

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Fachbereich Medizin

*Institutsvorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann*

**Die Bedeutung von Kationenkanälen und  
G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für die  
Mechanosensorik und -transduktion  
in Blutgefäßen und in Podozyten**

**Habilitationsschrift**

(kumulatives Verfahren)

vorgelegt von

**Dr. rer. nat. Ursula Storch**

(2017)

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>2</b>
1.1 Einführung in das Forschungsgebiet .....	3
<b>2 Zusammenfassung der Forschungsergebnisse .....</b>	<b>13</b>
2.1 Welche physiologische Bedeutung besitzen TRPC-Kationenkanäle? .....	13
2.2 Welche Rolle spielen TRPC-Kationenkanäle für die Mechanosensorik in Blutgefäßen? .....	18
2.3 Welche Bedeutung haben TRPC-Kationenkanäle für die Mechanosensorik in Podozyten? .....	22
<b>3 Ausblick .....</b>	<b>26</b>
<b>4 Literatur .....</b>	<b>27</b>
<b>5 Danksagung .....</b>	<b>43</b>
<b>6 Eigene Publikationen .....</b>	<b>44</b>
6.1 Originalarbeiten .....	44
6.2 Übersichtsartikel .....	46

# 1 Einleitung

Die vorliegende Habilitationsschrift ist eine Zusammenfassung meiner Forschungsergebnisse aus 15 Originalpublikationen, die den Schwerpunkt meiner Forschungsarbeit bilden. Das Ziel meines Habilitationsprojekts war die biophysikalische Untersuchung von rezeptorgesteuerten *transient receptor potential classical* (TRPC)-Kationenkanälen und die Identifizierung ihrer physiologischen Bedeutung. Insbesondere sollte die Rolle der TRPC-Kanäle für die Mechanosensorik und Mechanotransduktion im Gefäßsystem und in Podozyten untersucht werden. Hierzu sollten insbesondere folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welche physiologische Bedeutung besitzen TRPC-Kationenkanäle?
2. Welche Rolle spielen TRPC-Kationenkanäle für die Mechanosensorik in Blutgefäßen?
3. Welche Bedeutung haben TRPC-Kationenkanäle für die Mechanosensorik in Podozyten?

## 1.1 Einführung in das Forschungsgebiet

TRPC-Kationenkanäle gehören zur großen Kanalfamilie der TRP-Kationenkanäle, welche aufgrund von Aminosäuresequenzvergleichen in sieben Familien untergliedert werden. Bei den TRPC-Kanälen handelt es sich um nicht-selektive, rezeptorgesteuerte Kationenkanäle, die in Abhängigkeit von der Phospholipase C (PLC) durch  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Rohacs, 2013). Das „C“ steht für „classical“ oder „canonical“ und leitet sich von den an der Photorezeption in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beteiligten TRP-Kanälen her, die eine ausgeprägte Homologie zu TRPC-Kanälen aufweisen. Alle TRP-Kanäle sind als Tetramere aus vier Proteinuntereinheiten aufgebaut, was mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen dreier verwandter Kanäle aus der Vanilloid-Kanalfamilie, TRPV1 (Gao et al., 2016), TRPV2 (Huynh et al., 2016) und TRPV6 (Saotome et al., 2016), kürzlich bestätigt wurde. Darüber hinaus ist bekannt, dass TRPC-Kanäle sowohl als Homotetramere als auch als Heterotetramere vorkommen können. Die TRPC-Kanalfamilie besteht aus sieben Mitgliedern, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie in weitere Unterfamilien unterteilt werden: TRPC1, TRPC4/5 und TRPC3/6/7. TRPC2 besitzt hierbei eine Sonderrolle, da dieser Kanal beim Menschen aufgrund von mehreren Stopcodonen innerhalb des offenen Leserahmens nicht funktionell exprimiert wird und daher ein Pseudogen darstellt (Zhu et al., 1996; Vannier et al., 1999; Yildirim et al., 2003).

TRPC-Kanäle gelten allgemein als rezeptorgesteuerte Kanäle, allerdings ist dieser Signalweg noch nicht für alle TRPC-Kanäle im Detail aufgeklärt. Die Aktivierung von  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren führt zur Aktivierung der PLC, wodurch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) in die beiden Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat und 1,2-Diacyl-*sn*-glycerol (DAG) sowie in ein Oxonium (Gudermann und Mederos y Schnitzler, 2010; Huang et al., 2010) gespalten wird. Es besteht ein breiter Konsens darüber, dass die TRPC-Kanalunterfamilie TRPC3/6/7 durch DAG, das Spaltprodukt von  $PIP_2$ , aktivierbar ist (Hofmann et al., 1999). Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob DAG direkt am Kanal bindet oder ob es indirekt zur Kanalaktivierung beiträgt. Auch TRPC2 wurde bereits als DAG-sensitiv beschrieben (Lucas et al., 2003). Hingegen galten TRPC4- und TRPC5-Kanäle bislang als unempfindlich gegenüber DAG (Hofmann et al., 1999). Es zeigte sich sogar eine Inhibition von basalen TRPC5-Strömen durch DAG oder das membranpermeable DAG-Analogen 1-Oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (OAG) (Venkatachalam et al., 2003). Außerdem ist bekannt, dass die Proteinkinase C (PKC) an der TRPC5-Kanalinhibition durch DAG beteiligt ist (Venkatachalam et al., 2003) und dass TRPC4- und TRPC5-Kanäle durch Depletion von  $PIP_2$  aktiviert werden (Otsuguro et al., 2008; Trebak et al., 2009). Hier besteht ein Gegensatz zu TRPC6- und TRPC7-Kanälen, die durch  $PIP_2$ -Depletion inhibiert werden (Itsuki et al., 2014).

Schon früh gab es Hinweise, dass endogen exprimierte TRPC5-Kanäle ebenfalls DAG-sensitiv sein könnten (Lee et al., 2003). Allerdings fehlten bisher jegliche mechanistische Einsichten in die  $G_{q/11}$ -Protein-vermittelte TRPC4- und TRPC5-Kanalaktivierung. Ein auffälliger struktureller Unterschied zwischen TRPC4/5 und den gut charakterisierten DAG-sensitiven TRPC3/6/7-Kanälen ist das PDZ (*Post synaptic density-95/Drosophila Disc large/Zona occludentes-1* Protein)-Bindemotiv mit der Aminosäuresequenz „VTTRL“ am Ende des C-Terminus (Tang et al., 2000; Mery et al., 2002; Obukhov und Nowycky, 2004). Zudem ist bekannt, dass dieses C-terminale PDZ-Bindemotiv eine PKC-Phosphorylierungsstelle enthält, die für die Inaktivierung von TRPC5-Strömen nach Rezeptoraktivierung entscheidend ist (Zhu et al., 2005). Dieses PDZ-Bindemotiv ermöglicht Interaktionen mit den  $Na^+/H^+$  exchanger regulatory factor (NHERF)-Proteinen NHERF1 und NHERF2. Die Adapterproteine NHERF1 und NHERF2 sind strukturell nah verwandt, können Homo- und Heterodimere bilden (Shenolikar et al., 2001) und besitzen jeweils zwei PDZ-Bindedomänen sowie eine C-terminale Bindedomäne, über die

eine Verknüpfung an das Aktinzytoskelett über Interaktionen mit Vertretern der Ezrin-, Radixin- und Moesin-Proteinfamilie ermöglicht wird (Tang et al., 2000). Daher werden NHERF1 und NHERF2 hauptsächlich als Adapterproteine angesehen, die die Aufgabe haben, integrale Membranproteine mit dem Zytoskelett zu verknüpfen und die Lokalisation der Transmembranproteine an der Zellmembran zu erhöhen (Shenolikar und Weinman, 2001). Neben dieser Verankerungsfunktion sind NHERF-Proteine wichtig für die Aufrechterhaltung von essentiellen Zellfunktionen z.B. in Niere und Dünndarm wo sie mit Transportern, Ionenkanälen, Signalproteinen, Transkriptionsfaktoren, Enzymen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Tyrosinkinase-Rezeptoren interagieren (Hall et al., 1998a; Hall et al., 1998b; Hall et al., 1999; Maudsley et al., 2000; Weinman et al., 2006). Durch ihre Adapterfunktion regulieren sie zellspezifisch erstens den Phosphattransport in proximalen Tubuluszellen (Cunningham et al., 2010), zweitens die Aktivität des Glutamat-Transporters GLAST und des metabotropen Glutamatrezeptors mGlu5 in Astrozyten (Paquet et al., 2006; Ritter et al., 2011) und drittens den Ionentransport im Dünndarm (Ghishan und Kiela, 2012). Zudem beeinflussen NHERF-Proteine die Proliferation (Bhattacharya et al., 2012; Kruger et al., 2013) und sind möglicherweise an der Karzinogenese und Progression von Leberkrebs, Brustkrebs, Dickdarmkrebs, kleinzelligem Lungenkarzinom sowie Glioblastom beteiligt (Voltz et al., 2001; Georgescu et al., 2008; Lee et al., 2011; Mangia et al., 2015). Die subzelluläre NHERF1-Expression spielt hierbei vermutlich eine entscheidende Rolle. In Brustkrebszellen ist eine hohe zytoplasmatische Expression mit hoher Aggressivität und schlechter Prognose assoziiert und könnte daher als Marker für die Prognose der Krebserkrankung herangezogen werden (Saponaro et al., 2014). Eine aberrante nukleäre NHERF1-Expression hingegen könnte bei der Karzinogenese und Progression von Kolonkarzinomen eine Rolle spielen (Saponaro et al., 2014). Ferner ist die NHERF-Interaktion wichtig für die Funktion des Chloridkanals *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* „CFTR“ (Holcomb et al., 2015). Mutationen dieses Kanals führen zur autosomal-rezessiv vererbten Mukoviszidose (zystische Fibrose) (Guggino und Stanton, 2006) und zur kongenitalen Aplasie des *Vas deferens* „CAVD“ (Cuppens und Cassiman, 2004). Obwohl die Interaktionen von NHERF1 oder NHERF2 mit den C-Termini von TRPC4 und TRPC5 mittels Koimmunpräzipitationen mehrfach gezeigt und sogar funktionelle Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik durchgeführt wurden (Tang et al., 2000; Obukhov und Nowycky, 2004; Lee-Kwon et al., 2005), konnte lediglich die typische leichte Erhöhung der Zellmembranexpression, wie sie beim CFTR und anderen integralen Membranproteinen bereits beschrieben wurde, beobachtet werden. Im Rahmen dieses Habilitationsprojektes sollte daher genau untersucht werden, ob durch die NHERF-Verankerung spezielle Kanalfunktionen beeinflusst werden.

Für einige TRPC-Kanäle wurde neben der Agonisten-induzierten, rezeptorgesteuerten Kanalaktivierung ein speichergesteuerter Aktivierungsmechanismus postuliert. Dieser Aktivierungsmechanismus beruht auf der Beobachtung, dass eine Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher einen Calciumeinstrom in die Zelle auslösen kann. Der klassische speichergesteuerte, hoch selektive Calciumeinstrom wurde zuerst in Mastzellen charakterisiert und als „*calcium release-activated current*“ ( $I_{CRAC}$ ) bezeichnet (Hoth und Penner, 1992). Inzwischen ist bekannt, dass sogenannte Orai-Kanäle in der Zellmembran zusammen mit den calciumsensorischen transmembranären STIM 1-Proteinen im endoplasmatischen Retikulum die molekularen Korrelate für diesen speichergesteuerten Calciumeinstrom darstellen (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006; Zhang et al., 2006). Darüber hinaus wurden jedoch unselektive speichergesteuerte Ströme beobachtet, die durch TRPC-Kanäle vermittelt sein könnten (Parekh und Putney, 2005; Worley et al., 2007; Birnbaumer, 2009; Lee et al., 2010). Insbesondere wurde der TRPC1-Kanal als beteiligte Komponente am speichergesteuerten calciumselektiven Einstrom  $I_{CRAC}$  (Mori et al., 2002; Ong et al., 2013) sowie am speichergesteuerten unselektiven Einstrom (Zhu et al., 1996; Kiselyov et al., 1998; Singh et al., 2002; Liao et al., 2007; Cheng et al., 2008; Yuan et al., 2009) beschrieben. Für die Beteiligung von TRPC1 an diesen beiden speichergesteuerten Einstromen gibt es derzeit zwei

verschiedene Vorstellungsmodelle aus der Forschergruppe von Indu Ambudkar aus Bethesda. Das ältere Modell geht davon aus, dass präformierte homomere TRPC1-Kanäle in Vesikeln unterhalb der Zellmembran vorliegen. Durch die STIM 1-induzierten Orai-vermittelten hochselektiven Calcium-einströme, die die freie Calciumkonzentration unterhalb der Zellmembran kurzfristig stark lokal erhöhen, kommt es zur Translokation der Vesikel zur Zellmembran und zur Vesikelverschmelzung mit der Zellmembran, so dass die vesikulär vorliegenden präformierten TRPC1-Kanäle aus ihrer Warteposition befreit werden und in die Zellmembran inserieren. Dort bewirken sie den speichergesteuerten unselektiven Einstrom (Cheng et al., 2011). Das jüngere Modell beruht darauf, dass bestimmte TRPC1-Proteinisoformen stets in der Zellmembran vorliegen und als akzessorische Untereinheiten die Orai-Kanalkomplexe hinsichtlich ihrer Calciumselektivität beeinflussen. Je mehr diese bestimmten TRPC1-Proteinisoformen in der Zellmembran vorliegen, desto unselektiver ist der speichergesteuerte Einstrom an Calciumionen (Ong et al., 2013). Allerdings gibt es auch experimentell gut belegte Ergebnisse, die eine Beteiligung von TRPC1-Kanälen am speichergesteuerten Calciumeinstrom ausschließen (Sinkins et al., 1998; Lintschinger et al., 2000; Wedel et al., 2007). Aufgrund dieser diskrepanten Ergebnisse zur Beteiligung des TRPC1 an den speichergesteuerten Einstromen (Nesin und Tsiokas, 2014), sollten im Rahmen dieses Habilitationsprojekts die Stromveränderungen in verschiedenen Zellsystemen zum einen durch überexprimierende TRPC1-Proteine und zum anderen durch Herunterregulation endogener TRPC1-Proteine charakterisiert werden.

Außer TRPC1- wurden auch TRPC3- (Zagranichnaya et al., 2005; Kim et al., 2006; Liu et al., 2007a), TRPC4- (Philipp et al., 2000; Freichel et al., 2001; Tirupathi et al., 2002; Wang et al., 2004), TRPC5- (Zeng et al., 2004; Xu et al., 2006; Liu et al., 2007a), TRPC6- (Brechard et al., 2008; Selli et al., 2009) und TRPC7-Kanäle (Lievremont et al., 2004; Zagranichnaya et al., 2005) als speichergesteuert beschrieben. Einige dieser Ergebnisse, die für eine speichergesteuerte Aktivierung dieser TRPC-Kanäle sprechen, sind durch ihre methodischen Limitationen wenig belastbar, da überwiegend nur Messungen der freien intrazellulären Calciumkonzentration mit dem klassischen Speicherentleerungsprotokoll durchgeführt wurden. Es handelt sich um eine intrazelluläre Speicherentleerung mittels eines Inhibitors der Calciumpumpe des sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Retikulums in calciumfreier extrazellulärer Lösung und die anschließende Applikation von Calcium- oder Bariumhaltiger extrazellulärer Lösung. Dieses Protokoll beeinflusst nicht nur das intrazelluläre Milieu bezüglich des Calciums, sondern ändert auch zusätzlich den Phosphorylierungszustand der Zelle, wodurch zelluläre Effektoren wie Ionenkanäle, Transporter und Enzyme mitbeeinflusst werden. Häufig fehlen in den oben genannten Studien elektrophysiologische Untersuchungen, die als Nagelprobe dienen, um eindeutig speichergesteuerte Kanäle zu identifizieren.

Außerdem wurde ein weiterer nicht rezeptorgesteuerter, jedoch direkt mechanisch gesteuerter Aktivierungsmechanismus bei TRPC1-, TRPC5- und TRPC6-Kanälen beschrieben (Inoue et al., 2009b). Die Forschergruppe von Owen Hamill aus Galveston (USA) konnte zeigen, dass endogene TRPC1-Proteine in Oozyten von *Xenopus laevis* am membrandehnungsaktiven Calciumeinstrom beteiligt sind und dass heterolog überexprimierte, humane TRPC1-Proteine einen membrandehnungsaktiven Calciumeinstrom hervorrufen (Maroto et al., 2005). Zwei weitere Forschergruppen, eine von Félix Viana de la Iglesia aus Alicante (Spanien) und eine von Xiaqiang Yao aus Hongkong (China), konnten mechanosensitive TRPC5-Ströme sowohl heterolog in Überexpressionssystemen (Gomis et al., 2008; Jemal et al., 2014; Shen et al., 2015) als auch endogen in Barorezeptorneuronen (Lau et al., 2016) beschreiben. Darüber hinaus wurden mechanosensitive TRPC6-Ströme erstens in der Gefäßmuskulatur (Welsh et al., 2002), zweitens im Überexpressionssystem (Spasova et al., 2006) und drittens in Podozyten (Huber et al., 2007) beobachtet. Allerdings konnte in keiner dieser Untersuchungen eindeutig gezeigt werden, ob es sich tatsächlich um direkte, mechanische TRPC1-,

TRPC5- oder TRPC6-Kanalaktivierungen handelt. Daher war die Untersuchung zur intrinsischen Mechanosensitivität von TRPC-Kanälen ein zentrales Ziel dieses Habilitationsprojektes.

Für die intrinsische Mechanosensitivität von integralen Membranproteinen existieren zwei Modellvorstellungen (Christensen und Corey, 2007; Inoue et al., 2009b; Mederos y Schnitzler et al., 2011). Zum einen gibt es die Vorstellung, dass ein integrales Membranprotein allein über die Veränderung des seitlichen Druckspannungsprofils der Phospholipiddoppelschicht (Cantor, 1997) Konformationsänderungen ohne die Beteiligung des Zytoskeletts oder der extrazellulären Matrix durchführt. Somit beeinflusst die veränderte Membranspannung bzw. das veränderte seitliche Druckspannungsprofil der Membran die flexiblen Strukturen des integralen Membranproteins und führt zu einer aktiven Proteinkonformation (Cantor, 1999; Bezrukov, 2000). Neben diesem sogenannten Membranmodell, das für bakterielle mechanosensitive Ionenkanäle zutrifft (Martinac, 2004), gibt es zum anderen die Vorstellung eines sogenannten Verankerungsmodells. Es beruht auf dem mechanosensitiven Multiproteinkanalkomplex des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* mit porenbildenden Kanalproteinen aus der Degenerin-Familie, die homolog zum epithelialen Natriumkanal sind (Chalfie und Sulston, 1981; Chalfie und Au, 1989; Bianchi, 2007; Chalfie, 2009). Dieser Ionenkanalkomplex weist Verankerungen sowohl mit der extrazellulären Matrix als auch mit dem Zytoskelett auf (Fronius und Clauss, 2008). Mechanische Kräfte führen über diese starren Verankerungen des Ionenkanalkomplexes zu Konformationsänderungen und letztendlich zur Öffnung der Kanalpore.

Ein solcher mechanosensitiver Kanalkomplex wurde bei Säugetier-Podozyten von Tobias B. Huber und seinen Forscherkollegen aus Freiburg (Deutschland) postuliert (Huber et al., 2007). Die Podozyten bei Säugetieren sind hochdifferenzierte Epithelzellen, die mit ihren vielfach miteinander verzahnten Fortsätzen zum einen die innere Auskleidung der Bowman-Kapsel bilden und zum anderen zusammen mit der Basalmembran und der Endothelzellschicht den glomerulären Filterapparat für die Primärharnbildung aufbauen. Dabei sind Podozyten mit ihrer hochdynamischen und hochdifferenzierten Schlitzmembran entscheidend verantwortlich für die glomeruläre Filterfunktion, die darin besteht, einerseits eine hohe hydraulische Permeabilität und andererseits eine ausreichende Impermeabilität für Plasmaproteine zu gewährleisten. Eine chronische Überdruckbelastung, wie etwa bei der Nephrosklerose durch Hypertonie, führt letztendlich immer zu einer Podozytenschädigung und damit zu einer Dysfunktion der Schlitzmembranen (Dasgupta et al., 2007; Wang et al., 2009a). Diese histologischen, physiologischen und pathophysiologischen Merkmale der Podozyten unterstützen stark das bis jetzt nicht widerlegte Hubersche Postulat für eine Existenz eines podozytären molekularen Mechanosensors. Es wird aber auch zurzeit nicht ernsthaft und wissenschaftlich begründet bestritten. Interessanterweise exprimieren Podozyten das integrale Membranprotein Podocin, das ein Aminosäuresequenzhomologon von MEC-2 darstellt, welches wiederum am Aufbau des mechanosensitiven Kanalkomplexes in *Caenorhabditis elegans* beteiligt ist (Huang et al., 1995; Boute et al., 2000). Somit besteht die Möglichkeit, dass Podocin ein Bestandteil des podozytären Mechanosensors sein könnte. Zudem ist bekannt, dass Mutationen im Podocin-Gen zu einer progredienten Nierenerkrankung, der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) führen (Tsukaguchi et al., 2002; Monteiro et al., 2006; Tonna et al., 2008). Neben der genuinen FSGS (siehe Seite 11) kann sich eine FSGS auch symptomatisch durch zum Beispiel eine Hypertonie-induzierte Hyperfiltration entwickeln, also wieder durch eine chronische Überdruckbelastung. Da Podocin und der Kationenkanal TRPC6 physisch miteinander interagieren und einen Proteinkomplex in der Schlitzmembran bilden (Huber et al., 2006), wurde von Tobias B. Huber und seinen Forscherkollegen ein intrinsisch mechanosensitiver Ionenkanalkomplex aus TRPC6 und Podocin als podozytärer molekularer Mechanosensor vorgeschlagen (Huber et al., 2007). Hierbei konnte zum einen mittels Koimmunpräzipitationen die physische Interaktion zwischen TRPC6 und Podocin und zum anderen

mittels Elektronenmikroskopie die Kollokalisierung in der Schlitzmembran nachgewiesen werden. Zudem zeigten sich in TRPC6 und Podocin koexprimierenden Oozyten größere durch das DAG-Analogon OAG-induzierte Stromantworten als bei TRPC6 allein exprimierenden Oozyten (Huber et al., 2006), die aber in beiden Fällen eine ungewöhnlich langsame Aktivierungskinetik aufwiesen und nicht wie üblich inaktivierten. Die zur Identifizierung benötigten Strom-Spannungskennlinien fehlen leider, so dass nicht eindeutig geklärt ist, ob die beobachteten induzierten Ströme wirklich auf TRPC6-Kanalströmen beruhen. Darüber hinaus fehlen jegliche Experimente zur Mechanosensitivität des TRPC6-Podocin-Kanalkomplexes. Die Aufklärung der Rolle von TRPC6 für die Mechanosensitivität von Podozyten war daher ein weiteres Ziel dieses Habilitationsprojektes.

Neben der direkten Mechanosensitivität von integralen Membranproteinen gemäß des Membran- oder Verankerungsmodells besteht auch die Möglichkeit einer indirekten Mechanosensitivität. Im Falle eines Ionenkanals bedeutet das, dass dieser selbst nicht intrinsisch mechanosensitiv ist, sondern erst nach Aktivierung eines weiteren mechanosensitiven Proteins über einen zwischengeschalteten Signaltransduktionsweg aktiviert wird (Mederos y Schnitzler et al., 2011). Diese indirekte mechanische Kanalaktivierung sollte durch den zusätzlichen Signaltransduktionsweg langsamer ablaufen als die direkte mechanische Kanalaktivierung laut des Verankerungs- oder Membranmodells (zusammengefasst in Mederos y Schnitzler et al. (2011) und Storch et al. (2012b)). Im Rahmen dieses Forschungsprojekts sollte daher auch die Möglichkeit einer indirekten Mechanosensitivität von TRPC-Kanälen in Betracht gezogen werden.

