Pipettenlösung mit folgender Zusammensetzung verwendet:

120 mM CsCl, 3,949 mM CaCl₂, gepuffert auf 100 nM freies Ca²⁺ mit 10 mM BAPTA, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM Na₃-GTP, 9,4 mM NaCl.

Die Titration erfolgte mit 5 M CsOH auf einen pH-Wert von 7,20.

Es wurde eine Badlösung mit einer Osmolarität zwischen 291 und 299 mOsmol herangezogen, welche folgende Zusammensetzung aufzeigte:

5 mM CsCl, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 10 mM Glucose, 140 mM NaCl.

Die Titration erfolgte mit 1,11 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,40.

Die Pharmaka zur Stimulation der Ionenkanäle wurden in maximaler Wirkkonzentration zur Badlösung zugegeben. Das DAG-Analogon OAG wurde in einer Konzentration von 100 μ M in der Badlösung eingesetzt, wobei diese 1%o DMSO und 1%o Fettsäure-freies Rinderserumalbumin aufwies, um die Löslichkeit des OAG zu verbessern.

10.6. Durchführung der Messung

10.6.1. Auswahl der Zelle

Je nach dem verwendeten Vektor fluoreszierten die Zellen unter blauem Licht (490 nm Anregung) grün (EGFP) oder unter gelbem Licht (590 nm Anregung) rot (mCherry). Für die Messungen bevorzugten wir mittelstark fluoreszierende Zellen, da sie stabilere Ableitungen erlaubten als stark fluoreszierende Zellen. Außerdem wurde darauf geachtet, nur einzeln liegende Zellen zu messen, damit keine Wechselwirkungen mit anderen Zellen auftreten können.

10.6.2. Die Positionierung der Pipette

Nach der Auswahl der Zelle wurde die Patchpipette mittels eines sogenannten Mikroloaders (Eppendorf, Hamburg) mit neun μ l Pipettenlösung von hinten luftblasen-frei befüllt und in den Pipettenhalter eingespannt. Mit Hilfe des Mikromanipulators (Ln mini/combi, Luigs und Neumann, Ratingen) wurde die Patchpipettenspitze in die Badlösung getaucht. Vor dem Eintauchen der Patchpipette wurde ein leichter Überdruck von 10 cm Wassersäule angelegt, um ein Verstopfung der Patchpipette durch Schmutzpartikel zu verhindern.

10.6.3. Die Offset-Korrektur

Als Offset-Potential bezeichnet man die Summe aller Potentiale in der Messkette, die nicht von der abzuleitenden Zelle oder vom Patch-Clamp-Verstärker selbst herrühren. Diese Potentiale entstehen zum einen zwischen chlorierten Silberdraht der

Ableitelektrode und der Pipettenlösung, und zum anderen zwischen Referenzelektrode und Badlösung. Um diese Spannungen nicht zu messen, wurde folgende Korrektur durchgeführt: Sobald die Pipettenspitze 1 bis 2 μm über der Zelle war, wurde dem Nullpotential ein Nullstrom zugeordnet.

10.6.4. Das Diffusionspotential

Das Diffusionspotential, das sog. „Liquid Junction Potential“ beschreibt eine Spannung, die dann entsteht, wenn zwei Lösungen verschiedener Ionen und Ionenkonzentrationen aufeinander treffen. Dieses aufgrund der verschiedenen Diffusionsgeschwindigkeiten von Ionen entstehendes Potential muss berücksichtigt werden. Mit Hilfe eines Unterprogramms der Firma Axon Instruments, Union City, USA wurde das Diffusionspotential rechnerisch für die verwendete Bad- und Pipettenlösung (siehe Kap. 10.5) bestimmt. Das Diffusionspotential betrug +4,0 mV und jede Ganzzelleableitung wurde damit korrigiert.

10.6.5. Die Etablierung des „Gigaseals“

Für eine gute Ableitung mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik ist ein hoher Abdichtwiderstand – ein sogenannter Gigaseal – zwischen Patchpipette und Zellmembran notwendig. Bei der Annäherung der Patchpipette bis zur Sealbildung wurde in der Spannungsklemme über einen rechteckigen Kommandospannungspuls von ± 5 mV die Stromamplitude der Patchpipette angezeigt. Befand sich die Patchpipette kurz vor der Membran, nahm der Widerstand bei gleichbleibender Spannung zu und der Stromfluss wurde kleiner. Reduzierte sich die Stromamplitude der Patchpipette um 20-30%, wurde der Überdruck sofort abgelassen und durch leichtes Saugen mit dem Druckapplikator (siehe Abb. 2.4) ein steigender Unterdruck an die Zelle angelegt bis der Abdichtwiderstand höher als ein Gigaohm war. Damit war das sogenannte „Gigaseal“, erreicht. Folglich war die „cell-attached“-Konfiguration etabliert und die Patchpipettenkapazität wurde mittels der „cell-attached“- bzw. „on cell“-Aktivierung des Messprogramms kompensiert. Bei entkoppeltem Manometer wurde daraufhin gradiert ein starker Unterdruck erzeugt bis der Membranfleck aufriss. Dieser Unterdruck wurde sofort wieder entfernt und anschließend wurde die Zellmembrankapazität mittels des Messprogramms kompensiert. Außerdem wurde der Serienwiderstand bestimmt und es wurden nur Messungen mit niedrigen Serienwiderständen durchgeführt.

10.6.6. Die Ganzzelleableitung

Die Ganzzelleableitung bezeichnet eine Ableitkonfiguration, bei der ein Membranfleck mit einer Fläche kleiner als $1 \mu\text{m}^2$ unter der Patchpipette aufgerissen wird, sodass ein elektrischer Zugang vorhanden ist, der Ionenströme entlang der ganzen (bis auf den aufgerissenen Membranfleck) Zellmembran messen kann. Damit werden in der Regel nicht die Ströme eines Ionenkanalproteinkomplexes – die sogenannten Einzelkanalströme – sondern Ionenströme von vielen Ionenkanälen gemessen.

Die Etablierung einer Ganzzelleableitung erfolgt durch die Bildung eines Gigaseals wie sie in 10.6.5. beschrieben wird. Nach dem Aufbrechen des Membranflecks ersetzt die Pipettenlösung nach und nach das Zytoplasma, sodass man in dieser Konfiguration die Zusammensetzung sowohl des extra- als auch intrazellulären Milieus genau bestimmen kann.

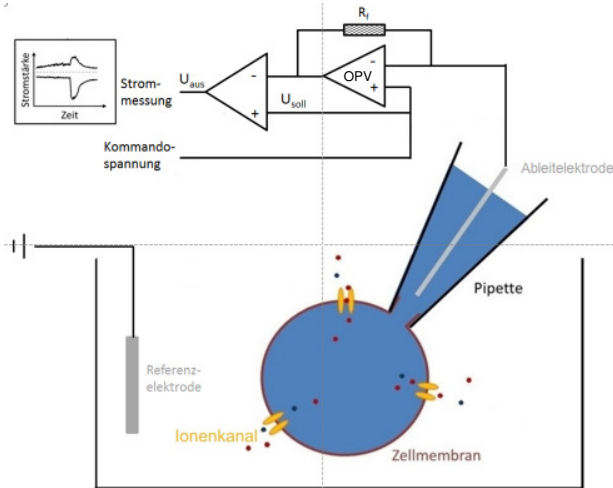


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Ganzzell-Konfiguration

Oben ist ein vereinfachter Schaltplan für den Patch-Clamp-Verstärker mit den Operationsverstärkern (OPV) und dem Rückkopplungswiderstand (R_f) dargestellt, um das Messprinzip zu veranschaulichen. Unten ist schematisch die Messkammer mit den beiden Elektroden und der Patchpipette abgebildet. Eine Ganzzell-Konfiguration mit aufgerissenen Membranflecken ist dargestellt. Durch das Aufreißen der Zellmembran wird der direkte Kontakt zum Zytoplasma hergestellt. Über die Referenzelektrode wird die Messkammer geerdet, während in der Spannungs-klemme über die Ableitelektrode in der Patchpipette der Kompensationsstrom I_{PIP} gemessen wird. Tritt zum Beispiel aufgrund der zu messenden Ionenströme durch die Ionenkanäle eine Änderung der Zellspannung auf, ergibt sich eine Spannungsdifferenz zwischen Sollspannung U_{soll} und der Spannung an der Ableitelektrode der Patchpipette U_{PIP} . Durch die Verschaltung des rechten Operationsverstärkers kommt es durch diese Differenz zu einem Stromfluss durch den Rückkopplungswiderstand R_f und der Ableitelektrode in die Zelle. Der Stromfluss versiegt, sobald die Zellspannung wieder gleich der Kommandospannung ist. Am linken Operationsverstärker liegt eine Spannung an, die proportional zum Strom durch den Rückkopplungswiderstand R_f ist.

Von dieser Spannung wird wiederum die Kommandospannung abgezogen. Die Differenz wird vom zweiten Operationsverstärker verstärkt und wird als Spannung U_{aus} am Ausgang gemessen. Aus der Spannung U_{aus} , der Operationsverstärkung und dem Rückkopplungswiderstand R_f kann der Kompensationsstrom I_{PIP} ermittelt werden, der den Ionenströmen in der Zellmembran entspricht. Dieser Strom wird anschließend in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

10.6.7. Das Messverfahren

Die Patch-Clamp-Ableitungen wurden mit Hilfe des Datenerfassungsprogrammes Patchmaster v2.67 (HEKA Electronics, Dr. Schulz GmbH, Lambrecht) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden mit diesem Programm in der Spannungsklemme trianguläre Spannungsrampen zwischen -100 und +60 mV appliziert. Damit wurde zu jedem Zeitpunkt in der Spannungsklemme Einwärts- oder Auswärtsströme gewöhnlich im zweistelligen bis dreistelligen pA-Bereich gemessen.

10.6.8. Auswertung der Messungen

Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der Auswertesoftware Fitmaster v2.69, um die Stromwerte aus Spannungsrampen gemittelt und die Zellmembrankapazitäten zu erhalten. Mit den Tabellenkalkulationsprogramme Origin 7.5 und 8.0 wurden die Strom-Spannungsbeziehungen, Stromzeitverläufe und die Stromdichten erstellt sowie die statistische Auswertung durchgeführt. Als statistisch signifikant unterschiedlich wurden Daten berücksichtigt, welche beim Studentischen Zwei-Stichproben-T-Test einen Wert von unter 0,05 aufwiesen. Es wurde für alle Stromdichten die Standardabweichung vom Mittelwert berechnet. Für alle Abbildungen in der vorliegenden Arbeit gilt: n. s. = nicht signifikant; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

IV. ERGEBNISSE

1. Molekularbiologie

1.1. Mutagenese

In der Literaturübersicht, Kap. 2.4.4.3, wurden vier PKC-Phosphorylierungsstellen - S666, S752, S833 und T972 - im TRPC5 beschrieben, welche für die Inaktivierung unter Rezeptorstimulation von Bedeutung sind. Um den Einfluss dieser Phosphorylierungsstellen auf die DAG-Aktivierbarkeit elektrophysiologisch zu untersuchen, wurden jeweils Aminosäureaustausche an den Positionen S666, S752 und T972 im TRPC5 durchgeführt. Ziel dieser Mutationen war es, entweder das Threonin bzw. Serin durch eine negativ geladene Aminosäure zu ersetzen, welche sterisch einem Phosphothreonin bzw. -serin gleicht oder eine phosphorylierbare Aminosäure durch eine nicht-phosphorylierbare zu ersetzen. Als phosphomimetische Aminosäuren wurden in der vorliegenden Arbeit Aspartat und Glutamat eingesetzt. Sowohl Aspartat (D) als auch Glutamat (E) ähneln durch ihre negativ geladene Carboxylgruppe und ihrem sterischen Aufbau dem Phosphoserin und Phosphothreonin (s. Abb. 3.1).

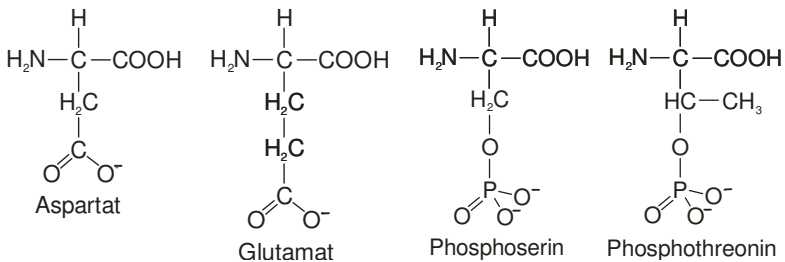


Abb.3.1: Vergleich phosphomimetischer Aminosäuren mit Phosphoserin und Phosphothreonin

Um eine Phosphorylierung des Threonins bzw. Serins zu verhindern, wurde ein Aminosäureaustausch durchgeführt mit Aminosäuren, welche keine freien

Elektronenpaare zur Bindung einer Phosphatgruppe zur Verfügung stellen. In der vorliegenden Arbeit wurden hierzu Serin und Threonin durch Glycin oder Alanin ersetzt, da diese kleinen Aminosäuren kaum sterisch behindern und die Positionen benachbarter Aminosäuren kaum verändern (s. Abb. 3.2).

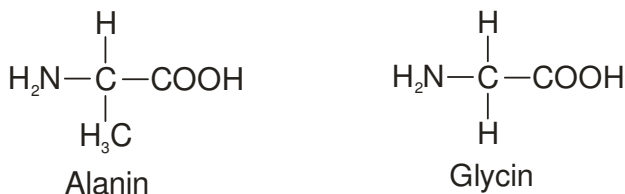


Abb.3.2: Verwendete nicht-phosphorylierbare Aminosäuren

Da die vorliegende kodierende DNA-Sequenz des mTRPC6-Kanalproteins mit einer C-terminalen Hämagglutinin-(HA)-Sequenz eine Punktmutation enthielt, die zu dem Aminosäureaustausch D872G führte, musste diese zunächst mittels zielgerichteter Mutagenese und unter Verwendung eines mTRPC6-G872D-Primers entfernt werden. Um zu überprüfen, ob die Position S846, welche sich ähnlich den Positionen S752 und T972 im mTRPC5 im letzten Drittel des C-Terminus befindet, einen Einfluss auf die DAG-Sensitivität des mTRPC6 hat, wurde in der anschließend mutationsfrei kodierenden DNA-Sequenz des mTRPC6-HA das Serin an der Position 846 durch ein Glycin ausgetauscht.

Die Anlege-Temperatur ist der entscheidende Parameter in der PCR, welcher darüber entscheidet, ob der Mutagenese-Primer an der richtigen Stelle binden kann oder nicht. Wird die Temperatur zu niedrig eingestellt, bindet der Primer unspezifisch und verursacht weitere, ungerichtete Mutationen. Ist sie zu hoch, kann der Primer nicht mehr binden. In der folgenden Tabelle 3.1 wird zusammengefasst, welche Anlege-Temperatur für welche Mutagenese verwendet wurde.

Zur Herstellung von:	Primer	Anlege- Temperatur
mTRPC6-G872D-HA-IRES-EGFP	mTRPC5-G872D-Primer	48,4 °C
mTRPC6-S846G-G872D-HA-IRES-EGFP	mTRPC5-G872D-Primer	49,5 °C
mTRPC6-S846G-HA-IRES-EGFP	mTRPC6-S846G-Primer	58,7 °C
mTRPC5-T972E-IRES-EGFP	mTRPC5-T972E-Primer	47,5 °C
mTRPC5-T972D-IRES-EGFP	mTRPC5-T972D-Primer	61,4 °C
mTRPC5-S752D-T972A in pcDNA3	mTRPC5-S752D-Primer	56,8 °C
mTRPC5-E598D in pcDNA3	mTRPC5-E598D-Primer	47 °C

Tab.3.1: Benötigte Anlegetemperaturen für die Mutagenese

1.2. Klonierung

Die folgende Übersicht zeigt die durch Klonierung fertiggestellten Konstrukte.

mTRPC5-S752A-T972A in pcDNA3
mTRPC5-S752A-T972A-IRES-EGFP
mTRPC5-S752A-T972E-IRES-EGFP
mTRPC5-S752D-T972A-IRES-EGFP
mTRPC5-S752D-T972D-IRES-EGFP
mTRPC5-S752D-T972E-IRES-EGFP
mTRPC5-S752D-IRES-EGFP
mTRPC5-E598D-IRES-EGFP

Tab.3.2: Übersicht über die durch Klonierung hergestellten Konstrukte

2. Elektrophysiologische Untersuchungen zur DAG-Sensitivität des TRPC5 und TRPC6

Wie in der Literaturübersicht im Kapitel 2.4.4 beschrieben, ist der genaue Aktivierungsmechanismus des TRPC5 noch unbekannt. Bekannt ist, dass TRPC5 nicht durch DAG aktivierbar ist und dass die Phosphorylierung durch die PKC eine Inaktivierung des TRPC5 unter Rezeptorstimulation bewirkt (Venkatachalam et al. 2003; Zhu et al. 2005). Ebenfalls wurde gezeigt, dass der Abbau von PIP₂ eine TRPC5-Aktivierung hervorruft (Trebak et al. 2009).

Um die Rolle von DAG, PKC und PIP₂ näher zu untersuchen, wurden Patch-Clamp-Messungen in der Ganzzellkonfiguration durchgeführt. Hierfür wurden folgende Kanalkonstrukte untersucht: der unveränderte mTRPC5, die Mutationen S752A, S752D, S752E, T972A, T972D, T972E im mTRPC5 sowie die Doppelmutationen S752A-T972A, S752A-T972D, S752D-T972A, S752D-T972D, S752D-T972E und der mTRPC6-S846G. Als DAG-Analogon wurde das membranpermeable 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol (OAG) in einer Konzentration von 100 µM verwendet. Zur Expressionskontrolle von TRPC5 wurde am Ende jeder Messung 300 µM LaCl₃ - ein Potentiator von TRPC5 - appliziert und die Aktivierung des TRPC5 abgewartet (Schaefer et al. 2000).

Zur Untersuchung der Rolle der PKC wurde der PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (Bim I) verwendet. Die zu messenden transfizierten HEK293T-Zellen wurden vor den Patch-Clamp-Messungen für mindestens zehn Minuten mit 1 µM Bim I vorinkubiert.

Da die PKC-Phosphorylierungsstelle T972 sich in der PDZ-Bindungsdomäne (V_TTRL) befindet, wäre es möglich, dass die Bindung von NHERF1 an diese Position die Aktivierung des TRPC5 beeinflusst. Um die Bindung von NHERF1 zu verhindern, wurde eine Variante des NHERF1 mit einer Mutation an der Position E68 (NHERF1-E68A) koexprimiert, die vermutlich aufgrund der fehlenden Phosphorylierung an der Position 68 in der PDZ-Bindestelle 1 nicht mehr in der Lage ist, an eine PDZ-Bindungsdomäne zu binden (Courbebaisse et al. 2012) und damit auch nicht an TRPC5.

Ob der Abbau von PIP₂ eine Auswirkung auf die DAG-Aktivierbarkeit von TRPC5 hat, wurde in dieser Arbeit mithilfe des Phosphatidylinositol-4-Kinase-Inhibitors

Wortmannin in einer Konzentration von 50 μM getestet. Die Phosphatidylinositol-4-Kinase wird zur Neusynthese von PIP_2 benötigt, wodurch eine Hemmung dieser Kinase einen PIP_2 -Abbau bewirkt. Wortmannin hemmt spezifisch die Phosphatidylinositol-4-Kinase, wobei die PKC und die Protein-Tyrosin-Kinase nicht inhibiert werden (Powis et al. 1994). Schließlich wurde auch der Einfluss von koexprimierten Rezeptoren auf die DAG-Aktivierbarkeit getestet. Hierzu wurde der muskarinische M5-Rezeptor, der mit 100 μM Carbachol (CCh) stimuliert werden kann, zusammen mit TRPC5 in HEK293-Zellen überexprimiert.

2.1. Untersuchungen zur DAG-Sensitivität des Wildtyp-mTRPC5

Schon mehrfach konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp mTRPC5 nicht DAG-sensitiv ist (Venkatachalam et al. 2003). Auch in unserem Labor konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Exemplarisch ist in Abb. 3.3 eine Messung des mTRPC5 dargestellt (Ren 2007). Im Stromzeitverlauf ist eine Stromabnahme nach Beginn der OAG-Applikation zu sehen mit einer Reduktion des Stroms unter den Basalwert (s. Abb. 3.3 A.).

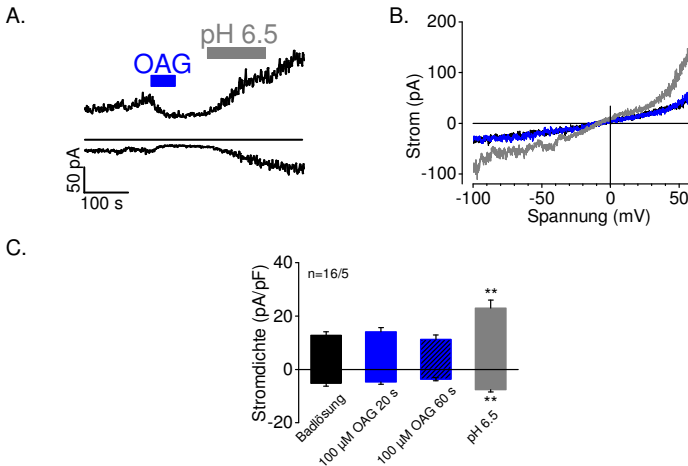


Abb. 3.3: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5

A. Im exemplarischen Stromzeitverlauf von mTRPC5-exprimierenden HEK293-Zellen ist eine Stromabnahme unter 100 μ M OAG (blauer Balken) zu erkennen. Erst unter leicht saurer Badlösung mit pH-Wert 6.5 ist ein Anstieg des TRPC5-Stroms zu sehen. B. Die Stromspannungskurve zeigt den doppelt-rektifizierenden Verlauf des mTRPC5 unter der leicht sauren Lösung (grau) mit einem Umkehrpotential bei null pA. Unter OAG (blau) und der Badlösung (schwarz) stellt sich die Kurve annähernd linear dar. C. Im Stromdichtensäulendiagramm kann 20 s nach Beginn der Applikation von OAG eine leichte Stromdichtenzunahme festgestellt werden. 60 s nach Beginn der OAG-Applikation konnten Stromdichtenabnahmen sowohl im Einwärts- als auch Auswärtsstrom unter den Basalwert beobachtet werden. Quelle: Ren 2007.

Die PKC spielt eine entscheidende Rolle in der Desensibilisierung des mTRPC5 (Zhu et al. 2005). Um zu untersuchen, ob sie auch eine Rolle in der DAG-Sensitivität einnimmt, wurde der mTRPC5-Wildtyp mit 1 μ M des PKC-Inhibitors Bim I vorinkubiert. Nach Applikation von 100 μ M OAG ist ein Stromanstieg unter OAG zu erkennen, genauso unter 100 μ M CCH (s. Abb. 3.4 A. Oben). Eine PKC-Inhibition bewirkte folglich die DAG-Sensitivität des mTRPC5-Wildtyp. Die Messungen wurden gemeinsam mit Frau Dr. Ursula Storch vom Walther-Straub-Institut

durchgeführt.

In Koexpression mit dem muscarinischen M5-Rezeptor war ebenfalls eine DAG-Sensitivität festzustellen (s. Abb. 3.4 C.).

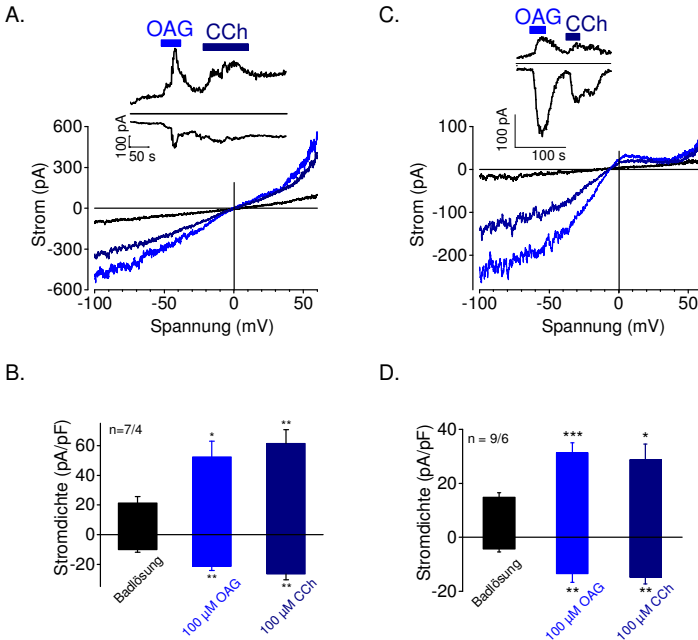


Abb. 3.4: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5 unter PKC-Inhibition und bei Rezeptorüberexpression

A. *Oben:* Dargestellt ist der exemplarische Stromzeitverlauf von mTRPC5-exprimierenden HEK293-Zellen ohne Rezeptorüberexpression nach Vorinkubation mit 1 μ M Bim I. Die Balken stellen die Applikation von 100 μ M OAG (blau) und 100 μ M CCh (dunkelblau) dar. Eine Stromzunahme findet sowohl unter OAG als auch CCh statt. *Unten:* Die Stromspannungsbeziehungen des mTRPC5 nach Bim I-Vorinkubation sind hier dargestellt. Typische TRPC5-Stromspannungsbeziehungen sind unter OAG (blau) und CCh (dunkelblau), nicht aber unter der Standardbadlösung (schwarz) zu sehen. B. Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5 mit Bim I-Vorinkubation zeigt die Stromdichtenzunahmen unter OAG und CCh. C.

Oben: Der exemplarische Stromzeitverlauf zeigt das Verhalten des mTRPC5 bei Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor. Unter OAG findet eine starke Stromzunahme sowohl in Einwärts- als auch Auswärtsrichtung statt. *Unten:* Die Stromspannungsbeziehungen von mTRPC5 und den muskarinischen M5-Rezeptor koexprimierenden HEK203-Zellen sind zu sehen vor (schwarz) und während der Applikation von OAG (blau) und CCh (dunkelblau). D. Im Stromdichtensäulendiagramm von mTRPC5 bei und den muskarinischen M5-Rezeptor koexprimierenden Zellen ist eine signifikante Stromdichtenzunahme sowohl in Auswärts- als auch Einwärtsrichtung unter OAG und CCh zu erkennen.

Wie in Abb. 3.4 gezeigt, war der TRPC5-Kanal sowohl unter PKC-Inhibition als auch bei Rezeptorüberexpression DAG-aktivierbar. Der Grund könnte darin liegen, dass die Rezeptorüberexpression ebenso wie die PKC-Inhibition eine Phosphorylierung des TRPC5-Kanals verhindert. Zudem könnte die Rezeptorüberexpression eine Dephosphorylierung des TRPC5-Kanals durch die Aktivierung von Phosphatasen bewirken. Um diese These zu überprüfen, wurden mTRPC5 und Rezeptor koexprimierende HEK293-Zellen in Anwesenheit des Phosphatasehemmers Calyculin A elektrophysiologisch untersucht.

Wie in Abb. 3.5 zu sehen ist, fand unter Calyculin A keine TRPC5-Aktivierung durch 100 μM OAG statt. CCh und LaCl_3 aktivierten jedoch den TRPC5. Die Dephosphorylierung durch Phosphatasen scheint daher eine notwendige Voraussetzung für die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 bei Rezeptorüberexpression zu sein.

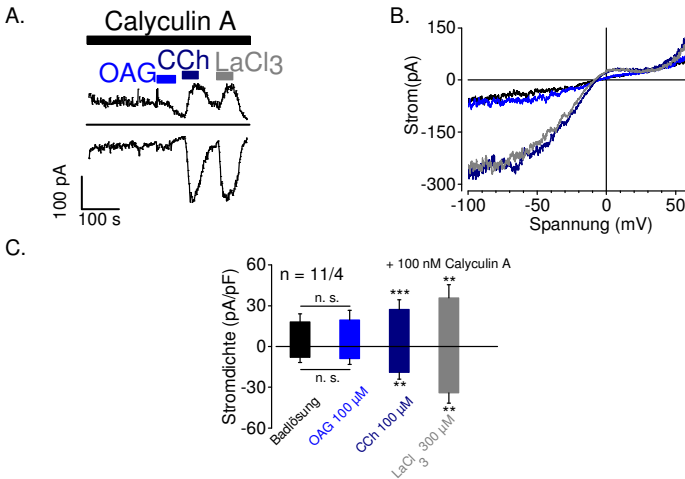


Abb. 3.5: Die Auswirkung der Phosphatasehemmung auf die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5

A. Im exemplarischen Stromzeitverlauf von mTRPC5 und M5-Rezeptor koexprimierenden Zellen ist keine Stromzunahme unter der Zugabe von OAG in Anwesenheit des Phosphatasehemmers Calyculin A zu sehen. B. Die Stromspannungskurven des mTRPC5 zeigen in Anwesenheit von Calyculin A den doppelt-rectifizierenden Verlauf des TRPC5 nur unter CCh (dunkelblau) und LaCl₃ (grau), nicht jedoch unter der Standardbadlösung (schwarz) bzw. unter OAG (blau). C. Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt die signifikante Stromdichtenzunahme unter CCh (dunkelblau) und LaCl₃ (grau).

Trebak et al. (2009) stellten fest, dass der Abbau von PIP₂ durch den Phosphatidylinositol-4-Kinase-Inhibitor Wortmannin zu einer Stimulation des TRPC5 führt. Dieses Ergebnis konnte durch uns bestätigt werden. Die Applikation von 50 μM Wortmannin führte tatsächlich zu einer Stimulation des mTRPC5, welche durch die zusätzliche Gabe von OAG noch gesteigert werden konnte (s. Abb. 3.6). Nach Applikation von 50 μM Wortmannin erfolgte eine Stromdichtenzunahme in Auswärtsrichtung von $87,8 \pm 19,1$ pA/pF und in Einwärtsrichtung von -79 ± 15 pA/pF. Bei zusätzlicher Gabe von OAG unter Wortmannin erhöhte sich der Auswärtsstrom mit $145,8 \pm 60,6$ pA/pF um das 1,6fache und der Einwärtsstrom mit $-119,1 \pm 43,6$ pA/pF um das 1,5fache. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die PIP₂-Depletion

nicht nur den TRPC5 aktiviert, sondern auch zu einer DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 führt. Dabei hat DAG nicht die gleiche Wirkung wie die PIP₂-Depletion, sondern vielmehr eine additive Wirkung.

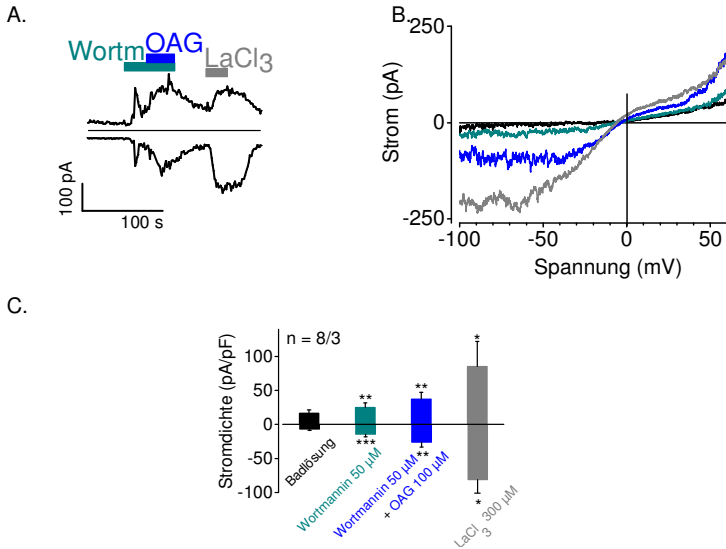


Abb. 3.6: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5 unter PIP₂-Depletion

A. Im exemplarischen Stromzeitverlauf von mTRPC5-überexprimierenden HEK293-Zellen ist eine Stromzunahme unter Wortmannin zu sehen, sowie eine verstärkte Stromzunahme bei zusätzlicher Gabe von OAG. B. Exemplarische Stromspannungskurven sind dargestellt während die Badlösung eingewaschen wird (schwarze Linie), unter Wortmannin (grün), unter Wortmannin und OAG (blau) und unter LaCl₃ (grau). C. Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt signifikante Stromdichtenzunahmen unter Wortmannin, Wortmannin mit OAG und LaCl₃.

Die PIP₂-Depletion durch Wortmannin hat den Nachteil, dass Wortmannin nicht nur die Phosphatidylinositol-4-Kinase inhibiert, sondern auch die DNA-abhängige Proteinkinase, die Myosin-leichte-Ketten-Kinase und mitogenaktivierte Kinasen (Amatya et al. 2012; Ferby et al. 1996; Nakanishi et al. 1994). Um ausschließen zu können, dass diese Seiteneffekte an der DAG-Aktivierbarkeit unter Wortmannin

beteiligt sind, wurde zusätzlich das spezifische Rapamycin-System von Lindner et al. verwendet (Lindner et al. 2011). Dieses System basiert auf folgendem Prinzip: Der zu testende Kanal wird zusammen mit dem membranständigen FK506-Rapamycin bindenden Protein (Lyn11-FRB-mCherry) und dem zytosolisch gelegenen FK506 bindenden Protein (Pseudojanin-FKBP-pmRFP) exprimiert. Am FKBP-Protein sind zusätzlich zwei Enzyme gebunden: Die humane Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase INPP5E und die Phosphatidylinositol-Phosphatase Sac1. Der Name Sac1 leitet sich vom Englischen „Suppressor of Actin“ ab und rührt daher, dass eine Mutation im Sac1-Gen zur Unterdrückung des Aktinstrukturgens 1 geführt hatte. INPP5E katalysiert den Abbau von PIP₂ zu PIP und Sac1 den Abbau von PIP zu PI. Die Applikation von 5 µM Rapamycin während der Patch-Clamp-Messung bewirkt eine Verbindung des membranständigen FRB-Proteins mit dem zytosolischen FKBP-Protein wodurch auch die an FKBP gebundenen Enzyme sich der Membran nähern und dort PIP₂ zu PI abbauen (s. Abb. 3.7 A.). Die Applikation von Rapamycin führte zu einer geringgradigen Stromzunahme und die zusätzliche Gabe von OAG konnte den TRPC5-Strom zusätzlich signifikant erhöhen (s. Abb. 3.7. B. und D.). Insgesamt konnte jedoch festgestellt werden, dass die Expressionsrate des TRPC5 in der Zellmembran sehr gering war, da auch die LaCl₃-Antworten mit einer Zunahme der Stromdichte von $-6,9 \pm 2,4$ pA/pF in Einwärts- und $5,2 \pm 1,8$ pA/pF in Auswärtsrichtung sehr niedrig ausfielen. Nichtsdestotrotz bestätigt dieses Experiment das Ergebnis der Messungen mit Wortmannin, nämlich dass der Abbau von PIP₂ zu einer DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-Kanals führt.

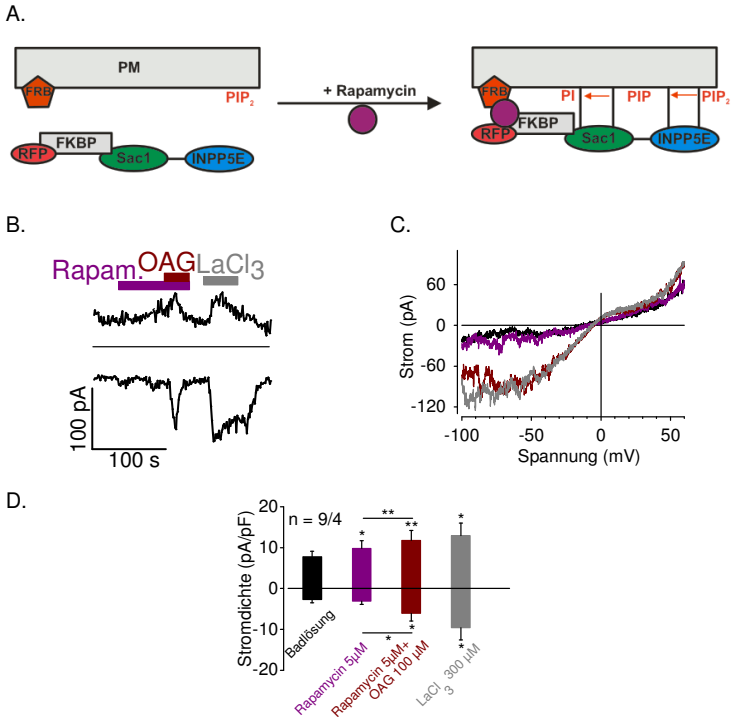


Abb. 3.7: Der Abbau von PIP_2 zu PI bewirkt eine DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5

A. Das Rapamycin-System von Lindern et al. (2011) ermöglicht den Abbau von PIP_2 zu PI. Dazu wird der Kanal mit FRB und FKBP koexprimiert. An das FKBP sind die zwei Enzyme INPP5E und Sac1 gebunden. Wird Rapamycin dazugegeben, verbinden sich FRB und FKBP. Die an FKBP gebundenen Enzyme nähern sich so der Plasmamembran (PM) und können dort PIP_2 zu PIP (INPP5E) und PIP zu PI (Sac1) abbauen. B. Der exemplarische Stromzeitverlauf des mTRPC5 in Koexpression mit Lyn11-FRB-mCherry und PseudojaninFKBP pmRFP zeigt eine leichte Stromerhöhung unter $5\ \mu\text{M}$ Rapamycin (lila Applikationsbalken) und eine Steigerung bei der zusätzlichen Gabe von $100\ \mu\text{M}$ OAG (roter Applikationsbalken). C. Die Stromspannungsbeziehungen unter der Badlösung (schwarz), Rapamycin (lila), Rapamycin und OAG (rot) und LaCl_3 (grau) zeigen den doppelt-

rektifizierenden Verlauf des TRPC5 vor allem unter OAG und LaCl_3 . C. Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt eine leichte Stromdichtenzunahme unter Rapamycin mit einer zusätzlichen Steigerung durch OAG und Rapamycin.

