

Aus dem Bereich Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Biophysikalische Eigenschaften und Aktivierungsmechanismen
des TRPC4/CCE1 – Ionenkanals**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2006

vorgelegt von: Jan Warnat
geb. am: 20.04.1971 in Neustadt/Weinstraße

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	3
1.1	Summary.....	3
2	Einleitung	3
2.1	Kalziumsignale in nicht erregbaren Zellen	3
2.2	Kapazitiver oder speichergesteuerter Kalziueinstrom	3
2.3	Die Molekulare Basis der Speicher- gesteuerten Calciumkanäle in Säugetierzellen ...	3
2.4	Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der TRP-Proteine in Säugetierzellen	3
2.5	Fragestellung	3
3	Material und Methodik	3
3.1	Elektrophysiologische Methoden	3
3.1.1	Messplatz	3
3.1.2	Pipetten.....	3
3.1.3	Verstärker, A/D-Wandler und Verarbeitungscomputer	3
3.1.4	Messprotokoll der Gesamtzellableitungen.....	3
3.1.5	Auswertung der Strom-/Spannungskurven	3
3.1.6	Zusammensetzung der Pipetten- und Badlösungen	3
3.2	Zellkulturen	3
3.3	Fura-2-Messungen	3
3.4	Statistik	3
4	Ergebnisse	3
4.1	Selektion von TRPC4/CCE1-transfizierten Zellen.....	3
4.2	Aktivierung von Ionenströmen in CHO(-) und CHO(CCE)-Zellen durch IP ₃	3
4.3	Untersuchungen zu Aktivierungsmechanismen des Kationeneinstromes in CHO(CCE1)-Zellen	3
4.4	Permeation von monovalenten und divalenten Ionen in IP ₃ -aktivierten CHO(CCE1)-Zellen	3
4.5	Kapazitative Kalziumströme in Nebennierenrindenzellen: TRPC4/CCE1 in ihrem natürlichen Umfeld.....	3
4.6	Nachweis eines speichergesteuerten Kalziueinstroms in SBAC-Zellen mit Fura-2-Fluoreszenzmessung	3
5	Diskussion	3
5.1	Stabile Expression von TRPC4/CCE1 in CHO-Zellen.....	3
5.2	Die Ionenkanaleigenschaften von TRPC4/CCE1	3
5.3	SBAC-Zellen exprimieren TRPC4/CCE1 und haben einen speichergesteuerten Kalziumstrom	3
5.4	TRPC4/CCE1 – ein Mitglied der TRP-Familie.....	3
6	Literaturverzeichnis	3
7	Publikationen	3
8	Lebenslauf	3

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AngII	Angiotensin II
ATP	Adenosintri-phosphat
BAPTA	1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure tetrakis(acetoxymethyl) ester
[Ca] _i	Intrazelluläre Kalziumkonzentration
[Ca] _o	Extrazelluläre Kalziumkonzentration
CCE1	Capcitative calcium entry (channel) 1, TRPC4 in der aktuellen Nomenklatur
CHO	Chinese Hamster Ovary (cells)
cDNA	Complementary DNA
CRAC	Calcium release activated channel
DAG	Diacylglycerol
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fura-2	Fura-25-Oxazolcarboxylsäure, 2-(6-(bis(carboxymethyl)amino)-5-(2-(2-(bis(carboxymethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)-2-benzofuranyl)-5-oxazolcarboxylsäure
HEDTA	N-(2-Hydroxyethyl)ethylendiamin-N,N',N'-triessigsäure
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HEK	Human embryonic kidney (cells)
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₄	Inositoltetrakisphosphat
NMDG	<i>N</i> -methyl-D-glucamin
PLC β	Phospholipase C β
PLC γ	Phospholipase C γ
RBL	Rat basophilic leukemia (cells)
SBAC	Bovine adrenal cortex cells
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SOC	Store operated channel

TG	Thapsigargin
TRP	Transient receptor potential
TRPC	Transient receptor potential channels
TRPL	Transient receptor potential like (channels)

1 Zusammenfassung

Die Familie der TRP-Proteine stellen eine heterogenen Gruppe von Kalzium leitenden Ionenkanälen dar, die sich bezüglich ihrer Aktivierung und Leitungseigenschaften sowie in ihrer Gewebeverteilung z.T. stark unterscheiden. So finden sich durch Hitze und Capsaicin aktivierbare Ionenkanäle, andere TRP-Proteine wirken als Osmolariätssensoren. Weitere Vertreter dieser Proteinfamilie haben wichtige Funktionen bei der Vasorelaxation, bei der Akrosomalen Reaktion oder wirken als Tumorsuppressor. Mutationen und Defekte in bestimmten TRP-Proteinen können die Polyzystische Nierenerkrankung oder eine Form der Mukopolidose auslösen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist TRPC4/CCE1, ein Vertreter der TRP-Familie, welcher aus Rinderretina- und Nebennierenrindenzellen kloniert wurde.

Im ersten Teil wurden die Aktivierungsmechanismen sowie die biophysikalischen Eigenschaften von TRPC4/CCE1 nach stabiler Expression in CHO-Zellen (CHO(CCE1)) mit Hilfe der patch-clamp Technik untersucht. Im zweiten Teil wurde mit equivalent angelegten Experimenten und zusätzlichen Fura-2-Fluoreszenzmessungen gezeigt, dass Nebennierenzellen des Rindes (SBAC-Zellen), die nativ TRPC4/CCE1 exprimieren, sehr ähnliche funktionelle Eigenschaften aufweisen. Somit konnte die Aktivierung und die Eigenschaften der durch TRPC4/CCE1 getragene Ströme auch in ihrem nativen Umfeld untersucht werden.

In beiden Zellsystemen, CHO(CCE1) und SBAC, ließ sich durch Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher, sowohl mit IP_3 als auch mit Thapsigargin, nicht aber mit IP_4 , ein einwärts gerichteter Strom mit deutlich positivem Umkehrpotential und ohne wesentliche Auswärtskomponente aktivieren. Dieser war signifikant größer als ein prinzipiell ähnlicher, aber sehr kleiner endogener Strom in nativen CHO-Zellen, welche nicht TRPC4/CCE1 exprimierten. Damit wurde funktionell nachgewiesen, dass TRPC4/CCE1 in CHO(CCE1)-Zellen und in SBAC-Zellen Speicher-gesteuerte Ionenkanäle bilden kann.