Neben dem genauen Aktivierungsmechanismus ist auch die physiologische Rolle der TRPC-Kanäle noch nicht vollständig aufgeklärt. Obwohl TRPC1 der erste in Säugetierzellen charakterisierte TRP-Kanal ist, gibt es immer noch große Kontroversen bezüglich der Funktion dieses Kanals. So ist bisher noch immer unklar, ob TRPC1-Kanalproteine überhaupt funktionelle homotetramere Kanäle bilden können. Es besteht jedoch Konsens darüber, dass TRPC1 heteromere Kanalkomplexe mit anderen TRPC-Proteinen bilden kann (Strübing et al., 2001, 2003). TRPC1 ist stark in Neuronen exprimiert und vermittelt in kultivierten embryonalen Neuronen von *Xenopus* eine positive axonale Chemotaxis (Wang und Poo, 2005). Außerdem bewirkt TRPC1 das durch metabotrope Glutamatrezeptoren induzierte, langsame, exzitatorische postsynaptische Potential in Purkinjezellen (Kim et al., 2003) und wirkt neuroprotektiv gegen exogene Neurotoxine (Bollimuntha et al., 2005). Des Weiteren verstärkt TRPC1 den Differenzierungsstatus der hippocampalen Neuronenzelllinie H19-7 (Wu et al., 2004). Hingegen erhöht TRPC1 die Proliferation von neuronalen Progenitorzellen aus dem Hippocampus (Li et al., 2012) und aus dem sogenannten Spiralganglion der Cochlea (Chen et al., 2015). Außerdem fördert der Calciumeinstrom über TRPC1 in Zellen der Unterkieferspeicheldrüse die Speichelsekretion (Liu et al., 2007b; Sun et al., 2015). Im kardiovaskulären System spielt TRPC1 ebenfalls eine Rolle für die Proliferation sowie für den Gefäßtonus. TRPC1 wirkt *in vitro* proliferationsfördernd auf glatte Muskelzellen aus der menschlichen Aorta (Érac et al., 2016). Zudem wurde eine erhöhte TRPC1-Expression in glatten Muskelzellen und in Herzmuskelzellen nach einer Stenose beobachtet (Kumar et al., 2006; Ohba et al., 2007). In beiden Fällen wirkt TRPC1 *in vitro* proliferationsfördernd. Dies wurde bei glatten Muskelzellen aus Saphenus-Venen des Menschen und aus Karotiden von Schweinen, Ratten und Mäusen (Kumar et al., 2006), sowie bei Herzmuskelzellen aus Ratten (Ohba et al., 2007) festgestellt. Somit sollen TRPC1-Kanäle für die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie verantwortlich sein. Des Weiteren bewirken TRPC1-Kanäle in der glatten Gefäßmuskulatur eine Vasokonstriktion (Kunichika et al., 2004; Lin et al., 2004; Bergdahl et al., 2005; Wolfle et al., 2010) und im Endothel eine Vasodilatation (Kochukov et al., 2013; Greenberg et al., 2017; Qu et al., 2017) unabhängig davon, ob es sich um große (Kunichika et al., 2004; Lin et al., 2004; Kochukov et al., 2013) oder kleine Leitungsgefäße (Greenberg et al., 2017; Qu et al., 2017) oder Widerstandsgefäße (Bergdahl et al., 2005;

Woffle et al., 2010) handelt und unabhängig davon, ob die Gefäße im Niederdruck- (Kunichika et al., 2004; Lin et al., 2004; Qu et al., 2017) oder im Hochdruckbereich liegen (Bergdahl et al., 2005; Woffle et al., 2010; Kochukov et al., 2013; Greenberg et al., 2017). Der genaue Signalweg zur Vasodilatation durch endotheliale TRPC1-Kanäle ist Stickstoffmonoxid-vermittelt, jedoch im Detail nicht geklärt.

Die DAG-sensitiven TRPC2-Kanäle (Lucas et al., 2003) werden höchstwahrscheinlich bei allen Makrosmatikern wie bei den meisten Fischen und den meisten Säugetieren funktionell exprimiert (Liman und Dulac, 2007). Bei den bekannten Mikrosmatikern wie den Hominiden und den anderen Schmalnasenaffen ist TRPC2 nicht funktionell exprimiert und liegt als Pseudogen vor (Liman und Innan, 2003; Zhang und Webb, 2003). Die Zell-, Gewebe- und Organexpression von TRPC2 beschränkt sich auf die Schilddrüse (Törnquist et al., 2014), den Hoden (Vannier et al., 1999), den Erythrozyten (Hirschler-Laszkiwicz et al., 2012) und das Jacobsonsche Organ, das auch als Vomeronasalorgan (VNO) bezeichnet wird (Liman et al., 1999; Hofmann et al., 2000). Die Funktion von TRPC2-Kanälen in der Schilddrüse wurde bisher nur von der Forschergruppe von Kid Törnquist aus Turku (Finnland) untersucht und ist noch weitgehend ungeklärt. In den Spermien sollen TRPC2-Kanäle die Akrosomreaktion vermitteln (Jungnickel et al., 2001), die das Eindringen des Spermiums in die Eizelle ermöglicht. Zudem sollen TRPC2-Kanäle in Erythrozyten die durch oxidativen Stress hervorgerufene hämolytische Anämie bewirken (Hirschler-Laszkiwicz et al., 2012). Im VNO sind TRPC2-Kanäle für die Wahrnehmung von Pheromonen entscheidend und der Verlust von TRPC2 in beiden Geschlechtern führt zu einer gestörten Pheromonwahrnehmung und folglich zu einer beeinträchtigten olfaktorischen Geschlechtererkennung und zu einem verringerten Aggressionsverhalten (Leypold et al., 2002; Stowers et al., 2002). Insbesondere paaren sich TRPC2-gendefiziente Männchen mit anderen Männchen (Stowers et al., 2002) und TRPC2-gendefiziente Weibchen zeigen sogar männliches Sexualverhalten (Kimchi et al., 2007). Da TRPC2-Kanäle im heterologen Überexpressionssystem nicht funktionell untersucht werden können, beschränkte sich die biophysikalische Charakterisierung dieses Kanals bisher im Wesentlichen auf die endogene Expression in olfaktorischen Zellen des VNO.

TRPC3-Kanäle sind stark im zentralen Nervensystem sowie im kardiovaskulären System exprimiert. Als erstes konnten Gen-Funktionsbeziehungen mit der TRPC3-gendefizienten Mauslinie erfolgreich untersucht werden. Es ergaben sich auffällige extrapyramidale Koordinationsstörungen, die sich durch das Fehlen des TRPC3-Kanal-vermittelten Calcium-Einstroms in Purkinjezellen begründen ließen (Hartmann et al., 2008). Des Weiteren konnte mittels des bekannten Alkylierungsmittels Ethylnitrosoharnstoff eine Mauslinien-Mutante generiert werden, die einen ataxischen Phänotyp aufwies, welcher sich auf eine Punktmutation durch den Aminosäureaustausch T635A im TRPC3-Gen zurückführen lässt. Die Forschergruppe von Dame Kay Davies in Oxford (England) konnte bei dieser als „*Moonwalker*“ bezeichneten Mauslinie eine gestörte Differenzierung in der frühen postnatalen Entwicklung und eine immense Degeneration in der späten postnatalen Entwicklung von Purkinjezellen im Cerebellum beobachten, die sich durch eine nicht näher analysierte rezeptorgesteuerte TRPC3-vermittelte Kanalaktivitätserhöhung begründete (Becker et al., 2009). Inzwischen konnte ein weiterer zerebellarer Zelltyp, die sogenannten unipolaren Bürstenzellen (Typ II) mit einer hohen TRPC3-Expression identifiziert werden. Diese Bürstenzellen sind glutamaterge Interneurone, die hauptsächlich in der inneren Körnerzellschicht des Lobulus IX und X lokalisiert sind (Dino et al., 1999). Sie vermitteln eine exzitatorische Vorsteuerung auf die sogenannten Körnerzellen, die wiederum die Purkinjezellen exzitatorisch ansteuern (Dino et al., 2000). Diese Bürstenzellen degenerieren massiv innerhalb der ersten vier postnatalen Wochen bei der *Moonwalker*-Mauslinie (Sekerikova et al., 2013). Aufgrund des Funktionszusammenhangs und der Koinzidenz von Bürstenzell-Degeneration und Ataxie, ist die TRPC3-T635A Expression in den unipolaren Bürstenzellen (Typ II) ursächlich und die späte Purkinjezell-Degeneration eine pathogenetische Konsequenz. Erstaunlicherweise gibt es bis dato

lediglich nur Indizien für die molekularen Ursachen der erhöhten Kanalaktivität von TRPC3-T635A. Zuletzt wurde eine Wasserstoff-Brückenbindung an T635 für wichtig erachtet, die eine geschlossene Kanalkonformation stabilisieren soll (Hanson et al., 2015). Dieses Threonin befindet sich in der zweiten intrazellulären Schleife an der sich die 5. transmembranäre Domäne anschließt, die dort an der intrazellulären Seite die Kanalporenwand bildet. Kleinste molekulare Verschiebungen in dieser Porenwand beeinflussen das Schaltverhalten von vielen ähnlich aufgebauten Ionenkanälen, so dass eine intrinsische Kanalfunktionsstörung naheliegend ist. Erstaunlicherweise steht immer noch eine gründliche biophysikalische Untersuchung der TRPC3-T635A-Kanalmutante aus, wie z. B. eine Charakterisierung der Basalaktivität (Dietrich et al., 2003) und eine Einzelkanalanalyse in einem heterologen Expressionssystem, bei der die Offen- und Geschlossenzeiten des Kanals statistisch erfasst werden.

Im Blutgefäßsystem finden sich TRPC3-Kanäle im Endothel des Niederdrucksystems zum Beispiel in der Nabelschnurvene (Groschner et al., 1998) und in der Lungenarterie (Kamouchi et al., 1999), aber auch im Endothel des Hochdrucksystems, zum Beispiel in den afferenten Arteriolen der Niere (Thilo et al., 2009) und in den Koronararterien (Smedlund und Vazquez, 2008). Während die physiologische Rolle samt Aktivierungsmechanismus von TRPC3-Kanälen im Endothel des Niederdrucksystems völlig unklar ist (Groschner et al., 1998; Kamouchi et al., 1999), sind hohe Expressionen von TRPC3-Kanälen im Endothel des Hochdrucksystems mit pathophysiologischen Funktionen wie der akzelerierten Hypertonie (Thilo et al., 2009) und der Arteriosklerose (Smedlund et al., 2015) assoziiert. Abgesehen von der endothelialen Expression konnten zwei unabhängige Forschergruppen TRPC3-Expressionen in der glatten Muskulatur von Widerstandsgefäßen nachweisen (Xi et al., 2008; Park et al., 2011). Auch hier ist der Aktivierungsmechanismus umstritten. Die Forschergruppe von Jonathan Jaggard aus Memphis (USA) hat Indizien für ein  $IP_3$ -gesteuertes physisches Koppeln zwischen einer unterhalb der Zellmembran vorliegenden  $IP_3$ -Rezeptorisoform und den TRPC3-Kanälen in der Zellmembran gefunden, die zu einer Kanalaktivierung führen (Xi et al., 2008; Adebisi et al., 2010). Hingegen findet die Forschergruppe von Min Goo Lee aus Seoul (Korea) eine alpha-Adrenozeptor-gesteuerte TRPC3-Kanalaktivierung unter der Kontrolle einer Serin-Threonin-Kinase, der sogenannten WNK4 (Park et al., 2011). Patienten mit Mutationen in dieser Kinase zeigen einen Pseudohypoaldosteronismus vom Typ II, der mit einer Hypertonie einhergeht. Diese Hypertonie begründet sich nicht nur durch die WNK4-bedingte Hyperfunktion des Natrium-Chlorid-Symporters im distalen Nephron, sondern auch durch die rezeptorgesteuerte WNK4-unkontrollierte Hyperaktivität von TRPC3-Kanälen in der glatten Muskulatur von Widerstandsgefäßen (Park et al., 2011).

Vier unabhängige Forschergruppen konnten zeigen, dass TRPC3-Kanäle in Herzmuskelzellen von Mäusen (Nakayama et al., 2006; Wu et al., 2010; Han et al., 2016) und Ratten (Onohara et al., 2006) sowie in der Herzmuskelzelllinie HL-1 exprimieren (Poteser et al., 2011) und eine entscheidende pathophysiologische Rolle spielen (Nakayama et al., 2006; Onohara et al., 2006; Wu et al., 2010; Poteser et al., 2011; Han et al., 2016). Hierbei bewirkt der Calciumeinstrom durch TRPC3-Kanäle eine Herzhypertrophie durch die Aktivierung der Calcium- und Calmodulin-abhängigen Serin/Threonin-Proteinphosphatase Calcineurin, wodurch es zur Dephosphorylierung von NFAT („*nuclear factor of activated T cells*“), einem Transkriptionsfaktor von T-Lymphozyten, kommt. Dieser dephosphorylierte Transkriptionsfaktor transloziert in den Zellkern und beeinflusst die Genexpression. Interessanterweise soll die Calcineurin-Aktivierung erst nach der Bindung von Calcineurin an das durch die Proteinkinase C phosphorylierbare Threonin an der Position 573 des TRPC3-Kanals geschehen (Poteser et al., 2011). Pharmakologische Interventionen mit Angiotensin II und/oder Phenylephrin über mehrtägige Infusionen sowie die transversale Aortenkonstriktion führen somit zu einer Genregulation, die eine Hypertonie-induzierte Herzhypertrophie verursacht. Neben den typischen Herzhypertrophie-sensitiven Genen

scheint sogar die Expression des spannungsgesteuerten Calciumkanals in Herzmuskelzellen beeinflusst zu werden (Han et al., 2016).

TRPC4- und TRPC5-Kanäle sind in zahlreichen Geweben exprimiert, unter anderem im Gehirn, in der Niere und im Gefäßsystem. Besonders hoch ist ihre Expression im zentralen Nervensystem. Hier sind sie an der Funktion der Amygdala beteiligt. TRPC4- und TRPC5-Kanäle vermitteln dort den Zustand hoher Angst gegenüber aversiven Reizen (Riccio et al., 2009; Riccio et al., 2014). Außerdem spielen TRPC4- und TRPC5-Kanäle in der Amygdala eine wichtige Rolle für das peripher induzierte neuropathische Schmerzsyndrom. Mikroinjektionen mit dem TRPC4- und TRPC5-Kanalblocker ML-204 in die Amygdala von Ratten verringerten sowohl das sensorische als auch das affektive Schmerzempfinden (Wei et al., 2015). Somit könnten ZNS-gängige TRPC4- und TRPC5-Kanalblocker in Zukunft als neuartige Anxiolytika oder sogar als sprunginnovative Analgetika gegen periphere Neuropathien eingesetzt werden. Abgesehen davon verursachten TRPC5-Kanäle in hippocampalen CA1-Pyramidenzellen aufgrund ihrer Calcium- und Natriumpermeabilität langanhaltende und weitgehend konstante Membranpotentialdepolarisationen, die sogenannten Plateaupotentiale (Tai et al., 2011). Das Auftreten dieser Plateaupotentiale wird bei der ictalen Phase eines epileptischen Anfalls beobachtet (Dichter und Ayala, 1987; Fraser und MacVicar, 1996). In Übereinstimmung mit diesem neurophysiologischen Befund wies die TRPC5-gendefiziente Mauslinie geringere epileptische Anfallsstärken auf (Phelan et al., 2013). Daher könnten TRPC5-Kanalblocker möglicherweise als Antiepileptika eingesetzt werden. TRPC5-Kanäle hemmen zudem sowohl das Längenwachstum von hippocampalen Neuriten als auch von Filopodien am Wachstumskegel von aussprossenden Axonen, wodurch sich die axonale Wegfindung verschlechtert (Greka et al., 2003). Außerdem haben TRPC5- und TRPC6-Kanäle entgegengesetzte Wirkungen auf das Aktinzytoskelett von Podozyten und Fibroblasten. Die rezeptorgesteuerte Aktivierung von TRPC5 in beiden Zelltypen durch Angiotensin II führt zur Reduktion von parallelen Stressfasern und damit zu einem motilen und nicht-kontraktilen Phänotyp *in vitro* (Tian et al., 2010). Diese Art von Reorganisation des Zytoskeletts geht mit einer Podozytenschädigung einher, die zur Zerstörung der Schlitzmembran und letztlich zur Proteinurie führt (Takeda et al., 2001; Asanuma et al., 2006; Faul et al., 2007). Hingegen verstärkt eine TRPC6-Aktivierung durch Angiotensin II die parallele Stressfaserbildung, wodurch ein kontraktiler aber nicht-motiler Phänotyp ausgebildet wird (Tian et al., 2010).

Darüber hinaus wird neuerdings eine pathophysiologische Bedeutung von TRPC4- und TRPC5-Kanälen in Krebszellen diskutiert. Eine erhöhte TRPC5-Kanalaktivität führt sowohl in Brustkrebszellen (Ma et al., 2012) als auch in kolorektalen Krebszellen (Wang et al., 2015) zu einer verstärkten Expression des bestuntersuchten ABC-Transporters P-Glykoprotein (MDR1). Dieser Transporter ist das wichtigste molekulare Korrelat für die Resistenz von Zytostatika und eliminiert zum Beispiel das bekannte und viel eingesetzte Interkalantium Doxorubicin, den Mitosehemmer Paclitaxel und den Antimetaboliten 5-Fluoruracil. Im Fall des Brustkrebses soll die verstärkte MDR1-Expression über den Transkriptionsfaktor NFATc3 und im Fall des Dickdarmkrebs über  $\beta$ -Catenin, einem Strukturprotein, das ebenfalls als Transkriptionsfaktor fungiert, geschehen (Ma et al., 2012; Wang et al., 2015). Im Gegensatz dazu zeigen die Befunde mit dem potenten TRPC4- und TRPC5-Kanalaktivator (-)-Englerin A, der in nanomolaren Konzentrationen mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 20 bis 28 nM wirkt, ausgeprägte zytotoxische Effekte auf diverse Krebszelllinien (Akbulut et al., 2015; Carson et al., 2015). (-)-Englerin A wirkt sogar bei tripel-negativen Brustkrebszellen zytotoxisch (Ratnayake et al., 2009), bei denen sowohl Östrogen- und Progesteronrezeptoren als auch Rezeptoren für den „*human epidermal growth factor*“ (HER2) als Zielstrukturen für Pharmaka fehlen. Diese Art des Mammakarzinoms gilt als besonders aggressiv (Dent et al., 2007) und findet sich bei ca. 15% aller Brustkrebspatientinnen (Gluz et al., 2009). Zur Behandlung des tripel-negativen Mammakarzinoms gibt es außer der Operation bisher nur eine breit wirkende, ungerichtete Chemotherapie. Leider kommt es trotz Chemotherapie innerhalb

der ersten drei Jahre häufig zu Rezidiven, wodurch sich die Überlebensrate der Patientinnen deutlich verringert (Liedtke et al., 2008). Eine zielgerichtete medikamentöse Therapie könnte in Zukunft die Prognose von Patientinnen mit tripel-negativem Mammakarzinom verbessern.

Des Weiteren verstärkt eine TRPC5-Kanalaktivität die Angiogenese beim Brustkrebs durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1) und anschließender Bildung des „*vascular endothelial growth factors*“ (VEGF) (Zhu et al., 2015). Im Gegensatz dazu hemmt die TRPC4-Kanalaktivität in Nierenzellkarzinomzellen die dortige Angiogenese über das sekretierte antiangiogenetisch wirkende Thrombospondin-1 (Veliceasa et al., 2007). Davon abgesehen steigert die TRPC4- und TRPC5-Kanalaktivität in Endothelzellen die Vaskulogenese (Antigny et al., 2012; Song et al., 2015), was eher für eine proangiogenetische Wirkung von TRPC4 und TRPC5 spricht. Da eine erhöhte Expression von TRPC1-, TRPC3-, TRPC4- und TRPC6-Kanälen in Ovarialkrebszellen zu einer vermehrten Migration und Proliferation von Krebszellen führte und somit tumorigen wirkte (Zeng et al., 2013), könnten auch TRPC1-, TRPC3- und TRPC6-Kanäle als Zielstrukturen für Chemotherapeutika in Frage kommen. Zurzeit gibt es jedoch mehr Belege für TRPC4- und TRPC5-Kanäle als entscheidende Zielstrukturen für onkologische Therapien.

TRPC6-Kanäle sind stark exprimiert in der glatten Gefäßmuskulatur, in Lunge, Gehirn, Plazenta, Milz, Eierstöcken, Dünndarm, sowie in Neutrophilen und in Fußfortsätzen von Podozyten (zusammengefasst in Nilius und Owsianik (2011)). Zahlreiche physiologische Funktionen von TRPC6-Kanälen wurden bereits identifiziert. Im neuronalen System begünstigen sie die Synthese von Endocannabinoiden (Bardell und Barker, 2010), verstärken das Dendriten-Wachstum (Tai et al., 2008; Heiser et al., 2013) und erhöhen die neuronale Plastizität (Heiser et al., 2013). Im vaskulären System sind TRPC6-Kanäle von Bedeutung für die  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-vermittelte Vasokonstriktion (Hill et al., 2006) und für die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur (Yu et al., 2003; Wang et al., 2016). Darüber hinaus wirken TRPC6-Kanäle proangiogenetisch (Hamdollah Zadeh et al., 2008; Ge et al., 2009). Außerdem bewirkt ein niedriger extrazellulärer pH-Wert eine TRPC6-Aktivierung, was zur Hemmung der Thrombozytenaggregation führt (Berna-Erro et al., 2014). Auch Oxidationsmittel wie Wasserstoffperoxid können TRPC6-Kanäle aktivieren und sogar deren Zellmembranexpression erhöhen (Graham et al., 2010). Interessanterweise wurden Patientenmutationen im TRPC6-Gen gefunden ähnlich wie beim Podocin-Gen (siehe Seite 6), die zur genuinen FSGS führen (Reiser et al., 2005; Winn et al., 2005; Heeringa et al., 2009; Santin et al., 2009; Zhu et al., 2009; Gigante et al., 2011; Chiluiza et al., 2013; Hofstra et al., 2013; Zhang et al., 2013; Riehle et al., 2016). Vermutlich bewirken diese TRPC6-Mutationen eine Podozytenschädigung durch eine Zerstörung der Schlitzmembran, die für die Filtration des Primärharns entscheidend ist. Bei FSGS-Patienten äußert sich die Beeinträchtigung der Barrierefunktion von Podozyten in Proteinurie und führt zur progredienten chronischen Niereninsuffizienz bis hin zu einem vollständigen terminalen Nierenversagen.