2.2. Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972A

Als nächstes wurde ein TRPC5-Konstrukt verwendet, das einen Aminosäureaustausch an der Position 972 von Threonin zu Alanin aufweist. Da Alanin über kein freies Elektronenpaar verfügt, um eine Phosphatgruppe zu binden, kann die Position 972 im mTRPC5-T972A nicht mehr phosphoryliert werden. Messungen mit dieser Mutante wurden durchgeführt, um den Einfluss der PKC-Phosphorylierung auf die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 zu überprüfen. Maximilian Philipp von der Philipps-Universität Marburg fand heraus, dass mTRPC5-T972A per se DAG-aktivierbar ist. Dieses Ergebnis konnte von mir bestätigt werden, was in Abb. 3.8 dargestellt ist. Nach Applikation von OAG kam es zur signifikanten Erhöhung der Stromdichten in Einwärtsrichtung um $-3,4 \pm 0,9$ pA/pF und in Auswärtsrichtung um $18,9 \pm 5,8$ pA/pF. Das deutet darauf hin, dass die fehlende Phosphorylierung an der Position 972 für die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5-Kanals essentiell sein könnte.

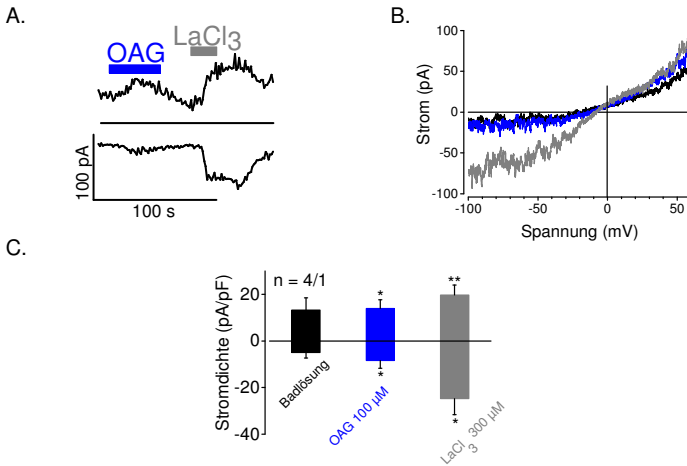


Abb. 3.8: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972A

A. Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-T972A-exprimierenden HEK293-Zellen ist eine Stromzunahme in Auswärts- und Einwärtsrichtung während der Applikation von 100 μ M OAG zu sehen. B. Exemplarische Stromspannungsbeziehungen des mTRPC5-T972A sind dargestellt unter der Badlösung (schwarz), unter OAG- (blau) und unter LaCl₃-Applikation (grau). C. Das Stromdichtensäulendiagramm lässt eine signifikante Stromdichtenzunahme unter OAG und LaCl₃ erkennen.

2.3. Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972E

Nachdem mTRPC5-T972A durch DAG aktivierbar war, stellte sich nun die Frage, ob eine phosphomimetische Mutation an Position 972 entsprechend zu einem Verlust der DAG-Aktivierbarkeit führt. Wie in Abb. 3.9 B zu erkennen ist, konnten OAG-Applikationen keine Aktivierungen von mTRPC5-T972E-Kanälen mehr hervorrufen. 300 μ M LaCl₃, das zur Expressionskontrolle verwendet wurde, führte hingegen zu deutlichen TRPC5-Kanalaktivierungen (s. Abb. 3.9 A. Oben). Auch bei Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor reagierte mTRPC5-T972E nicht auf OAG-Applikationen. Es zeigten sich stattdessen wie beim unveränderten mTRPC5 bei alleiniger Expression kurze Stromanstiege mit nachfolgender Hemmung (s. Abb. 3.9

C. Oben). Dies unterscheidet den mTRPC5-T972E vom unveränderten TRPC5, der bei Koexpression mit einem Rezeptor DAG-aktivierbar war (s. Abb 3.4.).

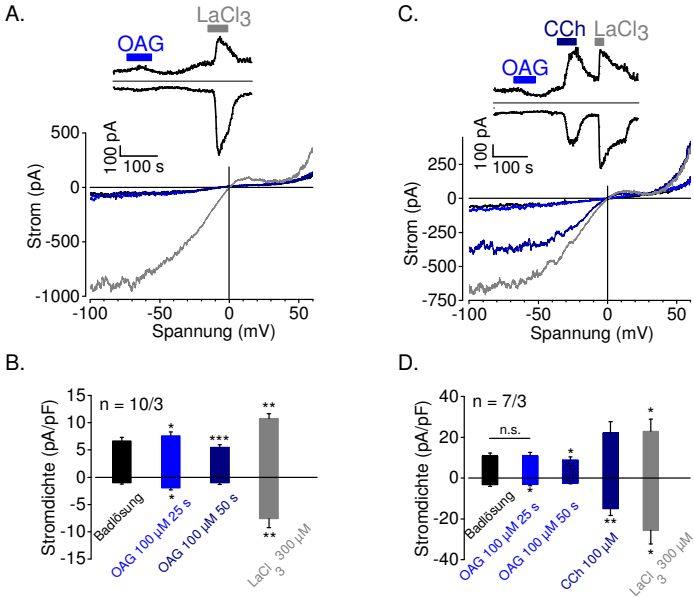


Abb. 3.9: Vergleich der DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972E ohne und mit Rezeptorüberexpression

A. *Oben*: Dargestellt ist der Stromzeitverlauf von mTRPC5-T972E-exprimierenden HEK293-Zellen ohne Rezeptorkoexpression mit den Applikationsbalken. Unter OAG ist eine kleine Stromzunahme mit nachfolgender Stromabnahme feststellbar. *Unten*: Abgebildet sind die Stromspannungsbeziehungen des mTRPC5-T972E ohne Rezeptorexpression unter der Badlösung (schwarz), unter OAG (blau) und LaCl₃ (grau). Nur unter LaCl₃ ist der typische doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 zu sehen. B. Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt die Stromdichten des mTRPC5-T972E ohne Rezeptorexpression während der Badlösung und 25 s sowie 50 s nach Beginn der Applikation von OAG und unter LaCl₃-Applikation. Es wird deutlich, dass OAG eine signifikante Stromdichtenzunahme nach 25 s

hervorruft, der eine deutliche Stromdichtenabnahme nach 50 s folgt, was darauf hindeutet, dass mTRPC5-T972E nicht DAG-aktivierbar ist. C. *Oben:* Der Stromzeitverlauf zeigt das Verhalten des mTRPC5-T972E in Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor. Es ist keine Aktivierung unter OAG zu beobachten. *Unten:* Die Stromspannungsbeziehungen des mTRPC5-T972E in Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor zeigen den doppelt-rektifizierenden Verlauf nur unter CCh (dunkelblau) und LaCl_3 (grau), nicht aber unter der Badlösung (schwarz) und OAG (hellblau). D. Im Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-T972E in Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor sind die Stromdichtenzunahmen unter CCh und LaCl_3 zu erkennen, sowie die Stromdichtenzunahme 25 s und die Stromdichtenabnahme 50 s nach Beginn der OAG-Applikation.

Um zu untersuchen, ob eine PKC-Inhibition einen Einfluss auf die DAG-Aktivierbarkeit der Mutante mTRPC5-T972E hat, wurden mTRPC5-T972E-überexprimierende HEK293-Zellen mit dem PKC-Inhibitor Bim I ($1 \mu\text{M}$) für zehn Minuten vorinkubiert. Nach Applikation von OAG kam es zu einer leichten Stromzunahme in Einwärts- und Auswärtsrichtung nach 25 s, gefolgt von einer Stromabnahme auf den Basalwert nach 50 s (s. Abb. 3.10 A. Oben). Diese Ergebnisse zeigen, dass die PKC-Inhibition keine DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972E hervorrufen kann.

Eine Phosphorylierung des Threonins an der Position 972 verhindert demnach offenbar die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5-Kanals. Ein Grund hierfür könnte die Bindung von NHERF1 an dieses Phosphothreonin sein, d.h. die NHERF1-Bindung könnte die Aktivierung durch DAG verhindern. Um das zu untersuchen, wurde NHERF1-E68A koexprimiert, welches nicht mehr in der Lage ist, an die PDZ-Bindungsdomäne von TRPC5 zu binden. Tatsächlich führte die Koexpression von NHERF1-E68A zusammen mit mTRPC5-T972E zu einer deutlichen, signifikanten Stromdichtenzunahme durch OAG von $-4,2 \pm 1,3 \text{ pA/pF}$ in Einwärts- und $1,7 \pm 0,5 \text{ pA/pF}$ in Auswärtsrichtung (s. Abb. 3.10 D.), was darauf hindeutet, dass NHERF1 eine entscheidende Rolle für die DAG-Aktivierbarkeit spielen könnte.

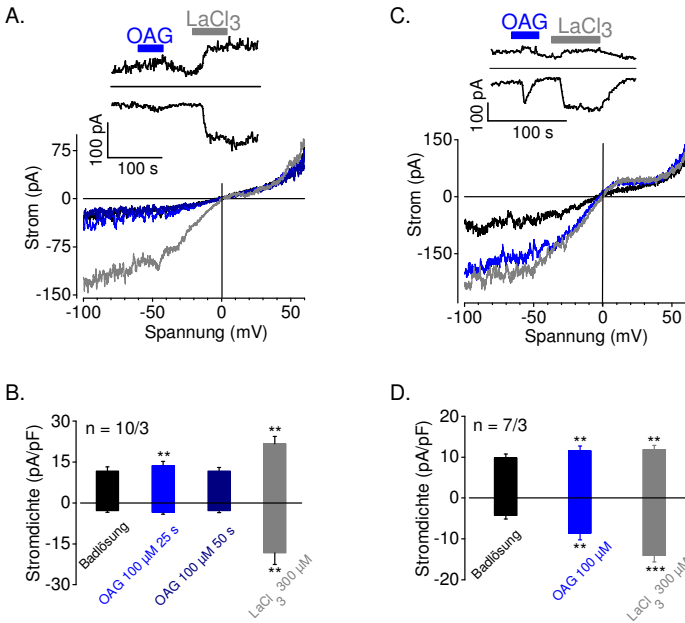


Abb. 3.10: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972E unter PKC-Inhibition und NHERF1 E68A Koexpression

A. Oben: Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-T972E-exprimierenden HEK293-Zellen nach Vorinkubation von 1 μ M Bim I ist keine Stromzunahme unter OAG zu beobachten. **Unten:** Zu sehen sind die Stromspannungsbeziehungen des mTRPC5-T972E nach Vorinkubation von 1 μ M Bim I unter der Badlösung (schwarz), OAG (blau) und LaCl₃ (grau). Der doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 ist nur unter LaCl₃ deutlich erkennbar. **B.** Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-T972E mit Bim I Vorinkubation zeigt nach OAG-Applikation eine leichte Stromzunahme nach 25 s und eine Abnahme der Stromdichte unter den Basalwert nach 50 s, was darauf hindeutet, dass es sich bei der anfänglichen, leichten Erhöhung nicht um eine TRPC5-Kanalaktivierung handelt. **C. Oben:** Der Stromzeitverlauf zeigt das Verhalten des mTRPC5-T972E bei Koexpression mit NHERF1-E68A. Es ist eine deutliche Stromzunahme besonders in Einwärtsrichtung nach Beginn der

OAG-Applikation zu sehen. *Unten:* Die Stromspannungsbeziehung des mTRPC5-T972E bei Koexpression mit NHERF1-E68A zeigt einen doppelt-rektifizierenden Verlauf sowohl unter OAG (blau) als auch unter LaCl_3 (grau). D. Im Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-T972E bei Koexpression mit NHERF1-E68A ist eine signifikante Stromzunahme in Auswärts- und Einwärtsrichtung unter OAG feststellbar.

Da die T972E-Mutante in Koexpression mit einem Rezeptor im Gegensatz zum Wildtyp keine Aktivierbarkeit durch OAG zeigte, wurde im nächsten Experiment untersucht, ob es auch einen Unterschied in der DAG-Sensitivität durch die PIP_2 -Depletion gibt. Die Applikation von 50 μM Wortmannin führte zu einer geringen Zunahme der Stromdichte von $0,7 \pm 0,4$ pA/pF in Einwärts- und $1,6 \pm 0,5$ pA/pF Auswärtsrichtung. Die zusätzliche Gabe von OAG erhöhete jedoch die Stromdichte um $7,8 \pm 3,3$ pA/pF in Einwärts- und um $6,9 \pm 2,3$ pA/pF in Auswärtsrichtung (s. Abb. 3.11 C.). Die T972E-Mutante wird folglich durch PIP_2 -Depletion DAG-sensitiv.

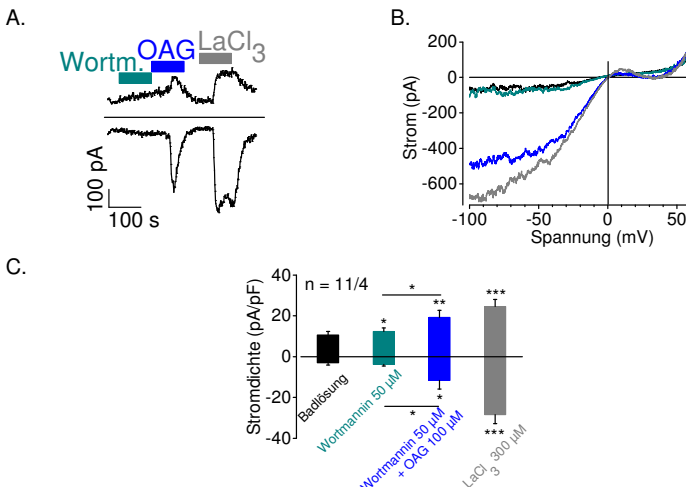


Abb. 3.11: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972E durch PIP_2 -Depletion

A. Zu sehen ist der Stromzeitverlauf von mTRPC5-T972E-exprimierenden HEK293-Zellen. Es ist eine geringe Stromzunahme unter Wortmannin (grüner Applikationsbalken) und eine starke Zunahme unter zusätzlicher Gabe von OAG (blauer Applikationsbalken) zu erkennen. B. Gezeigt werden die

Stromspannungsbeziehungen des mTRPC5-T972E unter der Badlösung (schwarz) und nach Applikation von Wortmannin (grün), Wortmannin und OAG (blau) und LaCl_3 (grau). Unter Wortmannin ist der doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 nur ansatzweise zu erkennen, unter OAG und LaCl_3 ist er deutlich zu sehen. C. Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt die Stromdichtenzunahmen unter Wortmannin, Wortmannin und OAG und LaCl_3 .

Die untersuchten mTRPC5-T972E-Kanäle waren nur unter PIP_2 -Depletion und NHERF1-E68A-Koexpression DAG-aktivierbar. Mit und ohne Vorinkubationen mit Bim I sowie bei Rezeptorkoexpression waren sie nicht DAG-aktivierbar. Die Ursache für die fehlende DAG-Aktivierbarkeit könnte sein, dass Aspartat in mTRPC5-T972E eine Methylgruppe kürzer ist als Phosphothreonin und daher aus sterischen Gründen die DAG-Aktivierung verhindert. Um dies genauer zu untersuchen, wurde auch die phosphomimetische T972D-Mutante untersucht, da das Glutamat die gleiche Kettenlänge wie das Phosphothreonin besitzt. Wie sich herausstellte, ist mTRPC5-T972D genauso wenig DAG-aktivierbar wie mTRPC5-T972E (s. Abb. 3.12 A. - D.). Die Applikation von OAG führte nach 25 s zu einer geringen Stromzunahme. 50 s nach Beginn der Applikation sank die Stromdichte in Auswärtsrichtung signifikant unter den Basalwert, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei nicht um eine TRPC5-Aktivierung durch OAG handelt. Demnach gibt es keinen Unterschied hinsichtlich der DAG-Aktivierbarkeit zwischen den phosphomimetischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat an der Position 972 im mTRPC5.

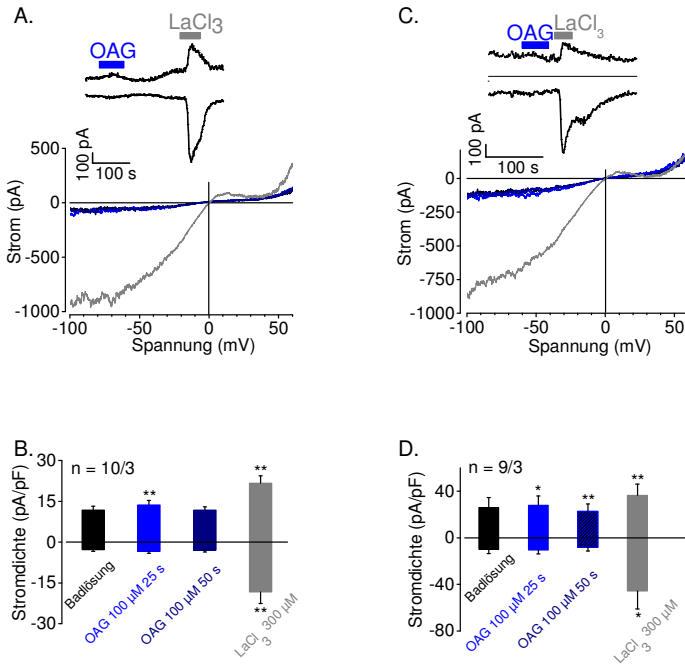


Abb. 3.12: Vergleich der DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-T972E und -T972D

A. Oben: Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-T972E-exprimierenden HEK293-Zellen ist keine Stimulation durch OAG erkennbar (blauer Applikationsbalken). **Unten:** Die Stromspannungsbeziehung des mTRPC5-T972E zeigt unter der Badlösung (schwarz) und unter OAG (blau) einen annähernd linearen Verlauf, während unter LaCl₃ (grau) der doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 zu sehen ist. **B.** Im Stromdichtensäulendiagramm ist die Stromdichtenzunahme 25 s nach Applikationsbeginn von OAG und eine Abnahme auf den Basalwert 50 s nach Applikationsbeginn zu erkennen. **C. Oben:** Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-T972D-exprimierenden HEK293-Zellen ist eine geringe Stromzunahme unter OAG mit folgender Hemmung zu erkennen. **Unten:** Die Stromspannungsbeziehungen zeigen unter der Badlösung (schwarz) und OAG (hellblau) keinen doppeltrektifizierenden Verlauf. Unter LaCl₃ (grau) ist dieser deutlich zu erkennen. **D.** Im Stromdichtensäulendiagramm ist eine geringe Zunahme unter OAG mit darauffolgender Hemmung zu sehen. Im

Vergleich scheint es keinen Unterschied in der DAG-Aktivierbarkeit zwischen den phosphomimetischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat an der Position 972 im mTRPC5 zu geben.

2.4. Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A

Als nächstes wurde die Rolle einer weiteren potentiellen PKC-Phosphorylierungsstelle für die DAG-Aktivierbarkeit untersucht. Die Mutation S752A führt dazu, dass die Aminosäure 752 nicht mehr phosphoryliert werden kann, da das freie Elektronenpaar zur Bindung einer Phosphatgruppe im Alanin fehlt. Bei Applikation von 100 μ M OAG findet keine signifikante Stromdichtenzunahme statt (s. Abb. 3.13 B.). Somit verhält sich mTRPC5-S752A wie der unveränderte TRPC5 (s. Abb. 3.3). Im Gegensatz zum unveränderten TRPC5 zeigt sich aber auch keine DAG-Aktivierbarkeit bei Koexpression mit einem Rezeptor, wobei die Rezeptor- und Lanthanantwort weiterhin zu sehen sind (s. Abb. 3.13 C. und D.). Dieses Ergebnis zeigt, dass sich mTRPC5-S752A anders als der unveränderte mTRPC5 verhält und auch bei Rezeptorkoexpression nicht DAG-aktivierbar wird.

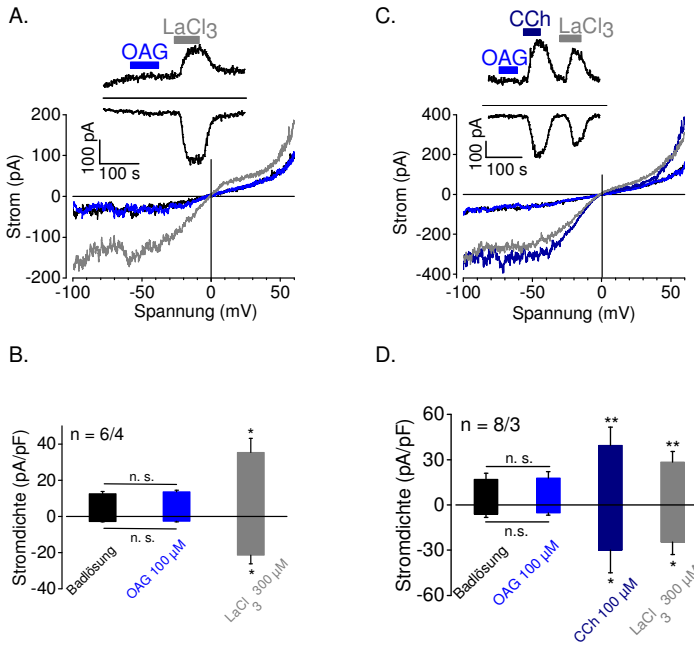


Abb. 3.13: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A ohne und mit Rezeptorüberexpression

A. *Oben*: Dargestellt ist der Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752A-exprimierenden HEK293-Zellen ohne Rezeptorüberexpression. Während der OAG-Applikation (blau) ist keine Stromerhöhung zu erkennen. *Unten*: Zu sehen sind die Stromspannungsbeziehungen des mTRPC5-S752A ohne Rezeptorüberexpression unter der Badlösung (schwarz), unter OAG (blau) und unter LaCl₃ (grau). Der doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 ist nur unter LaCl₃ deutlich zu sehen. B. Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt keine signifikante Stromdichtenerhöhung unter OAG. C. *Oben*: Gezeigt wird der Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752A und muskarinischen M5-Rezeptor koexprimierenden HEK293-Zellen. Unter OAG (blauer Applikationsbalken) ist keine Stromzunahme zu erkennen. Die Stromzunahmen in Auswärts- und Einwärtsrichtung unter CCh und LaCl₃ zeigen jedoch, dass der Rezeptor exprimiert wurde. *Unten*: Die Stromspannungsbeziehungen des mTRPC5-S752A bei Rezeptorüberexpression unter der Badlösung (schwarz), unter

OAG (hellblau), unter CCh (dunkelblau) und unter LaCl_3 (grau) lassen den typischen TRPC5-Verlauf nur unter CCh und LaCl_3 erkennen. D. Im Stromdichtensäulendiagramm ist keine signifikante Stromdichtenzunahme unter OAG zu sehen, wohl aber unter CCh und LaCl_3 .

Um zu überprüfen, ob OAG in der Wirkung mit endogenem DAG vergleichbar ist, wurden Ganzzellmessungen von mTRPC5-S752A-exprimierenden HEK293-Zellen mit dem DAG-Lipase-Inhibitor RHC-80267 durchgeführt. Dieser Inhibitor verhindert den Abbau von endogenem DAG durch die DAG-Lipase wodurch sich endogenes DAG in der Zelle anreichert. Nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ RHC-80267 stieg die Stromdichte weder in Einwärts- noch in Auswärtsrichtung signifikant an (s. Abb. 3.14 C.). Somit führt eine pharmakologisch induzierte endogene DAG-Produktion ebenso wie eine exogene OAG-Applikation nicht zu einer Aktivierung von heterolog exprimierten TRPC5-S752A-Kanälen.

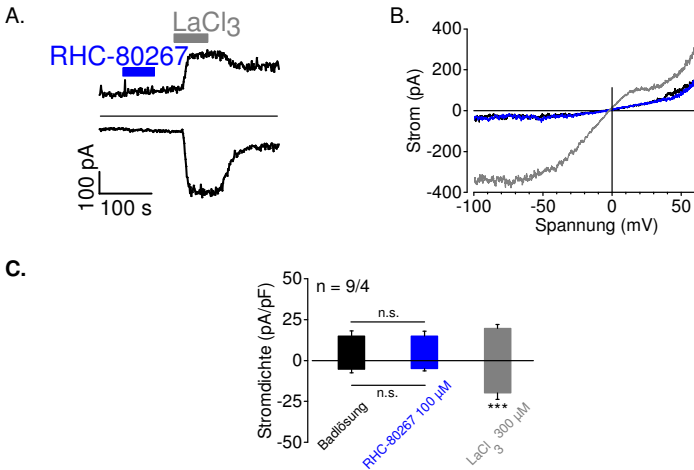


Abb. 3.14: Die Wirkung endogenen DAGs auf mTRPC5-S752A

A. *Oben*: Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752A-exprimierenden HEK293-Zellen ist weder im Einwärts- noch im Auswärtsstrom eine Stromerhöhung unter RHC-80267 erkennbar. *Unten*: Die Stromspannungskurve zeigt einen doppel-rectifizierenden Verlauf unter LaCl_3 (grau), nicht jedoch unter $100 \mu\text{M}$ RHC-80267 (blau) und der Badlösung (schwarz). C. Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt keine signifikante Stromerhöhung unter

RHC-80267 (blau). Unter LaCl_3 (grau) hingegen gibt es einen signifikanten Stromdichtenanstieg in Einwärtsrichtung.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob mTRPC5-S752A-Kanäle ebenso wie unveränderte mTRPC5-Kanäle unter PKC-Inhibition DAG-aktivierbar sind oder ob sie sich auch in dieser Hinsicht wie bei der Rezeptorkoexpression vom mTRPC5 unterscheiden. Inkubationen mit dem PKC-Inhibitor Bim I führten nicht zu einer DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A (s. Abb. 3.15 A. und B.), was darauf hindeutet, dass die fehlende NHERF1-Bindung für die DAG-Aktivierbarkeit dieser Mutante offenbar keine Rolle spielt. Als nächstes wurde daher NHERF1-E68A koexprimiert, das keine Wirkung haben sollte, da es nicht an TRPC5 binden kann. Tatsächlich zeigten die Patch-Clamp-Messungen jedoch, dass bei Koexpression mit NHERF1-E68A eine mTRPC5-S752A-Kanalaktivierung unter $100 \mu\text{M}$ OAG stattfindet (s. Abb. 3.15 C. und D.). Möglicherweise hat die NHERF1-E68A-Mutante unerwünschte Wirkungen in der Zelle, die unabhängig sind von der Interaktion mit dem C-Terminus des TRPC5.

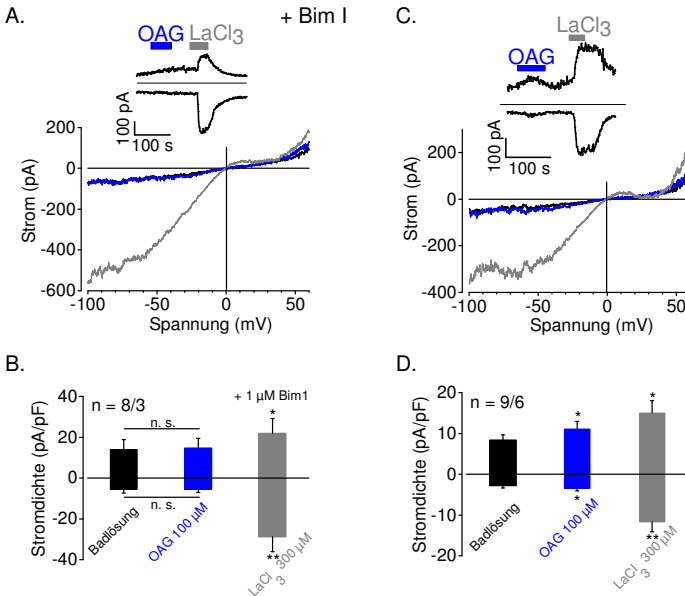


Abb. 3.15: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A unter PKC-Inhibition und in Koexpression mit NHERF1 E68A

A. Oben: Im exemplarischen Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752A-exprimierenden HEK293-Zellen nach Vorinkubation mit dem PKC-Inhibitor Bim I ist keine Aktivierung durch 100 μM OAG (blau) zu sehen. Die LaCl_3 -Antwort (grau) fällt mit einer Stromzunahme von über -300 pA im Einwärtsstrom deutlich aus. *Unten:* In der Stromspannungskurve ist kein doppel-rektifizierender Verlauf unter Badlösung (schwarz) und OAG (blau) zu sehen, wohl aber unter LaCl_3 (grau). **B.** Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752A zeigt, dass die Vorinkubation mit Bim I keinen Effekt auf die OAG-Aktivierbarkeit hat, die LaCl_3 -Antwort aber noch vorhanden ist. **C. Oben:** Der exemplarische Stromzeitverlauf des mTRPC5-S752A in Koexpression mit NHERF1-E68A zeigt eine Stimulation unter 100 μM OAG, ebenso unter 300 μM LaCl_3 . *Unten:* Die Stromspannungskurve des mTRPC5-S752A in Koexpression mit NHERF1-E68A zeigt den doppel-rektifizierenden Verlauf unter LaCl_3 (grau) und geringgradig unter OAG (blau). **D.** Im Stromdichtensäulendiagramm sind die signifikant-erhöhten Einwärts- und

Auswärtsströme unter OAG und LaCl_3 zu sehen.

Inwiefern der PIP_2 -Abbau eine Auswirkung auf S752A hat, wurde mittels zwei Experimenten getestet: Zum einen mit der Applikation des Phosphatidylinositol-4-Kinase-Inhibitors Wortmannin und zum anderen mit dem Rapamycin-System von Lindern et al. 2011 (s. o.). In beiden Experimenten kam es zu einer Stromerhöhung unter $50 \mu\text{M}$ Wortmannin und $5 \mu\text{M}$ Rapamycin und einer zusätzlichen Erhöhung bei gleichzeitiger Gabe von $100 \mu\text{M}$ OAG (s. Abb. 3.16 A. und C.).

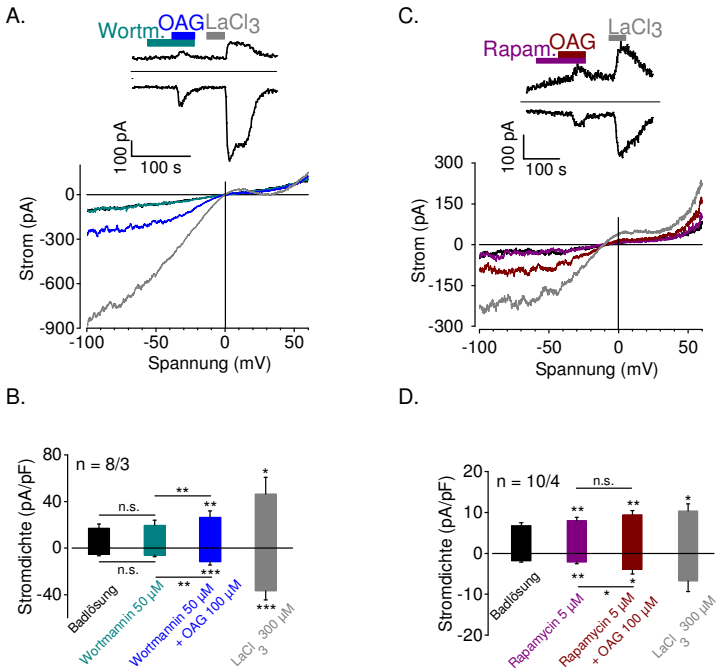


Abb. 3.16: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A durch PIP_2 -Depletion

Oben: Im exemplarischen Stromzeitverlauf wird der Einfluss von $50 \mu\text{M}$ Wortmannin (grün), $50 \mu\text{M}$ Wortmannin und $100 \mu\text{M}$ OAG (blau) und $300 \mu\text{M}$ LaCl_3 (grau) auf mTRPC5-S752A-exprimierende HEK293-Zellen gezeigt. Unter Wortmannin findet ein leichter Stromanstieg statt, der bei zusätzlicher Gabe von OAG noch verstärkt wird. *Unten:* Die Stromspannungskurve zeigt,

dass vor allem unter LaCl_3 (grau) und OAG (blau) der doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 sichtbar ist, während dieser unter der Badlösung (schwarz) und Wortmannin (grün) nur undeutlich zu erkennen ist. B. Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752A zeigt die Stromdichtenzunahme unter Wortmannin, die zusätzliche signifikante Stromzunahme bei gleichzeitiger OAG-Applikation und die signifikante Zunahme unter LaCl_3 . C. *Oben*: Im exemplarischen Stromzeitverlauf sind die Stromzunahmen von mTRPC5-S752A, Lyn11-FRB-mCherry, Pseudojanin FKBP? pmRFP koexprimierenden HEK293-Zellen unter $5 \mu\text{M}$ Rapamycin (lila), unter $5 \mu\text{M}$ Rapamycin und $100 \mu\text{M}$ OAG (rot) und unter $300 \mu\text{M}$ LaCl_3 zu sehen. *Unten*: Die Stromspannungskurve des mTRPC5-S752A zeigt den doppel-rektifizierenden Verlauf unter LaCl_3 (grau) und unter Rapamycin und OAG (rot). In lila ist die Stromspannungsbeziehung unter Rapamycin zu sehen und in schwarz die unter der Badlösung. D. Im Stromdichtensäulendiagramm sind die signifikant erhöhten Einwärts- und Auswärtsströme unter Rapamycin, OAG und Rapamycin, sowie LaCl_3 zu erkennen.

2.5. Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC6-S846G

Als nächstes wurde die Auswirkung eines Aminosäureaustauschs am TRPC6-Kanal auf die DAG-Aktivierbarkeit untersucht. Die Aminosäure Serin an der Position 846, welche sich in der CIRB-Domäne befindet (s. Abb. 1.6), wurde dazu gegen die nicht-phosphorylierbare Aminosäure Glycin (TRPC6-S846G) ausgetauscht. Wie in Abb. 3.17 zu sehen ist, hat die Mutation S846G keinerlei hemmenden Einfluss auf die Aktivierbarkeit durch das DAG-Analogon OAG. Nach Applikation von OAG ist eine signifikante Stromdichtenzunahme von $-92,9 \pm 23,9 \text{ pA/pF}$ in Einwärts- und $178,9 \pm 54,4 \text{ pA/pF}$ in Auswärtsrichtung zu verzeichnen. Damit spielt diese Aminosäure für die DAG-Aktivierbarkeit von TRPC6 offenbar keine Rolle.

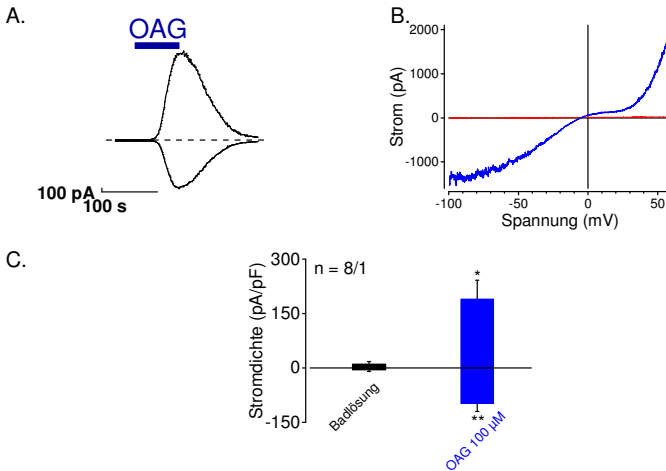


Abb. 3.17: MTRPC6 S846G ist DAG-sensitiv

A. Der Stromzeitverlauf von mTRPC6-S846G-exprimierenden HEK293-Zellen zeigt eine starke Aktivierung durch 100 μM OAG. Der blaue Balken symbolisiert die OAGApplikation. B. Die Stromspannungsbeziehung des mTRPC6-S846G zeigt den doppelt-rektifizierenden Verlauf des TRPC6 unter OAG (blau). An der Stromspannungsbeziehung des Basalstroms (rot) wird deutlich, dass der TRPC6 nicht basalaktiv ist. C. Im Stromdichtensäulendiagramm ist die deutliche Aktivierung durch OAG zu erkennen.