In weiteren Versuchen mit CHO(CCE1) konnte durch Variation der extrazellulären Ionenzusammensetzung gezeigt werden, dass der einwärts gerichtete Strom im wesentlichen von Ca^{2+} -Ionen getragen wird. Ca^{2+} -Ionen konnten durch Ba^{2+} -Ionen ersetzt werden ohne Änderungen in der Strom-Spannungskennlinie und der Stromdichte bei -

80mV. Na^+ fließt in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} im Konzentrationsbereich von 1-10 mM oder von 2 mM Mg^{2+} nicht durch den Kanal, wohl aber in Abwesenheit von extrazellulären divalenten Ionen. Dann kann dieser Natriumstrom mit Ca^{2+} im Bereich von 2- 5 μM vollständig blockiert werden. TRPC4/CCE1 zeigt also einen anomalen Molfraktionseffekt bezüglich Ca^{2+} und Na^+ , d.h. die Leitungseigenschaften und die Selektivität des Kanals ist abhängig von der extrazellulären Ionenzusammensetzung. Auch die korrespondierenden Messungen in SBAC-Zellen zeigten einen vergleichbaren Molfraktionseffekt. Als Ursache für diese Effekte kommt in Frage, dass TRPC4/CCE1-Kanäle Multi-Ionen-Poren bilden und darin Kalziumbindungsstellen hoher Affinität besitzen. Dies kann bei physiologischen extrazellulären Kalziumkonzentrationen den Fluß monovalenter Kationen durch den Kanal verhindern und andererseits eine hohe Kalziumselektivität erklären.

Insgesamt kann geschlossen werden, dass TRPC4/CCE1 eine speichergesteuerten, kalziumselektiven Ionenkanal darstellt, dessen Phänotyp CHO(CCE1)-Zellen und SBAC-Zellen repräsentieren.

Sowohl native, als auch rekombinante TRP-Kanäle können Heteromultimere bilden, die dann sehr unterschiedliche funktionelle Eigenschaften besitzen. TRPC4/CCE1 könnte ein geeigneter Kandidat für eine für die Kalziumselektivität verantwortliche Untereinheit sein.

1.1 Summary

The family of TRP proteins is a diverse group of calcium conducting ion channels with different activation mechanisms, ionic permeation and tissue distribution. Some of them are ion channels, which can be activated by heat or capsaicin, other TRP proteins function as sensors for osmolarity. Some members of this protein family play important roles in vasorelaxation, the acrosomal reaction or act as tumor suppressors. Mutations and defects in certain TRP proteins are responsible for polycystic kidney disease or one type of mucopolysaccharidosis. One member of the TRP family, which has been cloned from bovine retina and adrenal gland called TRPC4/CCE1 is subject of this thesis.

In the first part the activation mechanisms and biophysical properties of stably expressed TRPC4/CCE1 in CHO cells have been investigated using the patch clamp technique.

In the second part it has been shown in corresponding experiments and additional Fura-2 fluorescence measurements, that bovine adrenal gland cells (SBAC), which express TRPC4/CCE1 natively, exhibit very similar functional properties. Thus the activation and characteristics of TRPC4/CCE1 was investigated also in their native environment.

In both cell lines, SBAC and CHO(CCE1), the depletion of intracellular calcium stores by both IP_3 and Thapsigargin, but not by IP_4 , evoked an inward rectifying current with clearly positive reversal potential. This current significantly differed from a very small current in native CHO cells not expressing TRPC4/CCE1. This proves that TRPC4/CCE1 forms store operated ion channels in CHO(CCE1) and SBAC cells.

Variation of the extracellular ionic composition in further experiments revealed that the inward rectifying current is mainly carried by Ca^{2+} ions. Ca^{2+} ions could be replaced by Ba^{2+} ions without noticeable changes in the current voltage relations or the current density at -80mV. Na^+ was not able to permeate through the channel as long as extracellular Ca^{2+} in the range between 1 and 10 mM or 2 mM extracellular Mg^{2+} was present. Without extracellular divalent ions, Na^+ can permeate through the channel. This current could be blocked by 2-5 μM extracellular Ca^{2+} . Therefore TRPC4/CCE1 shows an anomalous mole fraction effect regarding Ca^{2+} and Na^+ , which means that the permeation properties and selectivity of the channels is dependant on the composition of the extracellular solution. The reason for this behaviour can be that TRPC4/CCE1 forms multi ion pores with internal high affinity calcium binding sites. So at physiological extracellular calcium

concentrations a flux of monovalent ions is prevented and, on the other hand, a high selectivity of the channel for Ca^{2+} can be explained.

These results lead to the main conclusion that TRPC4/CCE1 forms a store operated calcium selective channel and CHO(CCE1) cells und SBAC cells represent its phenotype.

Both native and recombinant TRP channels can form heteromultimeres, which show many different properties. TRPC4/CCE1 could be a promising candidate for a calcium selective unit.

2 Einleitung

Kalzium ist in vielfältigster Weise an wichtigen Zellfunktionen wesentlich beteiligt. Neben den essentiellen Funktionen in Nerven- und Muskelzellen spielt Kalzium eine wichtige Rolle als intrazellulärer Botenstoff in nicht erregbaren Zellen, z. B. bei der Apoptose, Immunantwort, Zellteilung, Drüsensekretion und vielen anderen Zellfunktionen (Carafoli (2002), Clapham (1995)). Während die Kalziumkonzentration im Extrazellulärraum etwa 2 mmol/l beträgt, sind es im Zytoplasma nur etwa ein Zwanzigtausendstel davon, circa 100-200 nmol/l. Dieser hohe Konzentrationsgradient wird durch Pufferung mittels intrazellulärer Kalzium-bindender Proteine sowie durch aktive Kalziumpumpen und Natrium-Kalzium-Gegentransporter aufrecht erhalten, die fortwährend Kalziumionen aus der Zelle heraus und auch vom Zytoplasma in die Zellorganellen pumpen. Die Bedeutung einer engmaschigen Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration lässt sich u. a. daran erkennen, dass sowohl zu niedrige aber auch zu hohe, lang anhaltende Kalziumkonzentrationen zum Zelltod führen können.

Auch kann die Dysfunktion der Ca^{2+} -Homöostase eine Vielzahl neuronaler, kardiovaskulärer und endokriner Erkrankungen hervorrufen (Missiaen et al. (2000)).