TRPC7-Kanäle wurden bisher von allen TRPC-Kanälen am wenigsten untersucht. Daher ist noch relativ wenig über die physiologische und pathophysiologische Rolle dieser Kanäle bekannt. TRPC7-Kanäle sind unter anderem im zentralen Nervensystem, in der Hypophyse, in der Niere (Riccio et al., 2002), im Herz, in der Lunge (Jang et al., 2012), im Endothel (Yip et al., 2004) und in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert (Walker et al., 2001; Maruyama et al., 2006; Ju et al., 2010). Möglicherweise führt die TRPC7-Kanalaktivierung in rhythmusgebenden Zellen des Atemzentrums zur Erhöhung der Atemfrequenz (Ben-Mabrouk und Tryba, 2010). Ferner wird vermutet, dass TRPC7-Kanäle für das verstärkte Zellwachstum bei Patienten mit autosomal dominanter polyzystischer Niere verantwortlich sind (Miyagi et al., 2009). Zudem gibt es Hinweise, dass myokardiale TRPC7-Kanäle an der Entstehung von Arrhythmien (Alvarez et al., 2008) und an der myokardialen Apoptose (Satoh et al., 2007) beteiligt sind. Widersprüchliche Ergebnisse finden sich zur Rolle von TRPC7 für den Pupillenlichtreflex. Die

Forschergruppe von King-Wai Yau aus Baltimore (USA) beobachtete, dass bei TRPC6- und TRPC7-doppelt gendefizienten Mäusen die lichtinduzierte Aktivierung von photosensitiven retinalen Ganglienzellen vollständig fehlt und schlussfolgerten, dass heteromere TRPC6/7-Kanäle an der lichtinduzierten Depolarisation maßgebend beteiligt sind (Xue et al., 2011). Im Gegensatz dazu konnte die Forschergruppe von Paulo Kofuji aus Minneapolis (USA) mit Hilfe der beiden TRPC3- und TRPC7-einfach-gendefizienten Mauslinien eine Beteiligung von TRPC3 und TRPC7 an der lichtinduzierten Aktivierung von retinalen Ganglienzellen ausschließen und beobachteten lediglich bei TRPC6-einfach-gendefizienten Mäusen eine verminderte lichtinduzierte Ganglienzelldepolarisation (Perez-Leighton et al., 2011). In einem Postskriptum führen die Forscher aus Baltimore erstaunlicherweise diese Diskrepanz auf die verwendeten unterschiedlichen Patch-Clamp-Konfigurationen der Ganzzellableitungen zurück: „*perforated patch*“-Ableitungen bei Xue et al. (2011) und konventionelle Ganzzellableitungen bei Perez-Leighton et al. (2011). Deshalb bleibt die physiologische Bedeutung von TRPC-Kanälen in retinalen Ganglienzellen bisher noch unklar und sollte in Zukunft gewissenhaft und kritisch analysiert werden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass TRPC-Kanäle an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im Organismus beteiligt sind. Obwohl die Anzahl der Publikationen zu TRPC-Kanälen ständig steigt, handelt es sich häufig um Einzelbefunde oder bruchstückhafte Ergebnisse, die oft nicht validiert genug oder sogar widersprüchlich sind, sodass immer noch, nach zurzeit mehr als 3000 Publikationen zu TRPC-Kanälen, viele und selbst generelle Fragen zur Funktion von TRPC-Kanälen unbeantwortet bleiben. Diese Publikationsflut erinnert an das von Yuri Lazebnik aus Cold Spring Harbour sehr treffend am Beispiel der Apoptose beschriebene Phänomen der Akkumulation von wissenschaftlichen Ergebnissen (Lazebnik, 2002), die eher Verwirrung hervorrufen und keinen fundamentalen Erkenntnisgewinn bringen. Nur ein systembiologischer Ansatz, bei dem Forscher Kanalaktivierungen und –inaktivierungen sowie dynamische Interaktion und deren Störungen bei TRPC-Kanälen quantitativ analysieren, trägt zu einem tiefen Verständnis der zell- und pathophysiologischen Rolle bei (Schneider und Klambunde, 2013; Munaron, 2015). Sowohl die detaillierte biophysikalische Charakterisierung und insbesondere die Aufklärung des Aktivierungsmechanismus von TRPC-Kanälen als auch die weitergehende Erforschung der physiologischen und pathophysiologischen Relevanz von TRPC-Kanälen stehen immer noch aus und sollten im Rahmen dieses Habilitationsprojektes untersucht werden.

## 2 Zusammenfassung der Forschungsergebnisse

### 2.1 Welche physiologische Bedeutung besitzen TRPC-Kationenkanäle?

Im Rahmen dieses Habilitationsprojektes wurden die Kationenkanäle TRPC1, TRPC4, TRPC5 und TRPC6 zunächst biophysikalisch charakterisiert und anschließend folgte die Untersuchung ihrer physiologischen Bedeutung. Zur Charakterisierung von TRPC1-Kanälen wurden von uns elektrophysiologische Ganzzelleableitungen im heterologen Überexpressionssystem mit TRPC1-überexprimierenden humanen embryonalen Nierenzellen (Storch et al., 2012a) und mit endogen TRPC1-exprimierenden primären, isolierten glatten Gefäßmuskelzellen (Dietrich et al., 2007) sowie immortalisierten *Gonadotropin-Releasing-Hormon*-(GnRH)-freisetzenden Neuronen (Storch et al., 2012a) durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass TRPC1-Proteine nicht in der Lage sind, funktionelle homomere und rezeptorgesteuerte (Storch et al., 2012a) oder speichergesteuerte Kationenkanäle auszubilden (Dietrich et al., 2007; Storch et al., 2012a). Die Forschergruppe von Mohamed Trebak aus Hershey (USA) bestätigte inzwischen, dass TRPC1-Proteine in glatten Gefäßmuskelzellen nicht für den speichergesteuerten Calciumeinstrom verantwortlich sind (Potier et al., 2009). Im Gegensatz dazu betrachten die Forschergruppen von Indu Ambudkar aus Bethesda (USA) und Albrecht Schwab aus Münster (Deutschland) TRPC1-Kanäle weiterhin als hochgradig calciumleitende und speichergesteuerte Kanäle (Ambudkar, 2007; Fabian et al., 2008; Fabian et al., 2011; Ambudkar et al., 2017). Dieser Widerspruch wird üblicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme begründet (Zellen aus der Unterkieferspeicheldrüse bei Indu Ambudkar (Liu et al., 2007b; Sun et al., 2015) und Nierenepithelzellen bei Albrecht Schwab (Fabian et al., 2008; Fabian et al., 2011)), was aber auch andererseits bedeutet, dass der Aktivierungsmechanismus keine intrinsische Leistung des Kanals sein kann.

Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass TRPC1-Proteine die Fähigkeit besitzen, funktionelle heterotetramere, rezeptorgesteuerte Kanalkomplexe mit anderen TRPC-Proteinuntereinheiten zu bilden (Storch et al., 2012a), und zwar nicht nur wie bereits beschrieben mit TRPC4 und TRPC5 (Strübing et al., 2001; Hofmann et al., 2002), sondern auch mit TRPC3, TRPC6 und TRPC7. In diesen Kanalkomplexen sind TRPC1-Proteine nicht nur akzessorische  $\beta$ -Untereinheiten, sondern sie sind an der Porenbildung beteiligt und reduzieren die Calciumpermeabilität (Storch et al., 2012a). Die Funktion von TRPC1-Proteinen als Suppressoren der Calciumpermeabilität wird dadurch untermauert, dass Aminosäureaustausche in der mutmaßlichen Porenregion von TRPC1 die Calciumpermeabilität zusätzlich verringerten (Storch et al., 2012a). Diese den Calciumeinstrom beeinträchtigende Funktion von TRPC1 wurde inzwischen von mehreren Forschergruppen, zum Beispiel von Dean D. Metcalfe aus Bethesda (USA), von Insuk So aus Seoul zusammen mit Hyum In Kim aus Suwon (Korea) und von Cigdem Selli aus Izmir (Türkei) unabhängig bestätigt (Medic et al., 2013; Kim et al., 2014; Erac et al., 2016). Zudem können TRPC1-Proteine vermutlich mit TRPV6, einem Vertreter der *transient receptor potential vanilloid* (TRPV)-Kanalfamilie, einen heteromeren Kanalkomplex bilden und wirken hier ebenfalls als Suppressoren des Calciumeinstroms (Schindl et al., 2012).

Die physiologische Bedeutung des reduzierten Calciumeinstroms in TRPC1-exprimierenden Zellen wurde von uns in GnRH-freisetzenden Neuronen, die eine besonders hohe endogene TRPC1-

Expression aufweisen, genauer untersucht. Auch in diesen Zellen waren TRPC1-Proteine Suppressoren der Calciumpermeabilität und die Herunterregulation der TRPC1-Expression verursachte einen erhöhten Calciumeinstrom, der sowohl zellmotilitäts- als auch zellmigrationsfördernd wirkte (Storch et al., 2012a). Um die physiologische Funktion von TRPC1 zu charakterisieren, wurden zudem TRPC1-gendefiziente Mäuse herangezogen. Diese Mäuse wiesen zunächst im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine erkennbaren Unterschiede auf (Dietrich et al., 2007). Dennoch konnten wir in Kooperation mit Norbert Weissmann aus Gießen (Deutschland) eine pathophysiologische Bedeutung von TRPC1 in präkapillären Lungenarterien identifizieren. TRPC1-gendefiziente Mäuse entwickelten keine Hypoxie-induzierte Hypertonie. Daher ist TRPC1 in glatten Muskelzellen aus präkapillären Lungenarterien offenbar für die Entstehung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie, einer Lungenerkrankung, die bislang nicht gezielt medikamentös behandelt werden kann, entscheidend (Malczyk et al., 2013). Somit könnte TRPC1 eine neue Zielstruktur für innovative Pharmaka zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie bei Hypoxie darstellen.

Überdies wurde im Rahmen dieses Habilitationsprojektes die gestörte Calciumhomöostase von differenzierten, ventrikulären Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) von Patienten mit einer katecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie (*catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia* [CPVT]) elektrophysiologisch charakterisiert. Bei dieser vererbten, meist durch Mutationen im Ryanodin Typ 2-Rezeptor-Gen verursachten Erkrankung des Herzmuskels, die mit einer unkontrollierten Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum einhergeht, lösen Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin lebensbedrohliche Arrhythmien aus. Außer der Behandlung mit Betablockern, die jedoch bei 30% der Patienten keine ausreichende Wirkung hat, sowie dem Einsatz von implantierbaren Defibrillatoren gibt es derzeit noch keine kausale Therapie. Wir konnten zeigen, dass das Muskelrelaxans Dantrolen, das die Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch eine Ryanodin-Rezeptorblockade hemmt, antiarrhythmisch wirkt (Jung et al., 2012b). Daher könnte möglicherweise in Zukunft eine Indikationserweiterung für Dantrolen als Antiarrhythmikum beantragt werden. Mit dieser Forschungsarbeit wurden somit Ryanodin-Rezeptorblocker als eine neue Klasse von Antiarrhythmika zur kausalen Behandlung von CPVT-Patienten identifiziert.

Da TRPC4- und TRPC5-Kanäle im Allgemeinen als rezeptorgesteuert betrachtet werden, der genaue Signalweg zur Kanalaktivierung jedoch weitgehend unklar ist, setzten wir uns zum Ziel, diesen Signalweg aufzuklären. Entgegen früherer anderslautender Befunde (Hofmann et al., 1999) zeigten unsere Untersuchungen, dass TRPC4- und TRPC5-Kanäle ebenso wie TRPC3-, TRPC6- und TRPC7-Kanäle DAG-sensitiv sind (Storch et al., 2017a). Im Gegensatz zu TRPC3, TRPC6 und TRPC7 wird jedoch die DAG-Sensitivität von TRPC4 und TRPC5 durch die Adapterproteine NHERF1 und NHERF2 (siehe Seite 3 und 4) eng reguliert. NHERF-Proteine stellen somit dynamische Regulatoren der TRPC4- und TRPC5-Kanalaktivität dar. Mittels intermolekularer Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Messungen konnten wir die dynamische Interaktion zwischen TRPC5 und NHERF1 sowie die Abspaltung von NHERF1 vom C-Terminus von TRPC5 sowohl nach Rezeptoraktivierung als auch nach PIP<sub>2</sub>-Depletion nachweisen. Außerdem konnten wir zeigen, dass Rezeptoraktivierungen und PIP<sub>2</sub>-Depletionen C-terminale Konformationsänderungen bei TRPC5-Kanälen auslösen. In jedem Fall riefen die Dissoziationen von NHERF-Proteinen vom C-Terminus eine DAG-Aktivierbarkeit von TRPC4- und TRPC5-Kanälen hervor. Voraussetzung für die NHERF-Interaktion war der Phosphorylierungsstatus des C-Terminus von TRPC4 und TRPC5. Erst nach Phosphorylierung eines C-terminalen Threonins im C-terminalen PDZ-Bindemotiv „VTTRL“ (siehe Seite 3) durch die Proteinkinase C konnten NHERF-Proteine am C-Terminus binden und die DAG-Aktivierbarkeit von TRPC4 und TRPC5 unterdrücken.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung führen zu einem neuen Modell der rezeptorgesteuerten TRPC4- und TRPC5-Kanalaktivierung: Die Stimulation von  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren bewirkt demnach eine Aktivierung der PLC wodurch  $PIP_2$  in die beiden Botenstoffe  $IP_3$  und DAG gespalten wird. Die  $PIP_2$ -Spaltung ruft eine C-terminale Konformationsänderung bei TRPC4 und TRPC5 hervor und verursacht dadurch eine Abspaltung von NHERF-Proteinen vom C-Terminus. Diese Abspaltung führt zu einer DAG-sensitiven Kanalkonformation, sodass das  $PIP_2$ -Spaltprodukt DAG nun den Kanal aktivieren kann. Das Modell der rezeptorgesteuerten TRPC4/5-Aktivierung ist in Abbildung 7 der Publikation Storch et al. (2017a) dargestellt. Dieser Signalweg spielt unter anderem in endogen TRPC4-exprimierenden proximalen Tubuluszellen und in endogen TRPC5-exprimierenden hippocampalen Neuronen eine Rolle (Storch et al., 2017a). Mit dieser Arbeit konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass alle TRPC-Kanäle DAG-sensitiv sind, weshalb nun ein Paradigmenwechsel bei der Einteilung von TRPC-Kanälen in DAG-sensitive und DAG-insensitive Unterfamilien dringend erforderlich ist. Zudem vereint dieser neue Signalweg die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse anderer Forschergruppen. Die hier gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen tiefere Einblicke in den Aktivierungsmechanismus von TRPC4- und TRPC5-Kationenkanälen, was letztlich eine notwendige Voraussetzung ist für das genauere Verständnis der zell- und pathophysiologischen Rolle dieser Kationenkanäle. Darüber hinaus konnten wir eine völlig neue Funktion von NHERF-Proteinen als dynamische Regulatoren der TRPC4- und TRPC5-Kanalaktivität entschlüsseln (Gough, 2017). Diese Erkenntnisse zur Rolle von NHERF-Proteinen könnten in Zukunft dazu beitragen, die physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieser Adapterproteine besser zu verstehen. Eine interessante pathophysiologische Bedeutung kommt der Interaktion von NHERF-Adapterproteinen mit missgefalteten CFTR-Kanälen aus Mukoviszidose-Patienten zu. Diese NHERF-Interaktion bewirkt eine Stabilisierung und verbesserte Plasmamembran-expression der missgefalteten CFTR-Kanäle (Loureiro et al., 2015), wodurch deren eingeschränkte Funktion teilweise wiederhergestellt werden kann. Da TRPC4- und TRPC5-Kanäle ebenso wie NHERF-Proteine in Tumorzellen exprimiert sind und dort das Tumorwachstum beeinflussen (siehe Seite 4 und Seite 10), könnte die von uns identifizierte dynamische Interaktion sogar für die Krebstherapie von medizinischer Relevanz sein. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen müssen, ob Kanal-NHERF-Proteinkomplexe tatsächlich als neue Angriffspunkte für Arzneimittel in Frage kommen.

Das nächste Ziel war die Aufklärung der physiologischen Bedeutung von TRPC6-Kationenkanälen. Dazu wurden TRPC6-gendefiziente Mäuse herangezogen und es wurden elektrophysiologische Ganzzelleableitungen von primären isolierten, glatten Muskelzellen aus Gehirnarterien von TRPC6-gendefizienten und Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Entgegen unserer Erwartungen waren in TRPC6-gendefizienten glatten Muskelzellen erhöhte basale und OAG-induzierte Stromantworten sowie stärker depolarisierte Membranpotentiale im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zu beobachten (Dietrich et al., 2005). Die erhöhten Ströme und Ruhemembranpotentiale waren auf eine kompensatorische Hochregulation von TRPC3-Kanälen in der glatten Gefäßmuskulatur zurückzuführen, die gegenüber TRPC6-Kanälen eine höhere Basalaktivität besitzen (Dietrich et al., 2003). Die erhöhte TRPC3-Kanalaktivität äußerte sich unter anderem in einem gesteigerten Tonus der glatten Muskulatur (Dietrich et al., 2005). Diese kompensatorische TRPC3-Überexpression in Aorta und Zerebralarterien war weder in der pulmonalen präkapillären Gefäßmuskulatur noch im mikrovaskulären pulmonalen Endothel von TRPC6-gendefizienten Mäusen zu beobachten und beschränkte sich daher offenbar auf das Hochdrucksystem. Im Rahmen einer Kooperation mit der Forschergruppe von Norbert Weissmann zeigte sich im Mausmodell, dass die Hypoxie-induzierte Aktivierung von TRPC6-Kanälen in präkapillären Lungenarterien entscheidend ist für die Entstehung der akuten Hypoxie-induzierten pulmonalen Vasokonstriktion, einer Autoregulation der pulmonalen Gefäßmuskulatur, die auch als Euler-Liljestrand-Mechanismus bekannt ist (Weissmann et al., 2006). Darüber hinaus verbessert TRPC6 offenbar den alveolären Gasaustausch (Weissmann et al., 2006). Mittels elektrophysiologischer Ganzzellmessungen

von isolierten präkapillären, pulmonalen TRPC6-gendefizienten Gefäßmuskelzellen konnten wir auch auf Einzelzellebene zeigen, dass im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen Hypoxie keine Stromerhöhungen hervorruft, was darauf hinweist, dass Hypoxie zu TRPC6-Kanalaktivierungen führt. Die Beteiligung von TRPC6 an der akuten Hypoxie-induzierten pulmonalen Vasokonstriktion konnte inzwischen von der Forschergruppe von Michael Schäfer aus Leipzig (Deutschland) bestätigt werden (Urban et al., 2016).

Darüber hinaus waren auch in isolierten pulmonalen TRPC6-gendefizienten Endothelzellen im Gegensatz zu Wildtyp-Endothelzellen keine Hypoxie-induzierten Stromerhöhungen zu beobachten (Weissmann et al., 2012). Zusammengefasst konnten wir folgenden Hypoxie-induzierten Signalweg in mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen identifizieren: Hypoxie führt zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, wodurch es zur Aktivierung der PLC-Isoform  $\gamma$  und zur Inhibition der DAG-Kinase kommt. Dadurch akkumuliert DAG in pulmonalen Endothelzellen, was zur Aktivierung von endothelialen TRPC6-Kanälen führt. Der Calciumeinstrom durch TRPC6-Kanäle erhöht die Gefäßpermeabilität, sodass es zur Bildung von Lungenödemen kommt. Ein Modell zu diesem Signalweg ist in der Publikation Weissmann et al. (2012) in der dortigen Abbildung 7C abgebildet. In Kooperation mit der Forschergruppe von Norbert Weissmann zeigte sich im Tiermodell, dass diese Hypoxie-induzierte TRPC6-Aktivierung in Endothelzellen essentiell ist für den Pathomechanismus des Hypoxie-induzierten Lungenperfusionsschadens. Eine Sauerstoffunterversorgung der Lunge führt bei Reperfusion, z.B. nach einer Lungentransplantation, häufig zu schweren Lungenödemen. TRPC6-Kanalblocker könnten möglicherweise in Zukunft diesen Lungenreperfusionsschaden verhindern. Die Aktivierung von TRPC6-Kanälen durch reaktive Sauerstoffspezies wurde auch von anderen Forschergruppen zum Beispiel von Chengchun Tang aus Nanjing (China) und von He-Ping Ma aus Atlanta (USA) zusammen mit Xue-Qi Li aus Harbin (China) in Podozyten (Wang et al., 2009b; Liu et al., 2013) sowie von Rong Ma aus Fort Worth (USA) in Gefäßmuskelzellen (Ding et al., 2011) beschrieben.

Zudem konnten wir zeigen, dass TRPC6-Kanäle an der Entstehung der Lungenfibrose maßgeblich beteiligt sind (Hofmann et al., 2017). Dazu wurde in Mäusen eine experimentelle Lungenfibrose mit Bleomycin ausgelöst, einem metallbindenden Glykoprotein, welches durch DNA-Fragmentierung und DNA-Synthesehemmung zytotoxisch wirkt und als Chemotherapeutikum vor allem bei Hodentumoren, Plattenepithelkarzinomen und Lymphomen eingesetzt wird. Das lungentoxische Bleomycin (Cooper et al., 1988), ruft im Tiermodell eine Interleukin-abhängige Entzündungsreaktion, eine erhöhte Collagenproduktion und eine Einschränkung des Lungenvolumens hervor, was sich schließlich als Krankheitsbild der Lungenfibrose manifestiert (Phan et al., 1981; Phan et al., 1985; Gharaee-Kermani und Phan, 1997; Izbicki et al., 2002; Shi et al., 2014; Williamson et al., 2015; Braun et al., 2017). TRPC6-gendefiziente Mäuse zeigten nach der Behandlung mit Bleomycin signifikant höhere Überlebensraten als Wildtyp-Mäuse. Die höheren Überlebensraten der TRPC6-gendefizienten Mäuse waren teilweise auf eine geringere Collagenproduktion in der Lunge zurückzuführen. Die überlebenden TRPC6-gendefizienten Mäuse waren vor einer Lungenfibrose geschützt und zeigten fast normale Lungenfunktionen. Bei Wildtyp-Mäusen bewirkte die Bleomycin-Behandlung eine TRPC6-Hochregulation in Lungenfibroblasten, wodurch Stressfasern vermehrt gebildet und schließlich die Kontraktion der Lungenmuskulatur beeinträchtigt wurde. Darüber hinaus waren TRPC6-Kanäle für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verantwortlich, einem essentiellen Schritt bei der Entstehung der Lungenfibrose. Ähnliche Befunde zur Funktion von TRPC6 als Promotor der Myofibroblastendifferenzierung wurden auch von der Forschergruppe von Jeffery D. Molkentin aus Cincinnati (USA) berichtet (Davis et al., 2012). In dieser Untersuchung zeigten TRPC6-gendefiziente Mäuse eine Beeinträchtigung der dermalen und kardialen Wundheilung. Vermutlich spielt auch der TRPV4-Kanal bei der Entstehung der Lungenfibrose eine wichtige Rolle (Rahaman et al., 2014). Wahrscheinlich ist TRPC6 in frühen und TRPV4 eher in späteren Stadien an der Pathogenese der

Lungenfibrose beteiligt. Die Lungenfibrose, unter der in Deutschland ca. 14.000 Patienten leiden, gilt momentan noch als unheilbar und es werden dringend kausal wirkende Medikamente benötigt. Möglicherweise könnten TRPC6- und TRPV4-Kanalblocker als innovative, kausal wirkende Therapieansätze geeignet sein.

Zusammengefasst zeigen unsere Befunde, dass TRPC1-Proteine offenbar keine funktionellen homotetrameren Kanäle bilden, jedoch in heterotetrameren Kanalkomplexen mit anderen TRPC-Kanaluntereinheiten als Suppressoren der Calciumpermeabilität fungieren. Überdies konnten wir den Signalweg der rezeptorgesteuerten TRPC4- und TRPC5-Kanalaktivierung aufklären und zeigen, dass alle TRPC-Kanäle DAG-sensitiv sind und dass die Kanalaktivität von TRPC4 und TRPC5 dynamisch reguliert wird durch eine C-terminale Interaktion mit NHERF-Adapterproteinen. Außerdem identifizierten wir eine pathophysiologische Funktion von TRPC1 in präkapillären pulmonalen glatten Muskelzellen für die Entstehung der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie, weshalb TRPC1-Kanalblocker als neue Therapieoption in Betracht gezogen werden können. Zudem konnten wir zeigen, dass TRPC6-Kanäle in präkapillären pulmonalen glatten Muskelzellen die physiologische Funktion der Hypoxie-induzierten pulmonalen Vasokonstriktion (den sog. Euler-Liljestrand-Mechanismus) vermitteln. Darüber hinaus sind TRPC6-Kanäle an zwei pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. Zum einen vermitteln TRPC6-Kanäle im mikrovaskulären pulmonalen Endothel den ischämischen Lungenreperfusionsschaden nach Lungentransplantationen und zum anderen beteiligen sie sich in Lungenfibroblasten an der Entstehung der Lungenfibrose. Da die Behandlung mit TRPC6-Kanalblockern bei Patienten mit progredienter Lungenfibrose die gewünschte und wichtige pulmonalphysiologische Reaktion, den Euler-Liljestrand-Mechanismus, außer Kraft setzen könnte, ist diese Therapieoption höchstwahrscheinlich hinfällig. Jedoch bei den ex vivo Lungentransplantaten, wo der Euler-Liljestrand-Mechanismus nicht aktiv ist, stellt ein TRPC6-Kanalblocker eine sprunghafte Therapieoption als präventive Maßnahme gegen den Lungenreperfusionsschaden dar.