2.6. Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752D

Die Mutation S752A im mTRPC5 bewirkte wie oben beschrieben eine fehlende DAG-Aktivierbarkeit bei alleiniger Expression, bei Rezeptorkoexpression sowie bei PKC-Inhibition. Da diese nicht-phosphorylierbare Mutation Unterschiede zum unveränderten TRPC5-Kanal zeigte, liegt die Vermutung nahe, dass die Position S752 im TRPC5-Kanal phosphoryliert vorliegt. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die phosphomimetische Mutation S752D im mTRPC5 eingeführt und anschließend genauer untersucht. Die Applikation von 100 μM OAG auf mTRPC5-S752D-exprimierende Zellen bewirkte zunächst eine geringe Stromzunahme mit $-0,36 \pm 0,1$

pA/pF im Einwärts- und $8,3 \pm 1,2$ pA/pF im Auswärtsstrom (s. Abb. 3.18 A. und B.). 50 s nach Beginn der OAG-Applikation sank der Einwärtsstrom um $-0,3 \pm 0,1$ pA/pF und der Auswärtsstrom um $-0,14 \pm 0,5$ pA/pF unter den Basalwert. Damit verhielt sich die mTRPC5-S752D-Mutante wie der unveränderte TRPC5. Die Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor führte im Gegensatz zur nicht phosphorylierbaren Mutante mTRPC5-S752A zu einer OAG-Aktivierbarkeit (s. Abb. 3.18 C). Die Stromdichten nahmen unter OAG-Applikation um $-3,8 \pm 1,0$ pA/pF im Einwärts- und um 5 ± 2 pA/pF im Auswärtsstrom zu.

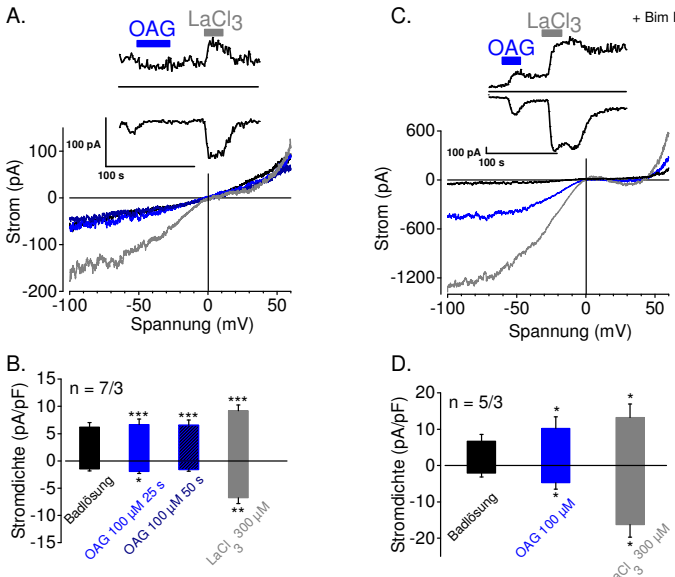


Abb. 3.18: Das Wildtyp-ähnliche Verhalten des mTRPC5-S752D ohne und mit Rezeptorüberexpression auf die DAG-Aktivierbarkeit

A. *Oben:* Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752D exprimierenden HEK293-Zellen ohne Rezeptorüberexpression ist deutlich die Hemmung des Stroms nach Applikation von OAG (blau) zu erkennen. *Unten:* Die Stromspannungskurve des mTRPC5-S752D zeigt die Stromspannungsbeziehung unter der Badlösung (schwarz), OAG (blau) und LaCl₃ (grau). Es ist nur unter LaCl₃ der doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 erkennbar. B. Das Stromdichtensäulendiagramm lässt den

Stromanstieg durch 100 μM OAG 25 s nach dem Einwaschen (blau) erkennen, gefolgt von einer Stromabnahme 50 s nach Beginn der OAG-Applikation (dunkelblau), sowie die Stromzunahme unter 300 μM LaCl_3 (grau). C. *Oben:* Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752D-exprimierenden HEK293-Zellen nach Vorinkubation von 1 μM Bim I ist eine deutliche Stromzunahme sowohl in Einwärts- als auch Auswärtsrichtung unter OAG (blau) sichtbar. *Unten:* Die Stromspannungsbeziehung des mTRPC5-S752D nach Vorinkubation von Bim I zeigt den doppelt-rektifizierenden Verlauf unter OAG (blau) und LaCl_3 (grau). Unter der Badlösung (schwarz) ist er nicht zu erkennen. D. Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752D mit Vorinkubation von Bim I zeigt die Stromdichtenzunahme unter OAG und LaCl_3 .

Um den Vergleich zum unveränderten TRPC5 zu vervollständigen, wurde mTRPC5-S752D auch unter PKC-Inhibition gemessen (s. Abb. 3.19 A.-C.). Wie der unveränderte mTRPC5 ist mTRPC5-S752D unter PKC-Inhibition DAG-aktivierbar. Im Einwärtsstrom ist unter 100 μM OAG ein Stromanstieg von $-17,5 \pm 6,8$ pA/pF zu verzeichnen und im Auswärtsstrom von $3,7 \pm 1,1$ pA/pF. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Aminosäureposition S752 im unveränderten TRPC5-Kanal phosphoryliert vorliegt.

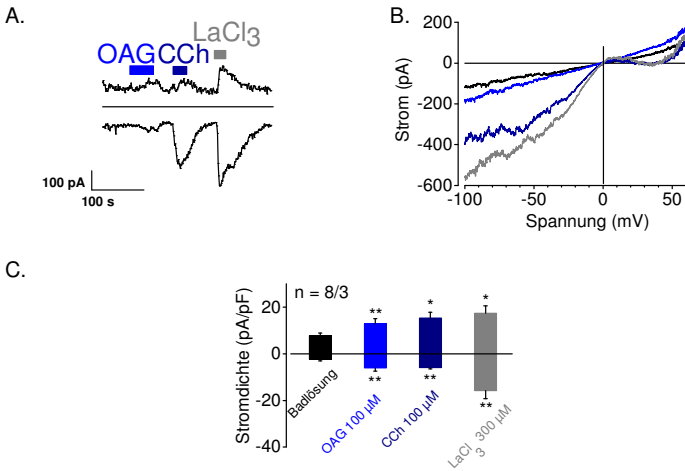


Abb. 3.19: Das Wildtyp-ähnliche Verhalten des mTRPC5-S752D unter PKC-Inhibition in Bezug auf die DAG-Aktivierbarkeit

A. Der Stromzeitverlauf des mTRPC5-S752D bei Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor zeigt die Stromzunahme unter 100 μ M OAG, 100 μ M CCh und 300 μ M LaCl₃. B. In der Stromspannungskurve vom mTRPC5-S752D in Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor sind die Stromspannungsbeziehung unter der Badlösung (schwarz), unter OAG (blau), unter CCh (dunkelblau) und unter LaCl₃ (grau) dargestellt. C. Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752D in Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor zeigt die Stromdichtenzunahme unter OAG und LaCl₃.

2.7. Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A-T972E

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass sowohl mTRPC5-S752A als auch mTRPC5-T972E weder bei Rezeptorüberexpression noch bei PKC-Inhibition DAG-aktivierbar war. Daher wurde als nächstes eine Doppelmutante mTRPC5-S752A-T972E untersucht, bei der das gleiche Verhalten zu erwarten ist. Unter 100 μ M OAG zeigte sich wie erwartet keine signifikante Stromdichtenzunahme. Unter 300 μ M

LaCl₃ fand eine Stromdichtenzunahme von $-22,1 \pm 7,1$ pA/pF in Einwärtsrichtung und von $7,6 \pm 2,4$ pA/pF in Auswärtsrichtung statt (s.Abb. 3.20 B.). Auch bei Rezeptorkoexpression zeigten sich wie erwartet keine Stromdichtenzunahmen unter OAG, jedoch erfolgte eine signifikante Kanalaktivierung durch Applikation von CCh und LaCl₃ (s. Abb. 3.20 C.). Somit unterschied sich diese Doppelmutante zwar nicht von den Einzelmutanten, jedoch vom unveränderten TRPC5, da dieser bei Rezeptorkoexpression DAG-aktivierbar war.

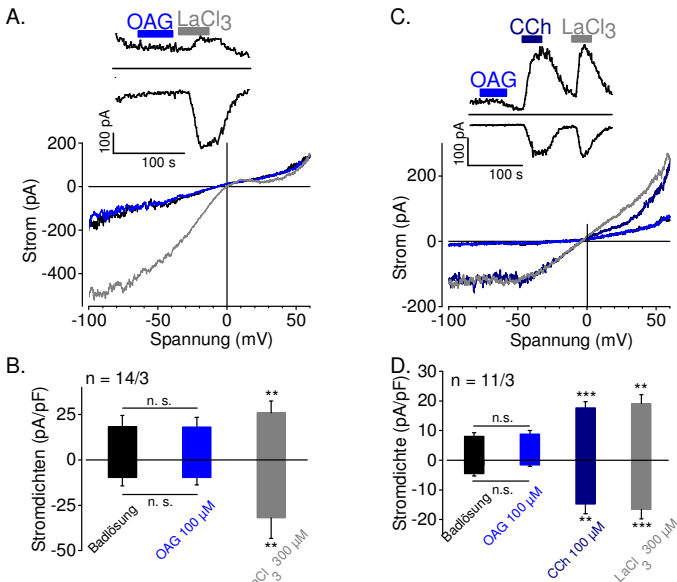


Abb. 3.20: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A-T972E ohne und mit Rezeptorüberexpression

A. *Oben:* Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752A-T972E-exprimierenden HEK293-Zellen ist keine Aktivierung durch 100 μM OAG (blau) erkennbar, wohl aber durch 300 μM LaCl₃ (grau). *Unten:* Die Stromspannungskurve des mTRPC5-S752A-T972E zeigt die Stromspannungsbeziehung unter der Badlösung (schwarz), OAG (blau) und LaCl₃ (grau). Der doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 ist nur unter LaCl₃ zu sehen. B. Im Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752A-T972E ist nur unter LaCl₃ eine signifikante Stromzunahme erkennbar. C. *Oben:* Der Stromzeitverlauf

von mTRPC5-S752A-T972E-exprimierenden HEK293-Zellen bei Rezeptorkoexpression zeigt keine Stromzunahmen unter 100 μM OAG. *Unten:* Die Stromspannungsbeziehung des mTRPC5-S752A-T972E bei Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor zeigt den doppelt-rektifizierenden Verlauf des TRPC5 unter CCh (dunkelblau) und LaCl_3 (grau), nicht aber unter der Badlösung (schwarz) und unter OAG (hellblau). D. Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752A-T972E bei Rezeptorkoexpression zeigt keine signifikante Stromdichtenzunahme unter OAG. Unter CCh und LaCl_3 nehmen die Stromdichten jedoch sowohl in Einwärts- als auch Auswärtsrichtung signifikant zu.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die Doppelmutante wie die Einzelmutationen trotz DAG-Inaktivierbarkeit bei Rezeptorüberexpression unter PIP_2 -Depletion eine Stimulation durch DAG zeigen würde. Tatsächlich nahm unter Wortmannin die Stromdichte geringgradig um $-1,4 \pm 0,9$ pA/pF im Einwärts- und um $2,6 \pm 1,3$ pA/pF im Auswärtsstrom zu. Bei der zusätzlichen Applikation von OAG stieg die Stromdichte nochmals um $-5,4 \pm 1,4$ pA/pF in Einwärts- und um $3,5 \pm 0,8$ pA/pF in Auswärtsrichtung an (s. Abb 3.21 C.).

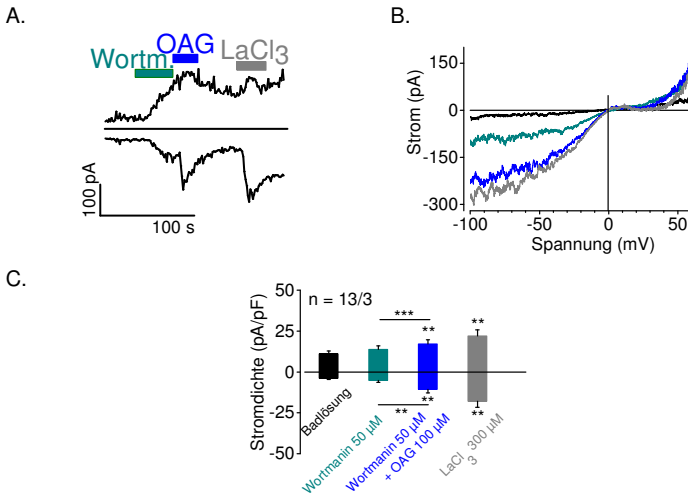


Abb. 3.21: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A-T972E unter PIP₂-Depletion

A. Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752A-T972E-exprimierenden HEK293-Zellen ist eine Stromzunahme unter 50 μM Wortmannin zu beobachten, sowie eine Steigerung dieser Zunahme bei zusätzlicher Applikation von 100 μM OAG. B. Die Stromspannungsbeziehungen des mTRPC5-S752A-T972E zeigen den doppelt-rektifizierenden Verlauf des TRPC5 sowohl unter Wortmannin (grün), unter Wortmannin und OAG (blau) und unter LaCl₃ (grau). Unter der Badlösung (schwarz) ist dieser Verlauf nicht erkennbar. C. Im Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752A-T972E ist keine signifikante Stromdichtenzunahme durch Wortmannin zu verzeichnen, jedoch bei zusätzlicher Applikation von OAG und unter LaCl₃.

2.8. Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752D-T972A

Die Mutation T972A im mTRPC5 führte wie oben beschrieben zu einer generellen DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5 (Kap. 2.2). Die Mutation S752D verhielt sich genauso wie der unveränderte mTRPC5, da sie *per se* nicht DAG-aktivierbar war jedoch nach PKC-Inhibition sowie bei Rezeptorüberexpression DAG-aktivierbar wurde (Kap. 2.4). Die Doppelmutante mTRPC5-S752D-T972A könnte demnach

ebenso wie mTRPC5-T972A immer DAG-aktivierbar sein. Diese These ließ sich tatsächlich bestätigen: mTRPC5-S752D-T972A war immer DAG-aktivierbar (s. Abb. 3.22). Nach Applikation von 100 μM OAG stieg der Einwärtsstrom um $-9,1 \pm 3,6$ pA/pF und der Auswärtsstrom um $15,2 \pm 3,5$ pA/pF. Das bedeutet, dass die Position S752 vermutlich phosphoryliert vorliegt und dass die Position T972 und damit die fehlende Bindung von NHERF1 die DAG-Aktivierbarkeit bestimmen könnt

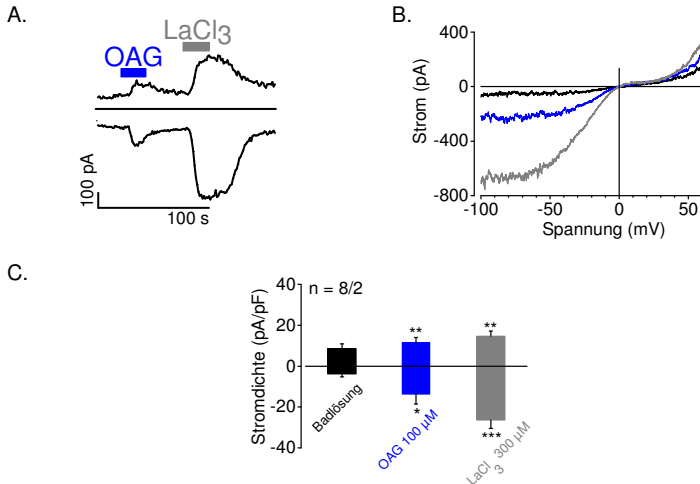


Abb. 3.22: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752D-T972A

A. Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752D-T972A-exprimierenden HEK293-Zellen ist die Aktivierung durch 100 μM OAG (blau) und 300 μM LaCl₃ (grau) zu sehen. B. Die Stromspannungskurve des mTRPC5-S752D-T972A zeigt die Stromspannungsbeziehung unter der Badlösung (schwarz), unter OAG (blau) und unter LaCl₃ (grau). Der doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 ist sowohl unter OAG als auch LaCl₃ sichtbar. C. Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt die signifikante Stromdichtenzunahme unter OAG (blau) und LaCl₃ (grau).

2.9. Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A-T972A

Zusätzlich wurde eine weitere Doppelmutante untersucht.

Nachdem die Doppelmutante S752D-T972A DAG-aktivierbar war, die Einzelmutante mTRPC5-S752A jedoch nicht - auch nicht bei Rezeptorkoexpression oder nach PKC-Inhibition (s. Kap. 2.4) - wurde als nächstes die Doppelmutante mTRPC5-S752A-T972A untersucht. Interessanterweise zeigte sich bei mTRPC5-S752A-T972A keine DAG-Aktivierbarkeit, auch nicht unter Rezeptorüberexpression und nach PKC-Inhibition (s. Abb. 3.23 A.-D.). Dies lässt darauf schließen, dass die Position 752 eine Schlüsselrolle in der DAG-Aktivierbarkeit spielt. Auch liegt die Vermutung nahe, dass die Position 752 im unveränderten mTRPC5 phosphoryliert vorliegt, da mTRPC5-S752D (s. Kap. 2.6) wie der unveränderte TRPC5 unter verschiedenen Bedingungen auf OAG reagierte und sich die Doppelmutante mTRPC5-S752D-T972A wie die DAG-aktivierbare Einzelmutante mTRPC5-T972A verhielt (s. Kap. 2.7).

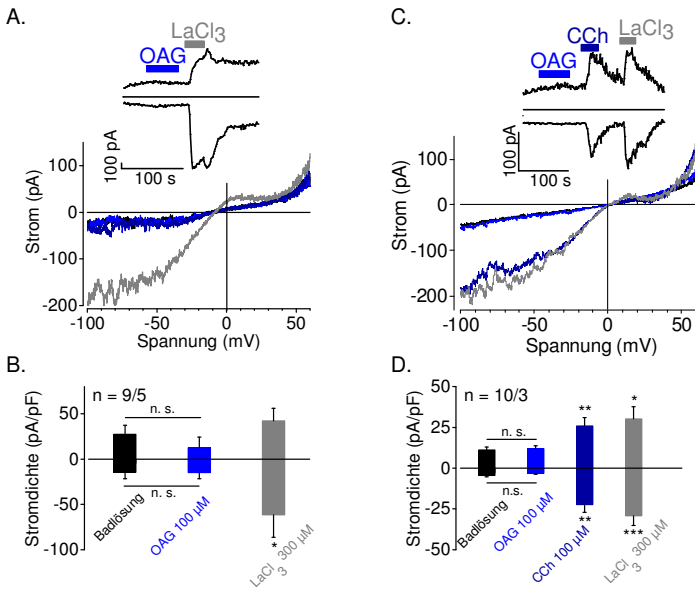


Abb. 3.23: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752A-T972A ohne und mit Rezeptorüberexpression

A. *Oben:* Im exemplarischen Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752A-T972A-exprimierenden HEK293-Zellen zeigt sich keine Aktivierung durch 100 µM OAG (blau), aber durch 300 µM LaCl₃ (grau). *Unten:* Die Stromspannungskurve des mTRPC5-S752A-T972A zeigt die Stromspannungsbeziehung unter der Badlösung (schwarz), OAG (blau) und LaCl₃ (grau). Der doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 ist nur unter LaCl₃ zu sehen. B. Im Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752A-T972A ist keine signifikante Stromzunahme unter OAG zu erkennen. Die signifikante Zunahme im Einwärtsstrom unter LaCl₃ weist auf die ausreichende Expression des TRPC5 hin. C. *Oben:* Der Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752A-T972A-exprimierenden HEK293-Zellen bei Rezeptorüberexpression zeigt keine Stromzunahme unter 100 µM OAG (blau), aber unter 100 µM CCh (dunkelblau) und 300 µM LaCl₃ (grau). *Unten:* Die Stromspannungsbeziehung des mTRPC5-S752A-T972A bei Rezeptorüberexpression zeigt den doppelt-rektifizierenden Verlauf unter CCh (dunkelblau) und LaCl₃ (grau), nicht aber unter der Badlösung (schwarz) und

OAG (hellblau). D. Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752A-T972A bei Rezeptorüberexpression zeigt keine signifikante Stromdichtenzunahme unter OAG (hellblau). Unter CCh (dunkelblau) und LaCl_3 (grau) nimmt die Stromdichte sowohl in Einwärts- als auch Auswärtsrichtung signifikant zu.

Da die Doppelmutante mTRPC5-S752A-T972A auch unter Rezeptorüberexpression nicht DAG-aktivierbar war, wurde im folgenden Experiment getestet, ob ein PIP_2 -Abbau zu einer DAG-Aktivierbarkeit führt. Die Applikation von 50 μM Wortmannin bewirkte eine Stromdichtenzunahme von $-1,4 \pm 0,9$ pA/pF in Einwärts- und $2,6 \pm 1,3$ pA/pF in Auswärtsrichtung. Die zusätzliche Applikation von 100 μM OAG führte zu einer signifikanten Stromdichtenzunahme von $-5,4 \pm 1,4$ pA/pF im Einwärts- und von $2,6 \pm 1,3$ pA/pF im Auswärtsstrom. (s. Abb. 3.24. A. und B.). Da die Doppelmutante S752A-T972A an der Position 972 nicht phosphorylierbar ist und somit vermutlich nicht NHERF1 binden kann, sollte die zusätzliche Expression von NHERF1-E68A keine Auswirkung auf die DAG-Aktivierbarkeit haben. Tatsächlich führte jedoch die Koexpression von NHERF1-E68A zu einer DAG-Aktivierbarkeit (s. Abb. 3.24 C. und D.). Die Stromdichte nahm während der OAG-Applikation um $-2,6 \pm 0,8$ pA/pF in Einwärts- und um $2,6 \pm 0,7$ pA/pF in Auswärtsrichtung zu. Die LaCl_3 -Applikation führte zu einer Stromdichtenzunahme von $-16,6 \pm 6,7$ pA/pF im Einwärtsstrom und zu einer Zunahme von $7,0 \pm 2,6$ pA/pF im Auswärtsstrom. Dieses Ergebnis eröffnet die Frage, ob NHERF1-E68A auch andere Zellbestandteile beeinflusst, wodurch diese generelle DAG-Aktivierbarkeit aller mTRPC5-Varianten unter NHERF1-E68A hervorgerufen wird.

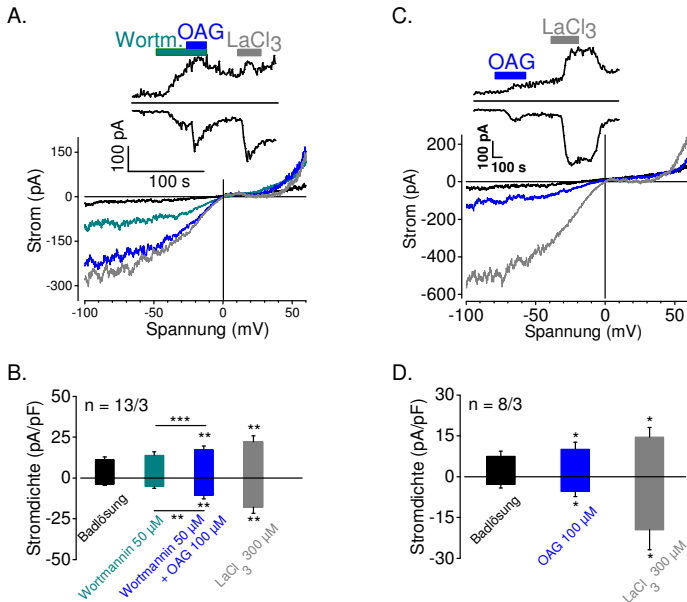


Abb. 3.24: Messungen des mTRPC5-S752A-T972A mit Wortmannin und NHERF1 E68A

A. *Oben*: Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752A-T972A-exprimierenden HEK293-Zellen ist eine Aktivierung durch 50 μ M Wortmannin (grün) zu sehen, welche zusammen mit 100 μ M OAG (blau) noch verstärkt wird. *Unten*: In der Stromspannungskurve ist der doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 sowohl unter Wortmannin (grün), unter OAG (blau) und unter LaCl₃ (grau) zu beobachten. Unter der Badlösung (schwarz) ist dieser Verlauf nicht zu erkennen. B. Im Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752A-T972A ist die signifikante Stromdichtenzunahme unter Wortmannin zu sehen, sowie die signifikante Stromzunahme durch die zusätzliche Applikation von OAG. C. *Oben*: Der Stromzeitverlauf des mTRPC5-S752A-T972A bei Koexpression mit NHERF1-E68A zeigt eine Stromzunahme unter 100 μ M OAG (blau) und 300 μ M LaCl₃ (grau). *Unten*: Die Stromspannungskurve des mTRPC5-S752A-T972A bei Koexpression mit NHERF1-E68A zeigt den doppelt-rektifizierenden Verlauf unter OAG (blau) und LaCl₃ (grau), nicht aber unter der Badlösung (schwarz). D. Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752A-T972A

mit NHERF1-E68A-Expression zeigt eine Stromdichtenzunahme unter OAG (hellblau) und LaCl_3 (grau).

2.10. Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit von mTRPC5-S752D-T972D

Nachdem sich mTRPC5-S752D genauso verhält wie der unveränderte mTRPC5 (s. Kap. 2.6) und sich mTRPC5-S752D-T972A genauso verhält wie mTRPC5-T972A (s. Kap. 2.2 und 2.7), stellte sich als nächstes die Frage, ob sich mTRPC5-S752D-T972D möglicherweise wie mTRPC5-T972D oder mTRPC5-T972E verhält (s. Kap. 2.3). Es stellte sich heraus, das mTRPC5-S752D-T972D weder mit noch ohne Rezeptorüberexpression DAG-aktivierbar war (s. Abb. 3.25.).

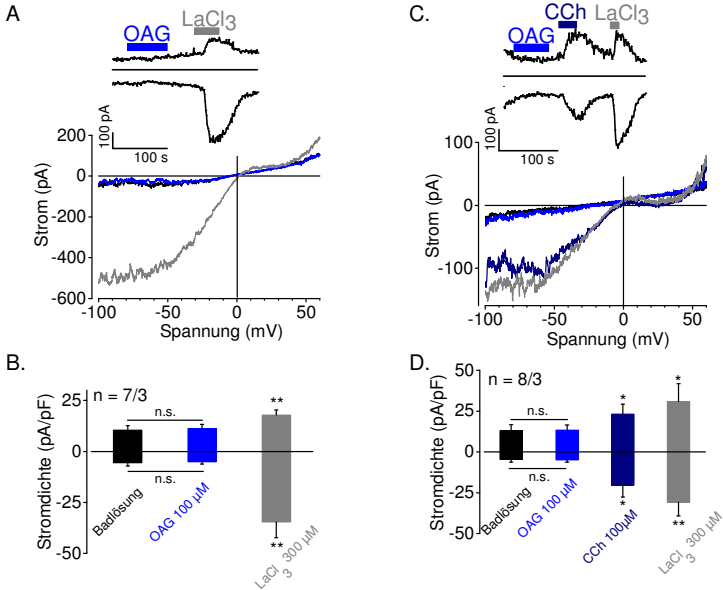


Abb. 3.25: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752D-T972D ohne und mit Rezeptorüberexpression

A. *Oben:* Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752D-T972D-exprimierenden HEK293-Zellen ist keine Aktivierung durch OAG (blauer Applikationsbalken)

feststellbar. *Unten*: Die Stromspannungskurve des mTRPC5-S752D-T972D zeigt die Stromspannungsbeziehungen unter der Badlösung (schwarz), unter OAG (blau) und unter LaCl_3 (grau). Unter LaCl_3 ist deutlich der doppelt-rektifizierende Verlauf des TRPC5 zu erkennen. B. Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752D-T972D zeigt keine signifikante Stromdichtenzunahmen unter OAG, jedoch signifikante Stromzunahmen unter LaCl_3 (grau). C. *Oben*: Der Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752D-T972D exprimierenden HEK293-Zellen bei Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor lässt keine Stimulation durch OAG erkennen. *Unten*: Die Stromspannungsbeziehungen des mTRPC5-S752D-T972D bei Rezeptorüberexpression zeigen den doppelt-rektifizierenden Verlauf unter CCh (dunkelblau) und LaCl_3 (grau). Unter der Badlösung (schwarz) und unter OAG (hellblau) ist dieser Verlauf nicht erkennbar. D. Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752D-T972D mit Rezeptorüberexpression zeigt die Stromdichtenzunahme unter CCh und LaCl_3 und keine Zunahme unter OAG.

Da eventuell ein Unterschied zwischen mTRPC5-T972D und -T972E in der DAG-Aktivierbarkeit bestehen könnte, wurden auch Messungen mit mTRPC5-S752D-T972E durchgeführt (s. Abb. 3.26. A. und B.). Wie mTRPC5-S752D-T972D so ist auch mTRPC5-S752D-T972E nicht DAG-aktivierbar. Damit scheint sich die Doppelmutante mTRPC5-S752D-T972D wie die Einzelmutanten mTRPC5-T972D oder mTRPC5-T972E zu verhalten.

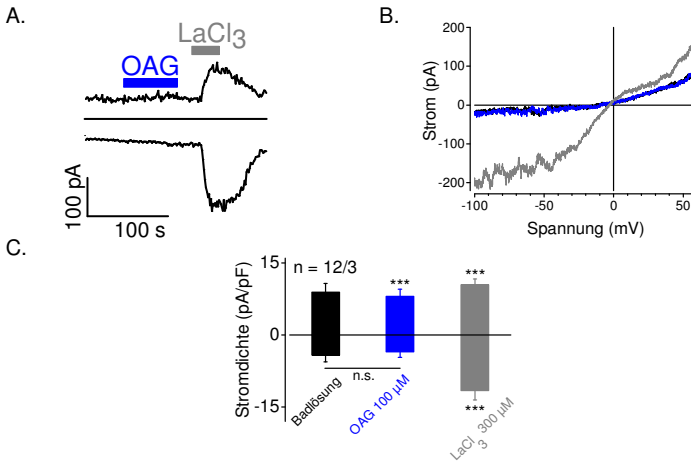


Abb. 3.26: Die DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S752D-T972E

A. Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752D-T972E-exprimierenden HEK293-Zellen ist keine Stromzunahme unter 100 μM OAG (blau) erkennbar, wohl aber unter 300 μM LaCl_3 (grau). B. Die Stromspannungskurve des mTRPC5-S752D-T972E zeigt den doppelt-rektifizierenden Verlauf nur unter LaCl_3 (grau). Unter der Badlösung (schwarz) und OAG (blau) ist er nicht zu beobachten. C. Im Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752D-T972E ist eine Stromdichtenabnahme unter OAG feststellbar, sowie eine Zunahme unter LaCl_3 .

2.11. Untersuchungen zur DAG-Aktivierbarkeit des mTRPC5-S666A

Eine weitere potentielle PKC-Phosphorylierungsstelle des TRPC5, stellt neben den Positionen T972 und S752 die Position S666 dar. In den Experimenten von Zhu et al. (2005) zeigte sich bei dieser Mutante (TRPC5-S666A) eine geringere Inaktivierung unter Rezeptorstimulation als bei den anderen Mutanten. Daher wurde diese Mutation ebenfalls in den mTRPC5 eingeführt und in Patch-Clamp-Experimenten alleine und bei Koexpression mit dem muskarinischen M5-Rezeptor gemessen. Es war kein TRPC5-ähnlicher Stromspannungsverlauf erkennbar, weder unter 100 μM OAG, noch unter 100 μM CCh oder 300 μM LaCl_3 . Die Stromspannungsbeziehung zeigt einen

relativ linearen Verlauf ohne Ähnlichkeit zum doppelt-rektifizierenden Verlauf des TRPC5 (s. Abb. 3.27. A. oben). Unter OAG, CCh und LaCl_3 nahm der Strom sogar etwas ab (s. Abb. 3.27. B.). Auch ohne Koexpression des Rezeptors zeigte sich keine Aktivierung des mTRPC5-S666A (a. Abb. 3.27. C. und D.). Da sich die Mutante nicht aktivieren ließ und sich auch keine Potenzierung durch LaCl_3 zeigte, stellt sich die Frage, ob diese Mutante überhaupt funktionell ist und an der Zellmembran exprimiert ist. Das muss in weiteren Experimenten noch genauer untersucht werden.

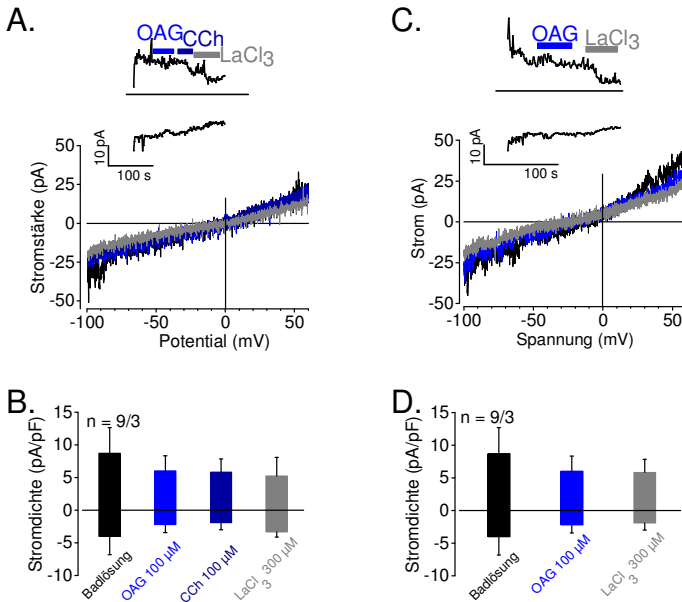


Abb. 3.27: Die Funktionalität des mTRPC5 S666A

A. *Oben*: Der Stromzeitverlauf von mTRPC5-S666A-exprimierenden HEK293-Zellen bei Koexpression des muskarinischen M5-Rezeptors zeigt einen sehr kleinen Strom mit fehlender Aktivierung unter OAG, CCh oder LaCl_3 . *Unten*: Die Stromspannungsbeziehung zeigt weder unter der Badlösung (schwarz), noch unter OAG (blau), CCh (dunkelblau) oder LaCl_3 (grau) den doppelt-rektifizierenden Verlauf des TRPC5. B. Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt die kleiner werdenden Ströme unter OAG, CCh und LaCl_3 . Es scheint

kein TRPC5 exprimiert zu sein. C. *Oben*: Der Stromzeitverlauf des mTRPC5-S666A zeigt eine Stromabnahme unter 100 μM OAG und 300 μM LaCl_3 . *Unten*: Die Stromspannungsbeziehungen unter der Badlösung (schwarz), OAG (blau) und LaCl_3 (grau) zeigen einen linearen Verlauf. D. Im Stromdichtensäulendiagramm ist eine Stromdichtenabnahme unter OAG und LaCl_3 sichtbar, so dass kein TRPC5-Kanal exprimiert zu sein scheint.

2.12. Das Verhalten des mTRPC5-E598D auf Lanthanchlorid

Bei der Durchführung des Protokolls zum Aminosäureaustausch an der Position 752 Serin zu Glutamat entstand durch Zufall eine zweite Mutation, nämlich E598D. Die entstandene Doppelmutante mTRPC5-E598D-S752D wurde anschließend ebenfalls in Patch-Clamp-Experimenten untersucht. Hierbei fiel auf, dass LaCl_3 die Einwärts- sowie die Auswärtsströme dieser Doppelmutante vollständig unterdrückte (s. Abb. 3.28 A. und B.). Daher wurde als nächstes die Einzelmutante mTRPC5-E598D angefertigt und ebenfalls in der Ganzzellkonfiguration gemessen. Dabei wurde sie zusätzlich mit einem Rezeptor koexprimiert, der als Expressionskontrolle diente, sollte der Kanal nicht auf LaCl_3 reagieren. Die Mutante mTRPC5-E598D war unter Rezeptorüberexpression DAG-aktivierbar ebenso wie der unveränderte mTRPC5. LaCl_3 -Applikationen führten jedoch zu einer Stromabnahme (s. Abb. 3.28 A. Oben) mit einer Abnahme der Stromdichten um $-1,4 \pm 0,4$ pA/pF in Einwärts- und um $3,0 \pm 0,8$ pA/pF in Auswärtsrichtung. 100 s nach Ende der LaCl_3 -Applikation und nach Auswaschen von LaCl_3 stieg die Stromdichte wieder um $-0,5 \pm 0,1$ pA/pF in Einwärts- und um $1,6 \pm 0,6$ pA/pF in Auswärtsrichtung an. Dies deutet darauf hin, dass die Strominhibition durch LaCl_3 reversibel ist. Diese Ergebnisse zeigen zudem, dass die Position E598 im mTRPC5 für die Potenzierung des TRPC5-Stroms durch LaCl_3 entscheidend sein könnte.