Die Bedeutung von Kalziumionen als intrazellulärem Botenstoff kommt dadurch zustande, dass in Abhängigkeit des Stimulus bzw. dessen Intensität und Dauer die Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration in ihrer Amplitude, in ihrem zeitlichen Verlauf und in ihrer subzellulären Lokalisation variiert, so dass Kalziumsignale unterschiedlicher Natur entstehen wie z. B. einzelne Erhöhungen, Plateaus, Wellen und Oszillationen (Berridge (1997)). Durch die Amplitude und Frequenz solcher Kalziumsignale ist eine effiziente Kodierung der Antworten in nahezu allen nicht-erregbaren Zellen möglich.

2.1 Kalziumsignale in nicht erregbaren Zellen

In nicht-erregbaren Zellen werden Kalziumsignale durch die Bindung eines Hormons oder Wachstumsfaktors an membranständigen Rezeptoren initiiert. Durch die Aktivierung solcher G-Protein gekoppelten Rezeptoren bzw. von Rezeptortyrosinkinasen werden die Phospholipasen C ($\text{PLC}\beta$ und $\text{PLC}\gamma$) aktiviert, die Biphosphoinositolphosphatid zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) spalten (Berridge, 1993). IP_3

kann an einen Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum (ER) - dem wesentlichen intrazellulären Kalziumspeicher (Burgess et al. 1983, Bird et al. 1992) - binden und einen Kalziumkanal aktivieren (Suppattapone et al. 1988), was zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt.

Es konnte gezeigt werden, daß es parallel dazu zu einem Kalziumeinstrom über die Zellmembran kommt, so dass die Kalziumsignale, die spezifische Antworten in nicht-erregbaren Zellen hervorrufen, biphasische Prozesse darstellen (Putney et al., 1981). Dieser Sachverhalt führte zur Entwicklung des Konzeptes des Kapazitiven Kalziumeinstroms (Putney 1993, Berridge 1995).

2.2 Kapazitiver oder speichergesteuerter Kalziumeinstrom

Ausgehend von der oben beschriebenen Signalkaskade führt die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher zu dem so genannten kapazitiven oder speichergesteuerten Einstrom von Kalziumionen in das Zytosol (Takemura und Putney, 1989; Takemura et al., 1989; Hallam et al., 1989):

Die Experimente, die richtungsweisend bei der Entwicklung des Konzeptes des kapazitiven oder speichergesteuerten Kalziumeinstroms waren, sind in Abb.1 dargestellt (Takemura und Putney, 1989): Eine Stimulation der Zelle mit Methacholin führt in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium zur Entleerung der Kalziumspeicher und zum Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$.

Dieser Anstieg ist transient; schließlich wird Kalzium ständig aus dem Zytoplasma herausgepumpt. Anschließende Blockade dieses Aktivierungsweges führt zu keinem wesentlichen Effekt. Wenn dann aber die extrazelluläre Kalziumkonzentration "normalisiert" wird, zeigt sich ein zweiter Peak der intrazellulären Kalziumkonzentration in den behandelten Zellen, und zwar deutlich größer als in nicht stimulierten Kontrollzellen (als "overshoot" bezeichnet). Behandelt man die Zelle wieder in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin, welcher die Kalziumpumpe am intrazellulären Kalziumspeicher blockiert und somit diesen depletiert (Jackson 1988), kommt es in ähnlicher Weise wie bei der Stimulation mit Methacholin zu einem transienten Anstieg von $[Ca]_i$. Durch Zugabe von Kalzium extrazellulär wird ebenfalls wieder ein zweiter Anstieg des intrazellulären Kalziums generiert und der

Kalziumspiegel bleibt für längere Zeit erhöht. Eine Zugabe von Methacholin führt in dieser Phase zu keiner weiteren Änderung.

Daraus lassen sich mehrere Schlüsse ziehen:

- a) Bei dem „überschießenden“ Anstieg des Kalziumspiegels („overshoot“) muss es sich also um einen zusätzlich aktivierten Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol handeln.
- b) Das relevante Signal für die Aktivierung dieses Kalziumeinstroms ist nicht unmittelbar IP₃-abhängig, sondern durch die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher bedingt. Weiter konnte gezeigt werden, daß die Wiederauffüllung des intrazellulären Kalziumspeichers nicht direkt von extrazellulär, sondern über das Zytosol erfolgt (Putney 1990 und Putney et al.1993, Machen et al.1988). Während der Wiederauffüllung kommt es häufig zu transienten Erhöhung des [Ca]_i (Takemura et al. 1989a+b, Shuttleworth 1990).
- c) Der o.g. Kalziumeinstrom muss also durch spannungsunabhängige Kationenkanäle getragen werden, die auch möglicherweise selektiv für Ca²⁺-Ionen sind.

Da alleinig die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher maßgebend für die Aktivierung dieser Kationenkanäle ist, werden sie als kapazitative oder speichergesteuerte Kanäle bezeichnet („store-operated channel“ (SOC); „calcium-release-activated calcium (CRAC) channel“).