## 2.2 Welche Rolle spielen TRPC-Kationenkanäle für die Mechanosensorik in Blutgefäßen?

Blutgefäße haben die Fähigkeit, mechanische Kräfte wahrzunehmen und diese in biologische Reaktionen umzuwandeln. Zwei verschiedene mechanische Reize treten in Blutgefäßen auf: der Blutdruck und der Blutfluss (zusammengefasst in Hill-Eubanks et al. (2014)). Der Blutdruck führt zur Dehnung der Gefäßwand und dadurch zur mechanischen Aktivierung von Gefäßmuskelzellen, wodurch es zur glatten Muskelzellkontraktion und schließlich zur Vasokonstriktion kommt. Dieser Mechanismus ist als myogener Gefäßtonus oder Bayliss-Effekt - nach seinem Entdecker Sir William Maddock Bayliss (Bayliss, 1902) - bekannt und stellt einen Autoregulationsmechanismus von kleinen Arterien und Arteriolen dar, bei dem ein steigender Blutdruck eine Vasokonstriktion bewirkt (Davis und Hill, 1999). Diese Autoregulation dient der Konstanthaltung der kapillären Durchblutung von Organen und Geweben und wird unabhängig vom Endothel durch mechanosensitive glatte Gefäßmuskelzellen in diesen sogenannten Widerstandsgefäßen ausgelöst. Ein erhöhter intravasaler Druck bewirkt einen Calciumeinstrom, wodurch es zur Kontraktion der glatten Muskelzellen und letztlich zur Vasokonstriktion kommt. Neben dem Blutdruck stellt der Blutfluss ebenfalls einen mechanischen Stimulus dar. Der Blutfluss übt Scherkräfte auf das Endothel aus und führt dadurch zur Aktivierung von mechanosensitiven Endothelzellen. Die mechanische Endothelzellaktivierung bewirkt schließlich eine Vasodilatation, die als Fluss-induzierte Vasodilatation bezeichnet wird (Hull et al., 1986; Kuo et al., 1990; Pohl et al., 1991; Falcone et al., 1993). Dieser Mechanismus verursacht eine adäquate Durchblutungssteigerung und kann bei vorliegender Endothelschädigung z.B. im Rahmen einer Arteriosklerose (Davies et al., 2005) gestört sein.

Obwohl der myogene Gefäßtonus schon vor 115 Jahren beschrieben wurde, waren die Mechanosensoren in glatten Muskelzellen auf molekularer Ebene lange Zeit weitgehend unbekannt. Daher war ein Ziel dieses Habilitationsprojektes, die Mechanosensoren in Gefäßmuskelzellen zu identifizieren. Diverse Proteine, vor allem integrale Membranproteine, wurden als potentielle Mechanosensoren diskutiert (zusammengefasst in Storch et al. (2012b)). Unter anderem wurde vermutet, dass TRPC-Kanäle Mechanosensoren in der Gefäßmuskulatur darstellen. Da TRPC1 als mechanosensitiv galt (Maroto et al., 2005) und in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert ist, wurde die Rolle von TRPC1-Proteinen als Mechanosensoren in glatten Muskelzellen und deren Bedeutung für den myogenen Gefäßtonus genauer untersucht. Der myogene Gefäßtonus war in Gehirnarterien von TRPC1-gendefizienten Mäusen jedoch unverändert (Dietrich et al., 2007). Auch die biophysikalische Untersuchung von mechanisch stimulierten isolierten TRPC1-gendefizienten glatten Gefäßmuskelzellen aus Gehirnarterien ergab keine Unterschiede zu Wildtyp-Zellen (Dietrich et al., 2007). Demnach spielen TRPC1-Kanäle offenbar keine entscheidende Rolle für die Mechanosensorik oder -transduktion, was inzwischen auch im heterologen Expressionssystem von Philip Gottlieb aus Buffalo (USA) im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit Kollegen aus Galveston (USA), aus Valbonne (Frankreich) und aus Brisbane und Perth (Australien) bestätigt wurde (Gottlieb et al., 2008).

Auch die als mechanosensitiv beschriebenen TRPC5-Kanäle (Gomis et al., 2008; Jemal et al., 2014; Shen et al., 2015; Lau et al., 2016) waren nicht mechanosensitiv bei heterologer Überexpression. Erst die Koexpression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führte zu mechanisch induzierbaren Strömen (diese Daten sind nicht publiziert), woraus wir schlussfolgerten, dass TRPC5-Kanäle nicht intrinsisch mechanosensitiv sind. Das nächste Ziel war die Untersuchung der von mehreren Forschergruppen aus

Burlington (USA), aus Baltimore (USA), aus Freiburg (Deutschland) und aus Fukuoka (Japan) postulierten intrinsischen Mechanosensitivität von TRPC6-Kanälen (Welsh et al., 2002; Spassova et al., 2006; Huber et al., 2007; Inoue et al., 2009a). Dazu wurden von uns zunächst elektrophysiologische Untersuchungen im heterologen Überexpressionssystem durchgeführt. TRPC6-überexprimierende Zellen waren nicht mechanosensitiv, weder nach mechanischer Stimulation durch hypoosmolare Zellschwellung noch nach Applikation von Überdruck, Sog oder Zugkraft über die Patchpipette (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Die fehlende intrinsische Mechanosensitivität von TRPC6 wurde inzwischen ebenso wie die fehlende intrinsische Mechanosensitivität von TRPC1 in einer gemeinschaftlichen Forschungsarbeit bestätigt (Gottlieb et al., 2008). Zur Untersuchung der Bedeutung von TRPC6-Kanälen für den myogenen Gefäßtonus wurden zudem TRPC6-gendefiziente Mäuse herangezogen. Diese Mäuse wiesen einen erhöhten Blutdruck sowie einen erhöhten Tonus der glatten Gefäßmuskulatur auf, was sich in einer verstärkten Konstriktion von Aortenringen und in einem bereits bei niedrigeren intravasalen Drücken einsetzenden myogenen Gefäßtonus zeigte und auf eine kompensatorische Hochregulation von TRPC3-Kanälen in den untersuchten Zerebralarterien zurückzuführen war (Dietrich et al., 2005).

Überraschenderweise führte erst die Koexpression von  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren zu mechanisch induzierbaren TRPC6-Stromantworten (Mederos y Schnitzler et al., 2008), was darauf hindeutet, dass  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren mechanosensitiv sind. Diverse  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren wie der Histamin  $H_1$ -, der muskarinische  $M_5$ -, der Angiotensin II  $AT_1$ -, der Endothelin  $ET_A$ - und der Vasopressin  $V_{1A}$ -Rezeptor wurden von uns als intrinsisch mechanosensitiv identifiziert (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Außerdem zeigte sich, dass die mechanisch induzierte Rezeptoraktivierung Agonisten-unabhängig ist. Mechanosensitive Rezeptoren sind zudem von wichtiger physiologischer Bedeutung in der glatten Gefäßmuskulatur. Wir konnten zeigen, dass insbesondere der in der glatten Gefäßmuskulatur stark exprimierte mechanosensitive  $AT_1$ -Rezeptor den myogenen Gefäßtonus von Gehirnarterien aus Ratten (Mederos y Schnitzler et al., 2008) und von Nierenarterien (Mederos y Schnitzler et al., 2008) und Mesenterialarterien aus Mäusen (Blodow et al., 2014) vermittelt. Zusammengefasst sind mechanosensitive Rezeptoren und nicht TRPC6-Kanäle die Mechanosensoren in der glatten Gefäßmuskulatur. TRPC6-Kanäle stellen hier vermutlich Mechanotransduktoren dar, die nach mechanischer Rezeptoraktivierung über eine Signalkaskade aktiviert werden und daher als indirekt mechanosensitiv klassifiziert werden können. Zum Modell der Rolle von  $AT_1$ -Rezeptoren und TRPC6-Kanälen für den myogenen Tonus siehe Abbildung 1 in Mederos y Schnitzler et al. (2011).

Da Nager im Gegensatz zum Menschen zwei Isoformen des  $AT_1$ -Rezeptors besitzen, nämlich  $AT_{1A}$  und  $AT_{1B}$ , war das nächste Ziel unserer Forschungsarbeit, die Bedeutung beider Rezeptorisoformen für den myogenen Tonus mittels gendefizienter Mausmodelle genauer zu untersuchen. Der myogene Tonus war nur in  $AT_{1B}$ - jedoch nicht in  $AT_{1A}$ -Rezeptor-gendefizienten Mesenterialarterien bei physiologischen intravasalen Drücken reduziert (Blodow et al., 2014), was zeigt, dass der  $AT_{1B}$ -Rezeptor für den myogenen Gefäßtonus entscheidend ist. Die besondere Bedeutung der  $AT_{1B}$ -Rezeptoren für den myogenen Tonus wird dadurch unterstützt, dass  $AT_{1B}$ -Rezeptoren in kleinen Widerstandsgefäßen wesentlich stärker exprimiert sind als  $AT_{1A}$ -Rezeptoren (Blodow et al., 2014). Außerdem war der myogene Gefäßtonus bei Angiotensinogen-gendefizienten Mäusen, die kein Angiotensin II bilden können, und bei Wildtyp-Mäusen nach Inkubation der Gefäßabschnitte mit dem ACE-Hemmer Captopril, der ebenfalls die Angiotensin II-Bildung unterdrückt, unverändert (Blodow et al., 2014). Somit ist der myogene Tonus tatsächlich unabhängig vom endogenen Agonisten Angiotensin II. Entgegen unserer Erwartungen zeigten jedoch  $AT_{1A/1B}$ -doppelt-gendefiziente Mäuse einen erhöhten myogenen Tonus bei niedrigen intravasalen Drücken bis 70 mmHg und erst bei hohen intravasalen Drücken war

der myogener Tonus reduziert (Storch et al., 2015). Der erhöhte myogene Tonus war auf eine kompensatorische Hochregulation des  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten Cysteinyl-Leukotrien 1 (CysLT<sub>1</sub>) Rezeptors zurückzuführen. Eine CysLT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade mit zwei verschiedenen selektiven Antagonisten verringerte den myogenen Tonus sowohl bei AT<sub>1A/1B</sub>-doppelt-gendefizienten als auch bei Wildtyp-Arterien (Storch et al., 2015). Zudem zeigte sich, dass AT<sub>1B</sub>- und CysLT<sub>1</sub>-Rezeptoren gemeinsam für ca. 63% des myogenen Tonus verantwortlich sind. Das entspricht in etwa dem Anteil des gesamten  $G_{q/11}$ -Protein-vermittelten Signalwegs am myogenen Tonus (Storch et al., 2015). Demnach vermitteln AT<sub>1B</sub>- und CysLT<sub>1</sub>-Rezeptoren über den  $G_{q/11}$ -Signalweg ca. 63% des myogenen Tonus. Für die restlichen 37% des myogenen Tonus müssen demnach andere mechanisch induzierte Signalwege eine Rolle spielen. Eine schematische Darstellung dieser Befunde befindet sich in Abbildung 1 in Mederos y Schnitzler et al. (2016) und eine Übersicht zu anderen potentiellen Mechanosensoren ist in Abbildung 1 in Storch et al. (2012b) schematisch dargestellt.

Inzwischen wurde die intrinsische Mechanosensitivität des AT<sub>1</sub>-Rezeptors von uns und von drei weiteren unabhängigen Forschergruppen, Issei Komuro aus Chiba (Japan), von Howard A. Rockman aus Durham (USA) und von Scott Early aus Reno (USA), beschrieben, und zwar im heterologen Überexpressionssystem (Zou et al., 2004; Mederos y Schnitzler et al., 2008; Yasuda et al., 2008; Rakesh et al., 2010), im Herzen, wo sie eine mechanisch-induzierte Herzhypertrophie auslösen (Zou et al., 2004; Rakesh et al., 2010) und in der glatten Gefäßmuskulatur, wo sie am myogenen Gefäßtonus beteiligt sind (Mederos y Schnitzler et al., 2008; Blodow et al., 2014; Pires et al., 2017). Die Forschergruppe von Scott Early bestätigte kürzlich sogar die Rolle der AT<sub>1B</sub>-Rezeptorisoform für den myogenen Gefäßtonus (Pires et al., 2017). Auch der H<sub>1</sub>-Rezeptor wurde inzwischen von einer Forschergruppe aus den Niederlanden als mechanosensitiver Rezeptor verifiziert (Adjobo-Hermans et al., 2011). Darüber hinaus wurde ein weiterer  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelter Rezeptor als mechanosensitiv charakterisiert und zwar der Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor, der vermutlich einen Sensor für Scherkräfte in Endothelzellen darstellt (Chachisvilis et al., 2006). Auch die G<sub>s</sub>-gekoppelten Dopamin D<sub>5</sub>-Rezeptoren wurden als Sensoren für Scherkräfte in embryonalen Endothelzellen identifiziert (Abdul-Majeed und Nauli, 2011). Außerdem konnten die  $G_{q/11}$ - und G<sub>s</sub>-gekoppelten Parathormon (PTH<sub>1</sub>)-Rezeptoren in Knochenzellen als Sensoren für Scherkräfte charakterisiert werden (Zhang et al., 2009). Auch drei G<sub>i/o</sub>-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurden als mechanosensitiv gegenüber Scherkräften beschrieben, nämlich der Formylpeptid FPR<sub>1</sub>-Rezeptor in Neutrophilen, der die Ausstülpung von Pseudopodien verringert (Makino et al., 2006), der endotheliale Apelinrezeptor, der die Scherkraft-induzierte Polarisierung von Endothelzellen vermittelt (Kwon et al., 2016; Zhao et al., 2016) und der endotheliale Sphingosin-1-Phosphate S1P<sub>1</sub>-Rezeptor, der für das Scherkraft-induzierte Auswachsen von Gefäßen während der Angiogenese entscheidend ist (Jung et al., 2012a).

Überdies wurden kürzlich sogenannte Adhäsions-G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Mechanosensoren beschrieben. Vermutlich sind die Adhäsions-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sowohl für die Propriozeption in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Scholz et al., 2015) als auch für die mechanisch induzierte Skelettmuskelhypertrophie (White et al., 2014) sowie für die mechanisch induzierte Myelinisierung (Petersen et al., 2015) entscheidend. Adhäsions-G-Protein-gekoppelte Rezeptoren besitzen eine auffällig lange extrazelluläre und eine Autoproteolyse-induzierende Domäne, die ein N-terminales Fragment vom Rezeptor abspalten kann. Der lange N-Terminus ist in der extrazellulären Matrix verankert und es wird vermutet, dass dieser für die Wahrnehmung mechanischer Kräfte verantwortlich sein könnte. Zusätzlich gibt es wahrscheinlich C-terminale Verankerungen von Adhäsions-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit dem Zytoskelett (zusammengefasst in Scholz et al. (2016)), weshalb diese Rezeptoren naheliegende Kandidatenproteine für das Verankerungsmodell darstellen könnten. Die wachsende Zahl an Forschungsergebnissen zu mechanosensitiven G-Protein-

gekoppelten Rezeptoren zeigt, dass dieser Aktivierungsmechanismus in diversen Zellen und Geweben von Bedeutung ist. Es bleibt spannend, ob zukünftige Untersuchungen weitere physiologische oder pathophysiologische Funktionen von mechanosensitiven G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aufdecken können.

In einem weiteren Forschungsprojekt beschäftigten wir uns mit der Bestimmung von  $G_{i/o}$ - und  $G_s$ -Protein-vermittelten intrazellulären cAMP-Spiegelveränderungen mit Hilfe von FRET-basierten cAMP-Sensoren, die in Zukunft als Werkzeuge zur Charakterisierung der Mechanosensitivität von  $G_{i/o}$ - und  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren dienen sollen. Die biochemische Standardmethode zur cAMP-Spiegelbestimmung ist ein radioaktives Vielzellassay, das zwar gut etabliert, höchst sensitiv und reproduzierbar ist (Salomon, 1991), jedoch keine Bestimmung von lokalen cAMP-Spiegelveränderungen mit hoher zeitlicher Auflösung in einzelnen Zellen ermöglicht. Zur dynamischen Messung des cAMP-Spiegels in Einzelzellen eignen sich auf FRET basierende cAMP-Sensoren besser als radioaktive Vielzellassays. Die bereits etablierten FRET-Sensoren wurden allerdings bisher nur für die Bestimmung von  $G_s$ -Protein-vermittelten cAMP-Spiegelzunahmen eingesetzt (DiPilato et al., 2004; Nikolaev et al., 2004; Ponsioen et al., 2004; Klarenbeek et al., 2011; Klarenbeek et al., 2015), jedoch nicht für  $G_{i/o}$ -Protein vermittelte cAMP-Spiegelabnahmen, die deutlich schwerer zu bestimmen sind, da sie wesentlich geringer sind als die  $G_s$ -Protein vermittelten cAMP-Spiegelzunahmen. Unter Einsatz verschiedener cAMP-Sensoren und durch Optimierung der Versuchsbedingungen konnten wir zeigen, dass FRET-basierte cAMP-Sensoren tatsächlich zur Messung von cAMP-Spiegelabnahmen nach  $G_{i/o}$ -Stimulation geeignet sind (Storch et al., 2017b). Hierbei war noch nicht einmal eine künstliche Erhöhung des basalen intrazellulären cAMP-Spiegels durch Vorbehandlung der Zellen mit dem Adenylylcyclaseaktivator Forskolin oder mit dem nicht-selektiven Phosphodiesteraseinhibitor 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) erforderlich. Sowohl Forskolin als auch IBMX beeinflussen zahlreiche weitere Proteinfunktionen und Signalwege in der Zelle, die wiederum die Rezeptorfunktion beeinflussen können, weshalb die Vermeidung dieser beiden Substanzen einen großen Vorteil darstellt. Somit konnten wir eine valide und reliabele Messmethode ausarbeiten, um mit Hilfe von FRET-basierten cAMP-Sensoren  $G_{i/o}$ -Protein-vermittelte Abnahmen der intrazellulären cAMP-Konzentration mit hoher Sensitivität und sowohl mit zeitlicher als auch mit räumlicher Auflösung zu detektieren.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass TRPC-Kanäle in der glatten Gefäßmuskulatur nicht als Mechanosensoren sondern als Mechanotransduktoren fungieren. Im vaskulären System wurden glattemuskuläre  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelte  $AT_{1B}$ - und  $CysLT_1$ -Rezeptoren als direkte Mechanosensoren identifiziert, die in Abhängigkeit vom  $G_{q/11}$ -Protein-Signalweg für ca. 63% des myogenen Tonus verantwortlich sind. Demnach müssen andere, mechanisch induzierte Signalwege für die übrigen ca. 37% des myogenen Tonus verantwortlich sein. Zur Bedeutung von mechanosensitiven G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Endothel gibt es bereits erste Befunde verschiedener Forschergruppen. Allerdings steht die Untersuchung der Bedeutung von endothelialen mechanosensitiven Rezeptoren für die Fluss-induzierte Vasodilatation noch aus.

## 2.3 Welche Bedeutung haben TRPC-Kationenkanäle für die Mechanosensorik in Podozyten?

Der TRPC6-Kanal wurde wie bereits oben beschrieben (siehe Seite 6 und 11) als Mechanosensor in Podozyten diskutiert, da zum einen Mutationen im TRPC6-Gen mit Podozytenschädigungen und dem Krankheitsbild der FSGS assoziiert sind (Reiser et al., 2005; Winn et al., 2005; Heeringa et al., 2009; Santin et al., 2009; Zhu et al., 2009; Gigante et al., 2011; Chiluiza et al., 2013; Hofstra et al., 2013; Zhang et al., 2013; Riehle et al., 2016), und da zum anderen vermutet wird, dass TRPC6-Kanäle in Podozyten einen mechanosensitiven Ionenkanalkomplex mit Podocin bilden (Huber et al., 2007), der an der Entstehung einer Podozytenschädigung durch chronische Überdruckbelastung beteiligt sein könnte. Die Rekonstitution dieses Kanalkomplexes aus TRPC6 und den Schlitzmembranproteinen Podocin, Nephrin und CD2AP im heterologen Überexpressionssystem führte jedoch nicht zur Mechanosensitivität, so dass diese TRPC6-Kanalkomplexe zumindest im heterologen Expressionsmodell nicht mechanosensitiv sind (Forst et al., 2016). Wir konnten jedoch zeigen, dass primäre Kurzzeit-kultivierte und immortalisierte Podozyten mechanosensitiv sind und dass mechanische Stimulation Kanalströme mit einer charakteristischen, einwärtsgerichteten Stromspannungsbeziehung in Podozyten hervorrufen kann. Um herauszufinden, ob endogene TRPC6-Kanalkomplexe in Podozyten mechanosensitiv sind, wurden zunächst TRPC6-gendefiziente Mäuse untersucht. Es waren keine Unterschiede zwischen mechanisch induzierten Kationenströmen von Wildtyp- und TRPC6-gendefizienten Podozyten zu beobachten. Sogar TRPC1/3/6-dreifach-gendefiziente Podozyten zeigten gleich große mechanisch induzierte Stromantworten wie Wildtyp-Podozyten und zwar sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des unselektiven TRPC-Kanalblockers SKF-96365 (Forst et al., 2016). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass TRPC-Kanäle offenbar keine Rolle für die Mechanosensorik oder –transduktion in Podozyten spielen.

Da auch Mutationen im PLC $\epsilon$ -Gen (Hinkes et al., 2006) mit dem Krankheitsbild der FSGS assoziiert sind und TRPC6-Kanäle PLC-abhängig aktiviert werden, haben wir darüber hinaus die Bedeutung von PLC $\epsilon$  für die TRPC6-Aktivierung in Podozyten genauer untersucht. TRPC6 und PLC $\epsilon$  waren sowohl im heterologen Überexpressionssystem als auch in Podozyten kolokalisiert und bildeten Proteinkomplexe. In beiden Zellsystemen führten Agonisten-induzierte Rezeptoraktivierungen und G-Protein-Aktivierungen durch das nicht-hydrolysierbare Guanosintriphosphat (GTP)-Analogon GTP $\gamma$ S über die Patch-Pipette zur Zunahme von TRPC6-Strömen (Kalwa et al., 2015). Die Herunterregulationen sowohl von PLC $\epsilon$  als auch von der am häufigsten exprimierten PLC-Variante PLC $\beta$ 1 verursachten jeweils Stromreduktionen um etwa 50%. Dieser Befund deutet darauf hin, dass beide PLC-Varianten gleichermaßen an der TRPC6-Kanalaktivierung beteiligt sind und dass beide Signalwege additiv wirken. Eine TRPC6-Patientenmutante, die mit dem Auftreten von FSGS assoziiert ist, war ebenfalls PLC $\epsilon$ - und PLC $\beta$ 1-abhängig aktivierbar. Insgesamt sind PLC $\epsilon$  und PLC $\beta$ 1 beide zu gleichen Teilen an der rezeptorgesteuerten TRPC6-Kanalaktivierung beteiligt (Kalwa et al., 2015). Somit konnte keine einzigartige Funktion von PLC $\epsilon$  in Podozyten identifiziert werden, die den Pathomechanismus der durch eine PLC $\epsilon$ -Mutation ausgelösten FSGS erklären könnte, so dass hier in Zukunft weitere Untersuchungen zur Aufklärung dieses Pathomechanismus notwendig sind.