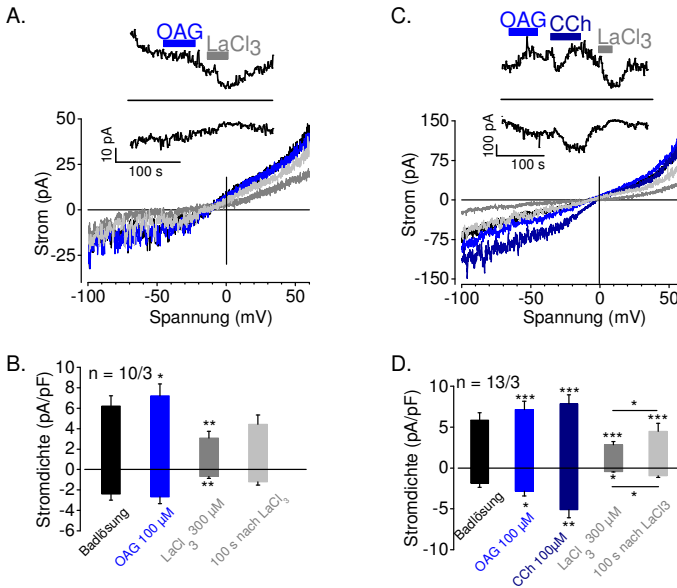


Abb. 3.28: Die Hemmung des mTRPC5-E598D-S752D und -E598D durch LaCl₃

A. *Oben:* Der Stromzeitverlauf von mTRPC5-S752D-E598D-exprimierenden HEK293-Zellen zeigt keine Antwort auf OAG (blau) und eine Strominhibition durch LaCl₃ (grau). *Unten:* In der Stromspannungskurve des mTRPC5-S752D-E598D ist ein doppelt-rektifizierender Verlauf unter der Badlösung (schwarz) und OAG (blau) zu sehen. Unter LaCl₃ (dunkelgrau) und 100 s nach dem Auswaschen von LaCl₃ (hellgrau) ist dieser Verlauf nicht zu erkennen. B. Das Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-S752D-E598D zeigt eine leichte Stromdichtenzunahme unter OAG (blau) und eine signifikante Abnahme unter LaCl₃ (grau). 100 s nach LaCl₃-Applikation nahm die Stromdichte wieder zu. C. *Oben:* Im Stromzeitverlauf von mTRPC5-E598D-exprimierenden HEK293-Zellen sind Stromzunahmen unter OAG und CCh sowohl in Einwärts-als auch in Auswärtsrichtung zu sehen. Unter LaCl₃ ist eine starke Stromabnahme erkennbar. *Unten:* In der Stromspannungsbeziehung des mTRPC5-E598D ist ein doppelt-rektifizierender Verlauf unter der Badlösung (schwarz), unter OAG (blau) und unter CCh (dunkelblau) erkennbar. Unter LaCl₃ (dunkelgrau) ist der Verlauf

fast linear. 100 s nach dem Auswaschen von LaCl_3 (hellgrau) ist der doppelt-
rektifizierende Verlauf des TRPC5 wieder erkennbar. D. Das
Stromdichtensäulendiagramm des mTRPC5-E598D zeigt eine Stimulation
unter OAG und CCh und eine signifikante Stromabnahme unter LaCl_3 . 100 s
nach der LaCl_3 -Applikation ist eine signifikante Stromzunahme feststellbar.

V. DISKUSSION

1. Die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 unter Überexpression einer NHERF1-Patientenmutante

Die PKC-Phosphorylierungsstelle des Threonins an der Stelle 972 (T972) liegt in der PDZ-Bindungsdomäne des C-Terminus vom TRPC5 (s. Abb. 1.6). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass einerseits ein Aminosäureaustausch dieses Threonins zu einem Phosphatgruppen-freien und nicht-phosphorylierbaren Alanin zu einer unerwarteten Aktivierbarkeit des TRPC5 durch das membranpermeable DAG-Analogon OAG führt (s. Abb. 3.8) und andererseits ein Aminosäureaustausch zu den phosphomimetischen Aminosäuren Aspartat oder Glutamat (T972D und T972E) keine unmittelbare DAG-Aktivierbarkeit verursacht (s. Abb. 3.9 A. und B. und Abb. 3.12 C. und D.). Zhu et al. (2005) vermuteten, dass die Phosphorylierung dieses Threonins die Bindung von NHERF1 an die PDZ-Bindungsdomäne beeinflusst. Der Regulationsfaktor 1 des Natriumionen-Protonen- (Na^+/H^+)-Austauschers, das sogenannte NHERF1, ist ein Brückenprotein, dessen erste Funktion an der Niere beschrieben worden ist (Weinman et al. 2005a). Es reguliert in der Niere die Na^+/H^+ -Austauscher-Isoform 3-Aktivität, indem es die cAMP-abhängige Proteinkinase A und die Na^+/H^+ -Austauscher-Isoform 3 in einem Komplex verbindet und dadurch die Phosphorylierung der Na^+/H^+ -Austauscher-Isoform 3 ermöglicht (Weinman et al. 2005b). NHERF1, welches auch als Ezrin-Radixin-Moesin-bindendes Phosphoprotein 50 bezeichnet wird, zeichnet sich aus durch zwei PDZ-Domänen und eine C-terminale Ezrin-Bindestelle, die eine Bindung an das Aktin-Zytoskelett ermöglicht und stellt somit unter den Zytoskelettproteinen ein Brückenprotein dar (s. Abb. 4.1) (Reczek et al. 1997). Es ist in der Lage über die PDZ-Domänen an eine Vielzahl von Proteinen zu binden, auch an TRPC4- und TRPC5-Kanälen (Tang et al. 2000). Die nachfolgende Tabelle zeigt die nachgewiesenen PDZ1-vermittelten Proteininteraktionen des NHERF1-Brückenproteins (s. Tab. 4.1).



Abb. 4.1: Aufbau von NHERF1

NHERF1 besteht aus 358 Aminosäuren. Die PDZ-Domäne 1 (PDZ1, rot) befindet sich N-terminal, die PDZ-Domäne 2 (PDZ2, orange) befindet sich in der Mitte und die Ezrin-Bindestelle (EB, gelb) am C-Terminus. Zahlen geben die Aminosäuren-Nummerierung an. Quelle: modifiziert nach Cheng et al. (2009).

Rezeptoren	Enzyme	Andere
β_2 Adrenorezeptor	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase	zystische Fibrose Transmembran-Regulator
P_2Y_1 -Purinrezeptor	β_1 -Untereinheit der H^+ -ATPase	Natrium-Phosphat-Kotransporter Typ IIa
Thrombozytenwachstumsfaktor-Rezeptor	PLC β_1 , 2 und 3	Natriumbikarbonat-Kotransporter 3
Parathormon-Rezeptor		Endothelzellen-spezifisches Adhäsionsmolekül
K-Opioid-Rezeptor		Aquaporin 9
Thromboxan A2-Rezeptor		
Calcitonin-Rezeptorähnlicher Rezeptor		
Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1		

Tab. 4.1: Bindungspartner der PDZ1-Domäne von NHERF1

TRPC4 und TRPC5 sind die einzigen Mitglieder der TRPC-Familie, die über ein PDZ- Bindemotiv verfügen (Tang et al. 2000; Obukhov und Nowycky 2004). Tang et al. (2000) konnten zeigen, dass TRPC4 und TRPC5 an die PDZ1-Domäne von NHERF1 binden, nicht jedoch an die PDZ2-Domäne. Ebenso können die PLC β_1 , 2 und 3 an die PDZ1-Domäne von NHERF1 binden (Tang et al. 2000; Jiang et al. 2014b). Eine C-terminale Deletion der drei letzten Aminosäuren TRL in der PDZ-

Bindestelle VTTRL des TRPC4-Kanals verhinderte die Bindung des NHERF1-Brückenproteins und äußerte sich in einer verminderten TRPC4-Expression in der Zellmembran (s.Abb.4.2) (Mery et al. 2002).

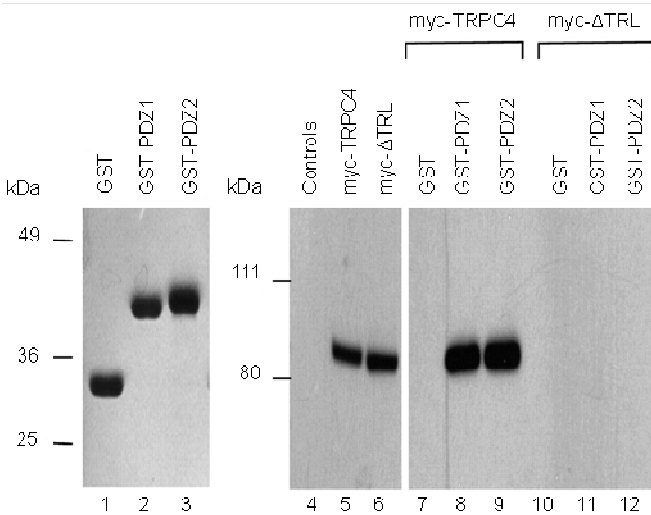


Abb. 4.2: Die Deletion des TRL-Motivs verhindert die NHERF1-Bindung im TRPC4

Es sind 12 Affinitätschromatographien abgebildet. Die erste zeigt, dass die Glutathion-S-Transferase an die Glutathion-haltige Matrix bindet. Die zweite und dritte Probenaufragungen zeigen, dass die PDZ1- und PDZ2-Domänen von NHERF1 ebenfalls an die Matrix binden, wenn sie mit Glutathion-S-Transferase verbunden sind. Die Probenaufragungen vier bis sechs zeigen Versuche mit myc-Antikörpern. Myc ist ein zehn Aminosäuren langes Peptid, welches vom c-myc-Gen stammt und als Antigen in der Affinitätschromatographie erfolgreich eingesetzt wird. Im Zellysate von nicht-transfizierten Zellen ist keine Bindung zum myc-Antikörper sichtbar, während myc-TRPC4 und myc-ΔTRL mit dem Antikörper reagieren (Probenaufragungen fünf und sechs). Für die siebte bis zwölfte Probenaufragung wurde dasselbe Zellysate verwendet wie für die

Probenauftragungen fünf bzw. sechs. Wie in der achten und neunten Probenauftragung zu erkennen ist, liegen die PDZ1- und PDZ2-Domänen von NHERF1 an myc-TRPC4 gebunden vor, während die Domänen nicht an myc- Δ TRL binden (Probenauftragungen elf und zwölf). Quelle: Mery et al. (2002)

Hingegen konnten Obukhov und Nowycky (2004) mittels der C-terminalen Deletion der fünf letzten Aminosäuren VTTRL keine Expressionsverminderung des TRPC5-Kanals in der Zellmembran beobachten. Jedoch zeigte sich eine Veränderung in der Verteilung des TRPC5-Kanals in der Zellmembran. Diese Unterschiede könnten sich möglicherweise auf die verschieden langen Deletionen zurückführen lassen. Außer Aminosäure-Deletionen, um die Bindung zu manipulieren, bieten einzelne Aminosäureaustausche, die die Bindungsenergie erhöhen oder erniedrigen, tiefere Einsichten und vermindern das Auftreten von Artefakten. Aufgrund dessen verhalten sich TRPC4 und TRPC5 bezüglich der NHERF1-Bindung und der DAG-Aktivierbarkeit vermutlich gleich.

Um zu überprüfen, ob die PDZ1-Domäne und nicht die PDZ2-Domäne des NHERF1-Brückenproteins mit TRPC4 bzw. TRPC5 interagiert und die DAG-Aktivierbarkeit dieser Kanäle beeinflusst, wurde die NHERF1-E68A-Patientenmutante eingesetzt. Der Aminosäureaustausch E68A, der sich in der PDZ1-Domäne des NHERF1-Proteins befindet, äußert sich bei Patienten als chronische Hypophosphatämie, da das mutierte NHERF1-Protein nicht mehr an den Natrium-Phosphat-Kotransporter Typ IIa binden kann, wodurch es zu einer mangelhaften Phosphatrückresorption kommt (Courbebaisse et al. 2012). Vermutlich beruht die verminderte Phosphatrückresorption auf einer verringerten Expression dieses Kotransporters in der Zellmembran von proximalen Nierentubuluszellen bei diesen Patienten (Courbebaisse et al. 2012). Damit könnte NHERF1 als Brückenprotein eine Verankerung dieses Kotransporters an die Zellmembran bewirken. Folglich könnte die NHERF1-E68A-Patientenmutante als Diskriminante für eine PDZ1 vermittelte Bindung und dessen Auswirkung auf die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 fungieren. Da NHERF1-Brückenproteine miteinander dimerisieren (Shenolikar et al. 2001), besteht die Möglichkeit, dass die endogen vorhandenen, unveränderten NHERF1-Brückenproteine von den überexprimierten NHERF1-E68A-Brückenproteinen gebunden werden und nicht mehr an die TRPC5-Kanäle binden können. Unerwarteterweise stellte sich aber heraus, dass alle eingesetzten TRPC5-Mutanten – auch die nicht DAG-aktivierbaren Mutanten wie

S752A und S752A-T972A – durch Koexpression von NHERF1-E68A eine DAG-Aktivierbarkeit aufwiesen. Dieses Phänomen kann nicht durch die Interaktion von NHERF1 mit dem C-Terminus von TRPC5 erklärt werden. Auffällig ist, dass PIP₂-Depletionen genauso wie NHERF1-E68A Überexpressionen eine DAG-Aktivierbarkeit von allen untersuchten TRPC5-Konstrukten bewirkten. Möglicherweise bewirkt die Überexpression von NHERF1-E68A eine PIP₂-Depletion durch Dislokalisierung oder Deregulation von PLC β -Isoformen in den membran nahen Proteinkomplexen. Aufgrund der Vielzahl an Bindungspartnern von NHERF1 mit PDZ1 und PDZ2, die vermutlich noch nicht alle bekannt sind, scheint die NHERF1-E68A-Patientenmutante unvorhersehbare Wirkungen bei Überexpression hervorzurufen, so dass sich diese Mutante zur Untersuchung der spezifischen Interaktion mit TRPC5 nicht eignet. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu zeigen ob und wie NHERF1-E68A eine PIP₂-Depletion bewirkt. Darüber hinaus ist wenig über die Bindungsenergie und deren Konsequenzen zwischen NHERF1 und TRPC4 bzw. TRPC5 bekannt.

Die Hypothese, dass die Phosphorylierung des Threonins an der Position 972 für die NHERF1-Bindung erforderlich ist, bedeutet nicht, dass eine Phosphorylierung in der PDZ-Bindedomäne eine notwendige Voraussetzung für eine PDZ-vermittelte Proteinbindung ist. So führt zum Beispiel die Phosphorylierung des zweiten Threonins im RTTPV-PDZ-Bindemotiv des AMPA-Rezeptor-interagierenden Proteins Stargazin zu einem Verlust der Bindung zu dem postsynaptischen Protein PSD-95 (Chetkovich et al. 2002). Auch ein phosphomimetischer Aminosäureaustausch in der PDZ-Bindungsdomäne des metabotropen Glutamaterezeptors R2 (ESVKI zu ESVKE) führte zu einem Verlust der Bindung zu folgenden Proteinen mit PDZ-Domäne: Glutamaterezeptor-interagierendes Protein und AMPA-Rezeptor-bindendes Protein (Osten et al. 2000). Mit Hilfe von molekulardynamischen Computersimulationen konnten Mamonova et al. (2012) die Bindungsenergien von den beiden PDZ-Domänen des NHERF1-Brückenproteins zu verschiedenen PDZ-Bindemotiven bestimmen. Hierbei zeigte sich, dass das Motiv NATRL gut an PDZ1 des NHERF1 bindet, was ein Widerspruch zu den hier vorliegenden Ergebnissen darstellt, denn VATRL des in der vorliegenden Arbeit mutierten TRPC5-Kanals verhindert die NHERF1-Bindung nachweislich. Die verwendete molekulardynamische Computersimulation basiert auf der Kristallstruktur von NHERF1 mit dem β_2 -Adrenorezeptor, bei der keine Phosphorylierung vorhanden ist im Gegensatz zur TRPC5-NHERF1-Bindung. Daher

ist es fraglich, ob diese Simulation für die TRPC5-NHERF1-Interaktion anwendbar ist. Außerdem war die Bindungsenergie des DTRL-Motivs schlechter als die des VQDTRL-Motivs, das sogar zusätzlich an PDZ2 des NHERF1 binden konnte. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Simulation für kurze Motive fehlerbehaftet ist und eine einfache Übertragung von Teilmotiven nicht möglich ist. Zudem wurde eine Simulation für VTTRL, das PDZ-Bindemotiv von TRPC4 und TRPC5, nicht durchgeführt.

Ein Hinweis, dass das NHERF1-Brückenprotein nicht mehr mit dem TRPC5-T972A-Aminosäureaustausch interagiert, ist die verlangsamte Kanalinaktivierung unter Rezeptorstimulation im Vergleich zum nicht-mutierten TRPC5-Kanal (Zhu et al. 2005). Zhu et al. (2005) zeigten sogar mit der TRPC5-T972A-Mutante eine fehlende Kanalinaktivierung unter Rezeptorstimulation. Auch die beiden Tatsachen, dass zum einen bei einer Überexpression von NHERF1 eine verstärkte TRPC5-Kanalinaktivierung auftritt und dass zum anderen die TRPC5-VTTRL-Deletionsmutante eine verringerte Kanalinaktivierung hervorruft, unterstützen eine weitere Funktion des NHERF1-Brückenproteins als Regulator der Kanalinaktivierung (Obukhov und Nowycky 2004; Zhu et al. 2005). Damit hat das NHERF1-Brückenprotein in der Interaktion mit TRPC4 bzw. TRPC5 höchstwahrscheinlich zwei Funktionen, nämlich die Vermittlung der DAG-Aktivierbarkeit und die Regulation der Kanalinaktivierung.

2. Die DAG-Aktivierbarkeit unter Rezeptorüberexpression

TRPC4- bzw. TRPC5-Kanäle wurden bisher sowohl als speicher- als auch als rezeptorreguliert beschrieben (s. Tab. 4.2). Möglicherweise hängt dies vom Überexpressionssystem und der Anordnung der TRPC5-Proteinunterheiten als Homo- oder Heterotetramere ab. Die Rezeptoraktivierung führt zu wesentlich größeren Strömen als die durch die Entleerung von Calciumspeicher entstehenden TRPC4- bzw. TRPC5-Ströme. Die Rezeptoraktivierung von TRPC4 und TRPC5 konnte von vielen verschiedenen Forschergruppen reproduziert werden; die Speicherregulation wird nur von wenigen Forschergruppen beobachtet (s. Tab. 4.2).

Rezeptorregulation	Speicherregulation
Mori et al. (2015)	Lee et al. (2010)
Kim et al. (2014)	Saleh et al. (2008)
Jeon et al. (2013)	Ma et al. (2008)
Storch et al. (2012)	Yang et al. (2005)
Jeon et al. (2012)	Wang et al. (2004)
Grisanti et al. (2012)	Freichel et al. (2001)
Tiruppathi et al. (2006)	Philipp et al. (1998)
Zhu et al. (2005)	
Ohta et al. (2004)	
Venkatachalam et al. (2003)	
Schaefer et al. (2000)	

Tab. 4.2.: Literaturübersicht zu den rezeptor- bzw. speicherregulierten Eigenschaften des TRPC4 und TRPC5

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass der TRPC5-Kanal durch einen Rezeptor, hier der muskarinische M5-Rezeptor, aktiviert werden kann; eine Speicher regulierende Funktion konnte nicht beobachtet werden. Es kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht, wie der TRPC5 durch den muskarinischen M5-Rezeptor aktiviert werden könnte: So wäre es denkbar, dass die α -Untereinheit des G-Proteins an den TRPC5 bindet und ihn dadurch aktiviert. Ebenso könnte die $\beta\gamma$ -Untereinheit den TRPC5 aktivieren, so wie es für die G-Protein regulierten, einwärts-rektifizierenden Kaliumkanäle beschrieben ist (Mahajan et al. 2013). Die PLC könnte den TRPC5 aufgrund ihrer Protonen-freisetzenden enzymatischen Reaktion aktivieren, denn zum einen wurde in Photorezeptoren von *Drosophila* gezeigt, dass die Aktivierung der PLC durch die Freisetzung von Protonen eine Ansäuerung des umgebenden Milieus um 0,2 pH-Werte bewirkt (Gudermann und Mederos y

Schnitzler 2010) und zum anderen ist der TRPC5-Kanal Protonen-sensitiv und aktiviert bei sauren pH-Werten (Semtner et al. 2007). Auch der Abbau von PIP₂ selbst kann den TRPC5 aktivieren (Trebak et al. 2009). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet und bestätigt werden (s. Kap. III 2.1). Da die PLC das membranständige PIP₂ in DAG und IP₃ spaltet (s. Abb. 1.9 C), besteht natürlich die Möglichkeit, dass einer der beiden entstehenden Botenstoffe – DAG oder IP₃ – den TRPC5 aktiviert. Allerdings konnte schon mehrfach bestätigt werden, dass die Aktivierung des TRPC5 durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren IP₃-unabhängig ist (Venkatachalam und Montell 2007b; Plant und Schaefer 2005; Venkatachalam et al. 2003). Auch eine DAG-vermittelte TRPC5-Kanalaktivierung konnten beispielsweise von Venkatachalam et al. (2003) bei einer transienten Überexpression von TRPC5 in HEK293-Zellen nicht beobachten werden (Venkatachalam et al. 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete DAG-Aktivierbarkeit könnte auf eine einfache Weise erklärbar sein: Da NHERF1-Brückenproteine an G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden und sogar deren Aktivität modulieren können (Romero et al. 2011; Magalhaes et al. 2012; Sun et al. 2007; Ardura und Friedman 2011), könnte eine überexpressionsbedingte Rekrutierung des endogenen und begrenzt-vorhandenen NHERF1-Brückenproteins an die überexprimierten G-Protein gekoppelte Rezeptoren vorliegen und somit ein Mangel von TRPC5-Kanalprotein-gebundenen NHERF1 entstehen. Die fehlende Bindung von NHERF1 an TRPC5 würde eine Aktivierbarkeit des TRPC5 durch DAG auslösen. Mit Hilfe der Koimmunpräzipitation konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass endogenes NHERF1-Protein tatsächlich nicht mehr an den TRPC5 gebunden vorliegt, wenn ein Rezeptor überexprimiert wird (s. Abb.4.3).

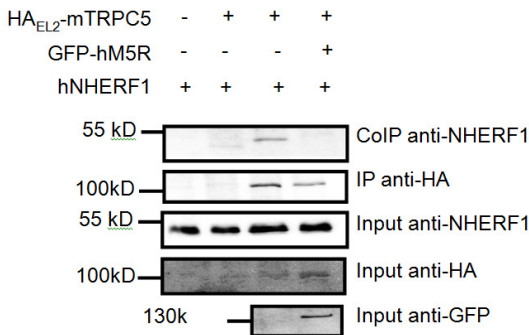


Abb. 4.3: Endogenes NHERF1 ist in Anwesenheit eines überexprimierten Rezeptors nicht mehr an mTRPC5 gebunden

Die Koimmunpräzipitation zeigt im oberen Fenster „CoIP anti-NHERF1“, dass in Anwesenheit von mTRPC5 NHERF1 gebunden ist (zweite Bande von rechts) und in Anwesenheit von mTRPC5 und dem muskarinischen M5-Rezeptor NHERF1 nicht mehr gebunden ist (rechte Probenauftragung). Die Kontrollprobenauftragung (ganz links) zeigt, dass in Abwesenheit von mTRPC5 kein NHERF1 gebunden ist. Die zweite Probenauftragung von links legt nahe, dass bei geringerer mTRPC5-Expression auch weniger NHERF1 gebunden vorliegt. Quelle: Gemessen von Anna-Lena Forst aus der Arbeitsgruppe von Dr. Ursula Storch, Walther-Straub-Institut.

Auch die Beobachtungen, dass die phosphomimetischen Mutanten mTRPC5-T972E und mTRPC5-S752A-T972E nicht DAG-aktivierbar sind (s. Abb. 3.9 und Abb. 3.23), unterstützt die nachfolgende Modellvorstellung (siehe Abb.4.4).

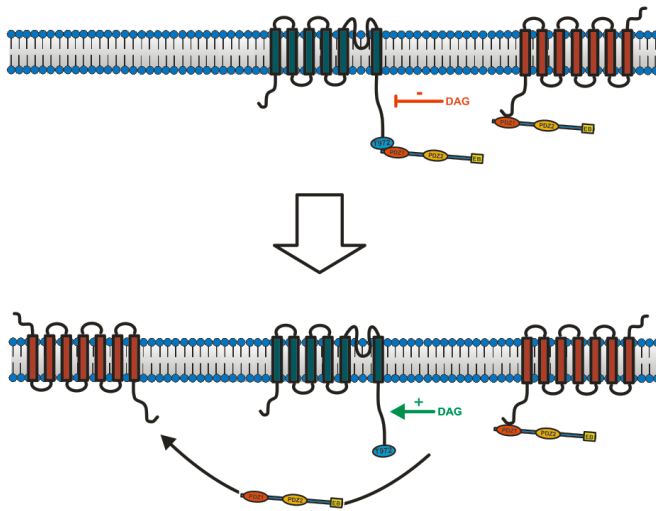


Abb. 4.4: Die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 bei Rezeptorüberexpression

Oben: NHERF1 ist an den TRPC5 (grün, mittig) gebunden und verhindert damit die Aktivierung durch DAG. *Unten:* Werden G-Protein gekoppelte Rezeptoren überexprimiert (links und rechts, rot), führt dies zur DAG-Aktivierbarkeit (grüner Pfeil) des TRPC5 (mittig). Vermutlich beruht die Aktivierbarkeit durch DAG darauf, dass endogenes NHERF1 bevorzugt an die überexprimierten Rezeptoren bindet und dadurch weniger NHERF1-Proteine an TRPC5-Kanäle gebunden vorliegen.

Ob jedoch NHERF1 tatsächlich an den muskarinischen M5-Rezeptor bindet, ist noch nicht bewiesen. Die fünf letzten Aminosäuren mit NSKLP am C-Terminus des muskarinischen M5-Rezeptors stellen ohne den Aufbau X-X-S/T-X-Φ bzw. X-X-Φ-X-Φ (X stellt eine beliebige Aminosäure dar, Φ eine hydrophobe Aminosäure) (Mamonova et al. 2012; Songyang et al. 1997; Hung und Sheng 2002) keine klassische PDZ1- oder PDZ2-Bindungsdomäne dar. Trotzdem ist es nicht auszuschließen, dass NHERF1-Brückenproteine mit diesem Rezeptor interagiert. Denn abgesehen von terminal stehenden PDZ-Bindungsdomänen gibt es auch nicht

terminal stehende PDZ-Bindedomänen, die sich über eine sogenannten engen β -Haarnadel-Struktur frei im Raum befinden wie bei der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (Christopherson et al. 1999). Hier greift das α -Syntrophin als Brückenprotein mit einer PDZ-Bindungsdomäne an (Adams et al. 2010).

3. Die Unterdrückung der DAG-Aktivierbarkeit bei NHERF-Überexpression

Des Weiteren bestätigen unsere Patch-Clamp-Untersuchungen mit überexprimierten NHERF1-Brückenproteinen, bei der keine TRPC5-Kanalaktivierung durch DAG beobachtet werden konnte (s. Abb. 4.5), das vorgeschlagen Modell der NHERF-Rekrutierung durch Rezeptorüberexpression.

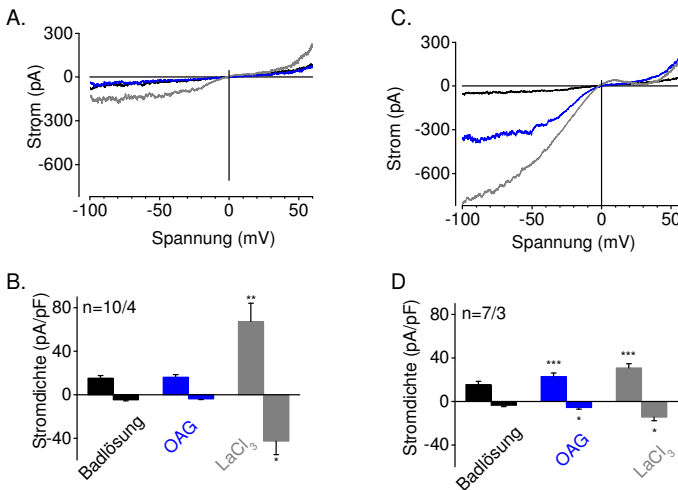


Abb. 4.5: NHERF1 beeinflusst die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5

A. Bei einer Überexpression von NHERF1-Brückenproteinen mit TRPC5-Kanälen in HEK293-Zellen lässt sich keine DAG-Aktivierbarkeit mit dem membranpermeablen DAG-Analogen OAG hervorrufen. Die Stromspannungsverläufe zeigen weder unter der Badlösung (schwarz) noch unter 100 μ M OAG (blau) den typisch doppelt-rektifizierenden Kurvenverlauf

des TRPC5-Kanals. Lediglich die anschließende Applikation von 100 μM LaCl_3 (grau) ruft TRPC5-Kanalströme mit typischer doppelt-rektifizierender Stromspannungsbeziehung hervor. Die LaCl_3 -Applikation stellt damit eine Expressionskontrolle für den TRPC5-Kanal dar. B. Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt die statistische Auswertung über 10 gemessene HEK293-Zellen mit der Überexpression von NHERF1 und TRPC5. Vier unabhängige Transfektionen wurden hierzu durchgeführt. Die statistische Auswertung zeigt ebenfalls keine DAG-Aktivierung mittels OAG-Applikation C. Allerdings bewirkt die Überexpression von TRPC5 und NHERF1 mit dem muskarinischen M5-Rezeptor eine OAG-induzierte TRPC5-Kanalaktivierung mit den typischen TRPC5-Stromspannungsbeziehungen (blau). D. Das Stromdichtensäulendiagramm zeigt deutlich OAG-induzierte TRPC5-Aktivierung. Quelle: Arbeitsgruppe Dr. Ursula Storch, Walther-Straub-Institut

Somit unterdrückt die NHERF1-Überexpression die DAG-Aktivierbarkeit von TRPC5, wenn NHERF1 stärker exprimiert wird als der muskarinische M5 Rezeptor.

4. Die regulative Funktion der PKC

In der Vergangenheit konnte unsere Arbeitsgruppe keinen großen Einfluss auf die TRPC5-Kanalaktivierung,-inaktivierung und DAG-Aktivierbarkeit über die Proteinkinase A mit Hilfe der Proteinkinasen A-Inhibitoren H-89 und KT-5720 feststellen. Lediglich Sung et al. (2011) ermittelten zwei Proteinkinase A-Phosphorylierungsstellen am C-Terminus des TRPC5-Kanals, Serin-794 und Serin-796, die eine 60%ige Unterdrückung des Kanalstromes über die $G\alpha_s$ -Protein-cAMP-Proteinkinase A-Signalkaskade bewirken.

Hingegen konnten Zhu et al. 2005 zeigen, dass die PKC eine zentrale Rolle in der Regulation der TRPC5-Aktivierung einnimmt. Im Detail analysierte die Forschergruppe von Herrn Ki Whan Kim die potentiellen PKC-Phosphorylierungsstellen Serin-666, Serin-752, Serin-833 und Threonin-972 am C-Terminus. Ein Aminosäureaustausch an diesen Positionen zu Alanin führte zu einer langsameren Inaktivierung unter Rezeptorstimulation. Abgesehen von der TRPC5-Kanalbasalaktivität inaktivieren unmutierte TRPC5-Kanäle vollständig, das heißt 100

s nach der maximalen Kanalaktivierung durch Rezeptorstimulation ist kein Rezeptor-induzierter einwärts- und auswärtsgerichteter TRPC5-Kanalstrom vorhanden. Hingegen zeigten TRPC5-Kanäle mit dem T752A-Aminosäureaustausch eine verlangsamte Inaktivierung, denn es lagen noch $30 \pm 3\%$ des maximalen Einwärtsstromes nach 100 s vor. Die TRPC5-T972A-Mutante wies die langsamste Inaktivierung auf. Mit $91 \pm 4\%$ des Einwärtsstromes 100 Sekunden nach der maximalen Kanalaktivierung durch Rezeptorstimulation liegt sogar ein fast völliger Verlust der Kanalaktivierung vor. Um herauszufinden, ob die PKC auch die DAG-Aktivierbarkeit beeinflusst und um zu überprüfen, ob die PKC die obengenannten potentiellen Phosphorylierungsstellen wirklich phosphoryliert und die Kanalaktivierung verändert, wurden in der vorliegenden Arbeit die Experimente mit dem potenten und selektiven PKC-Inhibitor BimI durchgeführt (s. Abb. 3.4 und 3.19 im Ergebnisteil). Eine vollständige Hemmung der PKC führte zur DAG-Aktivierbarkeit des nicht-mutierten TRPC5 und der TRPC5-S752D-Mutante (s. Abb. 3.4 und 3.19 im Ergebnisteil). Eine DAG-Aktivierbarkeit unter BimI-Applikation zeigte sich nicht bei den Aminosäureaustauschen TRPC5-T972E und TRPC5-S752A (s. Abb. 3.10 und 3.15 im Ergebnisteil). Damit entsteht die DAG-Aktivierbarkeit durch eine Unterdrückung der PKC-Phosphorylierung des Threonins an Position 972 (s. Abb. 4.6). Die PKC-Inhibitionen an den phosphorylierbaren Aminosäuren S666 und S833 spielen vermutlich keine oder eine untergeordnete Rolle in die DAG-Sensitivität des TRPC5-Kanals.

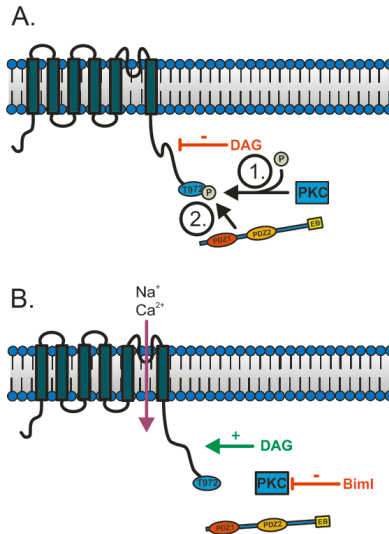


Abb. 4.6: Die Inhibition der PKC führt zur DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5

A.: Der TRPC5 (grün) wird durch die PKC an der Aminosäure T972 phosphoryliert (1.). Die Phosphorylierung ermöglicht die Bindung des NHERF1-Brückenproteins (2.). Durch die Bindung von NHERF1 ist der TRPC5-Kanal nicht DAG-aktivierbar. B. Die Inhibition der PKC durch Biml führt dazu, dass die Phosphorylierung des Threonins an Position 972 ausbleibt. Dadurch ist das NHERF1-Brückenprotein nicht mehr in der Lage, an den TRPC5 zu binden und der TRPC5 ist DAG-aktivierbar (grüner Pfeil).

Es lässt sich Folgendes dazu aussagen: Die phosphomimetischen Aminosäureaustausche T972E oder T972D² des TRPC5, die unter PKC-Inhibition nicht DAG-aktivierbar sind (s. Abb. 3.10), untermauern die oben genannten Schlussfolgerungen. Aufgrund der negativen Ladung der Carboxygruppe des Glutamats oder des Aspartats an Position 972 bindet das NHERF1-Brückenprotein an diese terminale PDZ-Bindungsdomäne, unabhängig von der PKC-Aktivität und

² Charakterisiert in der Arbeitsgruppe von Dr. Ursula Storch

unabhängig von einer Phosphorylierung oder Dephosphorylierung des Threonins-973 in der terminalen PDZ-Bindungsdomäne. Anscheinend sind diese Bindungen sehr stabil, denn sie lassen sich kaum beeinflussen. Des Weiteren lässt sich durch die PKC-Inhibition mit BimI feststellen, dass die Phosphorylierungen an den anderen potentiellen PKC-Phosphorylierungsstellen wahrscheinlich keinen Einfluss auf die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5-Kanals haben. Zu bedenken ist aber auch, dass nicht jede Proteinkinase-Inhibition zwangsläufig zu einer Dephosphorylierung führt, denn es könnte auch sein, dass aus sterischen Gründen Protein-Phosphatasen nicht angreifen können und somit der Zustand der Phosphorylierung unter der Proteinkinase-Inhibition unverändert bleibt. Zudem könnten Proteinkinasen, wie zum Beispiel die AMP-aktivierten Proteinkinasen für die Phosphorylierung an den anderen potentiellen PKC-Phosphorylierungsstellen verantwortlich sein, die für eine Inhibition mit BimI und H-89 nicht sensitiv sind. Nichtsdestotrotz könnte auch eine Dephosphorylierung an den anderen potentiellen PKC-Phosphorylierungsstellen zum Beispiel durch Serin-spezifische Protein-Phosphatasen die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5-Kanals beeinflussen und regulieren.

4.1. Die Rolle des Serins an der Position 752 des TRPC5-Kanals

Interessanterweise wies der Aminosäureaustausch des Serins an Position 752 zu einem Phosphatgruppen-freien und nicht-phosphorylierbaren Alanin unter PKC-Inhibition keine DAG-Aktivierbarkeit auf (s. Abb. 3.15). Das bedeutet, dass die NHERF1-Brückenproteine entweder in diesem Fall nicht von den C-Termini der TRPC5-Kanäle abfallen oder anders herum ausgedrückt, dass die C-Termini sich nicht von der NHERF1-Bindung befreien oder in dem anderen denkbaren Fall, dass die NHERF1-Brückenproteine tatsächlich nicht gebunden vorliegen und trotzdem keine DAG-Aktivierbarkeit vorliegt aufgrund einer fehlenden intramolekularen Transduktion zur DAG-Aktivierbarkeit. Im Gegensatz dazu zeigten die Aminosäureaustausche dieses Serins zu den phosphomimetischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat (S752D und S752E³) eine DAG-Aktivierbarkeit unter PKC-Inhibition. Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass das C-terminale Serin an der Position 752 phosphoryliert

³ Charakterisiert in der Arbeitsgruppe von Prof. Mederos y Schnitzler

vorliegen muss, um eine DAG-Aktivierbarkeit zu ermöglichen. Ob diese Phosphorylierung eine notwendige C-terminale Konformationsänderung bewirkt, an der DAG direkt binden kann oder ob die DAG-Bindung durch diese Konformationsänderung an einer anderen Stelle des C-Terminus erfolgt, ist bisher ungeklärt. Das Verhalten des Serins an der Position 752 mit der postulierten Konformationsänderung stellt aber vielleicht den Schlüssel zur Beantwortung der Kardinalfrage, wo DAG bindet.