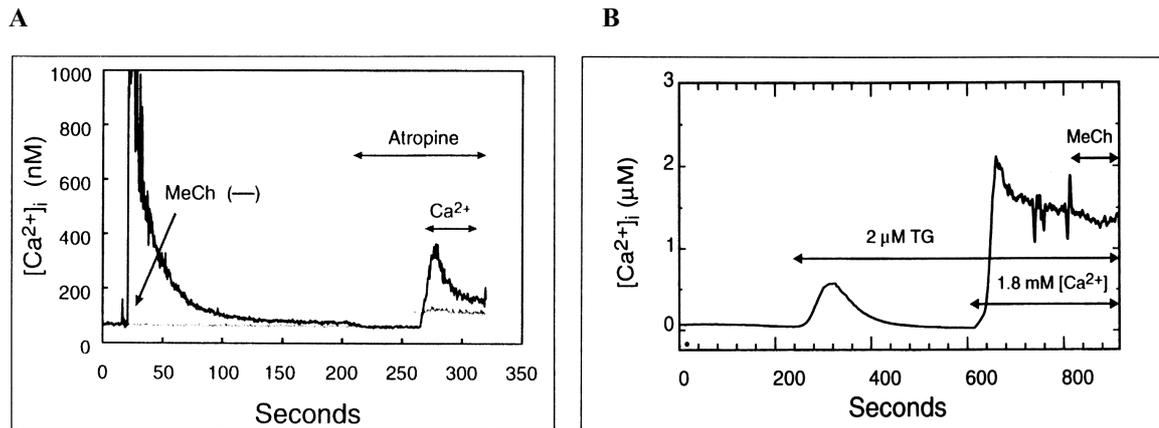


Abbildung 1 A: “Überschießender” Kalziumspiegel als Hinweis für einen speichergesteuerten Kalziumeinstrom (Takemura & Putney 1989). Parotiszellen der Ratte wurden in kalziumfreiem Medium inkubiert. Nach Stimulation mit Metacholin (MeCh) kommt es zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und anschließenden Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration. Nach Blockierung der muskarinergen Rezeptoren wird die extrazelluläre Kalziumkonzentration angehoben. In den zuvor speicherentleerten Zellen kommt es daraufhin zu einem deutlich stärkeren, transienten Anstieg des intrazellulären Kalziums. Kontrollexperiment grau dargestellt. **B:** Aktivierung mit Thapsigargin. Auch durch Entleerung der intrazellulären Speicher mit Thapsigargin in kalziumfreiem Medium kommt es nach Normalisierung des extrazellulären Kalziums zu einem deutlichen und transienten Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels. Dieser kann mit dem Agonisten nicht weiter erhöht werden.

Bis jetzt ist es aber noch nicht geklärt, welche Signale die Verbindung vom intrazellulären Kalziumspeicher zum Speicher-gesteuerten Ionenkanal herstellen. Prinzipiell ist ein löslicher Botenstoff, eine Kopplung über das Zytoskelett oder eine Art von Protein-Protein Interaktion (Irvine 1990) denkbar. Bei vielen ist die Aktivierung PLC-abhängig (Zhu et al. 1996, Okada et al. 1997, Okada et al. 1999, Vannier et al. 1999). Es wird vermutet, dass der IP_3 -Rezeptor des intrazellulären Kalziumspeichers direkt mit dem Kationen-/Kalziumkanal in der Zellmembran interagiert (Patterson et al. 1999). Nach künstlicher Trennung *in vitro* von ER und Zellmembran ließen sich einige Speichergesteuerten Kanäle nicht mehr aktivieren (Patterson et al. 1999, Ma et al. 2000). Andere Untersuchungen sprechen dafür, dass eine Exozytose von von Kanälen von intrazellulären Vesiceln an die Plasmamembran involviert ist (Fasolato et al. 1993, Somasundaram et al. 1995). Wieder andere Speicher-gesteuerten Kanäle lassen sich (*in vitro*) durch DAG aktivieren (Okada et al. 1999, Hofmann et al. 1999). Es gibt bisher keine einheitliche Theorie zur Aktivierung dieser Kanäle. Vielmehr ist wahrscheinlich, dass die inzwischen große und heterogen Gruppe dieser Kanäle auch unterschiedlich und abhängig davon, in welchem zellulären Umfeld sie exprimiert werden, aktiviert werden können. In Abb.2 wird das ursprüngliche Modell des Speichergesteuerten Kalziumeinstroms nochmals dargestellt.

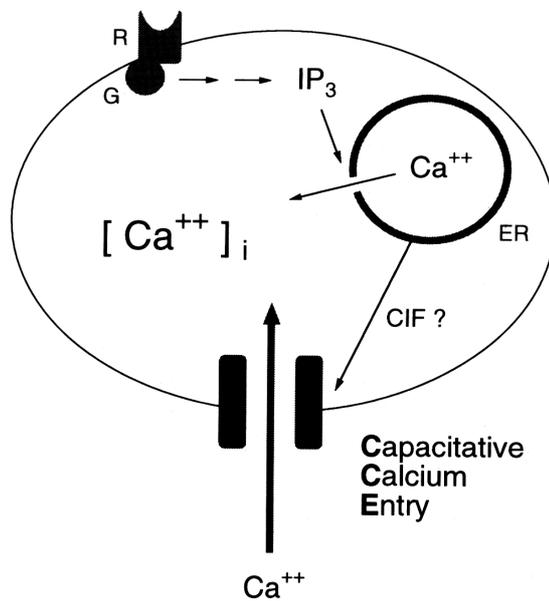


Abbildung 2: Modell des kapazitiven oder speichergesteuerten Kalziumeinstroms. R: Rezeptor. G: G-Protein. ER: Endoplasmatisches Reticulum. CIF: "Calcium influx factor".

Die Speicher-steuerten Kalziumkanäle finden sich in einer Vielzahl nicht erregbarer Zellen (aber auch in erregbaren Zellen), darunter Acinuszellen des Pankreas (Bahnson et al. 1993), T-Zellen (Fasolato et al. 1993, Fanger et al. 1995, Zweifach et al. 112+113), Mastzellen (Hoth et al. 1992+1993), Hepatozyten (Glennon et al. 1992, Thastrup et al. 1990), Endothelzellen (Dolor et al. 1992, Schilling et al. 1992), Makrophagen (Ohuchi et al. 1987), Zellen der Zona Glomerulosa (Ely et al. 1991, Rohács et al. 1994) und auch erstaunlich stark ausgeprägt im Gehirn bzw. Zellen des zentralen Nervensystems (Garcia et al. 1997, Li et al. 1999, Mori et al. 1998, Philipp et al. 1998).

2.3 Die Molekulare Basis der Speicher- gesteuerten Calciumkanäle in Säugetierzellen

Die Fruchtfliege *Drosophila*, die in vielfältiger Weise für die Untersuchung der zellulären Lichtantwort dienlich ist, war der Ausgangspunkt auf der Suche nach Genen, die für Speicher-gesteuerte Kanalproteine in Säugetierzellen kodieren. So wie die Aktivierung Speicher-gesteuerter Kationenkanäle in Säugetierzellen (s. Abb. 1) ist die Phototransduktion in *Drosophila* auch ein Phospholipase-C-abhängiger Prozess, der zu Na⁺- und Ca²⁺-Einströme in der Photorezeptorzellen führt und schließlich in einer lang anhaltenden Depolarisation der Zellmembran mündet (Baumann et al., 1995). Im Gegensatz dazu wies die spontan aufgetretene *trp* -Mutante der Fruchtfliege nur eine transiente Potentialänderung (*trp*: transient receptor potential) nach Lichtstimulation auf (Cosens et al. 1969; Minke et al. 1975). Durch Aufklärung des Gendefektes, der der *trp*-Mutante zugrunde lag, konnte das TRP-Gen identifiziert werden, das ein Kanalprotein mit sechs Transmembranregionen kodiert (Montell 1997).