Unsere Daten zur fehlenden Mechanosensitivität von podozytären TRPC6-Kanälen stehen im Gegensatz zu den Befunden aus der Forschergruppe von Stuart Dryer aus Houston (USA) (Anderson et al., 2013). Die in dieser Arbeit dargestellten mechanisch induzierten Ströme in Podozyten wurden als

TRPC6-Ströme bezeichnet. Sie weisen jedoch eine starke Auswärtsrektifizierung im Gegensatz zu den von uns beobachteten mechanisch induzierten Strömen auf. Ähnliche auswärtsrektifizierende Ströme konnten wir nur in nicht mit Chloridkanalblockern vorbehandelten Podozyten beobachten. Vermutlich führen mechanische Stimulationen zur Aktivierung von endogenen Volumen-regulierten Chloridkanälen (*volume regulated anion channels* [VRACs]) in Podozyten (Pedersen et al., 2016). Da diese VRAC-Ströme in unseren Händen die unselektiven Kationenströme in Podozyten überlagerten, wurden alle Messungen in Anwesenheit von Chloridkanalblockern durchgeführt. Folglich ist nicht auszuschließen, dass die konträren Befunde der Forschergruppe von Stuart Dryer sich dadurch erklären lassen, dass in deren Untersuchungen hauptsächlich Chlorid- und nicht Kationenströme gemessen wurden.

Ebenso wie TRPC6-Kanäle konnten wir  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren als Mechanosensoren in Podozyten ausschließen. Eine Blockade des gesamten  $G_{q/11}$ -Signalwegs hatte keinen Einfluss auf die beobachteten mechanisch induzierten Stromanstiege und Calciumeinströme (Forst et al., 2016). Demnach scheint der  $G_{q/11}$ -Protein/TRPC-Signalweg keine Bedeutung für die Mechanosensorik oder -transduktion in Podozyten zu haben. Stattdessen fanden wir heraus, dass unselektive, trimerisch aufgebaute, Adenosintriphosphat (ATP)-gesteuerte ( $P_2$ )-Kationenkanäle aus der X-Unterfamilie ( $P_2X$ -Kanäle) stark in Podozyten exprimiert sind und sowohl durch Agonistenstimulation mit ATP als auch durch mechanische Stimulation aktiviert werden. Beide Stimuli führten zu charakteristischen einwärtsrektifizierenden Stromspannungsverläufen. Durch den Einsatz verschiedener selektiver und unselektiver  $P_2X$ -Kanallocker konnten schließlich  $P_2X_4$ -Kanäle als mechanisch aktivierbar identifiziert werden (Forst et al., 2016). Dieser Befund wurde mit Hilfe von isolierten Podozyten aus einer  $P_2X_4$ -gendefizienten Mauslinie bestätigt.  $P_2X_4$ -Kanäle waren jedoch nicht intrinsisch mechanosensitiv, weder im heterologen Expressionssystem noch in Podozyten, sondern sie wurden durch extrazelluläres ATP aktiviert, das durch mechanische Stimulation freigesetzt wurde (Forst et al., 2016). Somit stellen  $P_2X_4$ -Kanäle in Podozyten offenbar keine Mechanosensoren, sondern Mechanotransduktoren dar.

Auch diese Ergebnisse decken sich nicht mit den Ergebnissen einer weiteren Arbeit aus der Forschergruppe von Stuart Dryer (Roshanravan und Dryer, 2014). In dieser Publikation wurde Suramin in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eingesetzt, die ausreichend ist, um  $P_2X_1$ -,  $P_2X_2$ -,  $P_2X_3$ -,  $P_2X_5$ - und  $P_2X_6$ -Kanäle sowie  $P_2Y$ -Rezeptoren zu blockieren. Suramin verursachte ebenso wie ein PLC-Inhibitor eine Stromreduktion, woraus eine Beteiligung von  $P_2Y$ -Rezeptoren abgeleitet wurde. Die Forschergruppe kam zu dem Schluss, dass eine Freisetzung von ATP zur Aktivierung von  $P_2Y$ -Rezeptoren führt, wodurch wiederum TRPC6-Kanäle aktiviert werden. In unseren Händen hingegen hatte Suramin in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  keinerlei Einfluss auf die Stromhöhe. Daraus schlussfolgerten wir, dass die mechanisch induzierten Ströme in Podozyten unabhängig sind sowohl von  $P_2Y$ -Rezeptoren, als auch von  $P_2X_1$ -,  $P_2X_2$ -,  $P_2X_3$ -,  $P_2X_5$ - und  $P_2X_6$ -Kanälen. Zudem konnten wir mit Hilfe eines potenten und selektiven  $G_{q/11}$ -Protein-Inhibitors zeigen, dass der  $G_{q/11}$ -Protein-Signalweg nicht an der Mechanosensorik oder -transduktion in Podozyten beteiligt ist (Forst et al., 2016). Diese Befunde und der Einsatz des selektiven  $P_2X_4$ -Kanallockers 5-(3-Bromophenyl)-1,3-dihydro-2H-benzofuro[3,2-e]-1,4-diazepin-2-one (5-BDBD), der in unseren Händen die mechanisch induzierten Ströme unterdrückte, führte schließlich zur Identifizierung von  $P_2X_4$ -Kanälen als Mechanotransduktoren in Podozyten. Auffällig sind auch in dieser Forschungsarbeit die dargestellten auswärtsrektifizierenden Stromspannungsbeziehungen. Während bei Roshanravan und Dryer (2014) ATP-induzierte auswärtsrektifizierende Ströme zu sehen sind, die als TRPC6-Ströme aufgefasst wurden, konnten wir bei unseren Experimenten nur einwärtsrektifizierende Ströme beobachten. Vermutlich sind diese gegensätzlichen Befunde wiederum durch den fehlenden Einsatz von Chloridkanalblockern in der Forschungsarbeit von Roshanravan und Dryer (2014) zu erklären. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass Chlorid- statt Kationenströme gemessen wurden.

Zusätzlich wurde von uns die Rolle von Cholesterol für die Mechanosensitivität von Podozyten untersucht. Cholesterol ist ein wichtiger, die Fluidität der Zellmembran bestimmender Zellmembranbestandteil, der für die Exozytose entscheidend ist (Lang, 2007). Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen Cholesterolgehalt und Podozytenschädigung vermutet (Fornoni et al., 2014). Die Depletion von Cholesterol in Podozyten verringerte die Mechanosensitivität, während die ATP-induzierten  $P_2X_4$ -Kationenströme unbeeinflusst blieben (Forst et al., 2016). Daher erhöht Cholesterol offenbar die Mechanosensitivität von Podozyten.

Auch die Rolle des Schlitzmembranproteins Podocin wurde von uns genauer analysiert, da Mutationen im Podocin-Gen FSGS ebenfalls mit FSGS assoziiert sind (Tsukaguchi et al., 2002; Monteiro et al., 2006; Tonna et al., 2008). Die podozytenspezifische Herunterregulation der Genexpression von Podocin führte zum Verlust der mechanisch induzierten Stromantworten in Podozyten (Forst et al., 2016). Daher spielt Podocin offenbar eine wichtige Rolle für die Mechanosensorik oder -transduktion in Podozyten, was in zukünftigen Untersuchungen genauer analysiert werden sollte. Auch dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Befunden aus der Forschergruppe von Stuart Dryer (Anderson et al., 2013). Seine Forschergruppe führte die Herunterregulation der Podocinexpression mittels siRNA zu erhöhten, mechanisch induzierten Stromantworten. Diese Unterschiede könnten außer an den nicht unterdrückten endogenen VRAC-Strömen auch durch unspezifische Nebeneffekte der verwendeten siRNA auf die Expression anderer Proteine erklärt werden. Überdies stehen diese Ergebnisse in auffälligem Gegensatz zu den Ergebnissen, dass TRPC6-Kanäle erst im Komplex mit Podocin mechanosensitiv werden (Huber et al., 2007), so dass die Herunterregulation von Podocin die Mechanosensitivität verringern statt erhöhen sollte. Dieser eklatante Widerspruch wurde in der Arbeit von Anderson et al. (2013) jedoch nicht diskutiert. Alles in allem sind die Ergebnisse der beiden Forschungsarbeiten aus der Forschergruppe von Stuart Dryer zur Rolle von TRPC6 in Podozyten (Anderson et al., 2013; Roshanravan und Dryer, 2014) aufgrund von messmethodischen Mängeln und von Fehlinterpretationen hinsichtlich der beobachteten Ströme in Podozyten sehr fraglich.

Darüber hinaus wurde von uns die Auswirkung von mechanischer Belastung auf das Aktinzytoskelett von Podozyten untersucht, da bei diesen hochdifferenzierten Zellen das Aktinzytoskelett eng reguliert ist und eine Desorganisation des Zytoskeletts eine beginnende Podozytenschädigung kennzeichnet (siehe auch Seite 10) (Endlich und Endlich, 2006; Faul et al., 2007; Mathieson, 2010; Endlich und Endlich, 2012; Endlich et al., 2017). Dazu wurden primäre Podozyten auf Silikonmembranen kultiviert und einer zweistündigen, zyklischen und radialen Membrandehnung ausgesetzt. Diese mechanische Belastung führte zu Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts, die durch Applikation des selektiven  $P_2X_4$ -Kanalblockers 5-BDBD signifikant reduziert werden konnten (Forst et al., 2016).

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass die Mechanosensorik und -transduktion in Podozyten unabhängig ist von TRPC-Kanälen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Stattdessen führt Membrandehnung über eine Vesikelverschmelzung zu einer ATP-Freisetzung und zur nachfolgenden Aktivierung von mechanotransduktiven unselektiven  $P_2X_4$ -Kanälen. Der Calciumeinstrom durch diese Kanäle verursacht eine Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts und führt letztlich zu einer Podozytenschädigung, die durch den  $P_2X_4$ -Kanalblocker 5-BDBD zumindest teilweise verhindert werden kann. Ein Modell für die Mechanotransduktion in Podozyten und für die Rolle von  $P_2X_4$ -Kanälen ist in der Publikation Forst et al. (2016) in der Abbildung 6J dargestellt. Möglicherweise können in Zukunft  $P_2X_4$ -Kanalblocker zur Behandlung von mechanisch induzierten Podozytenschädigungen z.B. durch glomeruläre Hypertension (Pullen und Fornoni, 2016; Endlich et al., 2017) therapeutisch eingesetzt werden.  $P_2X_4$ -Kanalblocker werden derzeit bereits als Zielstrukturen für Analgetika diskutiert (zusammengefasst in Stokes et al. (2017)), da  $P_2X_4$ -Kanäle stark in Neuronen und Gliazellen exprimiert

sind und sowohl neuropathische Schmerzen (Coull et al., 2005; Ulmann et al., 2008; Tsuda et al., 2009) als auch die Neuroinflammation (Ulmann et al., 2010) verstärken.

Eine mechanotransduktorische Rolle von  $P_2X_4$ -Kanälen wurde bereits in Endothelzellen beschrieben (Yamamoto et al., 2000; Yamamoto et al., 2006). Bei diesen Zellen führten Scherkräfte zur Freisetzung von ATP (Yamamoto et al., 2000). Auch im heterologen Expressionssystem in Oozyten wurden  $P_2X_4$ -Kanäle als Mechanotransduktoren charakterisiert (Yamamoto et al., 2000; Kessler et al., 2011). Die Untersuchung  $P_2X_4$ -gendifizienter Mäusen zeigte zudem eine verringerte Blutfluss-induzierte Vasodilatation und einen erhöhten Blutdruck (Yamamoto et al., 2006), der sich vermutlich auf die geringere Fluss-induzierte Vasodilatation in diesen Tieren zurückführen ließ. Trotz des chronisch erhöhten Blutdrucks wurde bisher bei  $P_2X_4$ -gendifizienten Mäusen keine Nierenschädigung beschrieben. Möglicherweise wirkt das Fehlen von  $P_2X_4$ -Kanälen im kompletten Mausorganismus protektiv auf die Podozytenfunktion. Diese protektive Wirkung muss im Detail noch untersucht werden. Kürzlich konnte bei der ersten Maus mit endothelspezifischer und induzierbarer Herunterregulation von  $P_2X_4$ -Kanälen eine stärkere ischämische Nervenschädigung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet werden (Ozaki et al., 2016). Im Endothel von Gehirnarterien wirken  $P_2X_4$ -Kanäle daher vermutlich neuroprotektiv und schützen vor einer ischämischen Nervenschädigungen z.B. nach einem Schlaganfall (Ozaki et al., 2016). Mit Hilfe von podozytenspezifischen, induzierbaren  $P_2X_4$ -gendifizienten Mäusen könnte die Funktion von  $P_2X_4$ -Kanälen in Podozyten in Zukunft genauer untersucht werden.

Zusammengefasst sind in Podozyten weder TRPC6-Kanäle noch  $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren für die Mechanosensorik oder -transduktion von Bedeutung. Stattdessen stellen purinerge  $P_2X_4$ -Kationenkanäle Mechanotransduktoren in Podozyten dar und werden durch extrazelluläres ATP aktiviert, das durch mechanische Stimulation freigesetzt wird. Die Mechanosensoren in Podozyten wurden bisher noch nicht identifiziert. Mechanische Belastung bewirkt über  $P_2X_4$ -Kanalaktivierung eine Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts, die durch  $P_2X_4$ -Kanalblocker zumindest teilweise verhindert werden kann. Somit könnten  $P_2X_4$ -Kanalblocker innovative Therapieoptionen zur Behandlung von mechanisch induzierten Podozytenschäden bei hypertensiver Nephropathie darstellen.

### 3 Ausblick

Die gewonnenen Erkenntnisse aus diesem Habilitationsprojekt erweitern das Wissen über die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Rezeptoren und Kationenkanälen aus der TRPC- und  $P_2X$ -Kationenkanalfamilie. Einige mechanistische und weitere medizinisch relevante Aspekte sollten in zukünftigen Forschungsprojekten genauer untersucht werden. Insbesondere sollte in Zukunft auf einen systembiologischen Ansatz Wert gelegt werden, der Quantifizierungen von Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken von Kanälen und genaue zeitliche und räumliche Analysen zu deren Signaltransduktionskaskaden in den Vordergrund stellt.

Es wäre lohnenswert, weitere mechanistische Aspekte der Aktivierung von TRPC-Kanälen genauer zu analysieren. Zum einen sollten die von uns beobachteten Konformationsänderungen bei TRPC-Kanälen weiter detailliert analysiert werden. Neben Einzelkanaluntersuchungen könnte die Methode des intramolekularen dynamischen FRET eingesetzt werden. Diese Untersuchungen könnten Aufschluss geben über die verschiedenen aktiven und inaktiven Kanalkonformationen, die bisher aufgrund der fehlenden Kristallstrukturanalysen von TRPC-Kanälen nicht bekannt sind. Mit Hilfe von Lichtschaltbaren DAG-Derivaten lassen sich zudem von Einwasch- und Auswascheffekten unbeeinflusste, exakte Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken bestimmen, die das Schaltverhalten der TRPC-Kanäle genau beschreiben, was sonst nur über aufwendige Einzelkanalanalysen möglich wäre. Zum anderen sollte die DAG-Bindestelle durch gezielte Aminosäureaustausche aufgefunden werden. Hierbei werden die Kanalkonstrukte für den intramolekularen dynamischen FRET hilfreich sein.

Die Mechanosensorik von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sollte unbedingt auf der molekularen Ebene weiter untersucht werden. Hierbei sollte eine systematische Untersuchung durchgeführt werden mit dem Ziel, einzelne Aminosäuren oder Aminosäurebereiche zu identifizieren, die für die mechanosensorische Funktion verantwortlich sind. Hierzu könnte die Methode des intramolekularen dynamischen FRET helfen, Änderungen von Rezeptorkonformationen zu detektieren. Des Weiteren sollte der Einfluss der Zellmembran mit ihrer Zusammensetzung und ihren chemo-physikalischen Eigenschaften, sowie der Einfluss des Zytoskeletts auf die molekularen mechanoperzeptorischen Eigenschaften von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bestimmt werden. Diese Untersuchungen könnten Aufschluss geben, ob bei Rezeptoren das Membran- oder das Verankerungsmodell gültig ist. Zudem sollte die Rolle von mechanosensitiven G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in verschiedenen Geweben und Organen systematischer und detaillierter erforscht werden.

Die Mechanosensitivität von Podozyten in Bezug auf molekulare und pathophysiologische Aspekte ist weitgehend unverstanden und eine umfassende Erforschung dieser Aspekte ist von wichtiger medizinischer Relevanz, um in Zukunft bei chronischer mechanischer Überlastung der Niere eine kausale protektive Therapie zu etablieren. Zum einen stellt sich auf der molekularen Ebene die Frage nach der Identität des Mechanosensors. Möglicherweise beteiligt sich Podocin an einem mechanosensorischen Proteinkomplex. Zum anderen sollte die pathophysiologische Rolle von  $P_2X_4$ -Kanälen und der protektive Effekt von  $P_2X_4$ -Kanalblockern auf Podozyten im Tiermodell sowohl bei Wildtyp- als auch bei podozytenspezifischen  $P_2X_4$ -gendefizienten Mäusen genauer untersucht werden.

## 4 Literatur

Abdul-Majeed, S., and Nauli, S.M. (2011). Dopamine receptor type 5 in the primary cilia has dual chemo- and mechano-sensory roles. *Hypertension* 58, 325-331.

Adebisi, A., Zhao, G., Narayanan, D., Thomas-Gatewood, C.M., Bannister, J.P., and Jaggar, J.H. (2010). Isoform-selective physical coupling of TRPC3 channels to IP3 receptors in smooth muscle cells regulates arterial contractility. *Circ Res* 106, 1603-1612.

Adjobo-Hermans, M.J., Goedhart, J., van Weeren, L., Nijmeijer, S., Manders, E.M., Offermanns, S., and Gadella, T.W., Jr. (2011). Real-time visualization of heterotrimeric G protein Gq activation in living cells. *BMC Biol* 9, 32.

Akbulut, Y., Gaunt, H.J., Muraki, K., Ludlow, M.J., Amer, M.S., Bruns, A., Vasudev, N.S., Radtke, L., Willot, M., Hahn, S., Seitz, T., Ziegler, S., Christmann, M., Beech, D.J., and Waldmann, H. (2015). (-)-Englerin A is a potent and selective activator of TRPC4 and TRPC5 calcium channels. *Angew Chem Int Ed Engl* 54, 3787-3791.

Alvarez, J., Coulombe, A., Cazorla, O., Ugur, M., Rauzier, J.M., Magyar, J., Mathieu, E.L., Boulay, G., Souto, R., Bideaux, P., Salazar, G., Rassendren, F., Lacampagne, A., Fauconnier, J., and Vassort, G. (2008). ATP/UTP activate cation-permeable channels with TRPC3/7 properties in rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H21-28.

Ambudkar, I.S. (2007). TRPC1: a core component of store-operated calcium channels. *Biochemical Society transactions* 35, 96-100.

Ambudkar, I.S., de Souza, L.B., and Ong, H.L. (2017). TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. *Cell Calcium* 63, 33-39.

Anderson, M., Kim, E.Y., Hagmann, H., Benzing, T., and Dryer, S.E. (2013). Opposing effects of podocin on the gating of podocyte TRPC6 channels evoked by membrane stretch or diacylglycerol. *Am J Physiol Cell Physiol* 305, C276-289.

Antigny, F., Girardin, N., and Frieden, M. (2012). Transient receptor potential canonical channels are required for in vitro endothelial tube formation. *J Biol Chem* 287, 5917-5927.

Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Faul, C., Tomino, Y., Kim, K., and Mundel, P. (2006). Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 8, 485-491.

Bardell, T.K., and Barker, E.L. (2010). Activation of TRPC6 channels promotes endocannabinoid biosynthesis in neuronal CAD cells. *Neurochem Int* 57, 76-83.

Bayliss, W.M. (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* 28, 220-231.

Becker, E.B., Oliver, P.L., Glitsch, M.D., Banks, G.T., Achilli, F., Hardy, A., Nolan, P.M., Fisher, E.M., and Davies, K.E. (2009). A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 6706-6711.

Ben-Mabrouk, F., and Tryba, A.K. (2010). Substance P modulation of TRPC3/7 channels improves respiratory rhythm regularity and ICAN-dependent pacemaker activity. *The European journal of neuroscience* 31, 1219-1232.

Bergdahl, A., Gomez, M.F., Wihlborg, A.K., Erlinge, D., Eyjolfson, A., Xu, S.Z., Beech, D.J., Dreja, K., and Hellstrand, P. (2005). Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: correlation with store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C872-880.

Berna-Ero, A., Albarran, L., Dionisio, N., Redondo, P.C., Alonso, N., Gomez, L.J., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2014). The canonical transient receptor potential 6 (TRPC6) channel is sensitive to extracellular pH in mouse platelets. *Blood cells, molecules & diseases* 52, 108-115.

Bezrukov, S.M. (2000). Functional consequences of lipid packing stress. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5, 237-243.

Bhattacharya, R., Wang, E., Dutta, S.K., Vohra, P.K., E, G., Prakash, Y.S., and Mukhopadhyay, D. (2012). NHERF-2 maintains endothelial homeostasis. *Blood* 119, 4798-4806.

- Bianchi, L. (2007). Mechanotransduction: touch and feel at the molecular level as modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular neurobiology* *36*, 254-271.
- Birnbaumer, L. (2009). The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *49*, 395-426.
- Blodow, S., Schneider, H., Storch, U., Wizemann, R., Forst, A.L., Gudermann, T., and Mederos y Schnitzler, M. (2014). Novel role of mechanosensitive AT1B receptors in myogenic vasoconstriction. *Pflugers Arch* *466*, 1343-1353.
- Bollimuntha, S., Singh, B.B., Shavali, S., Sharma, S.K., and Ebadi, M. (2005). TRPC1-mediated inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion neurotoxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biol Chem* *280*, 2132-2140.
- Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M.C., Niaudet, P., and Antignac, C. (2000). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* *24*, 349-354.
- Braun, R.K., Broymann, O., Braun, F.M., Brinkman, J.A., Clithero, A., Modi, D., Pegelow, D.F., Eldridge, M., and Teodorescu, M. (2017). Chronic intermittent hypoxia worsens bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Respiratory physiology & neurobiology*.
- Brechard, S., Melchior, C., Plancon, S., Schenten, V., and Tschirhart, E.J. (2008). Store-operated Ca<sup>2+</sup> channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. *Cell Calcium* *44*, 492-506.
- Cantor, R.S. (1997). Lateral pressures in cell membranes: A mechanism for modulation of protein function. *Journal of Physical Chemistry B* *101*, 1723-1725.
- Cantor, R.S. (1999). The influence of membrane lateral pressures on simple geometric models of protein conformational equilibria. *Chem Phys Lipids* *101*, 45-56.
- Carson, C., Raman, P., Tullai, J., Xu, L., Henault, M., Thomas, E., Yeola, S., Lao, J.M., McPate, M., Verkuyl, J.M., Marsh, G., Sarber, J., Amaral, A., Bailey, S., Lubicka, D., Pham, H., Miranda, N., Ding, J., Tang, H.M., Ju, H.S., Tranter, P., Ji, N., Krastel, P., Jain, R.K., Schumacher, A.M., Loureiro, J.J., George, E., Berellini, G., Ross, N.T., Bushell, S.M., Erdemli, G., and Solomon, J.M. (2015). Englerin A Agonizes the TRPC4/C5 Cation Channels to Inhibit Tumor Cell Line Proliferation. *PLoS one* *10*.
- Chachisvilis, M., Zhang, Y.L., and Frangos, J.A. (2006). G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 15463-15468.
- Chalfie, M. (2009). Neurosensory mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 44-52.
- Chalfie, M., and Au, M. (1989). Genetic control of differentiation of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Science* *243*, 1027-1033.
- Chalfie, M., and Sulston, J. (1981). Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* *82*, 358-370.
- Chen, H.C., Wang, C.H., Shih, C.P., Chueh, S.H., Liu, S.F., Chen, H.K., and Lin, Y.C. (2015). TRPC1 is required for survival and proliferation of cochlear spiral ganglion stem/progenitor cells. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* *79*, 2290-2294.
- Cheng, K.T., Liu, X., Ong, H.L., and Ambudkar, I.S. (2008). Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels. *J Biol Chem* *283*, 12935-12940.
- Cheng, K.T., Liu, X., Ong, H.L., Swaim, W., and Ambudkar, I.S. (2011). Local Ca<sup>2+</sup> entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals required for specific cell functions. *PLoS biology* *9*, e1001025.
- Chiluiza, D., Krishna, S., Schumacher, V.A., and Schlondorff, J. (2013). Gain-of-function mutations in transient receptor potential C6 (TRPC6) activate extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2). *J Biol Chem* *288*, 18407-18420.
- Christensen, A.P., and Corey, D.P. (2007). TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci* *8*, 510-521.
- Cooper, J.A., Jr., Zitnik, R.J., and Matthay, R.A. (1988). Mechanisms of drug-induced pulmonary disease. *Annual review of medicine* *39*, 395-404.