Die Ergebnisse mit Hilfe der Doppelmutanten mTRPC5-S752D-T972A, die DAG-aktivierbar war (s. Abb. 3.22) und mTRPC5-S752A-T972A sowie mTRPC5-S752D-T972D, die nicht DAG-aktivierbar waren (s. Abb. 3.23 und 3.25), bestätigen die dominante Rolle des Serins an der Position 752 über des Threonins an der Position 972 für die DAG-Aktivierbarkeit. Folglich müssen das Serin-752 phosphoryliert und das Threonin-972 dephosphoryliert vorliegen, damit der TRPC5-Kanal DAG-aktivierbar ist. Die Schlüsselfunktion des Serins an Position 752 im C-Terminus des TRPC5-Kanals konnte in der vorliegenden Arbeit nicht weiter analysiert werden. Dennoch können folgende Proteinkinasen von den über 370 möglichen Serin- bzw. Threonin-Proteinkinasen⁴ für diese Phosphorylierung ausgeschlossen werden. Erstens sind die 15 PKC-Isoformen durch die vorliegenden BimI-Experimente wahrscheinlich nicht hierfür verantwortlich. Auch die Proteinkinase A kann durch die von uns durchgeführten H-89-Experimente ausgeschlossen werden. Unabhängig davon spielen die potentiellen Proteinkinase A-Phosphorylierungsstellen, Serin-732, Serin-794, Serin-796, Serin-821 und Serin-841 (Sung et al. 2011), wahrscheinlich keine Rolle bei der DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5-Kanals. Ebenso kommt wahrscheinlich die Proteinkinase B-Gruppe mit den Proteinkinase B-Isoformen α , β und γ (auch AKT1, 2 und 3 genannt) nicht für die S752-Phosphorylierung in Frage. Denn für die Proteinkinase B α -Isoform muss das Sequenzmotiv R-X-R-X-X-S/T-F/L mit X für eine beliebige Aminosäure vorliegen (Alessi et al. 1996) und dieses Motiv unterscheidet sich sehr stark von der C-terminal Sequenz des TRPC5-Kanals mit 747-K-Q-D-I-S-S-F-753. Für die Proteinkinase G ist kein einheitliches Sequenz-Bindemotiv bekannt. Beispielsweise sind für eine Interaktion der Proteinkinase G β mit dem IP₃-Rezeptor-assoziierten cGMP-Kinasesubstrat viele geladene Aminosäuren

⁴ <http://enzyme.expasy.org/EC/2.7.11.>, zuletzt abgerufen am 23.03.2015 um 07.25 Uhr

verantwortlich (152-**SEEDKKK**NLALLEEAKLV**SERFLTRRGRKSRSS**-184) (Ammendola et al. 2001). Eine solches Motiv weisen die N- und C-Termini der TRPC4- und TRPC5-Kanäle nicht auf (s. Abb. 1.6). Im Gegensatz dazu weisen die N-Termini der TRPC3-, TRPC6- und TRPC7-Kanälen zwei konservierte Proteinkinase G-Phosphorylierungsstellen auf, die Phosphorylierung den speicherregulierten Calciumstrom hemmt (Yao 2007). Damit sind erst 19 Serin- bzw. Threonin-Proteinkinasen ausgeschlossen. Viel versprechende Kandidaten wären noch die AMP-aktivierten Kinasen oder sogar die 12 bekannten Rezeptorproteinkinasen. Zudem ist es denkbar, dass eine PKC-Phosphorylierung am Serin-752 nur einmal in der Prozessierung der TRPC5-Proteinuntereinheit geschieht und eine Konformationsänderung bewirkt, die weder eine Protein-Phosphatase noch eine Proteinkinase sterisch angreifen lässt.

In eukaryotischen Zellen kommen für die Dephosphorylierung zwei Familien von Serin- bzw. Threonin-Phosphatasen in Betracht: die Familie der Phosphoprotein-Phosphatase P (PPP) und die Familie der Phosphoprotein-Phosphatase M (PPM) (Cohen 1994; Wera und Hemmings 1995). Zur PPP-Familie gehören die am häufigsten in eukaryotischen Zellen vorkommenden Phosphatasen, nämlich PP1, PP2A und PP2B – die letztere ist auch bekannt als Calcineurin. PP2C gehört zur PPM-Familie und ist in eukaryotischen Zellen seltener vertreten. Eine Inhibition der Phosphatasen PP1 und PP2A der PPP-Familie mittels Calyculin A verhinderte die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5-Kanals. Auch eine zusätzliche Rezeptorüberexpression änderte nichts an diesem Verhalten (s. Abb. 3.5). Folglich könnten die Protein-Phosphatasen PP1 oder PP2 die Dephosphorylierung des C-terminalen Threonins-972 bewirken und damit die NHERF1-Proteinbrücken ablösen und so die DAG-Sensitivität des TRPC5-Kanals hervorrufen. Des Weiteren scheinen diese beiden Protein-Phosphatasen das phosphorylierte Serin-752 nicht zu beeinflussen. Das Phosphatasen gezielt eine bestimmte Aminosäure dephosphorylieren können, konnte am ionotropen Glutamatrezeptor des A-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure-Typs gezeigt werden (Anggono und Haganir 2012; Wang et al. 2013). Die GluA1-Untereinheit des A-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure-Rezeptors besitzt zwei wichtige Phosphorylierungsstellen mit Serin-831 und Serin-845. Eine Phosphorylierung des Serins-845 führte zu einer höheren Kanaloffenwahrscheinlichkeit und eine des Serins-831 führte zu einer höheren Kanalleitfähigkeit (Kristensen et al. 2011). Es stellte sich

heraus, dass das synaptische Plastizitätsphänomen, die Langzeit-Depression, zur alleinigen Dephosphorylierung des Serins-845, aber nicht des Serins-831 führte. Diese Dephosphorylierung konnte durch die Okadaische Säure, ein spezifischer Hemmer von PP1 und PP2A, verhindert werden (Lee et al. 1998). Somit kommt es im Zuge der Rezeptorstimulation zur Aktivierung einer Phosphatase, wahrscheinlich PP1 oder PP2, die in einer DAG-Kanalaktivierung mündet (s. Abb. 4.7).

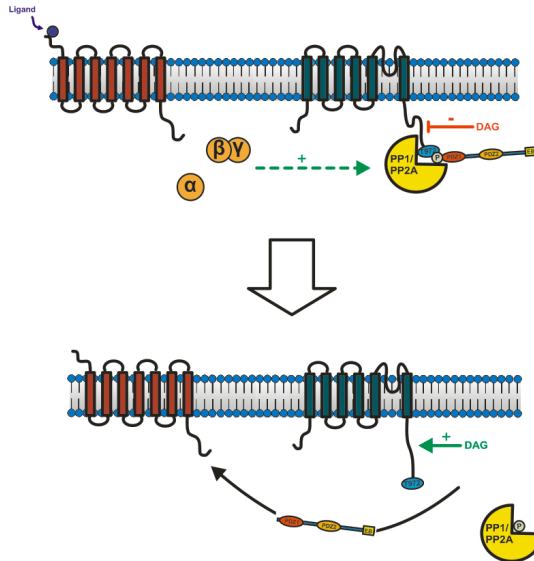


Abb. 4.7: Die Rolle der Phosphatasen in der DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5

Die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (oben links, rot) führt über einen noch ungeklärten Weg (oben, grüner, gestrichelter Pfeil) zur Aktivierung der Phosphatasen PP1 oder PP2A (oben, gelb). Diese Phosphatasen desphosphorylieren das Threonin an der Position 972 (T972) am TRPC5 (oben rechts, grüne Transmembrandomänen). Die Dephosphorylierung führt dazu, dass das NHERF1-Brückenprotein nicht mehr binden kann und sich räumlich vom C-Terminus entfernt (unten). Möglicherweise kommt es sogar zu einer Translokation von NHERF1 an G-Protein gekoppelten Rezeptoren (unten). Somit wird der TRPC5 DAG

aktivierbar (unten, grüner Pfeil).

5. Die Aktivierbarkeit des TRPC5 durch PIP₂-Depletion

PIP₂ ist ein membranständiges Phospholipid, das durch die PLC in DAG und IP₃ gespalten wird. Es gibt unterschiedliche Aussagen darüber, ob PIP₂ den TRPC5-Kanal hemmt oder aktiviert. In der Veröffentlichung von Trebak et al. (2009) wurde zum einen eine TRPC5-Kanalinhibition durch eine PIP₂-Applikation über die Patchpipette in der Ganzzelleableitung festgestellt und zum anderen führte eine PIP₂-Applikation über die Badlösung bei zellfreien Patch-Clamp-Ableitungen, bei denen die Innenseite des Membranflecks zur Badlösung zeigt, zu einer TRPC5-Kanalaktivierung. Zudem beobachteten Kim et al. (2008), dass eine PIP₂-Applikation in der Ganzzelleableitung die Inaktivierung des TRPC5-Kanals unter Rezeptorstimulation verlangsamt. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten sich auf die technisch-methodischen Schwierigkeiten bei der PIP₂-Applikation zurückführen lassen. Zudem führen klassische Ganzzelleableitungen und die obengenannte zellfreie Ableitkonfiguration zur Dislokalisierung von akzessorischen Membranproteinen, zum Auswaschen von intrazellulären Botenstoffen und zum Verlust der natürlichen Calcumpufferung, die die PIP₂-Regulation des TRPC5-Kanals beeinflussen können. Obwohl auch widersprüchliche Ergebnisse bei einer PIP₂-Depletion zu finden sind, wie etwa, dass der TRPC4-Kanal unter PIP₂-Depletion nicht aktiviert und der TRPC5-Kanal aktiviert (Plant und Schaefer 2003; Kim et al. 2008; Otsuguro et al. 2008), rufen PIP₂-Depletionen weniger Artefakte hervor. Somit bieten die Ergebnisse aus PIP₂-Depletionsexperimenten eine höhere Reliabilität und Validität als die der PIP₂-Applikationsexperimente. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der TRPC5-Kanal sowie alle in dieser Arbeit untersuchten TRPC5-Mutanten durch PIP₂-Depletion aktiviert werden und durch DAG aktivierbar sind. Die PIP₂-Depletion wurde mit zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen verifiziert: zum einen mit dem Phosphatidylinositol-4-Kinase-Inhibitor Wortmannin, der PIP₂ zu PIP abbaut (s. Abb. 3.6) und zum anderen mit dem Rapamycin-System von Lindner et al. (2011), bei dem PIP₂ zu PI abgebaut wird (s. Abb. 3.7). Interessant dabei ist vor allem, dass alle bisher untersuchten Aminosäureaustausche des TRPC5 durch PIP₂-Depletion aktivierbar waren, auch wenn sie unter Rezeptorüberexpression oder PKC-Inhibition

keine DAG-Aktivierbarkeit gezeigt hatten. Die PIP_2 -Depletion muss folglich den TRPC5-Kanal auf eine übergeordneten Weise direkt beeinflussen, die unabhängig ist von der NHERF1-Bindung oder von der Konformationsänderung durch das phosphorylierte Serin-752. Dieses Verhalten des TRPC5-Kanals könnte ein Alleinstellungsmerkmal sein, denn für den TRPC4 α -Kanal konnten Otsuguro et al. (2008) bereits nachweisen, dass die PIP_2 -Depletion durch Wortmannin nur eine sehr geringe Kanalaktivierung erzeugt. Diese und die anderen beiden β 1- und β 2-Isoformen des TRPC4-Kanals müssten mit den beiden obengenannten experimentellen Ansätzen zur PIP_2 -Depletion überprüft werden, um eine sichere Aussage treffen zu können, ob bezüglich der PIP_2 -Depletion wirklich ein Unterschied zwischen TRPC4 und TRPC5 besteht.

Kwon et al. (2007) konnten beim TRPC6 die Bindung von PIP_2 am C-Terminus nachweisen, indem der C-Terminus des TRPC6-Kanals mit einem Maltose-bindenden Protein fusioniert und mit wasserlöslichen, radioaktiv ^3H -markierten Inositolhexaphosphat inkubiert wurde. Eine Zugabe von PIP_2 zu dem radioaktiv markierten C-Terminus des TRPC6-Fusionsproteins, führte zu einer geringeren Radioaktivität des präzipitierten TRPC6-Fusionsproteins, die auf eine Inositolhexaphosphat-Verdrängung durch eine affine PIP_2 -Bindung beruht. Im Gegensatz zum TRPC5-Kanal führt allerdings die PIP_2 -Bindung zur TRPC6-Kanalaktivierung durch die Verdrängung des dort bindenden und inhibierenden Calmodulins (Friedlova et al. 2010). Des Weiteren bewirkt die PIP_2 -Depletion eine Hemmung der TRPC6-Kanalaktivität (Itsuki et al. 2014). Eine direkte Bindung von PIP_2 an den TRPC5 wurde bisher nicht experimentell gezeigt; es wären jedoch zwei Interaktionspartner des TRPC5-Kanals mit PIP_2 -Bindedomänen denkbar, nämlich Spektrin und das Sec14-Spektrin-Domänen1-Protein (SESTD1). Diese beiden Proteine und ihren Einfluss auf den TRPC5 sollen in den nächsten Kapiteln erläutert werden.

5.1. Der Einfluss von Spektrin auf den TRPC5

Spektrin ist ein Bestandteil des membrannahen Zytoskeletts und bildet aus einer α - und β -Untereinheit Heterodimere, die u.a. die Zellmembran-Stabilität, die Zellform und verschiedene zelluläre Funktionen beeinflussen (Zhang et al. 2013a). Sieben Spektrinuntereinheiten sind bekannt: α I und α II, sowie β I bis β V (De Matteis und Morrow 2000). Ein Merkmal sind die Spektrinwiederholungen, die aus 105

Aminosäuren bestehen. Die α I-Spektrin-Untereinheit besitzt eine SH3-Domäne, die an prolinreiche Proteindomänen binden kann, sowie zwei EF-Hand-Motive, die Calcium binden können. Die α II-Spektrin-Untereinheit besitzt darüber hinaus noch zusätzlich eine Calcium-Calmodulin-Bindestelle, sowie Bindestellen für Caspase und Calpain (Harris et al. 1988; Glantz et al. 2007). Die β -Spektrin-Untereinheiten verfügen über eine Aktinbindestelle, die aus zwei dafür codierenden Aminosäureabschnitten besteht und eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (Cohen et al. 1980; Bañuelos et al. 1998; Nilges et al. 1997). Sowohl über die Aktinbindestelle als auch über die Pleckstrin-Homologie-Domäne sind β -Spektrine dazu in der Lage, PIP₂ zu binden (An et al. 2005; Lemmon et al. 2002). Zu einem Heterodimer legen sich jeweils eine β -Spektrin-Untereinheit mit dem C-Terminus an eine α -Spektrin-Untereinheit mit dem N-Terminus aneinander. Zur Bildung eines Spectrin-Filaments verbinden sich zwei Heterodimere antiparallel zu einem Heterotetramer, die wiederum mit anderen Heterotetrameren über Aktin ein Filamentnetzwerk bilden (s. Abb. 4.8).

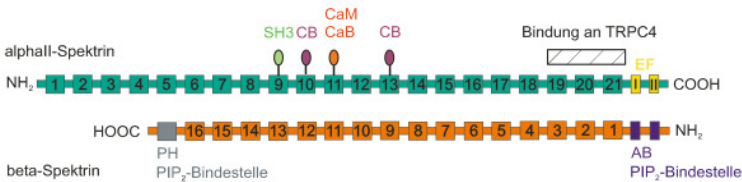


Abb. 4.8: Aufbau eines α - und β -Spektrin-Dimers

Die α - und β -Spektrine heterodimerisieren indem sie sich aneinander lagern. Diese Dimere bilden wiederum Spektrin-Heterotetramere, die über Aktinfilamente miteinander verbunden sind und ein sechseckiges Netzwerk bilden (nicht dargestellt). Die α -Spektrin-Untereinheit besteht aus 21 Spektrinwiederholungen (grün) und hat eine SH3-Domäne (hellgrün) in der neunten Spektrinwiederholung, eine Caspase- (CB, lila) in der zehnten und elften Spektrinwiederholung, eine Calpain- (CaB, orange) und eine Calmodulin-Bindestelle (CaM, orange) in der elften Wiederholung. An die 19. bis 21. Spektrinwiederholung kann nachweislich TRPC4 binden. Am Ende des C-Terminus befinden sich zwei EF-Hand-Motive (gelb), die Calcium binden können. Die β -Spektrin-Untereinheit ist mit 16 Spektrinwiederholungen (orange) kürzer und verfügt über eine Aktinbindestelle mit zwei dafür codierenden Aminosäureabschnitten (AB, lila), eine PH-Domäne (grau) am

Ende des C-Terminus. PIP₂ kann sowohl an der Aktinbindestelle als auch an der PH-Domäne binden. Quelle: modifiziert nach Davis et al. (2009).

Die Bindung von Spektrin an den TRPC5 wurde bisher noch nicht nachgewiesen, aber dafür die Bindung an den nahverwandten TRPC4 (Odell et al. 2008). Die Spektrin-Bindestelle des TRPC4-Kanals befindet sich direkt hinter der Calmodulin/IP₃-Bindestelle im C-Terminus (s. Abb. 1.6). Es können sowohl die α II-Spektrin-Untereinheiten mit der identifizierten TRPC4-Bindestelle (s. Abb. 4.7) als auch die β V-Spektrine mit einer noch unbekanntem TRPC4-Bindestelle an dieser Spektrin-Bindestelle binden. Ein Aminosäurenvergleich (s. Abb. 1.6) zur Spektrin-Bindung des TRPC4-Kanals zeigt, dass der TRPC5 bis auf zwei Aminosäuren in diesem Bereich die gleiche Aminosäuresequenz hat und alle anderen TRPC-Kanäle in diesem Bereich keine Sequenzähnlichkeiten aufweisen. Wahrscheinlich sind nur TRPC4- und TRPC5-Kanäle in der Lage, Spektrin zu binden. Odell et al. (2008) konnten außerdem zeigen, dass der Verlust der Bindung von α II-Spektrin am TRPC4-C-Terminus für die Insertion in die Zellmembran und für die Aktivierung des TRPC4-Kanals durch den epidermalen Wachstumsfaktor entscheidend sind. Die β 2-TRPC4-Isoform, der die Spektrinbindestelle fehlt, wird weder durch den epidermalen Wachstumsfaktor aktiviert noch wird die Expression in der Zellmembran erhöht. Dadurch lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Spektrin bindet an den TRPC5 und hält den C-Terminus in einer Konformation, die keine Aktivierung durch DAG erlaubt. Eine Spektrin-Ablösung, die über eine PIP₂-Depletion entstehen könnte, bewirkt eine C-terminale Konformationsänderung, die zur Ablösung von NHERF1-Brückenproteine und damit zur DAG-Aktivierbarkeit führt (s. Kap. V 1.). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte PKC-Phosphorylierungsstelle Serin-752 des TRPC5-Kanals befindet sich in der Spektrinbindestelle (s. Abb. 1.6) und beeinflusst möglicherweise die Spektrinbindung und / oder die C-terminale Konformationsänderung. Vermutlich verhindert der Aminosäureaustausch Serin-752 zu Alanin die notwendige C-terminale Konformationsänderung zur Ablösung von NHERF1-Brückenproteinen oder verhindert die Bindung von DAG selbst. Die phosphomimetischen Aminosäureaustausche zu Glutamat und Aspartat an dieser Position erlauben diese Konformationsänderung oder die DAG-Bindung. Da die phosphomimetischen und die nicht-phosphorylierbaren Aminosäureaustausche ähnlich große Basalaktivitäten besitzen und keine unmittelbare DAG-Aktivierbarkeit besitzt, scheint Serin-752

letztendlich die Bindung von Spektrin nicht zu beeinflussen. Da die TRPC5-Doppelmutante S752A-T972A bei Rezeptorüberexpression keine DAG-Aktivierbarkeit aufwies im Gegensatz zur TRPC5-T972A-Mutante, scheint der Aminosäureaustausch von Serin-752 zu Alanin die DAG-Aktivierbarkeit zu verhindern, obwohl NHERF1 nicht gebunden vorliegt. Damit scheint folgendes Vorstellungsmodell zur Rolle des Serins-752 naheliegend zu sein (s. Abb. 4.9).

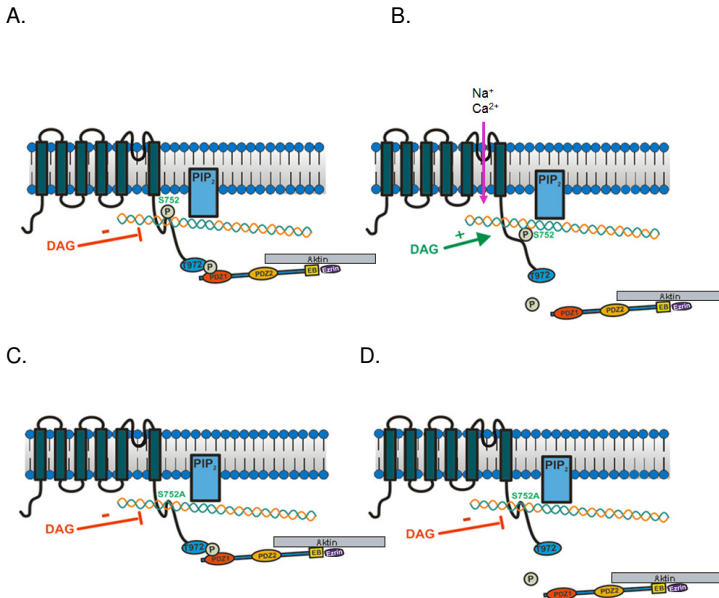


Abb. 4.9: Serin 752 ist vermutlich eine kritische Determinante für die Konformationsänderung des C-Terminus

A. Vermutlich liegt der TRPC5-Kanal im geschlossenen, aktivierbaren Zustand mit Spektrin (grün-orange) gebunden vor und das Serin an Position 752 ist phosphoryliert. B. Beim aktivierten TRPC5-Kanal (Na^+ - bzw. Ca^{2+} -Permeationspfeil) liegt das NHERF1-Brückenprotein nicht gebunden vor und daraus folgt vermutlich eine Konformationsänderung des C-Terminus von TRPC5, die ein phosphoryliertes Serin an der Aminosäureposition 752 benötigt. Diese Konformationsänderung ist eine notwendige Voraussetzung für die DAG-Sensitivität (grüner Pfeil) des TRPC5-Kanals. C. Auch an dem

Aminosäureaustausch TRPC5-S752A (grün) liegt Spektrin gebunden vor. Außerdem besitzt Spektrin eine Verbindung zum membranständigen PIP₂ (blau). Die notwendige Konformationsänderung des C-Terminus für die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 kann in der TRPC5-S752A-Mutante nicht erfolgen, obwohl NHERF1 (rechts unten) nicht gebunden vorliegt.

Die TRPC5-S752A-Mutante zeigt unter PKC-Inhibition und Rezeptorüberexpression keine DAG-Aktivierbarkeit, allerdings unter PIP₂-Depletion. Die Ergebnisse von Otsuguro et al. (2008) unterstützen, dass die TRPC4 α -Isoform ebenfalls unter PIP₂-Depletion aktiviert wird, indem die Verbindung dieser TRPC4-Isoform zu dem Aktinzytoskelett aufgelöst wird. Umgekehrt führt eine Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch das Pilztoxin Cytochalasin D dazu, dass der TRPC4 α -Kanal durch eine PIP₂-Applikation nicht inhibiert wird. Auch bei der Entfernung der letzten vier Aminosäuren der PDZ-Domäne (Δ TTRL), führt eine Applikation von PIP₂ zu keiner TRPC4 α -Kanalinhibition. Mittels Koimmunpräzipitation zeigten Otsuguro et al. (2008) außerdem, dass TRPC4 α nur an Aktin und Ezrin-Radixin-Moesin bindet, wenn die C-terminale PDZ-Domäne des TRPC4 α -Kanals intakt ist. Überträgt man die obengenannten TRPC4-Ergebnisse und die TRPC5-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf den Aktivierungsmechanismus des TRPC5-Kanals, wäre es denkbar, dass Spektrin über Aktin und Ezrin-Radixin-Moesin mit dem NHERF1-Brückenprotein ein membranahes Netzwerk bildet, das den C-Terminus des TRPC5-Kanals in einer nicht DAG-aktivierbaren Konformation hält. Wird vermehrt PIP₂ abgebaut, führt dies möglicherweise zur Auflösung des Spektrin-PIP₂-Ezrin-NHERF1-TRPC5-Komplexes, da vermutlich Spektrin durch den PIP₂-Abbau seine Bindung zum TRPC5-Kanal verliert. Die Konformationsänderung des C-Terminus könnte daraufhin die Ablösung des NHERF1-Brückenproteins von der C-terminalen PDZ-Bindungsdomäne des TRPC5-Kanals hervorrufen und zur DAG-Aktivierbarkeit führen (s. Abb. 4.9). Für diese Hypothese sprechen die neusten Untersuchungen mit intermolekularem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), die unsere Arbeitsgruppe am Walther-Straub-Institut durchführte. Die Methode beruht auf der strahlenlosen Energieübertragung von fluoreszierenden Proteinen, den sogenannten Donoren, auf andere fluoreszierende Proteine, die als Akzeptoren dienen, wenn sich diese beiden Proteine näher als 10 nm sind. Hierzu wurde das gelb fluoreszierende Protein EYFP C-terminal an das TRPC5-Kanalprotein fusioniert und das blau-grün fluoreszierende Protein Cerulian2 an den N-

Terminus des NHERF1-Brückenproteins. Nähern sich die beiden Fusionsproteine aneinander an, kommt es zur strahlenlosen Energieübertragung und das Fluoreszenzsignal des Akzeptors nimmt zu und das des Donors nimmt ab. Entfernen sich wiederum die beiden Fusionsproteine, nimmt das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab und das des Donors nimmt zu. Wie sich herausstellte, bewirkte die PIP₂-Depletion mittels Wortmannin eine Ablösung des NHERF1-Brückenproteins vom C-Terminus des TRPC5-Kanals mit 4 bis 5%igen FRET-Abnahmen. Auch bei dem phosphomimetischen Aminosäureaustausch Threonin-972 zu Aspartat konnte eine 2 bis 3%ige FRET-Abnahme detektiert werden, die sich durch eine affinere NHERF1-Bindung zurückführen lässt. Hingegen zeigte der Phosphatgruppen-freie und nicht phosphorylierbare Aminosäureaustausch Threonin-972 zu Alanin eine 0,5 bis 1%ige FRET-Zunahme, die als fehlende Bindung zwischen TRPC5 und NHERF1 interpretiert werden kann. Diese FRET-Zunahmen fanden sich auch bei dem TRPC6-Fusionsprotein mit C-terminalen EYFP. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der Abbau von PIP₂ und damit vermutlich die Ablösung des Spektrins eine Konformationsveränderung des C-Terminus bewirkt, wodurch die Bindung des TRPC5 zu NHERF1 verloren geht. Der Verlust der NHERF1-Bindung wiederum bewirkt die DAG-Sensitivität des TRPC5-Kanals (s. Abb. 4.10).

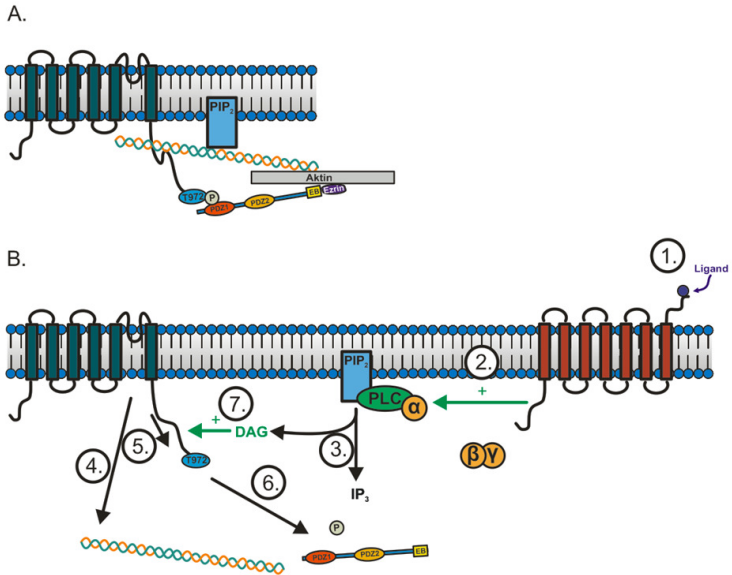


Abb. 4.10: Die PIP₂-Depletion bewirkt die DAG-Aktivierbarkeit durch Ablösung des Spektrins vom TRPC5

A. Hypothetischer Kanalkomplex einer TRPC5-Porenuntereinheit, bei dem der Kanal im geschlossenen Zustand ist. Spektrin (grün-orange) bindet sowohl an den TRPC5 über die Spektrinbindestelle als auch an PIP₂ (rechts). Über Aktin (grau) und Ezrin (lila) besteht eine Verbindung zu NHERF1. B. Der G-Protein gekoppelte Rezeptor (rechts, rot) wird durch die Bindung eines Liganden aktiviert (1.). Die α-Untereinheit trennt sich vom G-Protein gekoppelten Rezeptor und stimuliert die PLC (2.), welche PIP₂ in DAG und IP₃ spaltet (3.). Die PIP₂-Depletion führt zur Ablösung des Spektrins vom TRPC5 (4.) und damit zur Konformationsänderung des C-Terminus des TRPC5 (5.). NHERF1 verliert aufgrund dieser Konformationsänderung seine Bindung zum PDZ-Bindungsmotiv (6.). Der TRPC5 kann nun durch DAG aktiviert werden (7.).

5.2. Die Bindung des SESTD1 an den TRPC5

Als einen neuen möglichen Regulator der TRPC4- und TRPC5-Kanalfunktion entdeckten Miede et al. (2010) das Phospholipid-bindende Protein SESTD1. Dieses

Protein besitzt eine SEC14-ähnliche Bindungsdomäne sowie die drei Spektrin-Bindungsdomänen Spec-1, Spec-2 und Spec-3 (s. Abb. 4.10) (Yang und Cheyette, Benjamin N R 2013; Sato und Mishina 2003). Durch Koimmunpräzipitation und Glutathion-S-Transferase-Bindungstests konnte die Bindung der ersten Spektrindomäne (SPEC-1) an die SESTD1-Bindungsdomäne des TRPC4 und TRPC5 (s. Abb. 4.11) nachgewiesen werden. Die 29 Aminosäuren lange SESTD1-Bindungsdomäne ist beinahe identisch mit der CIRB und nur zwei Aminosäuren danach liegt die Spektrin-Bindestelle im TRPC4 (Odell et al. 2008)

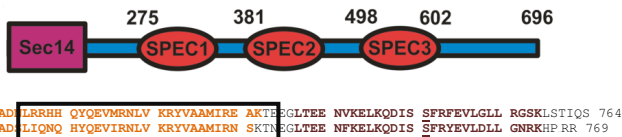


Abb. 4.11: Der Aufbau von SESTD1 und dessen Bindestelle im TRPC4 und TRPC5

Oben: SESTD1 besteht aus eine Sec14-ähnlichen Bindungsdomäne (Sec14) und drei Spektrinbindungsdomänen (SPEC1-3). Zahlen geben die Aminosäurennummerierung an. Unten: Nur TRPC4 und TRPC5 besitzen eine SESTD1-Bindestelle (schwarzer Kasten), welche beinahe identisch mit der CIRB ist (orange). Dicht hinter der SESTD1-Bindestelle befindet sich die Spektrin-Bindestelle (dunkelrot). In der Spektrinbindestelle liegt die PKC-Phosphorylierungsstelle S747 (TRPC4, unterstrichen) bzw. S752 (TRPC5, unterstrichen). Quelle: modifiziert nach Yang et al. (2013a)

Miehe et al. (2010) vermuten aufgrund der sehr geringen Distanz zwischen den Bindestellen, dass die SESTD1- und Spektrin-Bindestellen entweder eine gemeinsame Bindestelle sind, die entweder Spektrin bindet oder SESTD1, oder dass die beiden Bindestellen sich gegenseitig beeinflussen. Zudem konnten sie nachweisen, dass die SESTD1-Bindestelle Phospholipide binden kann, nämlich Phosphatidylinositol-Monophosphat, Phosphatidylinositol-Diphosphat und Phosphorsäure. Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol konnten nicht gebunden werden. Laut Jeon et al. (2012) ist die SESTD1-Bindestelle wichtig für die Aktivierbarkeit des TRPC4 durch $G\alpha_i$ -Protein gekoppelte Rezeptoren, da die $G\alpha_i$ -Protein-Untereinheit entweder direkt an die SESTD1-Bindestelle des TRPC4-C-Terminus bindet oder über das TRPC4 gebundene SESTD1. Außerdem stellten Miehe

et al. (2010) fest, dass eine deutliche Reduktion der TRPC4- und der TRPC5-Kanalaktivierung bei Rezeptorstimulation vorliegt, wenn die SESTD1-Expression mittels -spezifischer siRNA herunterreguliert wird. Diese Ergebnisse befürworten die Annahme, dass SESTD1 am TRPC4- und TRPC5-Kanal stets gebunden vorliegt. Des Weiteren fanden Miede et al. (2010) heraus, dass die SESTD1-Bindung zu PIP_2 calciumabhängig ist und sich durch einen höheren Calciumeinstrom über TRPC5 die Bindung verstärkt. Damit ist es kaum wahrscheinlich, dass SESTD1 direkt an der DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5 beteiligt ist. Eine indirekte Beteiligung an der DAG-Aktivierbarkeit könnte über die enge Nachbarschaft der Spektrin- und SESTD1-Bindestellen am C-Terminus des TRPC4- und TRPC5-Kanals bestehen.

6. Die fehlende Aktivierbarkeit von mTRPC5-S666A

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Phosphatgruppen-freie und nicht-phosphorylierbare Aminosäureaustausch Serin-666 zu Alanin im TRPC5 zu einem nicht-funktionsfähigen Kanal führte (s. Kap. IV 2.11). Wie Zhu et al. (2005) herausfanden, stellt das Serin-666 eine potentielle PKC-Phosphorylierungsstelle dar. Zudem zeigten sie in HEK293-Zellen einen funktionellen mTRPC5-S666A-Kanal, der eine langsamere Inaktivierung aufwies. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Mutante weder durch DAG, noch durch Rezeptorüberexpression und Rezeptorstimulation, sowie durch LaCl_3 -Applikationen aktiviert werden. In der Stromspannungsbeziehung konnten keine TRPC5-Basalströme detektiert werden; es waren lediglich die üblichen sehr kleine lineare Leckströme erkennbar. Die beiden von uns verwendeten Expressionsvektoren mit TRPC5-S666A wurden vollständig sequenziert und waren einwandfrei. Verunreinigungen konnten als Ursache ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz liegt das C-terminale Serin-666 des TRPC5-Kanals in der Prolin-reichen Sequenz, die wichtig für die Proteinfaltung und Protein-Protein-Interaktionen ist (Williamson 1994; Kay et al. 2000), so dass dort Aminosäureaustausche Fehlfaltungen und intrazelluläre Fehltransporte auslösen können. Da Proline selbst eine recht unflexible Struktur besitzen und α -Helices und β -Faltblätter unterbrechen können, bestimmen sie die dreidimensionale Struktur ihrer Umgebung und können somit stabile Strukturen erschaffen, die wichtige Interaktionen mit anderen Proteinen erleichtern wie zum Beispiel die Glycin-Prolin-Glutamin-reiche Sequenz der Myosin-Leichtkettenkinase mit dem F-Aktin (Brzeska et al. 2014). Nachgewiesen wurde bisher nur die Bindung des FKBP52-Proteins an diese Prolin-

reiche Sequenz des TRPC5 (Sinkins et al. 2004). FKBP52 ist ein Immunophilin, das besonders hoch im Nervensystem exprimiert ist und eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität besitzt. Shim et al. (2009) zeigten, dass FKBP52 nicht an TRPC1 binden kann, wenn das LPPPF-Motiv der Prolin-reichen Sequenz verändert wird und dass FKBP52 die cis-trans-Isomerisierung von Leucin-Prolin-Bindungen im N- und C-Terminus des TRPC1 katalysiert. Interessanterweise führte die Hemmung der Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität durch eine Mutation im FKBP52-Gen zu einer Hemmung sowohl der Basalaktivität des TRPC1-Kanals als auch der Kanalaktivierung durch Rezeptorstimulation. Das Serin-666 des TRPC5 befindet sich nur fünf Aminosäuren hinter dem kritischen LPPPF-Motiv der FKBP52-Bindung, und könnte durchaus die Bindung des Immunophilins beeinflussen. Möglicherweise bewirkt die fehlende FKBP52-Bindung eine reduzierte Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität am TRPC5 und führt dadurch zu einer Hemmung der TRPC5-Kanalaktivität.

7. Die mTRPC6-S846G-Mutation

Da das Serin an Position 846 des TRPC6 eine mögliche PKC-Phosphorylierungsstelle darstellt und in der Calmodulin/IP3-Bindestelle liegt (s. Abb. 1.6), wurde dessen Einfluss auf die DAG-Sensitivität des TRPC6 untersucht. Wie Abb. 3.17 deutlich macht, konnte kein unterschiedliches Verhalten gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass diese Position entweder keine PKC-Phosphorylierungsstelle darstellt oder dass diese Position keinen Einfluss auf die DAG-Sensitivität hat.