TRP ist ein 143kDa-Protein mit Strukturähnlichkeit zu den spannungsabhängigen Ca-Kanälen (VOCs), allerdings ohne die als Spannungssensor angesehene Region in der S4-Domäne (Montell et al. 1989, Phillips et al. 1992). Es konnte gezeigt werden, daß das TRP-Protein hauptverantwortlich für den Calciumeinstrom in die Zelle nach Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher ist. So stellte TRP einen Prototyp für den Speicher gesteuerten Kalziumkanal dar (Minke et al. 1992, Peretz et al. 1994a+b). Darüber hinaus ließen sich in Expressionsstudien in Sf9-Zellen und *Xenopus* Oozyten Ca-Einströme nachweisen, welche durch Thapsigargin auslösbar sind (Peterson et al. 1995, Sinkins et al. 1996, Vaca et al. 1994). Mit Hilfe der Information aus der Aminosäuresequenz von TRP und TRPL, einem weiteren Protein aus der Photorezeptoren von *Drosophila* mit großer Homologie zu TRP, konnten in den letzten Jahren mehr als 20 TRP-ähnliche Proteine aus Säugetierzellen identifiziert werden. Zhu et al. fanden mittels GenBank-Recherche einen EST (expressed sequence tag) von humanem Gehirn, welche in einer Sequenz von 47 Aminosäuren mit der von *trp* übereinstimmte. Daraus konnte die komplette cDNA kloniert werden, welche ein 759 Aminosäuren langes, zu *Trp* homologes Protein codiert. Es wird *Trp1* (oder *Htrp1*) genannt. Mittels Northern-Plot konnte *trp1* unter anderem in der Niere, Lunge, Milz, Pankreas, Thymus, glatter und quergestreifter Muskulatur nachgewiesen

werden; in Leberzellen, welche bekanntermaßen einen Speicher-gesteuerten Calciumstrom besitzen, gelang der Nachweis mittels PCR (Zhu et al. 1995).

Auf Grund ihrer Primärstruktur werden TRPs in 6 Untergruppen unterteilt: TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPP und TRPML. Die 7 Mitglieder der TRPC Familie („classical TRPs“: TRPC1 bis TRPC7) weisen die größte Ähnlichkeit zu TRP aus *Drosophila* aber auch zueinander auf und unterscheiden sich vor allem in den carboxyterminalen Bereichen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit TRPC4/CCE1, welches aus Rinderretina- und Nebennierenrindenzellen kloniert werden konnte (Philipp et al. 1996). Das Protein besteht aus 981 Aminosäuren und das Molekulargewicht beträgt etwa 110 kDa. Hydropathieanalysen legen eine Topologie mit sechs Transmembrandomänen nahe, wie sie auch für TRP vermutet werden. Die vermutete Porenregion liegt zwischen S5 und S6 und weist Ähnlichkeit mit der von durch cyclische Nukloetide wie z.B cAMP gesteuerten Ionenkanäle auf. Philipp et al. (1996) konnten die Expression von TRPC4/CCE1 mittels Northern Plot in Rindergewebe, sowie auch im Herz-, Hoden- und Kleinhirngewebe nachweisen. TRPC4 konnte transient in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) überexprimiert werden und funktionell mit der Patch-Clamp-Technik untersucht werden. Es zeigte sich, daß TRPC4/CCE1 die Eigenschaften eines Kationenkanals besitzt, welcher durch Entleerung der intrazellulären Speicher mittels Thapsigargin oder IP3 aktiviert werden konnte und eine gewisse Selektivität für Kalzium besitzt (Philipp et al. 1996).

Um diesen Ionenkanal weiter elektrophysiologisch zu untersuchen wurde TRP4/CCE1 stabil in CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen exprimiert (Warnat et al. 1999).

Insgesamt 14 potentiell stabil TRPC4/CCE1 exprimierende Zellklone standen zur Verfügung. In 12 Klonen hatte sich mittels RT-PCR die Expression von TRPC4/CCE1 und dem Selektionsmarker Dihydrofolatreduktase nachweisen lassen (Warnat et al., 1999).

2.4 Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der TRP-Proteine in Säugetierzellen

Inzwischen wurde eine Vielzahl, funktionell sehr unterschiedlicher, TRP-ähnlicher Proteine in Säugetierzellen untersucht. Exemplarisch sollen hier einige TRP-Proteine erwähnt werden. TRPV ist ein Vinalloidrezeptor beim Menschen, ein Kationenkanal, welcher sich

z.B. durch Capsaicin (wie etwa in Chillischoten enthalten), Hitzeeinwirkung oder durch pH-Änderungen aktivieren lässt (Caterina et al. 1997). TRP12 ist ein ebenfalls beim Menschen zu findender Kationenkanal, der auf Osmolaritätsänderungen reagiert (Wissenbach et al. 2000, Strotmann et al. 2000). Ein Mitglied der TRPM-Subfamilie, MLSN, ist ein Tumorsuppressorprotein, dessen Expressionsstärke mit dem Ausmaß der Metastasierung und Tumoraggressivität in einer Maus-Melanom-Zelllinie umgekehrt korreliert (Duncan et al. 1998, Hunter et al. 1998). MTR1 scheint eine Rolle bei dem Beckwith-Wiederman-Syndrom zu spielen, welches mit einem erhöhten Risiko zu Entwicklung von Neoplasien einhergeht. PKD2, ein Mitglied der TRPP Subfamilie, ist bei der Polyzystischen Nierenerkrankung verändert. TRPC2 in der Maus (nicht aber beim Menschen) scheint eine Untereinheit eines Kalziumkanals in Spermien zu sein und ist essentiell für die akrosomale Reaktion bei der Verschmelzung mit der Eizelle (O'Toole et al. 2000, Jungnickel et al. 2001). Das osmolaritätssensitive OTRPC4 könnte eine wichtige Rolle beim Elektrolyttransport bzw. -regulation im Bereich des distalen Nephrons spielen (Wissenbach et al. 2000, Strotmann et al. 2000). VR1, ein TRPV-Protein wird vor allem im Bereich der Hinterwurzeln und der Trigemuskerngebiete exprimiert. Mäuse, denen VR1 fehlt, haben ein gestörtes Schmerzempfinden (Caterina et al. 2000, Gunthorpe et al. 2000). Eine Mutation in TRPML führt zur Entwicklung der neurodegenerativen Erkrankung Mukopolipidose Typ IV (Amir et al. 1987, Berman et al. 1974). TRPC3 gilt als Kationenkanal, oder zumindest eine Untereinheit desselben, der in Endothelzellen durch oxidativen Stress aktiviert werden kann (Ryazanov et al. 1997). Schließlich scheint auch TRPC4 in Endothelzellen eine relevante Funktion zu besitzen. TRPC4-defiziente Knockout-Mäuse zeigen eine gestörte Vasorelaxation im Bereich der Aorta; zugleich lassen sich in deren Endothelzellen keine Kalziumeinströme mehr aktivieren, sodass diese Gefäßdysfunktion auf den fehlenden Speicher-gesteuerten Kalziumkanal zurückzuführen sein könnte (Freichel et al. 2001).