- Coull, J.A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* *438*, 1017-1021.
- Cunningham, R., Biswas, R., Steplock, D., Shenolikar, S., and Weinman, E. (2010). Role of NHERF and scaffolding proteins in proximal tubule transport. *Urological research* *38*, 257-262.
- Cuppens, H., and Cassiman, J.J. (2004). CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *International journal of andrology* *27*, 251-256.
- Dasgupta, I., Porter, C., Innes, A., and Burden, R. (2007). "Benign" hypertensive nephrosclerosis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* *100*, 113-119.
- Davies, P.F., Spaan, J.A., and Krams, R. (2005). Shear stress biology of the endothelium. *Annals of biomedical engineering* *33*, 1714-1718.
- Davis, J., Burr, A.R., Davis, G.F., Birnbaumer, L., and Molkenin, J.D. (2012). A TRPC6-Dependent Pathway for Myofibroblast Transdifferentiation and Wound Healing In Vivo. *Developmental Cell* *23*, 705-715.
- Davis, M.J., and Hill, M.A. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* *79*, 387-423.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* *13*, 4429-4434.
- Dichter, M.A., and Ayala, G.F. (1987). Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. *Science* *237*, 157-164.
- Dietrich, A., Kalwa, H., Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Salanova, B., Pinkenburg, O., Dubrovskaya, G., Essin, K., Gollasch, M., Birnbaumer, L., and Gudermann, T. (2007). Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflügers Arch* *455*, 465-477.
- Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T., and Gudermann, T. (2003). N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem* *278*, 47842-47852.
- Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaya, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., Essin, K., Pinkenburg, O., Luft, F.C., Gudermann, T., and Birnbaumer, L. (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol* *25*, 6980-6989.
- Ding, Y., Winters, A., Ding, M., Graham, S., Akopova, I., Muallem, S., Wang, Y., Hong, J.H., Gryczynski, Z., Yang, S.H., Birnbaumer, L., and Ma, R. (2011). Reactive oxygen species-mediated TRPC6 protein activation in vascular myocytes, a mechanism for vasoconstrictor-regulated vascular tone. *J Biol Chem* *286*, 31799-31809.
- Dino, M.R., Schuerger, R.J., Liu, Y., Slater, N.T., and Mugnaini, E. (2000). Unipolar brush cell: a potential feedforward excitatory interneuron of the cerebellum. *Neuroscience* *98*, 625-636.
- Dino, M.R., Willard, F.H., and Mugnaini, E. (1999). Distribution of unipolar brush cells and other calretinin immunoreactive components in the mammalian cerebellar cortex. *Journal of neurocytology* *28*, 99-123.
- DiPilato, L.M., Cheng, X., and Zhang, J. (2004). Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 16513-16518.
- Endlich, K., Kliewe, F., and Endlich, N. (2017). Stressed podocytes-mechanical forces, sensors, signaling and response. *Pflügers Arch*.
- Endlich, N., and Endlich, K. (2006). Stretch, tension and adhesion - adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes. *European journal of cell biology* *85*, 229-234.
- Endlich, N., and Endlich, K. (2012). The challenge and response of podocytes to glomerular hypertension. *Seminars in nephrology* *32*, 327-341.
- Erac, Y., Selli, C., and Tosun, M. (2016). TRPC1 ion channel gene regulates store-operated calcium entry and proliferation in human aortic smooth muscle cells. *Turk J Biol* *40*, 1336-1344.
- Fabian, A., Fortmann, T., Bulk, E., Bomben, V.C., Sontheimer, H., and Schwab, A. (2011). Chemotaxis of MDCK-F cells toward fibroblast growth factor-2 depends on transient receptor potential canonical channel 1. *Pflügers Arch* *461*, 295-306.

- Fabian, A., Fortmann, T., Dieterich, P., Riethmuller, C., Schon, P., Mally, S., Nilius, B., and Schwab, A. (2008). TRPC1 channels regulate directionality of migrating cells. *Pflugers Arch* 457, 475-484.
- Falcone, J.C., Kuo, L., and Meininger, G.A. (1993). Endothelial cell calcium increases during flow-induced dilation in isolated arterioles. *Am J Physiol* 264, H653-659.
- Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K., and Mundel, P. (2007). Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 17, 428-437.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179-185.
- Fornoni, A., Merscher, S., and Kopp, J.B. (2014). Lipid biology of the podocyte--new perspectives offer new opportunities. *Nat Rev Nephrol* 10, 379-388.
- Forst, A.L., Olteanu, V.S., Mollet, G., Wlodkowski, T., Schaefer, F., Dietrich, A., Reiser, J., Gudermann, T., Mederos, Y.S.M., and Storch, U. (2016). Podocyte Purinergic P2X4 Channels Are Mechanotransducers That Mediate Cytoskeletal Disorganization. *J Am Soc Nephrol* 27, 848-862.
- Fraser, D.D., and MacVicar, B.A. (1996). Cholinergic-dependent plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 16, 4113-4128.
- Freichel, M., Suh, S.H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2001). Lack of an endothelial store-operated  $Ca^{2+}$  current impairs agonist-dependent vasorelaxation in *TRP4<sup>-/-</sup>* mice. *Nat Cell Biol* 3, 121-127.
- Fronius, M., and Clauss, W.G. (2008). Mechano-sensitivity of ENaC: may the (shear) force be with you. *Pflugers Arch* 455, 775-785.
- Gao, Y., Cao, E., Julius, D., and Cheng, Y. (2016). TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature* 534, 347-351.
- Ge, R., Tai, Y., Sun, Y., Zhou, K., Yang, S., Cheng, T., Zou, Q., Shen, F., and Wang, Y. (2009). Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis. *Cancer Lett* 283, 43-51.
- Georgescu, M.M., Morales, F.C., Molina, J.R., and Hayashi, Y. (2008). Roles of NHERF1/EBP50 in cancer. *Curr Mol Med* 8, 459-468.
- Gharaee-Kermani, M., and Phan, S.H. (1997). Lung interleukin-5 expression in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 16, 438-447.
- Ghishan, F.K., and Kiela, P.R. (2012). Small intestinal ion transport. *Curr Opin Gastroenterol* 28, 130-134.
- Gigante, M., Caridi, G., Montemurno, E., Soccio, M., d'Apolito, M., Cerullo, G., Aucella, F., Schirinzi, A., Emma, F., Massella, L., Messina, G., De Palo, T., Ranieri, E., Ghiggeri, G.M., and Gesualdo, L. (2011). TRPC6 mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome and atypical phenotype. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 6, 1626-1634.
- Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., and Harbeck, N. (2009). Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 20, 1913-1927.
- Gomis, A., Soriano, S., Belmonte, C., and Viana, F. (2008). Hypoosmotic- and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels. *J Physiol* 586, 5633-5649.
- Gottlieb, P., Folgering, J., Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Bowman, C., Bichet, D., Patel, A., Sachs, F., Martinac, B., Hamill, O.P., and Honore, E. (2008). Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflugers Arch* 455, 1097-1103.
- Gough, N.R. (2017). New connections: NHERF gates activity. *Science signaling* 10.
- Graham, S., Ding, M., Ding, Y., Sours-Brothers, S., Luchowski, R., Gryczynski, Z., Yorio, T., Ma, H., and Ma, R. (2010). Canonical transient receptor potential 6 (TRPC6), a redox-regulated cation channel. *J Biol Chem* 285, 23466-23476.
- Greenberg, H.Z.E., Carlton-Carew, S.R.E., Khan, D.M., Zargaran, A.K., Jahan, K.S., Vanessa Ho, W.S., and Albert, A.P. (2017). Heteromeric TRPV4/TRPC1 channels mediate calcium-sensing receptor-induced nitric oxide production and vasorelaxation in rabbit mesenteric arteries. *Vascular pharmacology*.

- Greka, A., Navarro, B., Oancea, E., Duggan, A., and Clapham, D.E. (2003). TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat Neurosci* 6, 837-845.
- Groschner, K., Hingel, S., Lintschinger, B., Balzer, M., Romanin, C., Zhu, X., and Schreiber, W. (1998). Trp proteins form store-operated cation channels in human vascular endothelial cells. *FEBS letters* 437, 101-106.
- Gudermann, T., and Mederos y Schnitzler, M. (2010). Phototransduction: keep an eye out for acid-labile TRPs. *Curr Biol* 20, R149-152.
- Guggino, W.B., and Stanton, B.A. (2006). New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 426-436.
- Hall, R.A., Ostedgaard, L.S., Premont, R.T., Blitzer, J.T., Rahman, N., Welsh, M.J., and Lefkowitz, R.J. (1998a). A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8496-8501.
- Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., Weinman, E.J., Grinstein, S., and Lefkowitz, R.J. (1998b). The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Nature* 392, 626-630.
- Hall, R.A., Spurney, R.F., Premont, R.T., Rahman, N., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., and Lefkowitz, R.J. (1999). G protein-coupled receptor kinase 6A phosphorylates the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor via a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem* 274, 24328-24334.
- Hamdollah Zadeh, M.A., Glass, C.A., Magnussen, A., Hancox, J.C., and Bates, D.O. (2008). VEGF-mediated elevated intracellular calcium and angiogenesis in human microvascular endothelial cells in vitro are inhibited by dominant negative TRPC6. *Microcirculation* 15, 605-614.
- Han, J.W., Lee, Y.H., Yoen, S.I., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Lee, M.G., and Kim, J.Y. (2016). Resistance to pathologic cardiac hypertrophy and reduced expression of CaV1.2 in *Trpc3*-depleted mice. *Mol Cell Biochem* 421, 55-65.
- Hanson, S.M., Sansom, M.S., and Becker, E.B. (2015). Modeling Suggests TRPC3 Hydrogen Bonding and Not Phosphorylation Contributes to the Ataxia Phenotype of the Moonwalker Mouse. *Biochemistry* 54, 4033-4041.
- Hartmann, J., Dragicevic, E., Adelsberger, H., Henning, H.A., Sumser, M., Abramowitz, J., Blum, R., Dietrich, A., Freichel, M., Flockerzi, V., Birnbaumer, L., and Konnerth, A. (2008). TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron* 59, 392-398.
- Heeringa, S.F., Moller, C.C., Du, J., Yue, L., Hinkes, B., Chernin, G., Vlangos, C.N., Hoyer, P.F., Reiser, J., and Hildebrandt, F. (2009). A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. *PLoS one* 4, e7771.
- Heiser, J.H., Schuwald, A.M., Sillani, G., Ye, L., Muller, W.E., and Leuner, K. (2013). TRPC6 channel-mediated neurite outgrowth in PC12 cells and hippocampal neurons involves activation of RAS/MEK/ERK, PI3K, and CAMKIV signaling. *J Neurochem* 127, 303-313.
- Hill-Eubanks, D.C., Gonzales, A.L., Sonkusare, S.K., and Nelson, M.T. (2014). Vascular TRP channels: performing under pressure and going with the flow. *Physiology (Bethesda, Md)* 29, 343-360.
- Hill, A.J., Hinton, J.M., Cheng, H., Gao, Z., Bates, D.O., Hancox, J.C., Langton, P.D., and James, A.F. (2006). A TRPC-like non-selective cation current activated by alpha 1-adrenoceptors in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Cell Calcium* 40, 29-40.
- Hinkes, B., Wiggins, R.C., Gbadegesin, R., Vlangos, C.N., Seelow, D., Nurnberg, G., Garg, P., Verma, R., Chaib, H., Hoskins, B.E., Ashraf, S., Becker, C., Hennies, H.C., Goyal, M., Wharram, B.L., Schachter, A.D., Mudumana, S., Drummond, I., Kerjaschki, D., Waldherr, R., Dietrich, A., Ozaltin, F., Bakkaloglu, A., Cleper, R., Basel-Vanagaite, L., Pohl, M., Griebel, M., Tsygin, A.N., Soylu, A., Muller, D., Sorli, C.S., Bunney, T.D., Katan, M., Liu, J., Attanasio, M., O'Toole, J. F., Hasselbacher, K., Mucha, B., Otto, E.A., Airik, R., Kispert, A., Kelley, G.G., Smrcka, A.V., Gudermann, T., Holzman, L.B., Nurnberg, P., and Hildebrandt, F. (2006). Positional cloning uncovers mutations in *PLCE1* responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 38, 1397-1405.
- Hirschler-Laszkiewicz, I., Zhang, W., Keefer, K., Conrad, K., Tong, Q., Chen, S.J., Bronson, S., Cheung, J.Y., and Miller, B.A. (2012). *Trpc2* depletion protects red blood cells from oxidative stress-induced hemolysis. *Experimental hematology* 40, 71-83.
- Hofmann, K., Fiedler, S., Vierkotten, S., Weber, J., Klee, S., Jia, J., Zwickenpflug, W., Flockerzi, V., Storch, U., Yildirim, A.O., Gudermann, T., Konigshoff, M., and Dietrich, A. (2017). Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis. *Biochimica et biophysica acta* 1863, 560-568.

- Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* *397*, 259-263.
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2000). Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2. *Biochem J* *351*, 115-122.
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 7461-7466.
- Hofstra, J.M., Lainez, S., van Kuijk, W.H., Schoots, J., Baltissen, M.P., Hoefsloot, L.H., Knoers, N.V., Berden, J.H., Bindels, R.J., van der Vlag, J., Hoenderop, J.G., Wetzels, J.F., and Nijenhuis, T. (2013). New TRPC6 gain-of-function mutation in a non-consanguineous Dutch family with late-onset focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* *28*, 1830-1838.
- Holcomb, J., Spellmon, N., Trescott, L., Sun, F., Li, C., and Yang, Z. (2015). PDZ Structure and Implication in Selective Drug Design against Cystic Fibrosis. *Current drug targets* *16*, 945-950.
- Hoth, M., and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* *355*, 353-355.
- Huang, J., Liu, C.H., Hughes, S.A., Postma, M., Schwiening, C.J., and Hardie, R.C. (2010). Activation of TRP channels by protons and phosphoinositide depletion in *Drosophila* photoreceptors. *Curr Biol* *20*, 189-197.
- Huang, M., Gu, G., Ferguson, E.L., and Chalfie, M. (1995). A stomatin-like protein necessary for mechanosensation in *C. elegans*. *Nature* *378*, 292-295.
- Huber, T.B., Schermer, B., and Benzing, T. (2007). Podocin organizes ion channel-lipid supercomplexes: implications for mechanosensation at the slit diaphragm. *Nephron Experimental nephrology* *106*, e27-31.
- Huber, T.B., Schermer, B., Muller, R.U., Hohne, M., Bartram, M., Calixto, A., Hagmann, H., Reinhardt, C., Koos, F., Kunzelmann, K., Shirokova, E., Krautwurst, D., Harteneck, C., Simons, M., Pavenstadt, H., Kerjaschki, D., Thiele, C., Walz, G., Chalfie, M., and Benzing, T. (2006). Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 17079-17086.
- Hull, S.S., Jr., Kaiser, L., Jaffe, M.D., and Sparks, H.V., Jr. (1986). Endothelium-dependent flow-induced dilation of canine femoral and saphenous arteries. *Blood vessels* *23*, 183-198.
- Huynh, K.W., Cohen, M.R., Jiang, J., Samanta, A., Lodowski, D.T., Zhou, Z.H., and Moiseenkova-Bell, V.Y. (2016). Structure of the full-length TRPV2 channel by cryo-EM. *Nat Commun* *7*, 11130.
- Inoue, R., Jensen, L.J., Jian, Z., Shi, J., Hai, L., Lurie, A.I., Henriksen, F.H., Salomonsson, M., Morita, H., Kawarabayashi, Y., Mori, M., Mori, Y., and Ito, Y. (2009a). Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipase C/diacylglycerol and phospholipase A2/omega-hydroxylase/20-HETE pathways. *Circ Res* *104*, 1399-1409.
- Inoue, R., Jian, Z., and Kawarabayashi, Y. (2009b). Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. *Pharmacol Ther* *123*, 371-385.
- Itsuki, K., Imai, Y., Hase, H., Okamura, Y., Inoue, R., and Mori, M.X. (2014). PLC-mediated PI(4,5)P2 hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels. *J Gen Physiol* *143*, 183-201.
- Izbicki, G., Or, R., Christensen, T.G., Segel, M.J., Fine, A., Goldstein, R.H., and Breuer, R. (2002). Bleomycin-induced lung fibrosis in IL-4-overexpressing and knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *283*, L1110-1116.
- Jang, Y., Lee, Y., Kim, S.M., Yang, Y.D., Jung, J., and Oh, U. (2012). Quantitative analysis of TRP channel genes in mouse organs. *Archives of pharmacal research* *35*, 1823-1830.
- Jemal, I., Soriano, S., Conte, A.L., Morenilla, C., and Gomis, A. (2014). G protein-coupled receptor signalling potentiates the osmo-mechanical activation of TRPC5 channels. *Pflugers Arch* *466*, 1635-1646.
- Ju, M., Shi, J., Saleh, S.N., Albert, A.P., and Large, W.A. (2010). Ins(1,4,5)P3 interacts with PIP2 to regulate activation of TRPC6/C7 channels by diacylglycerol in native vascular myocytes. *J Physiol* *588*, 1419-1433.
- Jung, B., Obinata, H., Galvani, S., Mendelson, K., Ding, B.S., Skoura, A., Kinzel, B., Brinkmann, V., Rafii, S., Evans, T., and Hla, T. (2012a). Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. *Dev Cell* *23*, 600-610.

- Jung, C.B., Moretti, A., Mederos y Schnitzler, M., Iop, L., Storch, U., Bellin, M., Dorn, T., Ruppenthal, S., Pfeiffer, S., Goedel, A., Dirschinger, R.J., Seyfarth, M., Lam, J.T., Sinnecker, D., Gudermann, T., Lipp, P., and Laugwitz, K.L. (2012b). Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO molecular medicine* 4, 180-191.
- Jungnickel, M.K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J.R., and Florman, H.M. (2001). Trp2 regulates entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 3, 499-502.
- Kalwa, H., Storch, U., Demleitner, J., Fiedler, S., Mayer, T., Kannler, M., Fahlbusch, M., Barth, H., Smrcka, A., Hildebrandt, F., Gudermann, T., and Dietrich, A. (2015). Phospholipase C epsilon (PLCepsilon) induced TRPC6 activation: a common but redundant mechanism in primary podocytes. *Journal of cellular physiology* 230, 1389-1399.
- Kamouchi, M., Philipp, S., Flockerzi, V., Wissenbach, U., Mamin, A., Raeymaekers, L., Eggermont, J., Droogmans, G., and Nilius, B. (1999). Properties of heterologously expressed hTRP3 channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Physiol* 518 Pt 2, 345-358.
- Kessler, S., Clauss, W.G., and Fronius, M. (2011). Laminar shear stress modulates the activity of heterologously expressed P2X(4) receptors. *Biochimica et biophysica acta* 1808, 2488-2495.
- Kim, J., Kwak, M., Jeon, J.P., Myeong, J., Wie, J., Hong, C., Kim, S.Y., Jeon, J.H., Kim, H.J., and So, I. (2014). Isoform- and receptor-specific channel property of canonical transient receptor potential (TRPC)1/4 channels. *Pflugers Arch* 466, 491-504.
- Kim, J.Y., Zeng, W., Kiselyov, K., Yuan, J.P., Dehoff, M.H., Mikoshiba, K., Worley, P.F., and Muallem, S. (2006). Homer 1 mediates store- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent translocation and retrieval of TRPC3 to the plasma membrane. *J Biol Chem* 281, 32540-32549.
- Kim, S.J., Kim, Y.S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Worley, P.F., and Linden, D.J. (2003). Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* 426, 285-291.
- Kimchi, T., Xu, J., and Dulac, C. (2007). A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. *Nature* 448, 1009-1014.
- Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L., and Muallem, S. (1998). Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated channels. *Nature* 396, 478-482.
- Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D., and Jalink, K. (2015). Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PloS one* 10, e0122513.
- Klarenbeek, J.B., Goedhart, J., Hink, M.A., Gadella, T.W., and Jalink, K. (2011). A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PloS one* 6, e19170.
- Kochukov, M.Y., Balasubramanian, A., Noel, R.C., and Marrelli, S.P. (2013). Role of TRPC1 and TRPC3 channels in contraction and relaxation of mouse thoracic aorta. *J Vasc Res* 50, 11-20.
- Kruger, W.A., Monteith, G.R., and Poronnik, P. (2013). NHERF-1 regulation of EGF and neurotensin signalling in HT-29 epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 432, 568-573.
- Kumar, B., Dreja, K., Shah, S.S., Cheong, A., Xu, S.Z., Sukumar, P., Naylor, J., Forte, A., Cipollaro, M., McHugh, D., Kingston, P.A., Heagerty, A.M., Munsch, C.M., Bergdahl, A., Hultgardh-Nilsson, A., Gomez, M.F., Porter, K.E., Hellstrand, P., and Beech, D.J. (2006). Upregulated TRPC1 channel in vascular injury in vivo and its role in human neointimal hyperplasia. *Circ Res* 98, 557-563.
- Kunichika, N., Yu, Y., Remillard, C.V., Platoshyn, O., Zhang, S., and Yuan, J.X. (2004). Overexpression of TRPC1 enhances pulmonary vasoconstriction induced by capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L962-969.
- Kuo, L., Davis, M.J., and Chilian, W.M. (1990). Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol* 259, H1063-1070.
- Kwon, H.B., Wang, S., Helker, C.S., Rasouli, S.J., Maischein, H.M., Offermanns, S., Herzog, W., and Stainier, D.Y. (2016). In vivo modulation of endothelial polarization by Apelin receptor signalling. *Nat Commun* 7, 11805.
- Lang, T. (2007). SNARE proteins and 'membrane rafts'. *J Physiol* 585, 693-698.
- Lau, O.C., Shen, B., Wong, C.O., Tjong, Y.W., Lo, C.Y., Wang, H.C., Huang, Y., Yung, W.H., Chen, Y.C., Fung, M.L., Rudd, J.A., and Yao, X. (2016). TRPC5 channels participate in pressure-sensing in aortic baroreceptors. *Nat Commun* 7, 11947.