8. Physiologische Relevanz und TRPC5-Aktivierungsmodell

Aus den vorliegenden Ergebnissen können zwei Bedingungen für die DAG-Sensitivität des TRPC5-Kanals herausgearbeitet werden:

- Serin-752 ist phosphoryliert und Threonin-972 ist dephosphoryliert.
- Eine PIP₂-Depletion findet statt.

Wie bereits erörtert, wird vermutlich die Konformation des C-Terminus durch die Phosphorylierung des Serins-752 beeinflusst und die NHERF1-Bindung durch die

Phosphorylierung von Threonin-972 (s. Kap V 1. und 4.1). Die Überexpression eines $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptors bewirkt wahrscheinlich die Aktivierung der Phosphatase PP1 oder PP2A, wodurch Threonin-972 dephosphoryliert wird (s. Kap. V 2.).

Doch bleibt die Frage, ob diese Bedingungen auch *in vivo* vorherrschen und ob die Aktivierung des TRPC5-Kanals wirklich durch DAG stattfindet. Das folgende Aktivierungsmodell (s. Abb. 4.12) stellt den Fall dar, dass G-Protein gekoppelten Rezeptoren Serin- bzw. Threonin-Phosphatase spezifisch aktivieren.

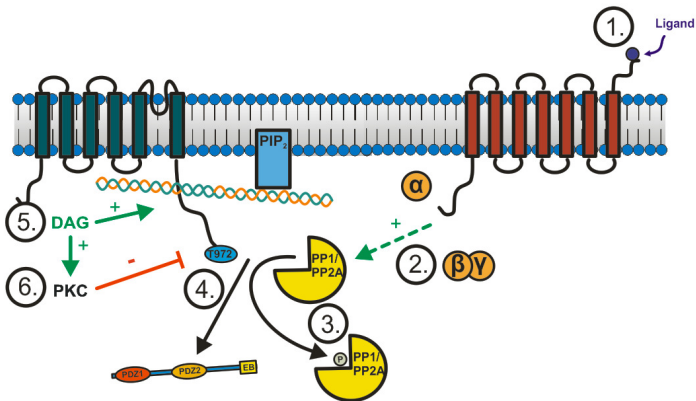


Abb. 4.12: Die Rolle der Phosphatasen im Aktivierungsmechanismus des TRPC5

Durch die Bindung eines Liganden wird ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (rechts, rot) aktiviert (1.). Die Aktivierung bewirkt über einen unbekannten Weg (2., gestrichelter Pfeil) die Aktivierung der Phosphatase PP1 oder PP2A. Diese dephosphoryliert Threonin-972 am TRPC5-Kanal (3.), wodurch die Bindung zum NHERF1-Brückenprotein verloren geht (4.). Die Konformation des C-Terminus ändert sich und DAG kann den TRPC5 aktivieren (5.). Außerdem stimuliert DAG die PKC (6.). In einem negativen Rückkopplungsmechanismus kommt es dadurch zur erneuten Phosphorylierung von Threonin-972 und damit zur Inaktivierung.

Sind die Serin- bzw. Threonin-Phosphatase bezüglich der DAG-Aktivierung nicht involviert, könnte folgender Aktivierungsmechanismus stattfinden: Im Zuge der Rezeptoraktivierung findet durch die PLC eine PIP₂-Depletion statt. Der PIP₂-Abbau führt zur Auflösung der TRPC5-Spektrin-PIP₂-Bindung. Spektrin fällt ab und die Konformation des C-Terminus ändert sich (s. Kap. V 4.1). Das NHERF1-Brückenprotein löst sich aufgrund dieser Konformationsänderung vom C-Terminus des TRPC5-Kanals ab und ermöglicht dadurch die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5-Kanals (s. Abb. 4.13). Das freigesetzte DAG könnte die PKC aktivieren, die in einem negativen Rückkopplungsmechanismus die TRPC5-Kanalaktivierung beendet, indem die PKC Threonin-972 wieder phosphoryliert und damit schließlich die Bindung des NHERF1-Brückenproteins ermöglicht. Über das SESTD1 ist noch zu wenig bekannt, um dessen Rolle in der Kanalaktivierung genau abschätzen zu können. Erwiesen ist jedoch, dass die SESTD1-Bindung für die Aktivierbarkeit des TRPC5 wichtig ist. Daher liegt SESTD1 vermutlich immer TRPC5-gebunden vor. Die DAG-Bindung findet höchstwahrscheinlich am C-Terminus statt, da die C-terminalen Spektrin- und PDZ-Bindestellen die DAG-Sensitivität stark beeinflussen. Bisher ist jedoch weder für die TRPC3/6/7-Unterfamilie noch für die TRPC4/5-Unterfamilie die DAG-Bindestelle bekannt (Hofmann et al. 1999; Venkatachalam et al. 2003; Dietrich und Gudermann 2014). Außerdem ist die vierte PKC-Phosphorylierungsstelle im C-Terminus mit dem Serin-833 noch nicht untersucht. Diese Phosphorylierungsstelle befindet sich in der zweiten Calmodulinbindestelle, die die Kanalaktivierungskinetik geringfügig beeinflusst (Ordaz et al. 2005) und somit nicht die DAG-Bindestelle enthalten kann.

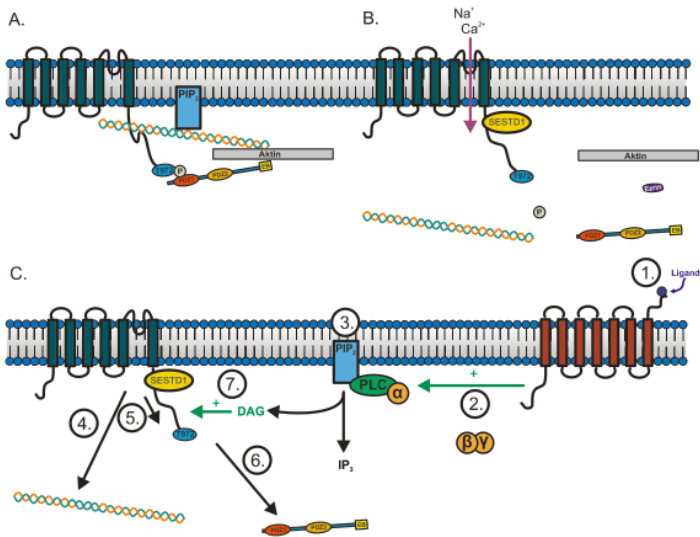


Abb. 4.13: Aktivierungsmodell des TRPC5

A.: Hypothetischer Kanalkomplex des TRPC5 im geschlossenen Zustand. TRPC5, NHERF1, Ezrin, Aktin, PIP₂ und Spektrin bilden einen Komplex, wodurch der TRPC5 im geschlossenen Zustand gehalten wird. B. Hypothetischer Kanalkomplex des TRPC5 im offenen Zustand. Sowohl Spektrin als auch NHERF1 liegen nicht mehr gebunden vor. C. Aktivierungsmodell: Die Bindung eines Liganden aktiviert einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (rechts, rot) (1.). Daraufhin spalten sich die α- und βγ-Untereinheiten ab. Die α-Untereinheit aktiviert die PLC (2.). Die PLC spaltet PIP₂ in DAG und IP₃ (3.). Der Abbau von PIP₂ führt zur Ablösung des Spektrins vom TRPC5-Kanal (4.). Durch die Ablösung des Spektrins findet eine Konformationsänderung des C-Terminus statt (5.). Diese Konformationsänderung bewirkt die Ablösung des NHERF1-Brückenproteins von der C-terminalen PDZ-Domäne des TRPC5-Kanals (6.). Der TRPC5 kann nun durch DAG aktiviert werden (7.).

Da die PIP₂-Depletion nicht oder nur gering den TRPC4 aktiviert, wird der TRPC4 eventuell nur durch die Aktivierung der Phosphatase DAG-sensitiv oder ein anderer

Mechanismus reguliert dessen DAG-Aktivierbarkeit. Dass die Regulation dieser zwei engverwandten Proteine unterschiedlich sein könnte, zeigt sich auch darin, dass der TRPC4-Kanal eine Calmodulinbindestelle mehr besitzt als der TRPC5-Kanal und dass die Membraninsertion des TRPC4-Kanals von NHERF1-Brückenproteine abhängiger ist als die des TRPC5-Kanals (Schaefer et al. 2002; Zhu 2005; Mery et al. 2002; Schaefer et al. 2002; Zhu et al. 2005).

Die vorliegenden Aktivierungsmodelle beziehen sich auf ein TRPC5-Homotetramer. Heterotetramere aus den porenbildenden TRPC1-, TRPC4- und TRPC5-Untereinheiten könnten einem anderen Aktivierungsmechanismus unterliegen. Im TRPC1-TRPC5-Heterotetramer beispielsweise ist TRPC1 an der Porenbildung beteiligt und beeinflusst die Kanalaktivität, indem es die Calciumpermeabilität und die Einzelkanalleitfähigkeit verringert (Storch et al. 2012; Strübing et al. 2001). Außerdem stellten Shi et al. (2012) fest, dass der TRPC1-TRPC5-Komplex in vaskulären, glatten Muskelzellen durch die PKC aktiviert und nicht wie im heterolog exprimierten TRPC5-Homotetramer inhibiert wird. Möglicherweise verringert die TRPC5-Kanaluntereinheit durch die NHERF1-Bindung die Kanalaktivierung des TRPC1-TRPC5-Heterotetramers unter PKC-Stimulation. Auch PIP₂- und PIP₃-Applikationen, die den TRPC5-Homotetramer normalerweise inhibieren, aktivieren den TRPC1-TRPC5-Heterotetramer. Das bedeutet, dass der Aktivierungsmechanismus in Heterotetrameren vermutlich anders abläuft als in Homotetrameren.

Zu den weiteren denkbaren Heterotetrameren gibt es noch keine ausreichenden Untersuchungen, die die Kanaleigenschaften und den Aktivierungsmechanismus beleuchten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass entgegen der bisherigen Annahme der TRPC5 DAG-sensitiv ist. Der Aktivierungsmechanismus ist dabei ein anderer als der der TRPC3/6/7-Unterfamilie.

9. Die E598D-Mutation

In der vorliegenden Arbeit entstand bei der Durchführung des Mutageneseprotokolls durch Zufall die TRPC5-E598D-S752D-Mutante (s. Kap. IV 2.12). Wie sich herausstellte, reagierte diese nicht auf 100 μ M LaCl₃, genauso wie die anschließend

hergestellte TRPC5-E598D-Porenmutante. Die DAG-Aktivierbarkeit unter Rezeptorüberexpression blieb jedoch erhalten. Eine ähnliche Porenmutation hatten bereits Jung et al. (2003) mit dem Aminosäureaustausch von Glutamat-598 zu Glutamin untersucht. Die funktionelle Gruppe des Glutamins (Q) besitzt im Vergleich zu der des Glutamats (E) eine Aminogruppe anstatt einer Carboxygruppe. Ansonsten sind die beiden Aminosäuren in Aufbau und Struktur gleich (s. Abb. 4.14). Die funktionelle Gruppe des Aspartats (D) ist hingegen um eine Methylgruppe kürzer als die des Glutamats (E). Die beiden Aminosäureaustausche, E598Q und E598D, unterscheiden sich somit zum einen in der Ladung – E598Q ist nicht geladen – und zum anderen in der Länge – E598Q ist eine Methylgruppe länger.

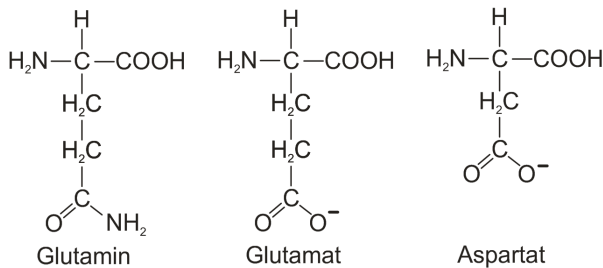


Abb. 4.14: Vergleich des Aufbaus von Glutamin, Glutamat und Aspartat

Im Vergleich sind die drei Aminosäuren Glutamin, Glutamat und Aspartat zu sehen. Glutamat unterscheidet sich nur hinsichtlich einer Carboxygruppe von Glutamin, während Aspartat um eine Methylgruppe kürzer ist.

Jung et al. (2003) fanden heraus, dass Lanthan den TRPC5 durch eine drastische Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit aktiviert, während die Einzelkanalleitfähigkeit um annähernd die Hälfte verringert wird. Bei Lanthan-Konzentrationen im mikromolaren Bereich überwiegt die Hemmung der Einzelkanalleitfähigkeit den Effekt der erhöhten Offenwahrscheinlichkeit und es kommt zu einem Block durch Lanthan. Extrazelluläres Calcium aktiviert auf ähnliche Art und Weise den TRPC5-Kanal und in Anwesenheit von hohem extrazellulärem Calcium ist eine Aktivierung durch Lanthan nicht möglich. Vermutlich kompetieren das extrazelluläre Calcium und Lanthan um dieselbe Bindestelle. Außerdem zeigten sie, dass drei Glutamate E543,

E595 und E598 zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne für die Aktivierung unter Lanthan verantwortlich sind. E543 befindet sich hinter dem Ende der fünften und E595 bzw. E598 befinden sich nahe dem Anfang der sechsten Transmembrandomäne. In einem Homotetramer bildet sich dadurch ein Ring aus zwölf negativ geladenen Glutamaten (s. Abb. 4.15). Jung et al. (2003) vermuten, dass dieser negativ-geladene Ring den extrazellulären Eintritt von Kationen kontrolliert, da die Entfernung der negativen Ladungen zu einer partiellen Inhibition des Lanthan- bzw. Calciumeinstroms bewirkt.

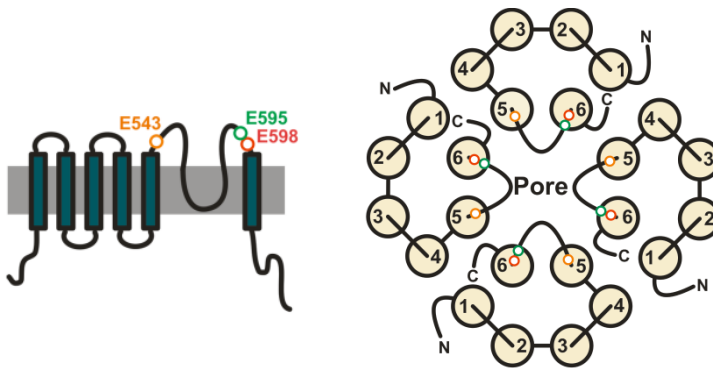


Abb. 4.15: Die Lokalisation von E543, E595 und E598 im TRPC5

Links ist schematisch der TRPC5 abgebildet mit der porenbildenden Region zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne und den Lanthan- bzw. Calcium-Bindestellen E543, E595 und E598. Rechts sind vier TRPC5-Kanaluntereinheiten zu sehen, die ein Homotetramer bilden. Die porenbildenden Regionen jeder TRPC5-Kanaluntereinheit ragen in das innere Lumen hinein und bilden gemeinsam die Porenwand. Wie zu erkennen ist, befinden sich die Aminosäuren E543 (orange), E595 (grün) und E598 (rot) am äußeren Rand der Porenöffnung und bilden einen Ring aus zwölf negativ geladenen Glutamaten. Quellen: linke Abb. modifiziert nach Jung et al. (2003), rechte Abb. modifiziert nach http://www.uni-leipzig.de/~pharma/main/research/schaefer/TRP_multimerisation.html, abgerufen am 09.01.2014

In der Ganzzell-Konfiguration waren bei der TRPC5-Porenmutante E543Q unter 100

μM LaCl_3 sowohl der TRPC5-Einwärts- als auch der -Auswärtsstrom reduziert (Jung et al. 2003). Die Doppelmutationen E595Q-E598Q führten nur zu einer Inhibition des Einwärtsstromes. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der von uns generierten E598D-Porenmutante ein nahezu vollständiger Block sowohl im Einwärts- als auch im Auswärtsstrom unter ebenfalls $100 \mu\text{M}$ LaCl_3 (s. Abb.4.16).

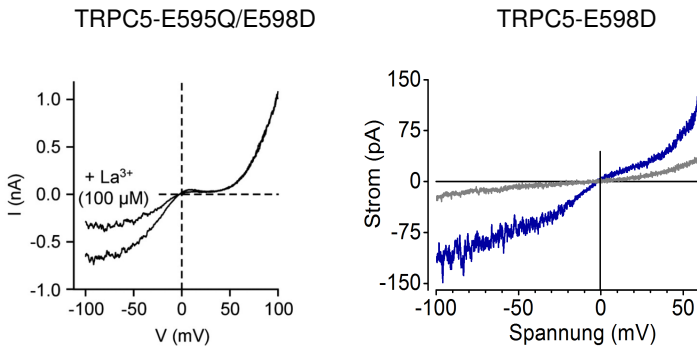


Abb. 4.16: Vergleich der Hemmung durch LaCl_3 von E595Q/E598Q und E598D

Links ist eine typische Ganzzelleableitung mit mTRPC5-E595Q-E598Q von Jung et al. (2003) zu sehen. Die untere Stromspannungskennlinie zeigt den Zustand unter Rezeptoraktivierung. Die obere Stromspannungskennlinie unter der Applikation von $100 \mu\text{M}$ LaCl_3 zeigt einen um 50% kleineren Einwärtsstrom. Der Auswärtsstrom bleibt unverändert. Rechts ist eine Ganzzelleableitung mit mTRPC5-E598D der vorliegenden Arbeit abgebildet. Die blaue Stromspannungskennlinie entstand unter Rezeptoraktivierung und die graue Stromspannungskennlinie unter Applikation von $100 \mu\text{M}$ LaCl_3 . Im Gegensatz zu der E595Q-E598Q-Porenmutante nimmt sowohl der Einwärts- als auch Auswärtsstrom um mehr als 70% ab und es ist keine typische TRPC5-Stromspannungskennlinie erkennbar.

Sowohl in der Arbeit von Jung et al. (2003) als auch in dieser Arbeit wurden $100 \mu\text{M}$ LaCl_3 sowie HEK293-Zellen als Überexpressionssystem verwendet. Lediglich verwendeten Jung et al. (2003) nicht einen muskarinischen Rezeptor sondern einen Histaminrezeptor. Exemplarische Messungen mit dem gleichen Histaminrezeptor und

der E598D-Porenmutante zeigten das gleiche Verhalten wie mit dem muskarinischen Rezeptor, so dass die Wahl des $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptors unkritisch ist. Dieser erstaunliche Unterschied verdeutlicht, dass der Wegfall von negativen Ladungen eine geringere Auswirkung hat als die sterische Ausrichtung der negativen Ladung. Zu beachten ist jedoch, dass in der vorliegenden Arbeit nur E598 verändert wurde und nicht E595 wie in der Arbeit von Jung et al. (2003). Möglicherweise beeinflusst die nahe gelegene Aminosäure E595 durch seine Ladung auch die Ausrichtung von E598. Es ist wahrscheinlich, dass das negativ geladene Aspartat des Aminosäureaustausches E598D das nahe gelegene negativ geladene Glutamat-595 weniger abstößt als das Glutamat-598. Durch die veränderte Ausrichtung der funktionellen Gruppen beider Aminosäuren könnten sich die Bindungseigenschaften für Lanthan bzw. Calcium ändern und somit die Permeation beeinflussen. Vermutlich findet bei dem Aminosäureaustausch E598D die Lanthanbindung tiefer in der Kanalpore statt, wodurch ein fast vollständiger Permeationsblock generiert wird. Aus den vorliegenden Ergebnissen geht auch eindeutig hervor, dass nicht das Aspartat-543 kritisch für die Aktivierbarkeit durch Lanthan ist, wie Jung et al. (2003) behaupten. Vielmehr scheint Aspartat-598 diese kritische Rolle einzunehmen. Um jedoch weitere konkrete Aussagen treffen zu können, sind weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen notwendig, bei denen die Offenwahrscheinlichkeit und Einzelkanalleitfähigkeit aller drei TRPC5-Porenmutanten E543D, E595D und E598D detailliert verglichen werden.

10. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird eine Bindung von Spektrin an den TRPC5 vermutet in Analogie zur bereits nachgewiesenen Bindung an den TRPC4-Kanal (Odell et al. 2008; Miede et al. 2010). Um die Interaktion von TRPC5 sowie den TRPC5-Mutanten S752A und S752D mit Spektrin zu zeigen, könnte eine Koimmunpräzipitation durchgeführt werden.

Ebenso fehlt noch der Nachweis der postulierten Konformationsänderung unter PIP_2 -Depletion. Dazu könnte die Methode des intramolekularen dynamischen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) eingesetzt werden. Bei Markierung sowohl des Endes als auch des Anfangs des C-Terminus von TRPC5 mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen sollte durch den PIP_2 -Abbau eine Veränderung des FRET-

Signals beobachtet werden, da eine Annäherung der beiden Fluorochrome auf weniger als 10 nm eine Zunahme und eine Entfernung der beiden Fluorochrome eine Abnahme des FRET-Signals verursachen. Eine Änderung des FRET-Signals wäre ein Hinweis auf eine Veränderung der Ausrichtung des C-Terminus und damit auf eine Konformationsänderung.

Außerdem könnte mittels der Methode des intermolekularen FRET, mit dem Proteininteraktionen analysiert werden können, gezeigt werden, dass NHERF1 nicht mehr an den C-Terminus der Mutante TRPC5-T972A binden kann. Dazu müsste NHERF1 N-terminal und die Mutante TRPC5-T972A C-terminal mit einem Fluorochrom markiert sein. Eine PIP₂-Depletion sollte keine Abnahme des FRET-Signals bewirken, da von vorne herein keine Proteininteraktion stattfindet und eine weitere räumliche Entfernung von ungebundenem NHERF1 und TRPC5-T972A nicht mehr detektierbar sein sollte.

Weiterhin ungeklärt ist auch, warum die S752A-T972A-Mutante bei NHERF1-E68A-Kooexpression DAG-aktivierbar war. Wie im Kap. V. 1. erläutert wurde, könnte das Expressionssystem und die Interaktion mit anderen Proteinen eine Rolle spielen. Daher wäre es interessant, ob die S752A-T972A-Mutante auch in anderen Überexpressionssystemen wie z.B. in Cos-7- oder in HeLa-Zellen bei Koexpression mit NHERF1-E68A DAG-aktivierbar ist. Eine fehlende DAG-Sensitivität in anderen Zellsystemen wäre ein eindeutiger Hinweis auf eine Interaktion von NHERF1-E68A mit endogenen Proteinen der HEK293T-Zellen, die zur DAG-Aktivierbarkeit führen könnte. In diesem Falle sollten zusätzliche Patch-Clamp-Messungen mit der NHERF1-E68A-Patientenmutante und weiteren TRPC5-Mutanten in anderen Expressionssystemen durchgeführt werden.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Aktivierungsmodell des TRPC5-Kanals. Interessant wäre es, ob das Modell auch auf den nahverwandten TRPC4-Kanal übertragbar ist. Dazu müssten entsprechende homologe Mutationen in den TRPC4 eingeführt und anschließend elektrophysiologisch untersucht werden.

Im Organismus kommt der TRPC5-Kanal häufig als Heterotetramer zusammen mit TRPC1 und/oder TRPC4 vor. Die Ergebnisse der Untersuchung von homotetrameren TRPC5-Kanälen können nicht ohne weiteres auf heterotetramere Kanäle übertragen werden. Daher sollten weitere Patch-Clamp-Messungen mit heterotetrameren

TRPC4/TRPC5- und TRPC1/TRPC5-Kanälen durchgeführt werden, um zu zeigen, ob auch die heterotetrameren TRPC1/4/5-Kanäle bei Rezeptorüberexpression, PKC-Inhibition und PIP₂-Depletion DAG-aktivierbar sind.

In der zweiten Calmodulinbindestelle von TRPC5 liegt eine weitere PKC-Phosphorylierungsstelle, S833, die bisher noch nicht untersucht wurde. Da die Entfernung der zweiten Calmodulinbindestelle zu einer verlangsamten Kanalaktivierung führt (Ordaz et al. 2005), könnte die Calmodulinbindestelle möglicherweise auch die DAG-Aktivierbarkeit beeinflussen. Daher sollten weitere Patch-Clamp-Messungen mit den Mutanten mTRPC5 S833A bzw. S833D/E bei Rezeptorüberexpression, PKC-Inhibition und PIP₂-Depletion durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte vermutlich aufgrund einer mangelnden Oberflächenexpression in der Zellmembran kein funktionsfähiger TRPC5-S666A-Kanal gemessen werden. Die Zelloberflächen-Biotinylierung wäre eine geeignete Methode, um die mangelnde Bindung des TRPC5-S666A an die Zelloberfläche nachzuweisen.

Zudem konnte die mTRPC5-E598D-Mutante nicht durch LaCl₃ aktiviert werden. Dies könnte an einer Verringerung der Kanaloffenwahrscheinlichkeit liegen, ähnlich wie bei der gut beschriebenen E543Q-Mutante (Jung et al. 2003). Um dies abzuklären, sind Patch-Clamp-Messungen mit den TRPC5-Mutanten E543D, E595D und E595D-E598D nötig, bei denen Einzelkanalleitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeiten bestimmt werden sollten. Möglicherweise sind die Strominhibition durch LaCl₃ sowie die Einzelkanalleitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeiten unterschiedlich ausgeprägt bei den TRPC5-Mutanten. Die Ergebnisse könnten nicht nur zeigen, wie TRPC5-Kanäle durch LaCl₃ aktiviert werden, sondern sie könnten auch Aufschluss geben über den Mechanismus der Strominhibition durch LaCl₃ bei den TRPC-Kanälen 3, 6 und 7.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Aktivierungsmechanismus des TRPC5-Kationenkanals elektrophysiologisch untersucht. Der TRPC5-Kanal wird Phospholipase C (PLC)-abhängig in Folge einer Aktivierung von $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten Rezeptoren aktiviert. Der genaue Aktivierungsmechanismus ist jedoch noch unbekannt, da TRPC4 und TRPC5 im Gegensatz zu TRPC3, TRPC6 und TRPC7 nicht durch das PLC-Produkt Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden. Ein auffallendes Charakteristikum der TRPC4-TRPC5-Unterfamilie ist die Spektrinbindestelle mit der Proteinkinase C (PKC)-Phosphorylierungsstelle Serin-752 und die PDZ-Bindungsdomäne, an die NHERF1 bindet und die die PKC-Phosphorylierungsstelle Threonin-972 beinhaltet. Deshalb wurden nicht-phosphorylierbare und phosphomimetische Aminosäureaustausche an diesen beiden Positionen systematisch analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass der TRPC5-Kanal entgegen bisherigen Beobachtungen durch DAG aktiviert wird, wenn eine der folgenden Voraussetzungen erfüllt ist:

- Das Serin-752 liegt phosphoryliert und das Threonin-972 liegt dephosphoryliert vor.
- Eine Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2)-Depletion findet statt.

Vermutlich ist eine Ablösung des NHERF1-Brückenproteins vom C-Terminus des TRPC5 eine notwendige Voraussetzung für die DAG-Aktivierbarkeit des TRPC5-Kanals.

Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse und der untersuchten Literatur wurde folgendes, hypothetisches Aktivierungsmodell für den TRPC5 erstellt: Der C-Terminus des TRPC5 bindet über das phosphorylierte Serin-752 an Spektrin, welches mit dem Aktinzytoskelett und dem membranständigen PIP_2 in Verbindung steht. Zusätzlich bindet das phosphorylierte Threonin-972 an das NHERF1-Brückenprotein, das über Ezrin ebenfalls an das Aktinzytoskelett gebunden ist. In diesem TRPC5-Kanalproteinkomplex mit Spektrin, PIP_2 , Aktinzytoskelett, Ezrin und NHERF1 ist der Kanal nicht DAG-sensitiv. Die Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors aktiviert die PLC, die daraufhin PIP_2 in DAG und Inositoltrisphosphat spaltet. Der

Zusammenfassung

PIP₂-Abbau führt zum Verlust der Spektrinbindung an den TRPC5 und bewirkt damit eine Konformationsänderung des C-Terminus, die zu einer Ablösung von NHERF1 führt. Der TRPC5-Kanal ist in diesem Zustand DAG-aktivierbar.

VI. SUMMARY

In the present study we investigated the mechanisms underlying the TRPC5 activation. The TRPC5 cation channel is activated by $G_{q/11}$ -coupled receptors in a phospholipase C (PLC)-dependent manner. The exact mechanism, however, is still unknown as TRPC4 and TRPC5 are not activated by the PLC product Diacylglycerol (DAG) contrary to TRPC3, TRPC6 and TRPC7. There are two outstanding features of TRPC4 and TRPC5: The first one is the Spectrin binding site including the protein kinase C (PKC) phosphorylation site serine-752. The second one is the PDZ-domain, which contains the PKC phosphorylation site threonine-972 and is furthermore able to bind NHERF1. Therefore we systematically investigated phospho-mimetic and phospho-deficient mutants of these PKC phosphorylation sites. Quite contrary to previous observations TRPC5 reacts DAG sensitively in case of one of the following conditions:

- Serine-752 is phosphorylated and threonine-972 dephosphorylated.
- The depletion of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate takes place.

The ablation of NHERF1 from the C-terminus of TRPC5 probably counts for another necessary condition that must be met for the DAG-sensitivity of TRPC5.

The present results and the studied literature allow the drawing up of a hypothetical model of TRPC5 activation: The C-terminus of TRPC5 binds spectrin via the phosphorylated serine-752. Spectrin itself is linked to the actincytoskeleton and the membrane-resident PIP_2 . Additionally threonine-972 binds to NHERF1, which is connected to ezrin and the actincytoskeleton. This channel complex containing TRPC5, spectrin, PIP_2 , actincytoskeleton, ezrin and NHERF1 prevents DAG-sensitivity of TRPC5. The activation of a G-protein coupled receptor stimulates the PLC which dissociates PIP_2 into DAG and inositol trisphosphate. The PIP_2 -depletion leads to the dislocation of spectrin from the TRPC5 and therefore to a conformational change in the C-terminus. This conformational change causes the ablation from NHERF1. The TRPC5 channel is now DAG-sensitiv.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, Marvin E.; Anderson, Kendra N E; Froehner, Stanley C. (2010): The alpha-syntrophin PH and PDZ domains scaffold acetylcholine receptors, utrophin, and neuronal nitric oxide synthase at the neuromuscular junction. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (33), S. 11004–11010. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1930-10.2010.
- Alessi, D. R.; Caudwell, F. B.; Andjelkovic, M.; Hemmings, B. A.; Cohen, P. (1996): Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. In: *FEBS letters* 399 (3), S. 333–338.
- Amatya, Parmeshwar Narayan; Kim, Hong-Beum; Park, Seon-Joo; Youn, Cha-Kyung; Hyun, Jin-Won; Chang, In-Youb et al. (2012): A role of DNA-dependent protein kinase for the activation of AMP-activated protein kinase in response to glucose deprivation. In: *Biochimica et biophysica acta* 1823 (12), S. 2099–2108. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.022.
- Ammendola, A.; Geiselhöringer, A.; Hofmann, F.; Schlossmann, J. (2001): Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase Ibeta. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (26), S. 24153–24159. DOI: 10.1074/jbc.M101530200.
- Anggono, Victor; Huganir, Richard L. (2012): Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. In: *Curr. Opin. Neurobiol.* 22 (3), S. 461–469. DOI: 10.1016/j.conb.2011.12.006.
- Ardura, Juan A.; Friedman, Peter A. (2011): Regulation of G protein-coupled receptor function by Na⁺/H⁺ exchange regulatory factors. In: *Pharmacol. Rev.* 63 (4), S. 882–900. DOI: 10.1124/pr.110.004176.
- Audo, Isabelle; Kohl, Susanne; Leroy, Bart P.; Munier, Francis L.; Guillonneau, Xavier; Mohand-Saïd, Saddek et al. (2009): TRPM1 is mutated in patients with autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. In: *Am. J. Hum. Genet.* 85 (5), S. 720–729. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.10.013.
- Bading, H.; Ginty, D. D.; Greenberg, M. E. (1993): Regulation of gene expression in

hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. In: *Science* 260 (5105), S. 181–186.

Bai, Chang-Xi; Giamarchi, Aurélie; Rodat-Despoix, Lise; Padilla, Françoise; Downs, Tamyra; Tsiokas, Leonidas; Delmas, Patrick (2008): Formation of a new receptor-operated channel by heteromeric assembly of TRPP2 and TRPC1 subunits. In: *EMBO Rep.* 9 (5), S. 472–479. DOI: 10.1038/embor.2008.29.

Bañuelos, S.; Saraste, M.; Djinović Carugo, K. (1998): Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding. In: *Structure (London, England : 1993)* 6 (11), S. 1419–1431.

Bates-Withers, Chris; Sah, Rajan; Clapham, David E. (2011): TRPM7, the Mg(2+) inhibited channel and kinase. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 704, S. 173–183. DOI: 10.1007/978-94-007-0265-3_9.

Bautista, Diana M.; Jordt, Sven-Eric; Nikai, Tetsuro; Tsuruda, Pamela R.; Read, Andrew J.; Poblete, Jeannie et al. (2006): TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. In: *Cell* 124 (6), S. 1269–1282. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.023.

Bautista, Diana M.; Pellegrino, Maurizio; Tsunozaki, Makoto (2013): TRPA1: A gatekeeper for inflammation. In: *Annu. Rev. Physiol.* 75, S. 181–200. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183811.

Bautista, Diana M.; Siemens, Jan; Glazer, Joshua M.; Tsuruda, Pamela R.; Basbaum, Allan I.; Stucky, Cheryl L. et al. (2007): The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. In: *Nature* 448 (7150), S. 204–208. DOI: 10.1038/nature05910.

Bellone, Rebecca R.; Forsyth, George; Leeb, Tosso; Archer, Sheila; Sigurdsson, Snaevær; Imsland, Freyja et al. (2010): Fine-mapping and mutation analysis of TRPM1: a candidate gene for leopard complex (LP) spotting and congenital stationary night blindness in horses. In: *Brief Funct Genomics* 9 (3), S. 193–207. DOI: 10.1093/bfpg/elq002.

Benham, Christopher D.; Gunthorpe, Martin J.; Davis, John B. (2003): TRPV channels as temperature sensors. In: *Cell Calcium* 33 (5-6), S. 479–487.

- Bennett, Thomas M.; Mackay, Donna S.; Siegfried, Carla J.; Shiels, Alan (2014): Mutation of the Melastatin-Related Cation Channel, TRPM3, Underlies Inherited Cataract and Glaucoma. In: *PLoS ONE* 9 (8), S. e104000. DOI: 10.1371/journal.pone.0104000.
- Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D. (2000): The versatility and universality of calcium signalling. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (1), S. 11–21. DOI: 10.1038/35036035.
- Bertuccio, Claudia A.; Caplan, Michael J. (2013): Polycystin-1C terminus cleavage and its relation with polycystin-2, two proteins involved in polycystic kidney disease. In: *Medicina (B Aires)* 73 (2), S. 155–162.
- Bezzerides, Vassilios J.; Ramsey, I. Scott; Kotecha, Suhas; Greka, Anna; Clapham, David E. (2004): Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. In: *Nat. Cell Biol.* 6 (8), S. 709–720. DOI: 10.1038/ncb1150.
- Blair, Nathaniel T.; Kaczmarek, J. Stefan; Clapham, David E. (2009): Intracellular calcium strongly potentiates agonist-activated TRPC5 channels. In: *J. Gen. Physiol.* 133 (5), S. 525–546. DOI: 10.1085/jgp.200810153.
- Blaustein, M. P.; Lederer, W. J. (1999): Sodium/calcium exchange: its physiological implications. In: *Physiol. Rev.* 79 (3), S. 763–854.
- Boulay, G. (2002): Ca(2+)-calmodulin regulates receptor-operated Ca(2+) entry activity of TRPC6 in HEK-293 cells. In: *Cell Calcium* 32 (4), S. 201–207.
- Boulay, G.; Zhu, X.; Peyton, M.; Jiang, M.; Hurst, R.; Stefani, E.; Birnbaumer, L. (1997): Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. In: *J. Biol. Chem.* 272 (47), S. 29672–29680.
- Bousquet, Simon M.; Monet, Michaël; Boulay, Guylain (2010): Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. In: *J. Biol. Chem.* 285 (52), S. 40534–40543. DOI: 10.1074/jbc.M110.160051.
- Braman, J.; Papworth, C.; Greener, A. (1996): Site-directed mutagenesis using

double-stranded plasmid DNA templates. In: *Methods Mol. Biol.* 57, S. 31–44. DOI: 10.1385/0-89603-332-5:31.

Brierley, Stuart M.; Castro, Joel; Harrington, Andrea M.; Hughes, Patrick A.; Page, Amanda J.; Rychkov, Grigori Y.; Blackshaw, L. Ashley (2011): TRPA1 contributes to specific mechanically activated currents and sensory neuron mechanical hypersensitivity. In: *J. Physiol. (Lond.)* 589 (Pt 14), S. 3575–3593. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.206789.

Brixel, Lili R.; Monteilh-Zoller, Mahealani K.; Ingenbrandt, Claudia S.; Fleig, Andrea; Penner, Reinhold; Enklaar, Thorsten et al. (2010): TRPM5 regulates glucose-stimulated insulin secretion. In: *Pflugers Arch.* 460 (1), S. 69–76. DOI: 10.1007/s00424-010-0835-z.