2.5 Fragestellung

Im Rahmen der Vorliegenden Arbeit sollte zunächst mit Hilfe der Patch-Clamp Technik untersucht werden, ob TRPC4/CCE1-exprimierenden CHO-Zellen elektrophysiologische Eigenschaften eines Zellsystems mit einem speichergesteuerten Kalziumeinstrom besitzen.

Aus den 12 Klonen sollte ein geeigneter Kandidat für die weitere Charakterisierung dieser elektrophysiologischen Eigenschaften bestimmt werden.

Im Hauptteil der Arbeit sollte die Aktivierung des Kalziumeinstroms, die Leitungseigenschaften und Selektivität des TRPC4/CCE1-Ionenkanals für Na^+ , Ca^{2+} - und andere Ionen untersucht werden.

Des Weiteren wurde mit der Patch-Clamp Technik und Fura-2-Fluoreszenzmessungen untersucht, ob sich diese Eigenschaften auch in einem „nativen“, TRPC4/CCE1 exprimierenden Zellsystem, und zwar in Nebennierenrindenzellen des Rindes (SBAC-Zellen), finden lassen.

3 Material und Methodik

3.1 Elektrophysiologische Methoden

Für die Untersuchung der Ionenströme durch die Zellmembran wurde Patch-Clamp-Technik eingesetzt und Gesamtzell-Ableitungen durchgeführt (Hamill et al. 1981).

Dabei wird die Glaspipette, die einer Elektrode sowie das gewünschte intrazelluläre Medium enthält, auf eine isolierte Zelle aufgesetzt und die Zellmembran leicht angesaugt, sodaß eine Abdichtung zum umliegenden Bad im Gigaohmbereich liegt. Dann wird durch zusätzliches Ansaugen der Zellmembran in die Pipette die Membran perforiert. Die Lösungen der Pipette und des Zellinneren vermischen sich. Das Potential der in der Pipette befindlichen Elektrode zur Badelektrode ist dann gleich dem Membranpotential der Zelle und kann eingestellt und verändert werden (Spannungsklemme). Zusätzlich kann die Kapazität der Zellmembran als Maß für ihre Größe gemessen werden. Durch Umschalten auf den Stromklemme Modus kann das Ruhemembranpotential der Zelle bestimmt werden.

3.1.1 Messplatz

Die Untersuchungen wurden auf einem schwingungsgedämpften Tisch durchgeführt. Dieser war mit einem nach vorne offenen Faraday-Käfig abgeschirmt. Auf der Tischplatte waren das Mikroskop (Zeiss Axiovert 100) sowie ein hydraulischer Mikromanipulator montiert. An letzterem war die Pipettenhalterung befestigt. Mit Hilfe des Manipulators wurde die Pipette unter Mikroskopsicht auf der zu untersuchenden Zelle platziert. Die Pipette war luftdicht am Pipettenhalter befestigt. Über einen am Pipettenhalter angebrachten Schlauch konnte mit dem Mund ein Über-/Unterdruck im Pipetteninneren erzeugt werden.

Um die extrazelluläre Lösungen während der Messungen austauschen zu können, wurde eine Perfusionspipette mit großer Auslassöffnung mit einem Standardhalter in unmittelbarer Nähe zur Zelle platziert. In dieser zweiten Pipette waren ein bis drei dünne

Schläuche unmittelbar an der Pipettenspitze platziert. An diese Schläuchen war jeweils eine Vorratsspritze über einen Dreiwegehahn angeschlossen. Somit konnten verschiedene Badlösungen an die Zellen gespült werden. Die Perfusion oder die Geschwindigkeit des Lösungsaustausches durch die Schläuche konnte über die Höhe der Vorratsspritzen gegenüber der Messkammer reguliert werden bzw. über die Dreiwegehähne ein- und ausgeschaltet werden.

3.1.2 Pipetten

Die Messpipetten für die Patch-Clamp-Versuche wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (Kimax-51, Kimble) mit Widerständen von 2-3 M Ω hergestellt. Dazu wurde sie mit dem Pipettenpuller gezogen und ggf. wurden anschließend die Öffnungen der Pipettenspitzen hitzpoliert. Die Messungen erfolgten stets innerhalb der ersten zwei Stunden nach Pipettenherstellung.

3.1.3 Verstärker, A/D-Wandler und Verarbeitungscomputer

Als Vorverstärker und Hauptverstärker mit Steuerungsgerät wurde der EPC-7 (List) verwendet.

Zur Digitalisierung der Signale war daran ein A/D-Wandler (Digi Data 1200, Axon Instruments) angeschlossen. Die Abtastfrequenz war 10 kHz. Vorgeschaltet war ein 8-poliges Besselfilter mit 3 kHz Eckfrequenz.

Die Anzeige, Speicherung sowie Steuerung des EPC-7 erfolgte über einen Standard-PC. Als Steuerungs- und Bearbeitungssoftware wurde das Programm pCLAMP 6 (Axon Instruments) verwendet. Über dieses Programm konnte einerseits die Steuerung des EPC-7 erfolgen, d.h. insbesondere die Festlegung der Membranspannung und andererseits die gemessenen Strom-Spannungskurven unmittelbar während der Messung anzeigen. Die Messdaten wurden zur weiteren Verarbeitung und Visualisierung in das Programm Sigma-Plot importiert.

3.1.4 Messprotokoll der Gesamtzelleableitungen

In der Gesamtzelleableitung wurden Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV und 400 ms Dauer (Vergl. Abb. 4) alle fünf Sekunden appliziert. Das Haltepotential betrug 0 mV. Der Serienwiderstand und die Membrankapazität konnten am Verstärker abgelesen werden. Die elektronische Kompensation des Aufladevorgangs der Membrankapazität wurde zwischen 30% und 50% eingestellt. Der Serienwiderstand lag in allen weiter analysierten Experimenten unter 7 M Ω . Die Messungen wurden beendet wenn sich keine weitere Aktivierung mehr zeigte, diese rückläufig war oder ein technisches Problem eintrat. Im letzteren Fall wurde die Messung komplett verworfen.