- Lazebnik, Y. (2002). Can a biologist fix a radio?--Or, what I learned while studying apoptosis. *Cancer cell* 2, 179-182.
- Lee-Kwon, W., Wade, J.B., Zhang, Z., Pallone, T.L., and Weinman, E.J. (2005). Expression of TRPC4 channel protein that interacts with NHERF-2 in rat descending vasa recta. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C942-949.
- Lee, K.P., Yuan, J.P., Hong, J.H., So, I., Worley, P.F., and Muallem, S. (2010). An endoplasmic reticulum/plasma membrane junction: STIM1/Orai1/TRPCs. *FEBS letters* 584, 2022-2027.
- Lee, S.J., Ritter, S.L., Zhang, H., Shim, H., Hall, R.A., and Yun, C.C. (2011). MAGI-3 competes with NHERF-2 to negatively regulate LPA2 receptor signaling in colon cancer cells. *Gastroenterology* 140, 924-934.
- Lee, Y.M., Kim, B.J., Kim, H.J., Yang, D.K., Zhu, M.H., Lee, K.P., So, I., and Kim, K.W. (2003). TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284, G604-616.
- Li, M., Chen, C., Zhou, Z., Xu, S., and Yu, Z. (2012). A TRPC1-mediated increase in store-operated Ca<sup>2+</sup> entry is required for the proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells. *Cell Calcium* 51, 486-496.
- Liao, Y., Erxleben, C., Yildirim, E., Abramowitz, J., Armstrong, D.L., and Birnbaumer, L. (2007). Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4682-4687.
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K.R., Andre, F., Tordai, A., Mejia, J.A., Symmans, W.F., Gonzalez-Angulo, A.M., Hennessy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G.N., and Pusztai, L. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 1275-1281.
- Lievremont, J.P., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr. (2004). Canonical transient receptor potential TRPC7 can function as both a receptor- and store-operated channel in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1709-1716.
- Liman, E.R., Corey, D.P., and Dulac, C. (1999). TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5791-5796.
- Liman, E.R., and Dulac, C. (2007). TRPC2 and the Molecular Biology of Pheromone Detection in Mammals. In *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, W.B. Liedtke, and S. Heller, eds. (Boca Raton (FL)).
- Liman, E.R., and Innan, H. (2003). Relaxed selective pressure on an essential component of pheromone transduction in primate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3328-3332.
- Lin, M.J., Leung, G.P., Zhang, W.M., Yang, X.R., Yip, K.P., Tse, C.M., and Sham, J.S. (2004). Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca<sup>2+</sup> channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 95, 496-505.
- Lintschinger, B., Balzer-Geldsetzer, M., Baskaran, T., Graier, W.F., Romanin, C., Zhu, M.X., and Groschner, K. (2000). Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca<sup>2+</sup>-sensitive cation channels. *J Biol Chem* 275, 27799-27805.
- Liu, B.C., Song, X., Lu, X.Y., Li, D.T., Eaton, D.C., Shen, B.Z., Li, X.Q., and Ma, H.P. (2013). High glucose induces podocyte apoptosis by stimulating TRPC6 via elevation of reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 1434-1442.
- Liu, D.Y., Thilo, F., Scholze, A., Wittstock, A., Zhao, Z.G., Harteneck, C., Zidek, W., Zhu, Z.M., and Tepel, M. (2007a). Increased store-operated and 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol-induced calcium influx in monocytes is mediated by transient receptor potential canonical channels in human essential hypertension. *J Hypertens* 25, 799-808.
- Liu, X., Cheng, K.T., Bandyopadhyay, B.C., Pani, B., Dietrich, A., Paria, B.C., Swaim, W.D., Beech, D., Yildirim, E., Singh, B.B., Birnbaumer, L., and Ambudkar, I.S. (2007b). Attenuation of store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17542-17547.
- Loureiro, C.A., Matos, A.M., Dias-Alves, A., Pereira, J.F., Uliyakina, I., Barros, P., Amaral, M.D., and Matos, P. (2015). A molecular switch in the scaffold NHERF1 enables misfolded CFTR to evade the peripheral quality control checkpoint. *Science signaling* 8, ra48.

- Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2003). A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* *40*, 551-561.
- Ma, X., Cai, Y., He, D., Zou, C., Zhang, P., Lo, C.Y., Xu, Z., Chan, F.L., Yu, S., Chen, Y., Zhu, R., Lei, J., Jin, J., and Yao, X. (2012). Transient receptor potential channel TRPC5 is essential for P-glycoprotein induction in drug-resistant cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 16282-16287.
- Makino, A., Prossnitz, E.R., Bunemann, M., Wang, J.M., Yao, W., and Schmid-Schonbein, G.W. (2006). G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* *290*, C1633-1639.
- Malczyk, M., Veith, C., Fuchs, B., Hofmann, K., Storch, U., Schermuly, R.T., Witzenzath, M., Ahlbrecht, K., Fecher-Trost, C., Flockerzi, V., Ghofrani, H.A., Grimminger, F., Seeger, W., Gudermann, T., Dietrich, A., and Weissmann, N. (2013). Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* *188*, 1451-1459.
- Mangia, A., Partipilo, G., Schirosi, L., Saponaro, C., Galetta, D., Catino, A., Scattone, A., and Simone, G. (2015). Fine Needle Aspiration Cytology: A Tool to Study NHERF1 Expression as a Potential Marker of Aggressiveness in Lung Cancer. *Molecular biotechnology* *57*, 549-557.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Martinac, B., and Hamill, O.P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* *7*, 179-185.
- Martinac, B. (2004). Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *J Cell Sci* *117*, 2449-2460.
- Maruyama, Y., Nakanishi, Y., Walsh, E.J., Wilson, D.P., Welsh, D.G., and Cole, W.C. (2006). Heteromultimeric TRPC6-TRPC7 channels contribute to arginine vasopressin-induced cation current of A7r5 vascular smooth muscle cells. *Circ Res* *98*, 1520-1527.
- Mathieson, P.W. (2010). Podocyte actin in health, disease and treatment. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* *25*, 1772-1773.
- Maudsley, S., Zamah, A.M., Rahman, N., Blitzer, J.T., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., and Hall, R.A. (2000). Platelet-derived growth factor receptor association with Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor potentiates receptor activity. *Mol Cell Biol* *20*, 8352-8363.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., and Gudermann, T. (2011). AT1 receptors as mechanosensors. *Current opinion in pharmacology* *11*, 112-116.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., and Gudermann, T. (2016). Mechanosensitive Gq/11 -protein coupled receptors mediate myogenic vasoconstriction. *Microcirculation*.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Essin, K., Gollasch, M., and Gudermann, T. (2008). Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J* *27*, 3092-3103.
- Medic, N., Desai, A., Olivera, A., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Beaven, M.A., Gilfillan, A.M., and Metcalfe, D.D. (2013). Knockout of the *Trpc1* gene reveals that TRPC1 can promote recovery from anaphylaxis by negatively regulating mast cell TNF-alpha production. *Cell Calcium* *53*, 315-326.
- Mery, L., Strauss, B., Dufour, J.F., Krause, K.H., and Hoth, M. (2002). The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface expression in HEK293 cells. *J Cell Sci* *115*, 3497-3508.
- Miyagi, K., Kiyonaka, S., Yamada, K., Miki, T., Mori, E., Kato, K., Numata, T., Sawaguchi, Y., Numaga, T., Kimura, T., Kanai, Y., Kawano, M., Wakamori, M., Nomura, H., Koni, I., Yamagishi, M., and Mori, Y. (2009). A pathogenic C terminus-truncated polycystin-2 mutant enhances receptor-activated Ca<sup>2+</sup> entry via association with TRPC3 and TRPC7. *J Biol Chem* *284*, 34400-34412.
- Monteiro, E.J., Pereira, A.C., Pereira, A.B., Krieger, J.E., and Mastroianni-Kirsztajn, G. (2006). NPHS2 mutations in adult patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of nephrology* *19*, 366-371.
- Mori, Y., Wakamori, M., Miyakawa, T., Hermosura, M., Hara, Y., Nishida, M., Hirose, K., Mizushima, A., Kurosaki, M., Mori, E., Gotoh, K., Okada, T., Fleig, A., Penner, R., Iino, M., and Kurosaki, T. (2002). Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* *195*, 673-681.

- Munaron, L. (2015). Systems biology of ion channels and transporters in tumor angiogenesis: An omics view. *Biochimica et biophysica acta* *1848*, 2647-2656.
- Nakayama, H., Wilkin, B.J., Bodi, I., and Molkentin, J.D. (2006). Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *FASEB J* *20*, 1660-1670.
- Nesin, V., and Tsiokas, L. (2014). Trpc1. *Handb Exp Pharmacol* *222*, 15-51.
- Nikolaev, V.O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., and Lohse, M.J. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* *279*, 37215-37218.
- Nilius, B., and Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome biology* *12*, 218.
- Obukhov, A.G., and Nowycky, M.C. (2004). TRPC5 activation kinetics are modulated by the scaffolding protein ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein-50 (EBP50). *Journal of cellular physiology* *201*, 227-235.
- Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., Mori, Y., Ono, K., Iijima, T., and Ito, H. (2007). Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* *42*, 498-507.
- Ong, E.C., Nesin, V., Long, C.L., Bai, C.X., Guz, J.L., Ivanov, I.P., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., Humphrey, M.B., and Tsiokas, L. (2013). A TRPC1 protein-dependent pathway regulates osteoclast formation and function. *J Biol Chem* *288*, 22219-22232.
- Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., and Kurose, H. (2006). TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J* *25*, 5305-5316.
- Otsuguro, K., Tang, J., Tang, Y., Xiao, R., Freichel, M., Tsvilovskyy, V., Ito, S., Flockerzi, V., Zhu, M.X., and Zholos, A.V. (2008). Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* *283*, 10026-10036.
- Ozaki, T., Muramatsu, R., Sasai, M., Yamamoto, M., Kubota, Y., Fujinaka, T., Yoshimine, T., and Yamashita, T. (2016). The P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning. *Sci Rep* *6*, 25893.
- Paquet, M., Asay, M.J., Fam, S.R., Inuzuka, H., Castleberry, A.M., Oller, H., Smith, Y., Yun, C.C., Traynelis, S.F., and Hall, R.A. (2006). The PDZ scaffold NHERF-2 interacts with mGluR5 and regulates receptor activity. *J Biol Chem* *281*, 29949-29961.
- Parekh, A.B., and Putney, J.W., Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* *85*, 757-810.
- Park, H.W., Kim, J.Y., Choi, S.K., Lee, Y.H., Zeng, W., Kim, K.H., Muallem, S., and Lee, M.G. (2011). Serine-threonine kinase with-no-lysine 4 (WNK4) controls blood pressure via transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) in the vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 10750-10755.
- Pedersen, S.F., Okada, Y., and Nilius, B. (2016). Biophysics and Physiology of the Volume-Regulated Anion Channel (VRAC)/Volume-Sensitive Outwardly Rectifying Anion Channel (VSOR). *Pflugers Arch* *468*, 371-383.
- Perez-Leighton, C.E., Schmidt, T.M., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., and Kofuji, P. (2011). Intrinsic phototransduction persists in melanopsin-expressing ganglion cells lacking diacylglycerol-sensitive TRPC subunits. *The European journal of neuroscience* *33*, 856-867.
- Petersen, S.C., Luo, R., Liebscher, I., Giera, S., Jeong, S.J., Mogha, A., Ghidinelli, M., Feltri, M.L., Schoneberg, T., Piao, X., and Monk, K.R. (2015). The adhesion GPCR GPR126 has distinct, domain-dependent functions in Schwann cell development mediated by interaction with laminin-211. *Neuron* *85*, 755-769.
- Phan, S.H., Thrall, R.S., and Williams, C. (1981). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Effects of steroid on lung collagen metabolism. *The American review of respiratory disease* *124*, 428-434.
- Phan, S.H., Varani, J., and Smith, D. (1985). Rat lung fibroblast collagen metabolism in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* *76*, 241-247.
- Phelan, K.D., Shwe, U.T., Abramowitz, J., Wu, H., Rhee, S.W., Howell, M.D., Gottschall, P.E., Freichel, M., Flockerzi, V., Birnbaumer, L., and Zheng, F. (2013). Canonical transient receptor channel 5 (TRPC5) and TRPC1/4 contribute to seizure and excitotoxicity by distinct cellular mechanisms. *Mol Pharmacol* *83*, 429-438.
- Philipp, S., Trost, C., Warnat, J., Rautmann, J., Himmerkus, N., Schroth, G., Kretz, O., Nastainczyk, W., Cavalie, A., Hoth, M., and Flockerzi, V. (2000). TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca<sup>2+</sup>-like channels in adrenal cells. *J Biol Chem* *275*, 23965-23972.

- Pires, P.W., Ko, E.A., Pritchard, H.A.T., Rudokas, M., Yamasaki, E., and Earley, S. (2017). The angiotensin II receptor type 1b is the primary sensor of intraluminal pressure in cerebral artery smooth muscle cells. *J Physiol*.
- Pohl, U., Herlan, K., Huang, A., and Bassenge, E. (1991). EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol* *261*, H2016-2023.
- Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkuis, F., van der Krogt, G., Zaccolo, M., Moolenaar, W.H., Bos, J.L., and Jalink, K. (2004). Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep* *5*, 1176-1180.
- Poteser, M., Schleifer, H., Lichtenegger, M., Schernthaner, M., Stockner, T., Kappe, C.O., Glasnov, T.N., Romanin, C., and Groschner, K. (2011). PKC-dependent coupling of calcium permeation through transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) to calcineurin signaling in HL-1 myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 10556-10561.
- Potier, M., Gonzalez, J.C., Motiani, R.K., Abdullaev, I.F., Bisailon, J.M., Singer, H.A., and Trebak, M. (2009). Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *Faseb J* *23*, 2425-2437.
- Pullen, N., and Fornoni, A. (2016). Drug discovery in focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* *89*, 1211-1220.
- Qu, Y.Y., Wang, L.M., Zhong, H., Liu, Y.M., Tang, N., Zhu, L.P., He, F., and Hu, Q.H. (2017). TRPC1 stimulates calciumsensing receptorinduced storeoperated Ca<sup>2+</sup> entry and nitric oxide production in endothelial cells. *Molecular medicine reports* *16*, 4613-4619.
- Rahaman, S.O., Grove, L.M., Paruchuri, S., Southern, B.D., Abraham, S., Niese, K.A., Scheraga, R.G., Ghosh, S., Thodeti, C.K., Zhang, D.X., Moran, M.M., Schilling, W.P., Tschumperlin, D.J., and Oلمان, M.A. (2014). TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice. *J Clin Invest* *124*, 5225-5238.
- Rakesh, K., Yoo, B., Kim, I.M., Salazar, N., Kim, K.S., and Rockman, H.A. (2010). beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Science signaling* *3*, ra46.
- Ratnayake, R., Covell, D., Ransom, T.T., Gustafson, K.R., and Beutler, J.A. (2009). Englerin A, a selective inhibitor of renal cancer cell growth, from *Phyllanthus engleri*. *Organic letters* *11*, 57-60.
- Reiser, J., Polu, K.R., Moller, C.C., Kenlan, P., Altintas, M.M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., McGee, M., Sugimoto, H., Brown, D., Kalluri, R., Mundel, P., Smith, P.L., Clapham, D.E., and Pollak, M.R. (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* *37*, 739-744.
- Riccio, A., Li, Y., Moon, J., Kim, K.S., Smith, K.S., Rudolph, U., Gapon, S., Yao, G.L., Tsvetkov, E., Rodig, S.J., Van't Veer, A., Meloni, E.G., Carlezon, W.A., Jr., Bolshakov, V.Y., and Clapham, D.E. (2009). Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. *Cell* *137*, 761-772.
- Riccio, A., Li, Y., Tsvetkov, E., Gapon, S., Yao, G.L., Smith, K.S., Engin, E., Rudolph, U., Bolshakov, V.Y., and Clapham, D.E. (2014). Decreased anxiety-like behavior and Galphaq/11-dependent responses in the amygdala of mice lacking TRPC4 channels. *J Neurosci* *34*, 3653-3667.
- Riccio, A., Medhurst, A.D., Mattei, C., Kelsell, R.E., Calver, A.R., Randall, A.D., Benham, C.D., and Pangalos, M.N. (2002). mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain research Molecular brain research* *109*, 95-104.
- Riehle, M., Buscher, A.K., Gohlke, B.O., Kassmann, M., Kolatsi-Joannou, M., Brasen, J.H., Nagel, M., Becker, J.U., Winyard, P., Hoyer, P.F., Preissner, R., Krautwurst, D., Gollasch, M., Weber, S., and Harteneck, C. (2016). TRPC6 G757D Loss-of-Function Mutation Associates with FSGS. *J Am Soc Nephrol* *27*, 2771-2783.
- Ritter, S.L., Asay, M.J., Paquet, M., Paavola, K.J., Reiff, R.E., Yun, C.C., and Hall, R.A. (2011). GLAST stability and activity are enhanced by interaction with the PDZ scaffold NHERF-2. *Neurosci Lett* *487*, 3-7.
- Rohacs, T. (2013). Regulation of transient receptor potential channels by the phospholipase C pathway. *Advances in biological regulation* *53*, 341-355.
- Roshanravan, H., and Dryer, S.E. (2014). ATP acting through P2Y receptors causes activation of podocyte TRPC6 channels: role of podocin and reactive oxygen species. *Am J Physiol Renal Physiol* *306*, F1088-1097.
- Salomon, Y. (1991). Cellular responsiveness to hormones and neurotransmitters: conversion of [3H]adenine to [3H]cAMP in cell monolayers, cell suspensions, and tissue slices. *Methods Enzymol* *195*, 22-28.

- Santin, S., Ars, E., Rossetti, S., Salido, E., Silva, I., Garcia-Maset, R., Gimenez, I., Ruiz, P., Mendizabal, S., Luciano Nieto, J., Pena, A., Camacho, J.A., Fraga, G., Cobo, M.A., Bernis, C., Ortiz, A., de Pablos, A.L., Sanchez-Moreno, A., Pintos, G., Mirapeix, E., Fernandez-Llama, P., Ballarin, J., Torra, R., Group, F.S., Zamora, I., Lopez-Hellin, J., Madrid, A., Ventura, C., Vilalta, R., Espinosa, L., Garcia, C., Melgosa, M., Navarro, M., Gimenez, A., Cots, J.V., Alexandra, S., Caramelo, C., Egado, J., San Jose, M.D., de la Cerda, F., Sala, P., Raspall, F., Vila, A., Daza, A.M., Vazquez, M., Ecija, J.L., Espinosa, M., Justa, M.L., Poveda, R., Aparicio, C., Rosell, J., Muley, R., Montenegro, J., Gonzalez, D., Hidalgo, E., de Frutos, D.B., Trillo, E., Gracia, S., and de los Rios, F.J. (2009). TRPC6 mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* *24*, 3089-3096.
- Saotome, K., Singh, A.K., Yelshanskaya, M.V., and Sobolevsky, A.I. (2016). Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6. *Nature* *534*, 506-511.
- Saponaro, C., Malfettone, A., Dell'Endice, T.S., Brunetti, A.E., Achimas-Cadariu, P., Paradiso, A., and Mangia, A. (2014). The prognostic value of the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 1 (NHERF1) protein in cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* *14*, 177-184.
- Satoh, S., Tanaka, H., Ueda, Y., Oyama, J., Sugano, M., Sumimoto, H., Mori, Y., and Makino, N. (2007). Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca<sup>2+</sup> channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis. *Mol Cell Biochem* *294*, 205-215.
- Schindl, R., Fritsch, R., Jardin, I., Frischauf, I., Kahr, H., Muik, M., Riedl, M.C., Groschner, K., and Romanin, C. (2012). Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca<sup>2+</sup> influx. *J Biol Chem* *287*, 35612-35620.
- Schneider, H.C., and Klabunde, T. (2013). Understanding drugs and diseases by systems biology? *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *23*, 1168-1176.
- Scholz, N., Gehring, J., Guan, C., Ljaschenko, D., Fischer, R., Lakshmanan, V., Kittel, R.J., and Langenhan, T. (2015). The adhesion GPCR latrophilin/CIRL shapes mechanosensation. *Cell Rep* *11*, 866-874.
- Scholz, N., Monk, K.R., Kittel, R.J., and Langenhan, T. (2016). Adhesion GPCRs as a Putative Class of Metabotropic Mechanosensors. *Handb Exp Pharmacol* *234*, 221-247.
- Sekerkova, G., Kim, J.A., Nigro, M.J., Becker, E.B., Hartmann, J., Birnbaumer, L., Mugnaini, E., and Martina, M. (2013). Early onset of ataxia in moonwalker mice is accompanied by complete ablation of type II unipolar brush cells and Purkinje cell dysfunction. *J Neurosci* *33*, 19689-19694.
- Selli, C., Erac, Y., Kosova, B., and Tosun, M. (2009). Post-transcriptional silencing of TRPC1 ion channel gene by RNA interference upregulates TRPC6 expression and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Vascular pharmacology* *51*, 96-100.
- Shen, B., Wong, C.O., Lau, O.C., Woo, T., Bai, S., Huang, Y., and Yao, X. (2015). Plasma membrane mechanical stress activates TRPC5 channels. *PLoS one* *10*, e0122227.
- Shenolikar, S., Minkoff, C.M., Steplock, D.A., Evangelista, C., Liu, M., and Weinman, E.J. (2001). N-terminal PDZ domain is required for NHERF dimerization. *FEBS letters* *489*, 233-236.
- Shenolikar, S., and Weinman, E.J. (2001). NHERF: targeting and trafficking membrane proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* *280*, F389-395.
- Shi, K., Jiang, J., Ma, T., Xie, J., Duan, L., Chen, R., Song, P., Yu, Z., Liu, C., Zhu, Q., and Zheng, J. (2014). Pathogenesis pathways of idiopathic pulmonary fibrosis in bleomycin-induced lung injury model in mice. *Respiratory physiology & neurobiology* *190*, 113-117.
- Singh, B.B., Liu, X., Tang, J., Zhu, M.X., and Ambudkar, I.S. (2002). Calmodulin regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent feedback inhibition of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx by interaction with a site in the C terminus of TrpC1. *Mol Cell* *9*, 739-750.
- Sinkins, W.G., Estacion, M., and Schilling, W.P. (1998). Functional expression of TrpC1: a human homologue of the Drosophila Trp channel. *Biochem J* *331 ( Pt 1)*, 331-339.
- Smedlund, K., and Vazquez, G. (2008). Involvement of native TRPC3 proteins in ATP-dependent expression of VCAM-1 and monocyte adherence in coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *28*, 2049-2055.
- Smedlund, K.B., Birnbaumer, L., and Vazquez, G. (2015). Increased size and cellularity of advanced atherosclerotic lesions in mice with endothelial overexpression of the human TRPC3 channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, E2201-2206.