Brough, G. H.; Wu, S.; Cioffi, D.; Moore, T. M.; Li, M.; Dean, N.; Stevens, T. (2001): Contribution of endogenously expressed Trp1 to a Ca²⁺-selective, store-operated Ca²⁺ entry pathway. In: *FASEB J.* 15 (10), S. 1727–1738.

Brzeska, Hanna; Pridham, Kevin; Chery, Godefroy; Titus, Margaret A.; Korn, Edward D. (2014): The association of myosin IB with actin waves in dictyostelium requires both the plasma membrane-binding site and actin-binding region in the myosin tail. In: *PLoS ONE* 9 (4), S. e94306. DOI: 10.1371/journal.pone.0094306.

Bublitz, Maik; Morth, J. Preben; Nissen, Poul (2011): P-type ATPases at a glance. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 15), S. 2515–2519. DOI: 10.1242/jcs.088716.

Büscher, Anja K.; Kranz, Birgitta; Büscher, Rainer; Hildebrandt, Friedhelm; Dworniczak, Bernd; Pennekamp, Petra et al. (2010): Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome. In: *Clin J Am Soc Nephrol* 5 (11), S. 2075–2084. DOI: 10.2215/CJN.01190210.

Butterwick, Joel A.; MacKinnon, Roderick (2010): Solution structure and phospholipid interactions of the isolated voltage-sensor domain from KvAP. In: *Journal of molecular biology* 403 (4), S. 591–606. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.09.012.

Cao, Erhu; Liao, Maofu; Cheng, Yifan; Julius, David (2013): TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. In: *Nature* 504 (7478), S. 113–118. DOI: 10.1038/nature12823.

Carrigan, Patricia E.; Ballar, Petek; Tuzmen, Sukru (2011): Site-directed mutagenesis. In: *Methods Mol. Biol.* 700, S. 107–124. DOI: 10.1007/978-1-61737-954-3_8.

Caterina, M. J.; Rosen, T. A.; Tominaga, M.; Brake, A. J.; Julius, D. (1999): A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. In: *Nature* 398 (6726), S. 436–441. DOI: 10.1038/18906.

Chan, Weng-Tat; Verma, Chandra S.; Lane, David P.; Gan, Samuel Ken-En (2013): A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. In: *Biosci. Rep.* 33 (6). DOI: 10.1042/BSR20130098.

Cheng, Henrique; Beck, Andreas; Launay, Pierre; Gross, Stefan A.; Stokes, Alexander J.; Kinet, Jean-Pierre et al. (2007): TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells. In: *Cell Calcium* 41 (1), S. 51–61. DOI: 10.1016/j.ceca.2006.04.032.

Cheng, Hong; Li, Jianquan; Fazlieva, Ruzaliya; Dai, Zhongping; Bu, Zimei; Roder, Heinrich (2009): Autoinhibitory interactions between the PDZ2 and C-terminal domains in the scaffolding protein NHERF1. In: *Structure (London, England : 1993)* 17 (5), S. 660–669. DOI: 10.1016/j.str.2009.03.009.

Chetkovich, Dane M.; Chen, Lu; Stocker, Timothy J.; Nicoll, Roger A.; Brecht, David S. (2002): Phosphorylation of the postsynaptic density-95 (PSD-95)/discs large/zona occludens-1 binding site of stargazin regulates binding to PSD-95 and synaptic targeting of AMPA receptors. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (14), S. 5791–5796.

Chiluiza, David; Krishna, Sneha; Schumacher, Valérie A.; Schlöndorff, Johannes (2013): Gain-of-function mutations in transient receptor potential C6 (TRPC6) activate extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2). In: *J. Biol. Chem.* 288 (25), S. 18407–18420. DOI: 10.1074/jbc.M113.463059.

Cho, K. O.; Hunt, C. A.; Kennedy, M. B. (1992): The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. In: *Neuron* 9 (5), S. 929–942.

Christopherson, K. S.; Hillier, B. J.; Lim, W. A.; Brecht, D. S. (1999): PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (39), S. 27467–27473.

Chubakov, Vladimir; Gudermann, Thomas (2014): Trpm6. In: *Handb Exp Pharmacol* 222, S. 503–520. DOI: 10.1007/978-3-642-54215-2_20.

Chung, Man-Kyo; Güler, Ali D.; Caterina, Michael J. (2008): TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. In: *Nature neuroscience* 11 (5), S. 555–564. DOI: 10.1038/nn.2102.

Clapham, D. E. (1995): Intracellular calcium. Replenishing the stores. In: *Nature* 375 (6533), S. 634–635. DOI: 10.1038/375634a0.

Clapham, D. E.; Runnels, L. W.; Strübing, C. (2001): The TRP ion channel family. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (6), S. 387–396. DOI: 10.1038/35077544.

Cohen, C. M.; Tyler, J. M.; Branton, D. (1980): Spectrin-actin associations studied by electron microscopy of shadowed preparations. In: *Cell* 21 (3), S. 875–883.

Cohen, P. (1994): The discovery of protein phosphatases: from chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease. In: *Bioessays* 16 (8), S. 583–588. DOI: 10.1002/bies.950160812.

Colburn, Raymond W.; Lubin, Mary Lou; Stone, Dennis J.; Wang, Yan; Lawrence, Danielle; D'Andrea, Michael R. et al. (2007): Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. In: *Neuron* 54 (3), S. 379–386. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.04.017.

Cooley, Nicola; Grubb, David R.; Luo, Jieting; Woodcock, Elizabeth A. (2014): The phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate-binding sequence of transient receptor potential channel canonical 4a is critical for its contribution to cardiomyocyte hypertrophy. In: *Mol. Pharmacol.* 86 (4), S. 399–405. DOI: 10.1124/mol.114.093690.

Cormack, B. P.; Valdivia, R. H.; Falkow, S. (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). In: *Gene* 173 (1 Spec No), S. 33–38.

Cosens, D. J.; Manning, A. (1969): Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. In: *Nature* 224 (5216), S. 285–287.

Courbebaisse, Marie; Leroy, Christine; Bakouh, Naziha; Salaün, Christine; Beck, Laurent; Grandchamp, Bernard et al. (2012): A new human NHERF1 mutation decreases renal phosphate transporter NPT2a expression by a PTH-independent mechanism. In: *PLoS ONE* 7 (4), S. e34764. DOI: 10.1371/journal.pone.0034764.

De Matteis, M. A.; Morrow, J. S. (2000): Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic

pathway. In: *Journal of cell science* 113 (Pt 13), S. 2331–2343.

Dhaka, Ajay; Murray, Amber N.; Mathur, Jayanti; Earley, Taryn J.; Petrus, Matt J.; Patapoutian, Ardem (2007): TRPM8 is required for cold sensation in mice. In: *Neuron* 54 (3), S. 371–378. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.02.024.

Dietrich, Alexander; Kalwa, Hermann; Rost, Benjamin R.; Gudermann, Thomas (2005): The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. In: *Pflugers Arch.* 451 (1), S. 72–80. DOI: 10.1007/s00424-005-1460-0.

Dietrich, Alexander; Kalwa, Hermann; Storch, Ursula; Mederos y Schnitzler, Michael; Salanova, Birgit; Pinkenburg, Olaf et al. (2007): Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. In: *Pflugers Arch.* 455 (3), S. 465–477. DOI: 10.1007/s00424-007-0314-3.

DiPolo, Reinaldo; Beaugé, Luis (2006): Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. In: *Physiological reviews* 86 (1), S. 155–203. DOI: 10.1152/physrev.00018.2005.

Duncan, L. M.; Deeds, J.; Hunter, J.; Shao, J.; Holmgren, L. M.; Woolf, E. A. et al. (1998): Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. In: *Cancer Res.* 58 (7), S. 1515–1520.

Eder, Petra; Groschner, Klaus (2008): TRPC3/6/7: Topical aspects of biophysics and pathophysiology. In: *Channels (Austin)* 2 (2), S. 94–99.

Eisfeld, J.; Lückhoff, A. (2007): TRPM2. In: *Handb Exp Pharmacol* (179), S. 237–252. DOI: 10.1007/978-3-540-34891-7_14.

Faas, Guido C.; Mody, Istvan (2012): Measuring the kinetics of calcium binding proteins with flash photolysis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1820 (8), S. 1195–1204. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.09.012.

Fahrner, Marc; Derler, Isabella; Jardin, Isaac; Romanin, Christoph (2013): The STIM1/Orai signaling machinery. In: *Channels (Austin)* 7 (5), S. 330–343. DOI: 10.4161/chan.26742.

Fan, Hong; Shen, Ya-Xing; Yuan, Yun-Feng (2014): Expression and prognostic roles of TRPV5 and TRPV6 in non-small cell lung cancer after curative resection. In: *Asian*

Pac. J. Cancer Prev. 15 (6), S. 2559–2563.

Ferby, I. M.; Waga, I.; Hoshino, M.; Kume, K.; Shimizu, T. (1996): Wortmannin inhibits mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor through a mechanism independent of p85/p110-type phosphatidylinositol 3-kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (20), S. 11684–11688.

Fleig, Andrea; Penner, Reinhold (2004): Emerging roles of TRPM channels. In: *Novartis Found. Symp.* 258, S. 248-58; discussion 258-66.

Flemming, Philippa K.; Dedman, Alexandra M.; Xu, Shang-Zhong; Li, Jing; Zeng, Fanning; Naylor, Jacqueline et al. (2006): Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. In: *J. Biol. Chem.* 281 (8), S. 4977–4982. DOI: 10.1074/jbc.M510301200.

Frachel, M.; Suh, S. H.; Pfeifer, A.; Schweig, U.; Trost, C.; Weissgerber, P. et al. (2001): Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. In: *Nat. Cell Biol.* 3 (2), S. 121–127. DOI: 10.1038/35055019.

Frachel, Marc; Philipp, Stephan; Cavalié, Adolfo; Flockerzi, Veit (2004): TRPC4 and TRPC4-deficient mice. In: *Novartis Found. Symp.* 258, S. 189-99; discussion 199-203, 263-6.

Frühwald, Julia; Camacho Londoño, Julia; Dembla, Sandeep; Mannebach, Stefanie; Lis, Annette; Drews, Anna et al. (2012): Alternative splicing of a protein domain indispensable for function of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) ion channels. In: *J. Biol. Chem.* 287 (44), S. 36663–36672. DOI: 10.1074/jbc.M112.396663.

Fuchs, Beate; Rupp, Markus; Ghofrani, Hossein A.; Schermuly, Ralph T.; Seeger, Werner; Grimminger, Friedrich et al. (2011): Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. In: *Respir. Res.* 12, S. 20. DOI: 10.1186/1465-9921-12-20.

Gabrowski, Gabriele: Zielgerichtete Mutagenese (I). Geht's noch? In: *Laborjournal* 2005 (12/2005), S. 60–61. Online verfügbar unter <http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v62.lasso>, zuletzt geprüft am 29.10.2014 um 10.00 Uhr.

Gabrowski, Gabriele: Zielgerichtete Mutagenese (II). Polymerase als Lückenfüller. In: *Laborjournal* 2006 (7/2006). Online verfügbar unter

<http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v68.lasso>, zuletzt geprüft am 29.10.2014 um 10.00 Uhr.

Gao, Guofeng; Wang, Weiwei; Tadagavadi, Raghu K.; Briley, Nicole E.; Love, Michael I.; Miller, Barbara A.; Reeves, W. Brian (2014): TRPM2 mediates ischemic kidney injury and oxidant stress through RAC1. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (11), S. 4989–5001. DOI: 10.1172/JCI76042.

García-Añoveros, J.; Nagata, K. (2007): TRPA1. In: *Handb Exp Pharmacol* (179), S. 347–362. DOI: 10.1007/978-3-540-34891-7_21.

Gigante, Maddalena; Caridi, Gianluca; Montemurno, Eustacchio; Soccio, Mario; d'Apolito, Maria; Cerullo, Giuseppina et al. (2011): TRPC6 mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome and atypical phenotype. In: *Clin J Am Soc Nephrol* 6 (7), S. 1626–1634. DOI: 10.2215/CJN.07830910.

Glantz, Susan B.; Cianci, Carol D.; Iyer, Rathna; Pradhan, Deepti; Wang, Kevin K W; Morrow, Jon S. (2007): Sequential degradation of alphaII and betaII spectrin by calpain in glutamate or maitotoxin-stimulated cells. In: *Biochemistry* 46 (2), S. 502–513. DOI: 10.1021/bi061504y.

Grant, Andrew D.; Cottrell, Graeme S.; Amadesi, Silvia; Trevisani, Marcello; Nicoletti, Paola; Materazzi, Serena et al. (2007): Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. In: *J. Physiol. (Lond.)* 578 (Pt 3), S. 715–733. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.121111.

Greagg, M. A.; Fogg, M. J.; Panayotou, G.; Evans, S. J.; Connolly, B. A.; Pearl, L. H. (1999): A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-strand uracil. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (16), S. 9045–9050.

Greka, Anna; Navarro, Betsy; Oancea, Elena; Duggan, Anne; Clapham, David E. (2003): TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. In: *Nat. Neurosci.* 6 (8), S. 837–845. DOI: 10.1038/nn1092.

Grimm, Christian; Barthmes, Maria; Wahl-Schott, Christian (2014): TRPML3. In: *Handb Exp Pharmacol* 222, S. 659–674. DOI: 10.1007/978-3-642-54215-2_26.

- Grisanti, Laurel A.; Kurada, Lalitha; Cilz, Nicholas I.; Porter, James E.; Lei, Saobo (2012): Phospholipase C not protein kinase C is required for the activation of TRPC5 channels by cholecystokinin. In: *Eur. J. Pharmacol.* 689 (1-3), S. 17–24. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.05.032.
- Grizel, A. V.; Glukhov, G. S.; Sokolova, O. S. (2014): Mechanisms of activation of voltage-gated potassium channels. In: *Acta naturae* 6 (4), S. 10–26.
- Gudermann, Thomas; Mederos y Schnitzler, Michael (2010): Phototransduction: keep an eye out for acid-labile TRPs. In: *Current biology : CB* 20 (4), S. R149-52. DOI: 10.1016/j.cub.2010.01.013.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *J. Mol. Biol.* 166 (4), S. 557–580.
- Hardie, R. C.; Minke, B. (1992): The *trp* gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. In: *Neuron* 8 (4), S. 643–651.
- Harris, A. S.; Croall, D. E.; Morrow, J. S. (1988): The calmodulin-binding site in alpha-fodrin is near the calcium-dependent protease-I cleavage site. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (30), S. 15754–15761.
- Harteneck, Christian (2005): Function and pharmacology of TRPM cation channels. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 371 (4), S. 307–314. DOI: 10.1007/s00210-005-1034-x.
- He, Zhuohao; Jia, Caixia; Feng, Shengjie; Zhou, Kechun; Tai, Yilin; Bai, Xue; Wang, Yizheng (2012): TRPC5 channel is the mediator of neurotrophin-3 in regulating dendritic growth via CaMKII α in rat hippocampal neurons. In: *J. Neurosci.* 32 (27), S. 9383–9395. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6363-11.2012.
- Heeringa, Saskia F.; Möller, Clemens C.; Du, Jianyang; Yue, Lixia; Hinkes, Bernward; Chernin, Gil et al. (2009): A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. In: *PLoS ONE* 4 (11), S. e7771. DOI: 10.1371/journal.pone.0007771.
- Heginbotham, Lise; Kutluay, Esin (2004): Revisiting voltage-dependent relief of block in ion channels: a mechanism independent of punchthrough. In: *Biophys. J.* 86 (6), S. 3663–3670. DOI: 10.1529/biophysj.103.039412.
- Heilmann, C.; Spamer, C.; Gerok, W. (1985): Reaction mechanism of the calcium-

transport ATPase in endoplasmic reticulum of rat liver. Demonstration of different reactive forms of the phosphorylated intermediate. In: *J. Biol. Chem.* 260 (2), S. 788–794.

Hofmann, Franz; Flockerzi, Veit; Kahl, Sabine; Wegener, Jörg W. (2014): L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. In: *Physiol. Rev.* 94 (1), S. 303–326. DOI: 10.1152/physrev.00016.2013.

Hofmann, T.; Obukhov, A. G.; Schaefer, M.; Harteneck, C.; Gudermann, T.; Schultz, G. (1999): Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. In: *Nature* 397 (6716), S. 259–263. DOI: 10.1038/16711.

Hofmann, Thomas; Schaefer, Michael; Schultz, Günter; Gudermann, Thomas (2002): Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (11), S. 7461–7466. DOI: 10.1073/pnas.102596199.

Hofstra, Julia M.; Lainez, Sergio; van Kuijk, Willie H M; Schoots, Jeroen; Baltissen, Marijke P A; Hoefsloot, Lies H. et al. (2013): New TRPC6 gain-of-function mutation in a non-consanguineous Dutch family with late-onset focal segmental glomerulosclerosis. In: *Nephrol. Dial. Transplant.* 28 (7), S. 1830–1838. DOI: 10.1093/ndt/gfs572.

Hong, Chansik; Kim, Jinsung; Jeon, Jae-Pyo; Wie, Jinhong; Kwak, Misun; Ha, Kotdaji et al. (2012): Gs cascade regulates canonical transient receptor potential 5 (TRPC5) through cAMP mediated intracellular Ca²⁺ release and ion channel trafficking. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421 (1), S. 105–111. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.123.

Houy, Sébastien; Croisé, Pauline; Gubar, Olga; Chasserot-Golaz, Sylvette; Tryoen-Tóth, Petra; Bailly, Yannick et al. (2013): Exocytosis and Endocytosis in Neuroendocrine Cells: Inseparable Membranes! In: *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, S. 135. DOI: 10.3389/fendo.2013.00135.

Hung, Albert Y.; Sheng, Morgan (2002): PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (8), S. 5699–5702. DOI: 10.1074/jbc.R100065200.

Imura, Kinichi; Yoshioka, Takeshi; Hikita, Ichiro; Tsukahara, Kiyoshi; Hirasawa,

Tsutomu; Higashino, Kenichi et al. (2007): Influence of TRPV3 mutation on hair growth cycle in mice. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363 (3), S. 479–483. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.08.170.

Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Kitani-Yasuda, T.; Tsukita, S. (1993): The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. In: *J. Cell Biol.* 121 (3), S. 491–502.

Jaquemar, D.; Schenker, T.; Trueb, B. (1999): An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. In: *J. Biol. Chem.* 274 (11), S. 7325–7333.

Jeon, Jae-Pyo; Hong, Chansik; Park, Eun Jung; Jeon, Ju-Hong; Cho, Nam-Hyuk; Kim, In-Gyu et al. (2012): Selective G α i subunits as novel direct activators of transient receptor potential canonical (TRPC)4 and TRPC5 channels. In: *J. Biol. Chem.* 287 (21), S. 17029–17039. DOI: 10.1074/jbc.M111.326553.

Jeon, Jae-Pyo; Roh, Seung-Eon; Wie, Jinhong; Kim, Jinsung; Kim, Hana; Lee, Kyu-Pil et al. (2013): Activation of TRPC4 β by G α i subunit increases Ca $^{2+}$ selectivity and controls neurite morphogenesis in cultured hippocampal neuron. In: *Cell calcium* 54 (4), S. 307–319. DOI: 10.1016/j.ceca.2013.07.006.

Jiang, Lin-Hua; Yang, Wei; Zou, Jie; Beech, David J. (2010): TRPM2 channel properties, functions and therapeutic potentials. In: *Expert Opin. Ther. Targets* 14 (9), S. 973–988. DOI: 10.1517/14728222.2010.510135.

Jiang, Yu; Huang, Haixia; Liu, Ping; Wei, Hua; Zhao, Haiyan; Feng, Ying et al. (2014a): Expression and localization of TRPC proteins in rat ventricular myocytes at various developmental stages. In: *Cell Tissue Res.* 355 (1), S. 201–212. DOI: 10.1007/s00441-013-1733-4.

Jiang, Yuanyuan; Wang, Shuo; Holcomb, Joshua; Trescott, Laura; Guan, Xiaoqing; Hou, Yuning et al. (2014b): Crystallographic analysis of NHERF1-PLC β 3 interaction provides structural basis for CXCR2 signaling in pancreatic cancer. In: *Biochemical and biophysical research communications* 446 (2), S. 638–643. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.03.028.

Jordt, S. E.; Tominaga, M.; Julius, D. (2000): Acid potentiation of the capsaicin

- receptor determined by a key extracellular site. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (14), S. 8134–8139. DOI: 10.1073/pnas.100129497.
- Jung, Silke; Mühle, Anja; Schaefer, Michael; Strotmann, Rainer; Schultz, Gunter; Plant, Tim D. (2003): Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. In: *J. Biol. Chem.* 278 (6), S. 3562–3571. DOI: 10.1074/jbc.M211484200.
- Jung, Silke; Strotmann, Rainer; Schultz, Günter; Plant, Tim D. (2002): TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. In: *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 282 (2), S. C347-59. DOI: 10.1152/ajpcell.00283.2001.
- Jungnickel, M. K.; Marrero, H.; Birnbaumer, L.; Lémos, J. R.; Florman, H. M. (2001): Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. In: *Nat. Cell Biol.* 3 (5), S. 499–502. DOI: 10.1038/35074570.
- Kendall, J. M.; Badminton, M. N.; Sala-Newby, G. B.; Campbell, A. K.; Rembold, C. M. (1996): Recombinant apoaequorin acting as a pseudo-luciferase reports micromolar changes in the endoplasmic reticulum free Ca²⁺ of intact cells. In: *The Biochemical journal* 318 (Pt 2), S. 383–387.
- Kendall, J. M.; Dormer, R. L.; Campbell, A. K. (1992): Targeting aequorin to the endoplasmic reticulum of living cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 189 (2), S. 1008–1016.
- Kim, Jinsung; Kwak, Misun; Jeon, Jae-Pyo; Myeong, Jongyun; Wie, Jinhong; Hong, Chansik et al. (2014): Isoform- and receptor-specific channel property of canonical transient receptor potential (TRPC)1/4 channels. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 466 (3), S. 491–504. DOI: 10.1007/s00424-013-1332-y.
- Kim, Min Ji; Jeon, Jae-Pyo; Kim, Hyun Jin; Kim, Byung Joo; Lee, Young Mee; Choe, Han et al. (2008): Molecular determinant of sensing extracellular pH in classical transient receptor potential channel 5. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 (2), S. 239–245. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.10.154.
- Kinoshita-Kawada, Mariko; Tang, Jisen; Xiao, Rui; Kaneko, Shuji; Foskett, J. Kevin; Zhu, Michael X. (2005): Inhibition of TRPC5 channels by Ca²⁺-binding protein 1 in

Xenopus oocytes. In: *Pflugers Arch.* 450 (5), S. 345–354. DOI: 10.1007/s00424-005-1419-1.

Koike, Chieko; Obara, Takehisa; Uriu, Yoshitsugu; Numata, Tomohiro; Sanuki, Rikako; Miyata, Kentarou et al. (2010): TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (1), S. 332–337. DOI: 10.1073/pnas.0912730107.

Kristensen, Anders S.; Jenkins, Meagan A.; Banke, Tue G.; Schousboe, Arne; Makino, Yuichi; Johnson, Richard C. et al. (2011): Mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating. In: *Nat. Neurosci.* 14 (6), S. 727–735. DOI: 10.1038/nn.2804.

Kruse, Martin; Pongs, Olaf (2014): TRPM4 channels in the cardiovascular system. In: *Curr Opin Pharmacol* 15, S. 68–73. DOI: 10.1016/j.coph.2013.12.003.

Lange, Ingo; Yamamoto, Shinichiro; Partida-Sanchez, Santiago; Mori, Yasuo; Fleig, Andrea; Penner, Reinhold (2009): TRPM2 functions as a lysosomal Ca²⁺-release channel in beta cells. In: *Sci Signal* 2 (71), S. ra23. DOI: 10.1126/scisignal.2000278.

Lee, H. K.; Kameyama, K.; Haganir, R. L.; Bear, M. F. (1998): NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. In: *Neuron* 21 (5), S. 1151–1162.

Lee, Kyu Pil; Yuan, Joseph P.; So, Insuk; Worley, Paul F.; Muallem, Shmuel (2010): STIM1-dependent and STIM1-independent function of transient receptor potential canonical (TRPC) channels tunes their store-operated mode. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (49), S. 38666–38673. DOI: 10.1074/jbc.M110.155036.

Lee, Ning; Chen, Jian; Sun, Lucy; Wu, Shujian; Gray, Kevin R.; Rich, Adam et al. (2003): Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). In: *The Journal of biological chemistry* 278 (23), S. 20890–20897. DOI: 10.1074/jbc.M211232200.

Li, H. S.; Xu, X. Z.; Montell, C. (1999): Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. In: *Neuron* 24 (1), S. 261–273.

Li, Yan; Jia, Yi-Chang; Cui, Kai; Li, Ning; Zheng, Zai-Yu; Wang, Yi-Zheng; Yuan, Xiao-Bing (2005): Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth

- cones by brain-derived neurotrophic factor. In: *Nature* 434 (7035), S. 894–898. DOI: 10.1038/nature03477.
- Li, Yao; Baylie, Rachael L.; Tavares, Matthew J.; Brayden, Joseph E. (2014): TRPM4 channels couple purinergic receptor mechanoactivation and myogenic tone development in cerebral parenchymal arterioles. In: *J. Cereb. Blood Flow Metab.* DOI: 10.1038/jcbfm.2014.139.
- Liao, Maofu; Cao, Erhu; Julius, David; Cheng, Yifan (2013a): Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. In: *Nature* 504 (7478), S. 107–112. DOI: 10.1038/nature12822.
- Liao, Maofu; Cao, Erhu; Julius, David; Cheng, Yifan (2013b): Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. In: *Nature* 504 (7478), S. 107–112. DOI: 10.1038/nature12822.
- Liedtke, Wolfgang; Friedman, Jeffrey M. (2003): Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (23), S. 13698–13703. DOI: 10.1073/pnas.1735416100.
- Lievremont, Jean-Philippe; Numaga, Takuro; Vazquez, Guillermo; Lemonnier, Loïc; Hara, Yuji; Mori, Emiko et al. (2005): The role of canonical transient receptor potential 7 in B-cell receptor-activated channels. In: *J. Biol. Chem.* 280 (42), S. 35346–35351. DOI: 10.1074/jbc.M507606200.
- Lièvremon, Jean-Philippe; Bird, Gary St J; Putney, James W. (2004): Canonical transient receptor potential TRPC7 can function as both a receptor- and store-operated channel in HEK-293 cells. In: *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 287 (6), S. C1709-16. DOI: 10.1152/ajpcell.00350.2004.
- Liman, E. R. (2007): TRPM5 and taste transduction. In: *Handb Exp Pharmacol* (179), S. 287–298. DOI: 10.1007/978-3-540-34891-7_17.
- Liman, E. R.; Corey, D. P.; Dulac, C. (1999): TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10), S. 5791–5796.
- Lindner, Moritz; Leitner, Michael G.; Halaszovich, Christian R.; Hammond, Gerald R V; Oliver, Dominik (2011): Probing the regulation of TASK potassium channels by

PI4,5P₂ with switchable phosphoinositide phosphatases. In: *J. Physiol. (Lond.)* 589 (Pt 13), S. 3149–3162. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.208983.

Lintschinger, B.; Balzer-Geldsetzer, M.; Baskaran, T.; Graier, W. F.; Romanin, C.; Zhu, M. X.; Groschner, K. (2000): Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca²⁺-sensitive cation channels. In: *J. Biol. Chem.* 275 (36), S. 27799–27805. DOI: 10.1074/jbc.M002705200.

Liu, X.; Wang, W.; Singh, B. B.; Lockwich, T.; Jadlowiec, J.; O'Connell, B. et al. (2000): Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells. In: *J. Biol. Chem.* 275 (5), S. 3403–3411.

Liu, Xibao; Singh, Brij B.; Ambudkar, Indu S. (2003): TRPC1 is required for functional store-operated Ca²⁺ channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region. In: *J. Biol. Chem.* 278 (13), S. 11337–11343. DOI: 10.1074/jbc.M213271200.

Lo, Chun-Yin; Tjong, Yung-Wui; Ho, Jenny Chung-Yee; Siu, Chung-Wah; Cheung, Sin-Ying; Tang, Nelson L. et al. (2014): An upregulation in the expression of vanilloid transient potential channels 2 enhances hypotonicity-induced cytosolic Ca²⁺ rise in human induced pluripotent stem cell model of Hutchinson-Gillford Progeria. In: *PLoS one* 9 (1), S. e87273. DOI: 10.1371/journal.pone.0087273.

Ma, Hong-Tao; Peng, Ze; Hiragun, Takaaki; Iwaki, Shoko; Gilfillan, Alasdair M.; Beaven, Michael A. (2008): Canonical transient receptor potential 5 channel in conjunction with Orai1 and STIM1 allows Sr²⁺ entry, optimal influx of Ca²⁺, and degranulation in a rat mast cell line. In: *J. Immunol.* 180 (4), S. 2233–2239.

Ma, Xin; Cao, Jingyuan; Luo, Jianhong; Nilius, Bernd; Huang, Yu; Ambudkar, Indu S.; Yao, Xiaoqiang (2010): Depletion of intracellular Ca²⁺ stores stimulates the translocation of vanilloid transient receptor potential 4-c1 heteromeric channels to the plasma membrane. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (11), S. 2249–2255. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.212084.

Magalhaes, Ana C.; Dunn, Henry; Ferguson, Stephen S G (2012): Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. In: *British journal of pharmacology* 165 (6), S. 1717–1736. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x.

- Mahajan, Rahul; Ha, Junghoon; Zhang, Miao; Kawano, Takeharu; Kozasa, Tohru; Logothetis, Diomedes E. (2013): A computational model predicts that Gβγ acts at a cleft between channel subunits to activate GIRK1 channels. In: *Science signaling* 6 (288), S. ra69. DOI: 10.1126/scisignal.2004075.
- Mamonova, Tatyana; Kurnikova, Maria; Friedman, Peter A. (2012): Structural basis for NHERF1 PDZ domain binding. In: *Biochemistry* 51 (14), S. 3110–3120. DOI: 10.1021/bi201213w.
- Markus Semtner (2011): Elektrophysiologische Charakterisierung des klassischen TRP-Kanals TRPC5. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Marburg. Pharmakologisches Institut. Online verfügbar unter <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2011/0363/>, zuletzt geprüft am 27.08.2014; 18.05 Uhr.
- McDonald, L. J.; Murad, F. (1996): Nitric oxide and cyclic GMP signaling. In: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211 (1), S. 1–6.
- McHugh, Damian; Flemming, Richard; Xu, Shang-Zhong; Perraud, Anne-Laure; Beech, David J. (2003): Critical intracellular Ca²⁺ dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation. In: *J. Biol. Chem.* 278 (13), S. 11002–11006. DOI: 10.1074/jbc.M210810200.
- McKemy, David D.; Neuhausser, Werner M.; Julius, David (2002): Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. In: *Nature* 416 (6876), S. 52–58. DOI: 10.1038/nature719.
- Meldolesi, J.; Pozzan, T. (1998a): The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. In: *Trends Biochem. Sci.* 23 (1), S. 10–14.
- Meldolesi, J.; Pozzan, T. (1998b): The heterogeneity of ER Ca²⁺ stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function. In: *J. Cell Biol.* 142 (6), S. 1395–1398.
- Menco, B. P.; Carr, V. M.; Ezeh, P. I.; Liman, E. R.; Yankova, M. P. (2001): Ultrastructural localization of G-proteins and the channel protein TRP2 to microvilli of rat vomeronasal receptor cells. In: *The Journal of comparative neurology* 438 (4), S. 468–489.
- Mery, Laurence; Strauss, Bettina; Dufour, Jean F.; Krause, Karl H.; Hoth, Markus (2002): The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface

expression in HEK293 cells. In: *J. Cell. Sci.* 115 (Pt 17), S. 3497–3508.

Michikawa, T.; Miyawaki, A.; Furuichi, T.; Mikoshiba, K. (1996): Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and calcium signaling. In: *Crit Rev Neurobiol* 10 (1), S. 39–55.

Miehe, Susanne; Bieberstein, Andrea; Arnould, Isabelle; Ihdene, Orhia; Rütten, Hartmut; Strübing, Carsten (2010): The phospholipid-binding protein SESTD1 is a novel regulator of the transient receptor potential channels TRPC4 and TRPC5. In: *J. Biol. Chem.* 285 (16), S. 12426–12434. DOI: 10.1074/jbc.M109.068304.

Miledi, R. (1973): Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. In: *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 183 (1073), S. 421–425.

Minke, B.; Selinger, Z. (1992): The inositol-lipid pathway is necessary for light excitation in fly photoreceptors. In: *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 47, S. 201–217.

Minke, B.; Wu, C.; Pak, W. L. (1975): Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. In: *Nature* 258 (5530), S. 84–87.

Minke, Baruch; Cook, Boaz (2002): TRP channel proteins and signal transduction. In: *Physiol. Rev.* 82 (2), S. 429–472. DOI: 10.1152/physrev.00001.2002.

Mir, Sevgi; Yavascan, Onder; Berdeli, Afig; Sozeri, Betul (2012): TRPC6 gene variants in Turkish children with steroid-resistant nephrotic syndrome. In: *Nephrol. Dial. Transplant.* 27 (1), S. 205–209. DOI: 10.1093/ndt/gfr202.

Mironov, S. L. (2008): Metabotropic glutamate receptors activate dendritic calcium waves and TRPM channels which drive rhythmic respiratory patterns in mice. In: *J. Physiol. (Lond.)* 586 (9), S. 2277–2291. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.149021.

Misquitta, C. M.; Sing, A.; Grover, A. K. (1999): Control of sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump expression in cardiac and smooth muscle. In: *Biochem. J.* 338 (Pt 1), S. 167–173.

Mitrovic, Sandra; Nogueira, Cristina; Cantero-Recasens, Gerard; Kiefer, Kerstin; Fernández-Fernández, José M.; Popoff, Jean-François et al. (2013): TRPM5-mediated calcium uptake regulates mucin secretion from human colon goblet cells. In: *Elife (Cambridge)* 2, S. e00658. DOI: 10.7554/eLife.00658.

Mochizuki, T.; Wu, G.; Hayashi, T.; Xenophontos, S. L.; Veldhuisen, B.; Saris, J. J. et

- al. (1996): PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. In: *Science* 272 (5266), S. 1339–1342.
- Montell, C. (1997): New light on TRP and TRPL. In: *Molecular pharmacology* 52 (5), S. 755–763.
- Montell, C. (2001): Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. In: *Sci. STKE* 2001 (90), S. re1. DOI: 10.1126/stke.2001.90.re1.
- Montell, Craig (2005): The TRP superfamily of cation channels. In: *Sci. STKE* 2005 (272), S. re3. DOI: 10.1126/stke.2722005re3.
- Moqrich, Aziz; Hwang, Sun Wook; Earley, Taryn J.; Petrus, Matt J.; Murray, Amber N.; Spencer, Kathryn S R et al. (2005): Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. In: *Science* 307 (5714), S. 1468–1472. DOI: 10.1126/science.1108609.
- Mori, Masayuki X.; Itsuki, Kyohei; Hase, Hideharu; Sawamura, Seishiro; Kurokawa, Tatsuki; Mori, Yasuo; Inoue, Ryuji (2015): Dynamics of receptor-operated Ca(2+) currents through TRPC channels controlled via the PI(4,5)P2-PLC signaling pathway. In: *Frontiers in pharmacology* 6, S. 22. DOI: 10.3389/fphar.2015.00022.
- Munsch, Thomas; Freichel, Marc; Flockerzi, Veit; Pape, Hans-Christian (2003): Contribution of transient receptor potential channels to the control of GABA release from dendrites. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (26), S. 16065–16070. DOI: 10.1073/pnas.2535311100.
- Muraki, Katsuhiko; Iwata, Yuko; Katanosaka, Yuki; Ito, Tomohiro; Ohya, Susumu; Shigekawa, Munekazu; Imaizumi, Yuji (2003): TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. In: *Circ. Res.* 93 (9), S. 829–838. DOI: 10.1161/01.RES.0000097263.10220.0C.
- Nagata, Keiichi; Duggan, Anne; Kumar, Gagan; García-Añoveros, Jaime (2005): Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. In: *J. Neurosci.* 25 (16), S. 4052–4061. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0013-05.2005.
- Nakanishi, S.; Catt, K. J.; Balla, T. (1994): Inhibition of agonist-stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate production and calcium signaling by the myosin light chain kinase

inhibitor, wortmannin. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (9), S. 6528–6535.

Nilges, M.; Macias, M. J.; O'Donoghue, S. I.; Oschkinat, H. (1997): Automated NOESY interpretation with ambiguous distance restraints: the refined NMR solution structure of the pleckstrin homology domain from beta-spectrin. In: *Journal of molecular biology* 269 (3), S. 408–422. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1044.

Nilius, Bernd; Droogmans, Guy; Wondergem, Robert (2003): Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle? In: *Endothelium* 10 (1), S. 5–15.

Nita, Lulia I.; Hershfinkel, Michal; Sekler, Israel (2015): Life after the birth of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCLX. In: *Science China. Life sciences* 58 (1), S. 59–65. DOI: 10.1007/s11427-014-4789-9.

Oancea, Elena; Vriens, Joris; Brauchi, Sebastian; Jun, Janice; Splawski, Igor; Clapham, David E. (2009): TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes. In: *Sci Signal* 2 (70), S. ra21. DOI: 10.1126/scisignal.2000146.