3.1.5 Auswertung der Strom-/Spannungskurven

Drei bis fünf Strom-Spannungskurven der ersten zehn (bei Anwesenheit eines Agonisten in der Pipettenlösung) bzw. 60 Sekunden (vor Zugabe eines Agonisten in die Badlösung) nach Eröffnung der Zellmembran unter der Pipettenspitze wurden gemittelt und als „Leckstrom“ definiert. Aufgrund möglicher Artefaktbildung und zusätzlicher Effekte während des schnellen Umladevorgangs der Zellmembran beim Sprung des Membranpotentials von 0 mV auf -100 mV wurde der Bereich zwischen -100 mV und -80 mV für die spätere Auswertung nicht berücksichtigt. Ebenso der Bereich zwischen +80 mV und +100 mV. Als Maß für die Aktivierung wurde die Stromstärke bei -80 mV verwendet. Die Maximale Aktivierung des Stroms, d.h. die größte Stromstärke bei -80 mV wurde in der Messreihe aufgesucht und um diesen Zeitpunkt herum drei bis fünf Einzelmessungen gemittelt. Von diesem „aktivierten Strom“ wurde die Leckstromkurve subtrahiert und somit der „aktivierte Nettostrom“ erhalten. Die Stromstärke bei -80 mV wurde dann zur Membrankapazität (als Maß für die Zellgröße) ins Verhältnis gesetzt und diese Stromdichte als Parameter für die Vergleiche mit anderen Messungen und die statistische Analyse verwendet.

3.1.6 Zusammensetzung der Pipetten- und Badlösungen

Die verwendeten Pipetten- und Badlösungen sind in Tab.1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: Badlösungen (in mM)

Badlösungen	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	BaCl ₂	Hepes	NMDG
Standard	120	5	10	2		10	
B_Ba	120	5		2	10		
B_Na_frei		5	10	2		10	115
B_Na-Mg_frei		5	10			10	115
B_Ca_2	120	5	2	2		10	
B_Ca_05	120	5	0,5	2		10	

Der pH-Wert der Badlösungen wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt. In einigen Versuchen wurde die externe Kalziumkonzentration weiter variiert. Für eine Kalziumkonzentration von 2 und 5 μM wurde zur Standardbadlösung (ohne NaCl und MgCl₂) 0,39 bzw. 0,61 mM CaCl₂ mit 1 mM HEDTA (pH 7,2) zugegeben. Eine entsprechende Lösung mit 100 nM Kalziumkonzentration wurde mit 0,4 mM CaCl₂ und 1 mM EGTA (pH 7,2) erreicht. Eine Kalziumkonzentration von 1 nM wurde für eine Lösung ohne CaCl₂ und mit 1 mM EGTA (pH 7,2) angenommen. Die initiale NaCl-Konzentration wurde bei Verwendung von EGTA und HEDTA verringert, um eine endgültige Natriumkonzentration von 120 mM zu erreichen.

In einigen Versuchen wurde Thapsigargin, 1 μM während des Versuches zur Badlösung gegeben.

Tabelle 2: Pipettenlösungen (in mM, sofern nicht anders angegeben)

	CsCl	MgCl ₂	EGTA	BAPTA	Hepes	CaCl
Standard	115	4	10		10	
P_BAPTA	115	4		10	10	
P_Ca_400nM	115	4	10		10	6,9
P_Ca_1 μM	115	4	10		10	8,5

Der pH-Wert der Pipettenlösungen wurde mit CsOH auf 7,2 eingestellt. Im Falle der Lösungen P_Ca_400nM und P_Ca_1µM wird eine resultierende freie Kalziumkonzentration von 400 nM bzw. 1 µM angenommen. In einigen Versuchen wurde IP₃ 10 µM oder IP₄ 20 µM zur Pipettenlösung gegeben.

Die Lösungen wurden bei 4° C gelagert und vor Gebrauch filtriert.

EDTA, HEDTA, BAPTA, Hepes wurden von SIGMA bezogen. IP₃, IP₄ und Thapsigargin stammen von Calbiochem. Alle anderen Salze stammen von Migge, Heidelberg.

Die Kalziumkonzentrationen von 100 nM und 1 nM wurden bei einigen Abbildungen in Form des umgekehrten Logarithmus als p[Ca] angegeben.

3.2 Zellkulturen

Die CHO-Zellen wurden in Polystyren-Brutflaschen mit γ -bestrahlter Oberfläche (Falcon) in Ham's F12-Medium (GIBCO BRL) mit 10 % fötalem Kälberserum (Life Technologies), Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 mU/ml) (jeweils Sigma) bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert (Heraeus Brutschrank).

Die Zellen wachsen in Monolayern und wurden bei etwa 90% Konfluenz jeden dritten Tag passagiert. Dazu wurde nach Waschen mit gepufferter Salzlösung (PBS) eine 0,05% Trypsin Lösung zugegeben, sodaß gerade der Boden der Kulturflasche benetzt ist. Das Ablösen und Abrunden der Zellen durch Aufbrechen der Zellkontakte wird unter dem Mikroskop beobachtet. Nach ca. 3 min wird der Prozess durch die Zugabe einer 10fachen Menge an Medium (mit 10% Serum) gestoppt. Die Zellsuspension wurde zur weiteren Kultivierung auf neue Flaschen aufgeteilt oder je etwa 10⁵ Zellen in 35 mm Schälchen verteilt und ausreichend Kulturmedium mit Serum ergänzt. Die Zellen in den 35mm-Schälchen wurden einen Tag später für die Messungen verwendet.

Zur Lagerung wurden die Zellen nach Zentrifugation (800 U/min, 7 min) und Abtragen des Überstands in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Cryovials (Nunc) in

flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Einfriermedium bestand aus Ham's F12 Medium, 10% Kälberserum und 5% Dimethylsulfoxid (Merck).

Die vorgenannte gepufferte Salzlösung (PBS) enthielt pro Liter H₂O: 8g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2g KH₂PO₄, 2,16g Na₂HPO₄·7 H₂O. Der pH wurde auf 7,4 mit NaOH eingestellt.