- Song, H.B., Jun, H.O., Kim, J.H., Fruttiger, M., and Kim, J.H. (2015). Suppression of transient receptor potential canonical channel 4 inhibits vascular endothelial growth factor-induced retinal neovascularization. *Cell Calcium* 57, 101-108.
- Spassova, M.A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., and Gill, D.L. (2006). A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 16586-16591.
- Stokes, L., Layhadi, J.A., Bibic, L., Dhuna, K., and Fountain, S.J. (2017). P2X4 Receptor Function in the Nervous System and Current Breakthroughs in Pharmacology. *Frontiers in pharmacology* 8, 291.
- Storch, U., Blodow, S., Gudermann, T., and Mederos y Schnitzler, M. (2015). Cysteinyl leukotriene 1 receptors as novel mechanosensors mediating myogenic tone together with angiotensin II type 1 receptors-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 121-126.
- Storch, U., Forst, A.L., Pardatscher, F., Erdogmus, S., Philipp, M., Gregoritz, M., Mederos y Schnitzler, M., and Gudermann, T. (2017a). Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, E37-E46.
- Storch, U., Forst, A.L., Philipp, M., Gudermann, T., and Mederos y Schnitzler, M. (2012a). Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *J Biol Chem* 287, 3530-3540.
- Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., and Gudermann, T. (2012b). G protein-mediated stretch reception. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H1241-1249.
- Storch, U., Straub, J., Erdogmus, S., Gudermann, T., and Mederos y Schnitzler, M. (2017b). Dynamic monitoring of Gi/o-protein-mediated decreases of intracellular cAMP by FRET-based Epac sensors. *Pflugers Arch* 469, 725-737.
- Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C., and Koentges, G. (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295, 1493-1500.
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29, 645-655.
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (2003). Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* 278, 39014-39019.
- Sun, Y., Birnbaumer, L., and Singh, B.B. (2015). TRPC1 regulates calcium-activated chloride channels in salivary gland cells. *Journal of cellular physiology* 230, 2848-2856.
- Tai, C., Hines, D.J., Choi, H.B., and MacVicar, B.A. (2011). Plasma membrane insertion of TRPC5 channels contributes to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 21, 958-967.
- Tai, Y., Feng, S., Ge, R., Du, W., Zhang, X., He, Z., and Wang, Y. (2008). TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. *J Cell Sci* 121, 2301-2307.
- Takeda, T., McQuistan, T., Orlando, R.A., and Farquhar, M.G. (2001). Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 108, 289-301.
- Tang, Y., Tang, J., Chen, Z., Trost, C., Flockerzi, V., Li, M., Ramesh, V., and Zhu, M.X. (2000). Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. *J Biol Chem* 275, 37559-37564.
- Thilo, F., Loddenkemper, C., Berg, E., Zidek, W., and Tepel, M. (2009). Increased TRPC3 expression in vascular endothelium of patients with malignant hypertension. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 22, 426-430.
- Tian, D., Jacobo, S.M., Billing, D., Rozkalne, A., Gage, S.D., Anagnostou, T., Pavenstadt, H., Hsu, H.H., Schlondorff, J., Ramos, A., and Greka, A. (2010). Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Science signaling* 3, ra77.
- Tirupathi, C., Freichel, M., Vogel, S.M., Paria, B.C., Mehta, D., Flockerzi, V., and Malik, A.B. (2002). Impairment of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ Res* 91, 70-76.
- Tonna, S.J., Needham, A., Polu, K., Uscinski, A., Appel, G.B., Falk, R.J., Katz, A., Al-Waheeb, S., Kaplan, B.S., Jerums, G., Savige, J., Harmon, J., Zhang, K., Curhan, G.C., and Pollak, M.R. (2008). NPHS2 variation in focal and segmental glomerulosclerosis. *BMC nephrology* 9, 13.

- Tornquist, K., Sukumaran, P., Kemppainen, K., Lof, C., and Viitanen, T. (2014). Canonical transient receptor potential channel 2 (TRPC2): old name-new games. Importance in regulating of rat thyroid cell physiology. *Pflügers Arch* 466, 2025-2034.
- Trebak, M., Lemonnier, L., DeHaven, W.I., Wedel, B.J., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr. (2009). Complex functions of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in regulation of TRPC5 cation channels. *Pflügers Arch* 457, 757-769.
- Tsuda, M., Kuboyama, K., Inoue, T., Nagata, K., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2009). Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. *Molecular pain* 5, 28.
- Tsukaguchi, H., Sudhakar, A., Le, T.C., Nguyen, T., Yao, J., Schwimmer, J.A., Schachter, A.D., Poch, E., Abreu, P.F., Appel, G.B., Pereira, A.B., Kalluri, R., and Pollak, M.R. (2002). NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest* 110, 1659-1666.
- Ulmann, L., Hatcher, J.P., Hughes, J.P., Chaumont, S., Green, P.J., Conquet, F., Buell, G.N., Reeve, A.J., Chessell, I.P., and Rassendren, F. (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci* 28, 11263-11268.
- Ulmann, L., Hirbec, H., and Rassendren, F. (2010). P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J* 29, 2290-2300.
- Urban, N., Wang, L., Kwiek, S., Rademann, J., Kuebler, W.M., and Schaefer, M. (2016). Identification and Validation of Larixyl Acetate as a Potent TRPC6 Inhibitor. *Mol Pharmacol* 89, 197-213.
- Vannier, B., Peyton, M., Boulay, G., Brown, D., Qin, N., Jiang, M., Zhu, X., and Birnbaumer, L. (1999). Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2060-2064.
- Veliceasa, D., Ivanovic, M., Hoepfner, F.T., Thumbikat, P., Volpert, O.V., and Smith, N.D. (2007). Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma. *The FEBS journal* 274, 6365-6377.
- Venkatachalam, K., Zheng, F., and Gill, D.L. (2003). Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* 278, 29031-29040.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J.P. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science* 312, 1220-1223.
- Voltz, J.W., Weinman, E.J., and Shenolikar, S. (2001). Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation. *Oncogene* 20, 6309-6314.
- Walker, R.L., Hume, J.R., and Horowitz, B. (2001). Differential expression and alternative splicing of TRP channel genes in smooth muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1184-1192.
- Wang, G., Lai, F.M., Kwan, B.C., Lai, K.B., Chow, K.M., Li, P.K., and Szeto, C.C. (2009a). Podocyte loss in human hypertensive nephrosclerosis. *American journal of hypertension* 22, 300-306.
- Wang, G.X., and Poo, M.M. (2005). Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature* 434, 898-904.
- Wang, Q., Wang, D., Yan, G., Sun, L., and Tang, C. (2016). TRPC6 is required for hypoxia-induced basal intracellular calcium concentration elevation, and for the proliferation and migration of rat distal pulmonary venous smooth muscle cells. *Molecular medicine reports* 13, 1577-1585.
- Wang, T., Chen, Z., Zhu, Y., Pan, Q., Liu, Y., Qi, X., Jin, L., Jin, J., Ma, X., and Hua, D. (2015). Inhibition of transient receptor potential channel 5 reverses 5-Fluorouracil resistance in human colorectal cancer cells. *J Biol Chem* 290, 448-456.
- Wang, X., Pluznick, J.L., Wei, P., Padanilam, B.J., and Sansom, S.C. (2004). TRPC4 forms store-operated Ca<sup>2+</sup> channels in mouse mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C357-364.
- Wang, Z., Wei, X., Zhang, Y., Ma, X., Li, B., Zhang, S., Du, P., Zhang, X., and Yi, F. (2009b). NADPH oxidase-derived ROS contributes to upregulation of TRPC6 expression in puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury. *Cell Physiol Biochem* 24, 619-626.
- Wedel, B., Boyles, R.R., Putney, J.W., Jr., and Bird, G.S. (2007). Role of the store-operated calcium entry proteins Stim1 and Orai1 in muscarinic cholinergic receptor-stimulated calcium oscillations in human embryonic kidney cells. *J Physiol* 579, 679-689.

- Wei, H., Sagalajev, B., Yuzer, M.A., Koivisto, A., and Pertovaara, A. (2015). Regulation of neuropathic pain behavior by amygdaloid TRPC4/C5 channels. *Neurosci Lett* *608*, 12-17.
- Weinman, E.J., Hall, R.A., Friedman, P.A., Liu-Chen, L.Y., and Shenolikar, S. (2006). The association of NHERF adaptor proteins with G protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Physiol* *68*, 491-505.
- Weissmann, N., Dietrich, A., Fuchs, B., Kalwa, H., Ay, M., Dumitrascu, R., Olschewski, A., Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Ghofrani, H.A., Schermuly, R.T., Pinkenburg, O., Seeger, W., Grimminger, F., and Gudermann, T. (2006). Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 19093-19098.
- Weissmann, N., Sydykov, A., Kalwa, H., Storch, U., Fuchs, B., Mederos y Schnitzler, M., Brandes, R.P., Grimminger, F., Meissner, M., Freichel, M., Offermanns, S., Veit, F., Pak, O., Krause, K.H., Schermuly, R.T., Brewer, A.C., Schmidt, H.H., Seeger, W., Shah, A.M., Gudermann, T., Ghofrani, H.A., and Dietrich, A. (2012). Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice. *Nat Commun* *3*, 649.
- Welsh, D.G., Morielli, A.D., Nelson, M.T., and Brayden, J.E. (2002). Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* *90*, 248-250.
- White, J.P., Wrann, C.D., Rao, R.R., Nair, S.K., Jedrychowski, M.P., You, J.S., Martinez-Redondo, V., Gygi, S.P., Ruas, J.L., Hornberger, T.A., Wu, Z., Glass, D.J., Piao, X., and Spiegelman, B.M. (2014). G protein-coupled receptor 56 regulates mechanical overload-induced muscle hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 15756-15761.
- Williamson, J.D., Sadofsky, L.R., and Hart, S.P. (2015). The pathogenesis of bleomycin-induced lung injury in animals and its applicability to human idiopathic pulmonary fibrosis. *Experimental lung research* *41*, 57-73.
- Winn, M.P., Conlon, P.J., Lynn, K.L., Farrington, M.K., Creazzo, T., Hawkins, A.F., Daskalakis, N., Kwan, S.Y., Ebersviller, S., Burchette, J.L., Pericak-Vance, M.A., Howell, D.N., Vance, J.M., and Rosenberg, P.B. (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* *308*, 1801-1804.
- Woffle, S.E., Navarro-Gonzalez, M.F., Grayson, T.H., Stricker, C., and Hill, C.E. (2010). Involvement of nonselective cation channels in the depolarisation initiating vasomotion. *Clin Exp Pharmacol Physiol* *37*, 536-543.
- Worley, P.F., Zeng, W., Huang, G.N., Yuan, J.P., Kim, J.Y., Lee, M.G., and Muallem, S. (2007). TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium* *42*, 205-211.
- Wu, X., Eder, P., Chang, B., and Molkenkin, J.D. (2010). TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 7000-7005.
- Wu, X., Zagranichnaya, T.K., Gurda, G.T., Eves, E.M., and Villereal, M.L. (2004). A TRPC1/TRPC3-mediated increase in store-operated calcium entry is required for differentiation of H19-7 hippocampal neuronal cells. *J Biol Chem* *279*, 43392-43402.
- Xi, Q., Adebisi, A., Zhao, G., Chapman, K.E., Waters, C.M., Hassid, A., and Jaggar, J.H. (2008). IP3 constricts cerebral arteries via IP3 receptor-mediated TRPC3 channel activation and independently of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res* *102*, 1118-1126.
- Xu, S.Z., Boulay, G., Flemming, R., and Beech, D.J. (2006). E3-targeted anti-TRPC5 antibody inhibits store-operated calcium entry in freshly isolated pial arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *291*, H2653-2659.
- Xue, T., Do, M.T., Riccio, A., Jiang, Z., Hsieh, J., Wang, H.C., Merbs, S.L., Welsbie, D.S., Yoshioka, T., Weissgerber, P., Stolz, S., Flockerzi, V., Freichel, M., Simon, M.I., Clapham, D.E., and Yau, K.W. (2011). Melanopsin signalling in mammalian iris and retina. *Nature* *479*, 67-73.
- Yamamoto, K., Korenaga, R., Kamiya, A., and Ando, J. (2000). Fluid shear stress activates Ca<sup>2+</sup> influx into human endothelial cells via P2X4 purinoceptors. *Circ Res* *87*, 385-391.
- Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Kobayashi, M., Kawamura, K., Masuda, H., Kamiya, A., and Ando, J. (2006). Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* *12*, 133-137.
- Yasuda, N., Miura, S., Akazawa, H., Tanaka, T., Qin, Y., Kiya, Y., Imaizumi, S., Fujino, M., Ito, K., Zou, Y., Fukuhara, S., Kunimoto, S., Fukuzaki, K., Sato, T., Ge, J., Mochizuki, N., Nakaya, H., Saku, K., and Komuro, I. (2008). Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep* *9*, 179-186.

- Yildirim, E., Dietrich, A., and Birnbaumer, L. (2003). The mouse C-type transient receptor potential 2 (TRPC2) channel: alternative splicing and calmodulin binding to its N terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 2220-2225.
- Yip, H., Chan, W.Y., Leung, P.C., Kwan, H.Y., Liu, C., Huang, Y., Michel, V., Yew, D.T., and Yao, X. (2004). Expression of TRPC homologs in endothelial cells and smooth muscle layers of human arteries. *Histochem Cell Biol* *122*, 553-561.
- Yu, Y., Sweeney, M., Zhang, S., Platoshyn, O., Landsberg, J., Rothman, A., and Yuan, J.X. (2003). PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol* *284*, C316-330.
- Yuan, J.P., Kim, M.S., Zeng, W., Shin, D.M., Huang, G., Worley, P.F., and Muallem, S. (2009). TRPC channels as STIM1-regulated SOCs. *Channels (Austin)* *3*, 221-225.
- Zagranichnaya, T.K., Wu, X., and Villereal, M.L. (2005). Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *J Biol Chem* *280*, 29559-29569.
- Zeng, B., Yuan, C., Yang, X., Atkin, S.L., and Xu, S.Z. (2013). TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Current cancer drug targets* *13*, 103-116.
- Zeng, F., Xu, S.Z., Jackson, P.K., McHugh, D., Kumar, B., Fountain, S.J., and Beech, D.J. (2004). Human TRPC5 channel activated by a multiplicity of signals in a single cell. *J Physiol* *559*, 739-750.
- Zhang, J., and Webb, D.M. (2003). Evolutionary deterioration of the vomeronasal pheromone transduction pathway in catarrhine primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 8337-8341.
- Zhang, Q., Ma, J., Xie, J., Wang, Z., Zhu, B., Hao, X., Yang, L., Ren, H., and Chen, N. (2013). Screening of ACTN4 and TRPC6 mutations in a Chinese cohort of patients with adult-onset familial focal segmental glomerulosclerosis. *Contributions to nephrology* *181*, 91-100.
- Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Zhang, X.H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 9357-9362.
- Zhang, Y.L., Frangos, J.A., and Chachisvilis, M. (2009). Mechanical stimulus alters conformation of type 1 parathyroid hormone receptor in bone cells. *Am J Physiol Cell Physiol* *296*, C1391-1399.
- Zhao, H., Yao, P., Li, L., and Chen, L. (2016). Apelin receptor signaling: a novel mechanism of endothelial cell polarization. *Acta biochimica et biophysica Sinica* *48*, 1138-1139.
- Zhu, B., Chen, N., Wang, Z.H., Pan, X.X., Ren, H., Zhang, W., and Wang, W.M. (2009). Identification and functional analysis of a novel TRPC6 mutation associated with late onset familial focal segmental glomerulosclerosis in Chinese patients. *Mutation research* *664*, 84-90.
- Zhu, M.H., Chae, M., Kim, H.J., Lee, Y.M., Kim, M.J., Jin, N.G., Yang, D.K., So, I., and Kim, K.W. (2005). Desensitization of canonical transient receptor potential channel 5 by protein kinase C. *Am J Physiol Cell Physiol* *289*, C591-600.
- Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1996). trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell* *85*, 661-671.
- Zhu, Y., Pan, Q., Meng, H., Jiang, Y., Mao, A., Wang, T., Hua, D., Yao, X., Jin, J., and Ma, X. (2015). Enhancement of vascular endothelial growth factor release in long-term drug-treated breast cancer via transient receptor potential channel 5-Ca(2+)-hypoxia-inducible factor 1alpha pathway. *Pharmacol Res* *93*, 36-42.
- Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., Toko, H., Tamura, K., Kihara, M., Nagai, T., Fukamizu, A., Umemura, S., Iiri, T., Fujita, T., and Komuro, I. (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol* *6*, 499-506.

## 5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann dafür, dass er es mir ermöglichte, wissenschaftlich tätig zu sein und meine eigenen wissenschaftlichen Ideen zu verfolgen. Für seine langjährige Förderung und Unterstützung gilt ihm mein herzlichster Dank.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler für seine kompetente Unterstützung in allen wissenschaftlichen Belangen, für die langjährige gute Zusammenarbeit und für seine Freundschaft.

Herrn Prof. Karl-Ludwig Laugwitz danke ich aufrichtig für die Unterstützung bei der Verwirklichung meines Habilitationsprojektes.

Allen ehemaligen und derzeitigen Doktoranden, insbesondere Frau Dr. Stephanie Blodow, Frau Serap Erdogmus, Frau Dr. Anna-Lena Forst, Frau Moira Mager, Herrn Vlad Olteanu, Frau Dr. Franziska Pardatscher, Herrn Dr. Holger Schneider und Frau Julie Straub und danke ich vielmals für ihr Engagement im Labor, für die vielen anregenden Diskussionen und für das freundliche Miteinander. Besonderer Dank geht auch an Dr. Jana Demleitner und Katharina Hofmann.

Ich bedanke mich außerdem sehr herzlich bei Frau Laura Danner für ihre hervorragende technische Unterstützung und die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Zudem danke ich allen Kollegen am Walther-Straub-Institut, die mich unterstützt haben. Besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Alexander Dietrich für die gute Zusammenarbeit bei Kooperationsprojekten und an Herrn Dr. Vladimir Chubanov für die spannenden wissenschaftlichen Diskussionen. Mein Dank gilt auch meinen Kollegen aus der medizinischen und wissenschaftlichen Lehre für ihre Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Privatdozent Dr. Dr. Harald Mückter und Frau Prof. Dr. Ingrid Boekhoff bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Kooperationspartnern für den regen methodischen und wissenschaftlichen Austausch.

Mein Dank geht auch an Frau Johanna Zaißerer, Herrn Peter Mann und Herrn Hans-Jürgen Schindler für ihre hervorragende technische Unterstützung, dem Sekretariat mit Frau Jutta Schreier, Frau Monika Krämer und Frau Lena Beggel sowie der Finanzverwaltung mit Frau Josefine Lakatos. Ich bedanke mich zudem sehr herzlich bei Frau Doris Estermann für die exzellente Pflege meiner Yuccapalme.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsprojekte danke ich der FoeFoLe-Förderung der Fakultät für Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, der Friedrich-Baur-Stiftung sowie der Münchner Medizinischen Wochenschrift. Außerdem danke ich der Ludwig-Maximilians-Universität München für Mittel für die Gleichstellung in Forschung und Lehre.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Schwester und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben und mir jederzeit mit Motivation und Aufmunterung beiseite standen. Ich danke besonders auch den Wissenschaftlerinnen von WOPOL e.V. für ihre ermutigende Unterstützung.

Zu guter Letzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, die mich stets liebevoll unterstützt und mir in jeder Lebenslage Rückhalt geboten haben. Ihnen widme ich diese Arbeit.

## 6 Eigene Publikationen

Die folgenden 15 Originalpublikationen und 4 Übersichtsartikel sind der Habilitationsschrift angefügt:

### 6.1 Originalarbeiten

1. Storch U\*, Straub J\*, Erdogmus S, Gudermann T und Mederos y Schnitzler M.  
Dynamic monitoring of  $G_{i/o}$ -protein-mediated decreases of intracellular cAMP by FRET-based Epac sensors.  
*Pflugers Arch.* 2017 Jun;469(5-6):725-737 \*geteilte Erstautorenschaft
2. Storch U\*, Forst AL\*, Pardatscher F, Erdogmus S, Philipp M, Gregoritz M, Mederos y Schnitzler M und Gudermann T.  
Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jan 3;114(1):E37-E46. \*geteilte Erstautorenschaft
3. Hofmann K, Fiedler S, Vierkotten S, Weber J, Klee S, Jia J, Zwicklenpflug W, Flockerzi V, Storch U, Yildirim AÖ, Gudermann T, Königshoff M und Dietrich A.  
Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis.  
*Biochim Biophys Acta.* 2017 Feb;1863(2):560-568.
4. Forst AL, Olteanu VS, Mollet G, Wlodkowski T, Schaefer F, Dietrich A, Reiser, J, Gudermann T, Mederos y Schnitzler M und Storch U.  
Podocyte purinergic  $P_2X_4$  channels are mechanotransducers that mediate cytoskeletal disorganization.  
*J Am Soc Nephrol.* 2016 Mar; 27(3):848-862.
5. Kalwa H\*, Storch U\*, Demleitner J\*, Fiedler S, Mayer T, Kannler M, Fahlbusch M, Barth H, Smrcka A, Hildebrandt F, Gudermann T und Dietrich A.  
Phospholipase C epsilon-induced TRPC6 activation: A common but redundant mechanism in primary podocytes.  
*J Cell Physiol.* 2015 Jun;230(6):1389-1399. \*geteilte Erstautorenschaft

6. Storch U\*, Blodow S\*, Gudermann T und Mederos y Schnitzler M.  
Cysteinyl Leukotriene 1 receptors as novel mechanosensors mediating myogenic tone together with angiotensin II type 1 receptors.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Jan;35(1):121-126. \*geteilte Erstautorenschaft
7. Malczyk M, Veith C, Fuchs B, Hofmann K, Storch U, Schermuly RT, Witzentrath M, Ahlbrecht K, Fecher-Trost C, Flockerzi V, Ghofrani HA, Grimminger F, Seeger W, Gudermann T, Dietrich A und Weissmann N.  
Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension.  
*Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Dec 15;188(12):1451-1459.
8. Blodow S\*, Schneider H\*, Storch U\*, Wizemann R, Forst AL, Gudermann T und Mederos y Schnitzler M.  
Novel role of mechanosensitive AT<sub>1B</sub> receptors in myogenic vasoconstriction.  
*Pflugers Arch.* 2014 Jul;466(7):1343-1353. \*geteilte Erstautorenschaft
9. Weissmann N, Sydykov A, Kalwa H, Storch U, Fuchs B, Mederos y Schnitzler M, Brandes RP, Grimminger F, Meissner M, Freichel M, Offermanns S, Veit F, Pak O, Krause KH, Schermuly RT, Brewer AC, Schmidt HH, Seeger W, Shah AM, Gudermann T, Ghofrani HA und Dietrich A.  
Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice.  
*Nat Commun.* 2012 Jan 31;3:649.
10. Jung CB, Moretti A, Mederos y Schnitzler M, Iop L, Storch U, Bellin M, Dorn T, Ruppenthal S, Pfeiffer S, Goedel A, Dirschinger RJ, Seyfarth M, Lam JT, Sinnecker D, Gudermann T, Lipp P und Laugwitz KL.  
Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.  
*EMBO Mol Med.* 2012 Mar;4(3):180-191.
11. Storch U, Forst AL, Philipp M, Gudermann T und Mederos y Schnitzler M.  
Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes.  
*J Biol Chem.* 2012 Jan 27;287(5):3530-3540.
12. Mederos y Schnitzler M\*, Storch U\*, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, Gollasch M und Gudermann T.  
G<sub>q</sub>-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction.  
*EMBO J.* 2008 Dec 3;27(23):3092-103. \*geteilte Erstautorenschaft

13. Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaja G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L und Gudermann T.  
Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1.  
*Pflugers Arch.* 2007 Dec;455(3):465-477.
14. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F und Gudermann T.  
Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 12;103(50):19093-19098.
15. Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T und Birnbaumer L.  
Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice.  
*Mol Cell Biol.* 2005 Aug;25(16):6980-6989.

## 6.2 Übersichtsartikel

1. Mederos y Schnitzler M, Storch U und Gudermann T.  
Mechanosensitive Gq/11 Protein-Coupled Receptors Mediate Myogenic Vasoconstriction.  
*Microcirculation.* 2016 Nov;23(8):621-625.
2. Storch U, Mederos y Schnitzler M und Gudermann T.  
G protein-mediated stretch reception.  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Mar 15;302(6):H1241-1249.
3. Mederos y Schnitzler M, Storch U und Gudermann T.  
AT1 receptors as mechanosensors.  
*Curr Opin Pharmacol.* 2011 Apr;11(2):112-116.
4. Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Kalwa H, Storch U und Gudermann T.  
Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels.  
*Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2005 Apr;371(4):257-265