Oberwinkler, J.; Phillipp, S. E. (2007): TRPM3. In: *Handb Exp Pharmacol* (179), S. 253–267.

Oberwinkler, Johannes; Lis, Annette; Giehl, Klaus M.; Flockerzi, Veit; Philipp, Stephan E. (2005): Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. In: *J. Biol. Chem.* 280 (23), S. 22540–22548. DOI: 10.1074/jbc.M503092200.

Obukhov, Alexander G.; Nowycky, Martha C. (2004): TRPC5 activation kinetics are modulated by the scaffolding protein ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein-50 (EBP50). In: *J. Cell. Physiol.* 201 (2), S. 227–235. DOI: 10.1002/jcp.20057.

Obukhov, Alexander G.; Nowycky, Martha C. (2005): A cytosolic residue mediates Mg²⁺ block and regulates inward current amplitude of a transient receptor potential channel. In: *J. Neurosci.* 25 (5), S. 1234–1239. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4451-04.2005.

Odell, Adam F.; Van Helden, Dirk F; Scott, Judith L. (2008): The spectrin cytoskeleton influences the surface expression and activation of human transient

receptor potential channel 4 channels. In: *J. Biol. Chem.* 283 (7), S. 4395–4407. DOI: 10.1074/jbc.M709729200.

Ohta, Toshio; Morishita, Masataka; Mori, Yasuo; Ito, Shigeo (2004): Ca²⁺ store-independent augmentation of [Ca²⁺]_i responses to G-protein coupled receptor activation in recombinantly TRPC5-expressed rat pheochromocytoma (PC12) cells. In: *Neuroscience letters* 358 (3), S. 161–164. DOI: 10.1016/j.neulet.2004.01.028.

Okada, T.; Inoue, R.; Yamazaki, K.; Maeda, A.; Kurosaki, T.; Yamakuni, T. et al. (1999): Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. In: *J. Biol. Chem.* 274 (39), S. 27359–27370.

Okada, T.; Shimizu, S.; Wakamori, M.; Maeda, A.; Kurosaki, T.; Takada, N. et al. (1998): Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain. In: *J. Biol. Chem.* 273 (17), S. 10279–10287.

Ordaz, Benito; Tang, Jisen; Xiao, Rui; Salgado, Alfonso; Sampieri, Alicia; Zhu, Michael X.; Vaca, Luis (2005): Calmodulin and calcium interplay in the modulation of TRPC5 channel activity. Identification of a novel C-terminal domain for calcium/calmodulin-mediated facilitation. In: *J. Biol. Chem.* 280 (35), S. 30788–30796. DOI: 10.1074/jbc.M504745200.

Osten, P.; Khatri, L.; Perez, J. L.; Köhr, G.; Giese, G.; Daly, C. et al. (2000): Mutagenesis reveals a role for ABP/GRIP binding to GluR2 in synaptic surface accumulation of the AMPA receptor. In: *Neuron* 27 (2), S. 313–325.

Ovey, Ishak Suat; Nazıroğlu, Mustafa (2014): Homocysteine and Cytosolic GSH Depletion Induce Apoptosis and Oxidative Toxicity Through Cytosolic Calcium Overload in Hippocampus of Aged Mice: Involvement of TRPM2 and TRPV1 Channels. In: *Neuroscience*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.078.

Owsianik, Grzegorz; Talavera, Karel; Voets, Thomas; Nilius, Bernd (2006): Permeation and selectivity of TRP channels. In: *Annu. Rev. Physiol.* 68, S. 685–717. DOI: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406.

Ozawa, Terutaka (2010): Modulation of ryanodine receptor Ca²⁺ channels (Review).

In: *Mol Med Rep* 3 (2), S. 199–204. DOI: 10.3892/mmr_00000240.

Panda, Satchidananda; Nayak, Surendra K.; Campo, Brice; Walker, John R.; Hogenesch, John B.; Jegla, Tim (2005): Illumination of the melanopsin signaling pathway. In: *Science* 307 (5709), S. 600–604. DOI: 10.1126/science.1105121.

Pape, Hans-Christian; Munsch, Thomas; Budde, Thomas (2004): Novel vistas of calcium-mediated signalling in the thalamus. In: *Pflugers Arch.* 448 (2), S. 131–138. DOI: 10.1007/s00424-003-1234-5.

Pascarella, Giovanni; Lazarevic, Dejan; Plessy, Charles; Bertin, Nicolas; Akalin, Altuna; Vlachouli, Christina et al. (2014): NanoCAGE analysis of the mouse olfactory epithelium identifies the expression of vomeronasal receptors and of proximal LINE elements. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 8, S. 41. DOI: 10.3389/fncel.2014.00041.

Patapoutian, Ardem; Peier, Andrea M.; Story, Gina M.; Viswanath, Veena (2003): ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (7), S. 529–539. DOI: 10.1038/nrn1141.

Patterson, Randen L.; van Rossum, Damian B; Nikolaidis, Nikolas; Gill, Donald L.; Snyder, Solomon H. (2005): Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. In: *Trends Biochem. Sci.* 30 (12), S. 688–697. DOI: 10.1016/j.tibs.2005.10.005.

Pedersen, Stine Falsig; Owsianik, Grzegorz; Nilius, Bernd (2005): TRP channels: an overview. In: *Cell Calcium* 38 (3-4), S. 233–252. DOI: 10.1016/j.ceca.2005.06.028.

Penniston, J. T.; Enyedi, A. (1998): Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump. In: *J. Membr. Biol.* 165 (2), S. 101–109.

Penniston, John T.; Padányi, Rita; Pászty, Katalin; Varga, Karolina; Hegedus, Luca; Enyedi, Agnes (2014): Apart from its known function, the plasma membrane Ca²⁺ ATPase can regulate Ca²⁺ signaling by controlling phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels. In: *J. Cell. Sci.* 127 (Pt 1), S. 72–84. DOI: 10.1242/jcs.132548.

Perez-Leighton, Claudio E.; Schmidt, Tiffany M.; Abramowitz, Joel; Birnbaumer, Lutz; Kofuji, Paulo (2011): Intrinsic phototransduction persists in melanopsin-expressing ganglion cells lacking diacylglycerol-sensitive TRPC subunits. In: *The*

- European journal of neuroscience* 33 (5), S. 856–867. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07583.x.
- Perraud, A. L.; Fleig, A.; Dunn, C. A.; Bagley, L. A.; Launay, P.; Schmitz, C. et al. (2001): ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. In: *Nature* 411 (6837), S. 595–599. DOI: 10.1038/35079100.
- Phelan, Kevin D.; Mock, Matthew M.; Kretz, Oliver; Shwe, U. Thaug; Kozhemyakin, Maxim; Greenfield, L. John et al. (2012): Heteromeric canonical transient receptor potential 1 and 4 channels play a critical role in epileptiform burst firing and seizure-induced neurodegeneration. In: *Mol. Pharmacol.* 81 (3), S. 384–392. DOI: 10.1124/mol.111.075341.
- Philipp, S.; Hambrecht, J.; Braslavski, L.; Schroth, G.; Freichel, M.; Murakami, M. et al. (1998): A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. In: *EMBO J.* 17 (15), S. 4274–4282. DOI: 10.1093/emboj/17.15.4274.
- Phillips, A. M.; Bull, A.; Kelly, L. E. (1992): Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. In: *Neuron* 8 (4), S. 631–642.
- Pippin, Jeffrey W.; Durvasula, Raghu; Petermann, Arndt; Hiromura, Keiju; Couser, William G.; Shankland, Stuart J. (2003): DNA damage is a novel response to sublytic complement C5b-9-induced injury in podocytes. In: *J. Clin. Invest.* 111 (6), S. 877–885. DOI: 10.1172/JCI15645.
- Powis, G.; Bonjouklian, R.; Berggren, M. M.; Gallegos, A.; Abraham, R.; Ashendel, C. et al. (1994): Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. In: *Cancer Res.* 54 (9), S. 2419–2423.
- Pozzan, T.; Rizzuto, R.; Volpe, P.; Meldolesi, J. (1994): Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. In: *Physiol. Rev.* 74 (3), S. 595–636.
- Prakriya, Murali (2013): Store-operated Orai channels: structure and function. In: *Curr Top Membr* 71, S. 1–32. DOI: 10.1016/B978-0-12-407870-3.00001-9.
- Putney, J. W.; Bird, G. S. (1993): The signal for capacitative calcium entry. In: *Cell* 75 (2), S. 199–201.
- Reading, S. A.; Earley, S.; Waldron, B. J.; Welsh, D. G.; Brayden, J. E. (2005):

TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288 (5), S. H2055-61. DOI: 10.1152/ajpheart.00861.2004.

Rees, S.; Coote, J.; Stables, J.; Goodson, S.; Harris, S.; Lee, M. G. (1996): Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. In: *BioTechniques* 20 (1), S. 102-4, 106, 108-10.

Ren, Haoming (2007): Untersuchung des Aktivierungsmechanismus von TRPC5. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg, Marburg. Insitut für Pharmakologie und Toxikologie.

Riccio, Antonio; Li, Yan; Moon, Jisook; Kim, Kwang-Soo; Smith, Kiersten S.; Rudolph, Uwe et al. (2009): Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. In: *Cell* 137 (4), S. 761–772. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.039.

Riccio, Antonio; Mattei, Cesar; Kelsell, Rosemary E.; Medhurst, Andrew D.; Calver, Andrew R.; Randall, Andrew D. et al. (2002): Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca²⁺ influx. In: *J. Biol. Chem.* 277 (14), S. 12302–12309. DOI: 10.1074/jbc.M112313200.

Robbins, Ashlee; Kurose, Masayuki; Winterson, Barbara J.; Meng, Ian D. (2012): Menthol activation of corneal cool cells induces TRPM8-mediated lacrimation but not nociceptive responses in rodents. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (11), S. 7034–7042. DOI: 10.1167/iovs.12-10025.

Romero, Guillermo; Zastrow, Mark von; Friedman, Peter A. (2011): Role of PDZ proteins in regulating trafficking, signaling, and function of GPCRs: means, motif, and opportunity. In: *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* 62, S. 279–314. DOI: 10.1016/B978-0-12-385952-5.00003-8.

Rychkov, Grigori Y.; Barritt, Gregory J. (2011): Expression and function of TRP channels in liver cells. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 704, S. 667–686. DOI: 10.1007/978-94-007-0265-3_35.

Sah, Rajan; Mesirca, Pietro; Mason, Xenos; Gibson, William; Bates-Withers, Christopher; Van den Boogert, Marjolein et al. (2013): Timing of myocardial trpm7 deletion during cardiogenesis variably disrupts adult ventricular function, conduction,

- and repolarization. In: *Circulation* 128 (2), S. 101–114. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000768.
- Saleh, Sohag N.; Albert, Anthony P.; Peppiatt-Wildman, C. M.; Large, William A. (2008): Diverse properties of store-operated TRPC channels activated by protein kinase C in vascular myocytes. In: *J. Physiol. (Lond.)* 586 (10), S. 2463–2476. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.152157.
- Samways, Damien S K; Li, Zhiyuan; Egan, Terrance M. (2014): Principles and properties of ion flow in P2X receptors. In: *Front Cell Neurosci* 8, S. 6. DOI: 10.3389/fncel.2014.00006.
- Santín, Sheila; Ars, Elisabet; Rossetti, Sandro; Salido, Eduardo; Silva, Irene; García-Maset, Rafael et al. (2009): TRPC6 mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis. In: *Nephrol. Dial. Transplant.* 24 (10), S. 3089–3096. DOI: 10.1093/ndt/gfp229.
- Santoni, Giorgio; Farfariello, Valerio; Amantini, Consuelo (2011): TRPV channels in tumor growth and progression. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 704, S. 947–967. DOI: 10.1007/978-94-007-0265-3_49.
- Sato, Tomomi; Mishina, Masayoshi (2003): Representational difference analysis, high-resolution physical mapping, and transcript identification of the zebrafish genomic region for a motor behavior. In: *Genomics* 82 (2), S. 218–229.
- Schaefer, M.; Plant, T. D.; Obukhov, A. G.; Hofmann, T.; Gudermann, T.; Schultz, G. (2000): Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. In: *J. Biol. Chem.* 275 (23), S. 17517–17526.
- Schaefer, Michael; Plant, Tim D.; Stresow, Nicole; Albrecht, Nadine; Schultz, Gunter (2002): Functional differences between TRPC4 splice variants. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (5), S. 3752–3759. DOI: 10.1074/jbc.M109850200.
- Schenker, T.; Trueb, B. (1998): Down-regulated proteins of mesenchymal tumor cells. In: *Exp. Cell Res.* 239 (1), S. 161–168. DOI: 10.1006/excr.1997.3896.
- Semtner, Marcus; Schaefer, Michael; Pinkenburg, Olaf; Plant, Tim D. (2007): Potentiation of TRPC5 by protons. In: *J. Biol. Chem.* 282 (46), S. 33868–33878. DOI: 10.1074/jbc.M702577200.

Shaw, Patrick J.; Qu, Bin; Hoth, Markus; Feske, Stefan (2013): Molecular regulation of CRAC channels and their role in lymphocyte function. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (15), S. 2637–2656. DOI: 10.1007/s00018-012-1175-2.

Shen, Yin; Rampino, Melissa Ann F; Carroll, Reed C.; Nawy, Scott (2012): G-protein-mediated inhibition of the Trp channel TRPM1 requires the G $\beta\gamma$ dimer. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (22), S. 8752–8757. DOI: 10.1073/pnas.1117433109.

Shenolikar, S.; Minkoff, C. M.; Steplock, D. A.; Evangelista, C.; Liu, M.; Weinman, E. J. (2001): N-terminal PDZ domain is required for NHERF dimerization. In: *FEBS letters* 489 (2-3), S. 233–236.

Shi, Juan; Mori, Emiko; Mori, Yasuo; Mori, Masayuki; Li, Jishuo; Ito, Yushi; Inoue, Ryuji (2004): Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. In: *J. Physiol. (Lond.)* 561 (Pt 2), S. 415–432. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.075051.

Shim, Sangwoo; Yuan, Joseph P.; Kim, Ju Young; Zeng, Weizhong; Huang, Guo; Milshteyn, Aleksandr et al. (2009): Peptidyl-prolyl isomerase FKBP52 controls chemotropic guidance of neuronal growth cones via regulation of TRPC1 channel opening. In: *Neuron* 64 (4), S. 471–483. DOI: 10.1016/j.neuron.2009.09.025.

Shimizu, Takahiro; Owsianik, Grzegorz; Freichel, Marc; Flockerzi, Veit; Nilius, Bernd; Vennekens, Rudi (2009): TRPM4 regulates migration of mast cells in mice. In: *Cell Calcium* 45 (3), S. 226–232. DOI: 10.1016/j.ceca.2008.10.005.

Sidi, Samuel; Friedrich, Rainer W.; Nicolson, Teresa (2003): NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. In: *Science* 301 (5629), S. 96–99. DOI: 10.1126/science.1084370.

Sinkins, W. G.; Estacion, M.; Schilling, W. P. (1998): Functional expression of TrpC1: a human homologue of the *Drosophila* Trp channel. In: *Biochem. J.* 331 (Pt 1), S. 331–339.

Sinkins, William G.; Goel, Monu; Estacion, Mark; Schilling, William P. (2004): Association of immunophilins with mammalian TRPC channels. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (33), S. 34521–34529. DOI: 10.1074/jbc.M401156200.

Songyang, Z.; Fanning, A. S.; Fu, C.; Xu, J.; Marfatia, S. M.; Chishti, A. H. et al. (1997): Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. In: *Science (New York, N.Y.)* 275 (5296), S. 73–77.

Spiczak, Sarah von; Muhle, Hiltrud; Helbig, Ingo; de Kovel, Carolien G F; Hampe, Jochen; Gaus, Verena et al. (2010): Association study of TRPC4 as a candidate gene for generalized epilepsy with photosensitivity. In: *Neuromolecular Med.* 12 (3), S. 292–299. DOI: 10.1007/s12017-010-8122-x.

Stamboulian, Séverine; Moutin, Marie-Jo; Treves, Susan; Pochon, Nathalie; Grunwald, Didier; Zorzato, Francesco et al. (2005): Junctional, an inositol 1,4,5-triphosphate receptor associated protein, is present in rodent sperm and binds TRPC2 and TRPC5 but not TRPC1 channels. In: *Developmental biology* 286 (1), S. 326–337. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.08.006.

Starowicz, Katarzyna; Nigam, Santosh; Di Marzo, Vincenzo (2007): Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. In: *Pharmacol. Ther.* 114 (1), S. 13–33. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.01.005.

Storch, Ursula; Forst, Anna-Lena; Philipp, Maximilian; Gudermann, Thomas; Mederos y Schnitzler, Michael (2012): Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. In: *J. Biol. Chem.* 287 (5), S. 3530–3540. DOI: 10.1074/jbc.M111.283218.

Story, Gina M.; Peier, Andrea M.; Reeve, Alison J.; Eid, Samer R.; Mosbacher, Johannes; Hricik, Todd R. et al. (2003): ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. In: *Cell* 112 (6), S. 819–829.

Stowers, Lisa; Holy, Timothy E.; Meister, Markus; Dulac, Catherine; Koentges, Georgy (2002): Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. In: *Science (New York, N.Y.)* 295 (5559), S. 1493–1500. DOI: 10.1126/science.1069259.

Striggow, F.; Ehrlich, B. E. (1996): The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor of cerebellum. Mn²⁺ permeability and regulation by cytosolic Mn²⁺. In: *J. Gen. Physiol.* 108 (2), S. 115–124.

Strotmann, Rainer; Schultz, Gunter; Plant, Tim D. (2003): Ca²⁺-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a C-terminal

calmodulin binding site. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (29), S. 26541–26549. DOI: 10.1074/jbc.M302590200.

Strübing, C.; Krapivinsky, G.; Krapivinsky, L.; Clapham, D. E. (2001): TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. In: *Neuron* 29 (3), S. 645–655.

Strübing, Carsten; Krapivinsky, Grigory; Krapivinsky, Luba; Clapham, David E. (2003): Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. In: *J. Biol. Chem.* 278 (40), S. 39014–39019. DOI: 10.1074/jbc.M306705200.

Sun, Yutong; McGarrigle, Deirdre; Huang, Xin-Yun (2007): When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. In: *Molecular bioSystems* 3 (12), S. 849–854. DOI: 10.1039/b706343a.

Sung, Tae Sik; Jeon, Jae Pyo; Kim, Byung Joo; Hong, Chansik; Kim, Sung Young; Kim, Jinsung et al. (2011): Molecular determinants of PKA-dependent inhibition of TRPC5 channel. In: *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 301 (4), S. C823–32. DOI: 10.1152/ajpcell.00351.2010.

Suss-Toby, E.; Selinger, Z.; Minke, B. (1991): Lanthanum reduces the excitation efficiency in fly photoreceptors. In: *J. Gen. Physiol.* 98 (4), S. 849–868.

Sutton, Keith A.; Jungnickel, Melissa K.; Wang, Yanli; Cullen, Kay; Lambert, Stephen; Florman, Harvey M. (2004): Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. In: *Dev. Biol.* 274 (2), S. 426–435. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.07.031.

Szallasi, Arpad; Cortright, Daniel N.; Blum, Charles A.; Eid, Samer R. (2007): The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. In: *Nat Rev Drug Discov* 6 (5), S. 357–372. DOI: 10.1038/nrd2280.

Tai, Chao; Hines, Dustin J.; Choi, Hyun B.; MacVicar, Brian A. (2011): Plasma membrane insertion of TRPC5 channels contributes to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. In: *Hippocampus* 21 (9), S. 958–967. DOI: 10.1002/hipo.20807.

Tang, Y.; Tang, J.; Chen, Z.; Trost, C.; Flockerzi, V.; Li, M. et al. (2000): Association

- of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. In: *J. Biol. Chem.* 275 (48), S. 37559–37564. DOI: 10.1074/jbc.M006635200.
- Terawaki, Shin-ichi; Maesaki, Ryoko; Hakoshima, Toshio (2006): Structural basis for NHERF recognition by ERM proteins. In: *Structure* 14 (4), S. 777–789. DOI: 10.1016/j.str.2006.01.015.
- Thiel, Gerald; Müller, Isabelle; Rössler, Oliver G. (2013): Signal transduction via TRPM3 channels in pancreatic β -cells. In: *J. Mol. Endocrinol.* 50 (3), S. R75-83. DOI: 10.1530/JME-12-0237.
- Thodeti, Charles K.; Matthews, Benjamin; Ravi, Arvind; Mammoto, Akiko; Ghosh, Kaustabh; Bracha, Abigail L.; Ingber, Donald E. (2009): TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin-to-integrin signaling. In: *Circ. Res.* 104 (9), S. 1123–1130. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.192930.
- Thompson, Sunnie R. (2012): Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. In: *Trends Microbiol.* 20 (11), S. 558–566. DOI: 10.1016/j.tim.2012.08.002.
- Tiruppathi, Chinnaswamy; Ahmmed, Gias U.; Vogel, Stephen M.; Malik, Asrar B. (2006): Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability. In: *Microcirculation* 13 (8), S. 693–708. DOI: 10.1080/10739680600930347.
- Tiruppathi, Chinnaswamy; Freichel, Marc; Vogel, Stephen M.; Paria, Biman C.; Mehta, Dolly; Flockerzi, Veit; Malik, Asrar B. (2002a): Impairment of store-operated Ca²⁺ entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. In: *Circ. Res.* 91 (1), S. 70–76.
- Tiruppathi, Chinnaswamy; Minshall, Richard D.; Paria, Biman C.; Vogel, Stephen M.; Malik, Asrar B. (2002b): Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. In: *Vascul. Pharmacol.* 39 (4-5), S. 173–185.
- Toyoda, Masao; Suzuki, Daisuke; Honma, Masashi; Uehara, Goro; Sakai, Takako; Umezono, Tomoya; Sakai, Hideto (2004): High expression of PKC-MAPK pathway mRNAs correlates with glomerular lesions in human diabetic nephropathy. In: *Kidney Int.* 66 (3), S. 1107–1114. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00798.x.

Trebak, Mohamed; Lemonnier, Loic; DeHaven, Wayne I.; Wedel, Barbara J.; Bird, Gary S.; Putney, James W. (2009): Complex functions of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in regulation of TRPC5 cation channels. In: *Pflugers Arch.* 457 (4), S. 757–769. DOI: 10.1007/s00424-008-0550-1.

Trost, C.; Bergs, C.; Himmerkus, N.; Flockerzi, V. (2001): The transient receptor potential, TRP4, cation channel is a novel member of the family of calmodulin binding proteins. In: *Biochem. J.* 355 (Pt 3), S. 663–670.

Tsiokas, Leonidas (2009): Function and regulation of TRPP2 at the plasma membrane. In: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 297 (1), S. F1-9. DOI: 10.1152/ajprenal.90277.2008.

Valiyaveetil, Francis I.; Sekedat, Matthew; MacKinnon, Roderick; Muir, Tom W. (2006): Structural and functional consequences of an amide-to-ester substitution in the selectivity filter of a potassium channel. In: *Journal of the American Chemical Society* 128 (35), S. 11591–11599. DOI: 10.1021/ja0631955.

van der Kant, Rik; Neeffjes, Jacques (2014): Small regulators, major consequences - Ca²⁺ and cholesterol at the endosome-ER interface. In: *Journal of cell science* 127 (Pt 5), S. 929–938. DOI: 10.1242/jcs.137539.

Van Der Stelt, Mario; Di Marzo, Vincenzo (2004): Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. In: *Eur. J. Biochem.* 271 (10), S. 1827–1834. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04081.x.

Vazquez, G.; Lievremont, J. P.; St J Bird, G; Putney, J. W. (2001): Human Trp3 forms both inositol trisphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B lymphocytes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (20), S. 11777–11782. DOI: 10.1073/pnas.201238198.

Vazquez, Guillermo; Wedel, Barbara J.; Trebak, Mohamed; St John Bird, Gary; Putney, James W. (2003): Expression level of the canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channel determines its mechanism of activation. In: *J. Biol. Chem.* 278 (24), S. 21649–21654. DOI: 10.1074/jbc.M302162200.

Venkatachalam, Kartik; Montell, Craig (2007a): TRP channels. In: *Annu. Rev. Biochem.* 76, S. 387–417. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.

- Venkatachalam, Kartik; Montell, Craig (2007b): TRP channels. In: *Annu. Rev. Biochem.* 76, S. 387–417. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- Venkatachalam, Kartik; Montell, Craig (2007c): TRP channels. In: *Annu. Rev. Biochem.* 76, S. 387–417. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- Venkatachalam, Kartik; Zheng, Fei; Gill, Donald L. (2003): Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. In: *J. Biol. Chem.* 278 (31), S. 29031–29040. DOI: 10.1074/jbc.M302751200.
- Vennekens, R.; Hoenderop, J. G.; Prenen, J.; Stuiver, M.; Willems, P. H.; Droogmans, G. et al. (2000): Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel. In: *J. Biol. Chem.* 275 (6), S. 3963–3969.
- Venugopal, Bhuvaramurthy; Browning, Marsha F.; Curcio-Morelli, Cyntia; Varro, Andrea; Michaud, Norman; Nanthakumar, Nanda et al. (2007): Neurologic, gastric, and ophthalmologic pathologies in a murine model of mucopolidosis type IV. In: *Am. J. Hum. Genet.* 81 (5), S. 1070–1083. DOI: 10.1086/521954.
- Voets, Thomas; Nilius, Bernd; Hoefs, Susan; van der Kemp, Annemiete W C M; Droogmans, Guy; Bindels, Rene J M; Hoenderop, Joost G J (2004): TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. In: *J. Biol. Chem.* 279 (1), S. 19–25. DOI: 10.1074/jbc.M311201200.
- Voets, Thomas; Talavera, Karel; Owsianik, Grzegorz; Nilius, Bernd (2005): Sensing with TRP channels. In: *Nat. Chem. Biol.* 1 (2), S. 85–92. DOI: 10.1038/nchembio0705-85.
- Vogt-Eisele, A. K.; Weber, K.; Sherkheli, M. A.; Vielhaber, G.; Panten, J.; Gisselmann, G.; Hatt, H. (2007): Monoterpenoid agonists of TRPV3. In: *Br. J. Pharmacol.* 151 (4), S. 530–540. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707245.
- Vriens, J.; Owsianik, G.; Fisslthaler, B.; Suzuki, M.; Janssens, A.; Voets, T. et al. (2005): Modulation of the Ca²⁺ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. In: *Circ. Res.* 97 (9), S. 908–915. DOI: 10.1161/01.RES.0000187474.47805.30.
- Vriens, Joris; Owsianik, Grzegorz; Hofmann, Thomas; Philipp, Stephan E.; Stab,

- Julia; Chen, Xiaodi et al. (2011): TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. In: *Neuron* 70 (3), S. 482–494. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.02.051.
- Wang, Xiaoxia; Pluznick, Jennifer L.; Wei, Peilin; Padanilam, Babu J.; Sansom, Steven C. (2004): TRPC4 forms store-operated Ca²⁺ channels in mouse mesangial cells. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 287 (2), S. C357-64. DOI: 10.1152/ajpcell.00068.2004.
- Wang, Yun; Lei, Yongzhong; Fang, Li; Mu, Yonggao; Wu, Jing; Zhang, Xuan (2013): Roles of phosphatase 2A in nociceptive signal processing. In: *Mol Pain* 9, S. 46. DOI: 10.1186/1744-8069-9-46.
- Weinman, Edward J.; Cunningham, Rochelle; Shenolikar, Shirish (2005a): NHERF and regulation of the renal sodium-hydrogen exchanger NHE3. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 450 (3), S. 137–144. DOI: 10.1007/s00424-005-1384-8.
- Weinman, Edward J.; Cunningham, Rochelle; Wade, James B.; Shenolikar, Shirish (2005b): The role of NHERF-1 in the regulation of renal proximal tubule sodium-hydrogen exchanger 3 and sodium-dependent phosphate cotransporter 2a. In: *J. Physiol. (Lond.)* 567 (Pt 1), S. 27–32. DOI: 10.1113/jphysiol.2005.086777.
- Weissgerber, Petra; Kriebes, Ulrich; Tsvilovskyy, Volodymyr; Olausson, Jenny; Kretz, Oliver; Stoerger, Christof et al. (2012): Excision of Trpv6 gene leads to severe defects in epididymal Ca²⁺ absorption and male fertility much like single D541A pore mutation. In: *J. Biol. Chem.* 287 (22), S. 17930–17941. DOI: 10.1074/jbc.M111.328286.
- Welsh, Donald G.; Morielli, Anthony D.; Nelson, Mark T.; Brayden, Joseph E. (2002): Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. In: *Circ. Res.* 90 (3), S. 248–250.
- Wera, S.; Hemmings, B. A. (1995): Serine/threonine protein phosphatases. In: *Biochem. J.* 311 (Pt 1), S. 17–29.
- Wes, P. D.; Chevesich, J.; Jeromin, A.; Rosenberg, C.; Stetten, G.; Montell, C. (1995): TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (21), S. 9652–9656.

- Widmayer, P.; Küper, M.; Kramer, M.; Königsrainer, A.; Breer, H. (2012): Altered expression of gustatory-signaling elements in gastric tissue of morbidly obese patients. In: *Int J Obes (Lond)* 36 (10), S. 1353–1359. DOI: 10.1038/ijo.2011.216.
- Winn, Michelle P.; Daskalakis, Nikki; Spurney, Robert F.; Middleton, John P. (2006): Unexpected role of TRPC6 channel in familial nephrotic syndrome: does it have clinical implications? In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 (2), S. 378–387. DOI: 10.1681/ASN.2005090962.
- Wissenbach, U.; Niemeyer, B. A. (2007): TRPV6. In: *Handb Exp Pharmacol* (179), S. 221–234. DOI: 10.1007/978-3-540-34891-7_13.
- Woodhull, A. M. (1973): Ionic blockage of sodium channels in nerve. In: *J. Gen. Physiol.* 61 (6), S. 687–708.
- Woods, D. F.; Bryant, P. J. (1991): The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. In: *Cell* 66 (3), S. 451–464.
- Xu, Shang-Zhong; Muraki, Katsuhiko; Zeng, Fanning; Li, Jing; Sukumar, Piruthivi; Shah, Samir et al. (2006): A sphingosine-1-phosphate-activated calcium channel controlling vascular smooth muscle cell motility. In: *Circ. Res.* 98 (11), S. 1381–1389. DOI: 10.1161/01.RES.0000225284.36490.a2.
- Xu, Z.; Kopf, G. S.; Schultz, R. M. (1994): Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ release in early and late events of mouse egg activation. In: *Development* 120 (7), S. 1851–1859.
- Yamada, H.; Wakamori, M.; Hara, Y.; Takahashi, Y.; Konishi, K.; Imoto, K.; Mori, Y. (2000): Spontaneous single-channel activity of neuronal TRP5 channel recombinantly expressed in HEK293 cells. In: *Neurosci. Lett.* 285 (2), S. 111–114.
- Yang, Hua; Mergler, Stefan; Sun, Xingcai; Wang, Zheng; Lu, Luo; Bonanno, Joseph A. et al. (2005): TRPC4 knockdown suppresses epidermal growth factor-induced store-operated channel activation and growth in human corneal epithelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (37), S. 32230–32237. DOI: 10.1074/jbc.M504553200.
- Yang, XiaoYong; Cheyette, Benjamin N R (2013): SEC14 and spectrin domains 1

(Sestd1) and Dapper antagonist of catenin 1 (Dact1) scaffold proteins cooperatively regulate the Van Gogh-like 2 (Vangl2) four-pass transmembrane protein and planar cell polarity (PCP) pathway during embryonic development in mice. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (28), S. 20111–20120. DOI: 10.1074/jbc.M113.465427.

Yang, XiaoYong; Fisher, Daniel A.; Cheyette, Benjamin Nr (2013a): SEC14 and Spectrin Domains 1 (Sestd1), Dishevelled 2 (Dvl2) and Dapper Antagonist of Catenin-1 (Dact1) co-regulate the Wnt/Planar Cell Polarity (PCP) pathway during mammalian development. In: *Communicative & integrative biology* 6 (6), S. e26834. DOI: 10.4161/cib.26834.

Yang, Yong Ryoul; Follo, Matilde Y.; Cocco, Lucio; Suh, Pann-Ghill (2013b): The physiological roles of primary phospholipase C. In: *Adv Biol Regul* 53 (3), S. 232–241. DOI: 10.1016/j.jbior.2013.08.003.

Yu, Ying; Fantozzi, Ivana; Remillard, Carmelle V.; Landsberg, Judd W.; Kunichika, Naomi; Platoshyn, Oleksandr et al. (2004): Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (38), S. 13861–13866. DOI: 10.1073/pnas.0405908101.

Yu, Ying; Sweeney, Michele; Zhang, Shen; Platoshyn, Oleksandr; Landsberg, Judd; Rothman, Abraham; Yuan, Jason X-J (2003): PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. In: *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 284 (2), S. C316-30. DOI: 10.1152/ajpcell.00125.2002.

Yuan, Joseph P.; Zeng, Weizhong; Huang, Guo N.; Worley, Paul F.; Muallem, Shmuel (2007): STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. In: *Nat. Cell Biol.* 9 (6), S. 636–645. DOI: 10.1038/ncb1590.

Zayats, Vasilina; Samad, Abdul; Minofar, Babak; Roelofs, Katherine E.; Stockner, Thomas; Ettrich, Rudiger (2013): Regulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by its N-terminal ankyrin repeat domain. In: *J Mol Model* 19 (11), S. 4689–4700. DOI: 10.1007/s00894-012-1505-1.

Zeng, Weizhong; Yuan, Joseph P.; Kim, Min Seuk; Choi, Young Jin; Huang, Guo N.; Worley, Paul F.; Muallem, Shmuel (2008): STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. In: *Molecular cell* 32 (3), S. 439–448. DOI:

10.1016/j.molcel.2008.09.020.

Zhang, L.; Saffen, D. (2001): Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. In: *J. Biol. Chem.* 276 (16), S. 13331–13339. DOI: 10.1074/jbc.M008914200.

Zhang, Peng; Yang, Chun; Delay, Rona J. (2010): Odors activate dual pathways, a TRPC2 and a AA-dependent pathway, in mouse vomeronasal neurons. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 298 (5), S. C1253-64. DOI: 10.1152/ajpcell.00271.2009.

Zhang, Rui; Zhang, ChenYu; Zhao, Qi; Li, DongHai (2013a): Spectrin: structure, function and disease. In: *Science China. Life sciences* 56 (12), S. 1076–1085. DOI: 10.1007/s11427-013-4575-0.

Zhang, Wei; Yan, Zhiqiang; Jan, Lily Yeh; Jan, Yuh Nung (2013b): Sound response mediated by the TRP channels NOMPC, NANCHUNG, and INACTIVE in chordotonal organs of *Drosophila* larvae. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (33), S. 13612–13617. DOI: 10.1073/pnas.1312477110.

Zhang, Zheng; Yu, Haijie; Huang, Junhao; Faouzi, Malika; Schmitz, Carsten; Penner, Reinhold; Fleig, Andrea (2014): The TRPM6 kinase domain determines the Mg-ATP sensitivity of TRPM7/M6 heteromeric ion channels. In: *J. Biol. Chem.* 289 (8), S. 5217–5227. DOI: 10.1074/jbc.M113.512285.

Zhu, Mei Hong; Chae, MeeRee; Kim, Hyun Jin; Lee, Young Mee; Kim, Min Ji; Jin, Nan Ge et al. (2005): Desensitization of canonical transient receptor potential channel 5 by protein kinase C. In: *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 289 (3), S. C591-600. DOI: 10.1152/ajpcell.00440.2004.

Zhu, Michael Xi (2005): Multiple roles of calmodulin and other Ca(2+)-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. In: *Pflugers Arch.* 451 (1), S. 105–115. DOI: 10.1007/s00424-005-1427-1.

Zhu, X.; Chu, P. B.; Peyton, M.; Birnbaumer, L. (1995): Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. In: *FEBS Lett.* 373 (3), S. 193–198.

Zhu, X.; Jiang, M.; Peyton, M.; Boulay, G.; Hurst, R.; Stefani, E.; Birnbaumer, L.

(1996): trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. In: *Cell* 85 (5), S. 661–671.

Zitt, C.; Zobel, A.; Obukhov, A. G.; Harteneck, C.; Kalkbrenner, F.; Lückhoff, A.; Schultz, G. (1996): Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion. In: *Neuron* 16 (6), S. 1189–1196.

VIII. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. vet. Hermann Ammer für die Ermöglichung der Promotion an der Tierärztlichen Fakultät und die stets große Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler und Frau Dr. Ursula Storch gilt mein Dank für die kompetente Betreuung meiner Arbeit, sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch bei der schriftlichen Zusammenfassung.

Meinen Labor-Kolleginnen Anna-Lena Forst, Serap Erdogmus, Julie Straub, Laura Danner und Joanna Zaisserec möchte ich ganz herzlich für die sehr gute Einarbeitung und Unterstützung danken, sowie für das stets sehr freundschaftliche und hilfsbereite Miteinander.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium und diese Doktorarbeit ermöglichten und mich immer liebevoll unterstützt haben. Besonderer Dank gilt an dieser Stelle auch meinem Mann Robert, der geduldig alle Höhen und Tiefen während der Doktorarbeit ertragen hat und mich immer wieder aufmunterte und motivierte und damit maßgeblich bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen hat.