Die SBAC-Zellen (ATCC, CRL 1796) wurden in identischer Weise kultiviert.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 mit annähernd laminarem Luftstrom (Heraeus) durchgeführt. Die verwendeten Lösungen wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Pipetten und andere Gebrauchsmaterialien wurden entweder autoklaviert, hitzesterilisiert oder als sterile Einmalartikel verwendet.

3.3 Fura-2-Messungen

Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration wurde qualitativ mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 ermittelt. Zur Beladung der Zellen wurde Fura-2 in membrangängiger Form als Acetoxymethylester (Fura-2/AM) eingesetzt. Hierfür wurden die zu untersuchende Zellen in einer Kulturschale 15 min mit 4 µM Fura-2/AM bei 37°C im Brutschrank inkubiert, so dass der Ester durch Esterasen im Cytosol gespalten wird und Fura-2 als freie Säure in der Zelle gefangen wird. Fura-2 ändert sein Exzitationsspektrum in Abhängigkeit der vorherrschenden Kalziumkonzentration. Bei Anregung mit UV-Licht von 380 nm Wellenlänge verringert sich die emittierte Lichtmenge mit steigender Kalziumkonzentration, während bei Anregung mit 340 nm die Emission zunimmt. Die Fluoreszenz bei 380 nm im Verhältnis zu der bei 340 nm ist also ein Maß für die Kalziumkonzentration in der Zelle. Bei dem Meßsystem TILLvision (TILL Photonics)

stehen o.g. Wellenlängen zur Verfügung. Computergesteuert wird der Lichtstrom über einen Spiegel 1 mal pro Sekunde umgestellt, so dass die Zellen abwechselnd mit beiden Wellenlängen beleuchtet werden. Mit einer an einem Steuerrechner angeschlossenen und an das Untersuchungsmikroskop gekoppelten CCD-Kamera wird der Experimentierbereich aufgenommen. Am Rechner lassen sich im Bildfeld Bereiche (ROI: : regions of interest) definieren, die einzeln analysiert werden können. Diese Bereiche waren

in diesem Fall jeweils eine komplette Zellen. Durch sekundliche Messung der Helligkeit dieser ROIs bei 340 und 380 nm kann nun der Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration jedes einzelnen ROIs bzw. Zelle gemessen werden. Dabei wird die Fluoreszenzquelle mit dem Umlenkspiegel durch den Rechner gesteuert, so dass jederzeit definiert ist, welches Licht auf die Zellen einwirkt. Die Kalziummessungen wurden unkalibriert durchgeführt, d.h. es werden nur qualitative Aussagen getroffen und nicht die absolute Kalziumkonzentration gemessen.

3.4 Statistik

Die Signifikanzberechnungen wurden mit Sigma Plot durchgeführt (Student t-Test). Angaben zu durchschnittliche Stromdichten bestehen bestehen jeweils aus Mittelwert \pm Standardabweichung.

4 Ergebnisse

4.1 Selektion von TRPC4/CCE1-transfizierten Zellen

Nach der stabilen Transfektion von TRPC4/CCE1 in CHO-Zellen lagen insgesamt 14 verschiedene Zellklonen vor, bei denen sowohl Transkripte von TRPC4/CCE1 so wie des Selektionsmarkers Dihydrofolatreduktase (DHFR) mittels PCR nachweisbar waren (Warnat et al., 1999). Diese stabil TRPC4/CCE1-exprimierende Zellklonen Wildtypzellen (CHO(-)) wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in Gesamtzellableitungen dahingehend untersucht, ob ein einwärts gerichteter Ionenstrom mit Inositoltrisphosphat (IP3) aktivierbar ist. Dazu wurde die Standardpipettenlösung um 10 μM IP3 ergänzt. In Wildtypzellen ließ sich ein sehr kleiner, einwärts gerichteter Strom beobachten. Einige der untersuchten Zellklone zeigten im V bei -80 mV im Vergleich zu den Wildtypzellen keine erkennbare zusätzliche Stromaktivierung. Diese Messungen wurden nicht weiter quantifiziert und sind in Tabelle 3 mit (+) gekennzeichnet. Falls eine zusätzliche Aktivierung eines einwärts gerichteten Stroms erkennbar war, wurde die Stromdichte bei -80 mV gemessen. Dies ist in Tabelle 1 mit + und ++ gekennzeichnet. In zwei Messreihen (CHO-15 und CHO-25) fanden sich signifikant von den Wildtypmessungen abweichende Ergebnisse. Zellklon (CHO(CCE1a)) (entspricht CHO(25)) wurde schließlich für alle weiteren Versuche aufgrund der höheren Stromdichte bei -80 mV und des sehr guten Signifikanzniveaus von $p < 0,001$ ausgewählt.

Tabelle 3: Selektion der CCE-transfizierten Zellklone. WT: Wildtyp. PCR: Nachweis von Transkripten der Dihydrofolatreduktase (DHFR) und TRPC4/CCE1. Patch Clamp Messung: Aktivierung eines Stroms mit IP₃. Angabe der Stromdichte bei -80 mV. T-Test: Student's t-Test.

CHO-Klon	PCR		Patch Clamp Messung			
	DHFR	TRPC4/CCE 1	Aktivierung	Stromdichte [pA/pF]	Anzahl	t-Test
CHO(-)	-	-	+	0,32 ± 0,23	n=18	
CHO-11	+	+	(+)		n=7	
CHO-12	+	+	+	0,8 ± 1,47	n=8	
CHO-13	+	+	(+)		n=7	
CHO-14	+	+	+	0,27 ± 0,13	n=5	
CHO(CCE1) =(CHO-15)	+	+	++	1,25 ± 0,68 *	n= 5	p<0,05
CHO-16	+	+	(+)		n=7	
CHO-21	+	+	(+)		n=7	
CHO-22	+	+	+	0,16 ± 0,19	n=6	
CHO-23	+	+	(+)		n=7	
CHO-24	+	+	(+)		n=7	
CHO(CCE1a) =(CHO-25)	+	+	++	1,63 ± 0,85 *	n=17	p<0,001
CHO-31	+	+/-	(+)		n=7	

Daraufhin wurden nochmals die Zellklone WT, CHO-25 und CHO-15 mit der rT-PCR-Technik auf das Vorhandensein von TRPC4/CCE1-mRNA bzw. auch des Selektionsmarkers Dihydrofolatreduktase untersucht (Abb. 3A). In einer Northern-Blot-Analyse zeigten beide transfizierten Zelllinien im Gegensatz zum Wildtyp ein adäquates Signal für das entsprechende TRPC4/CCE1-Protein (Abb. 3B).

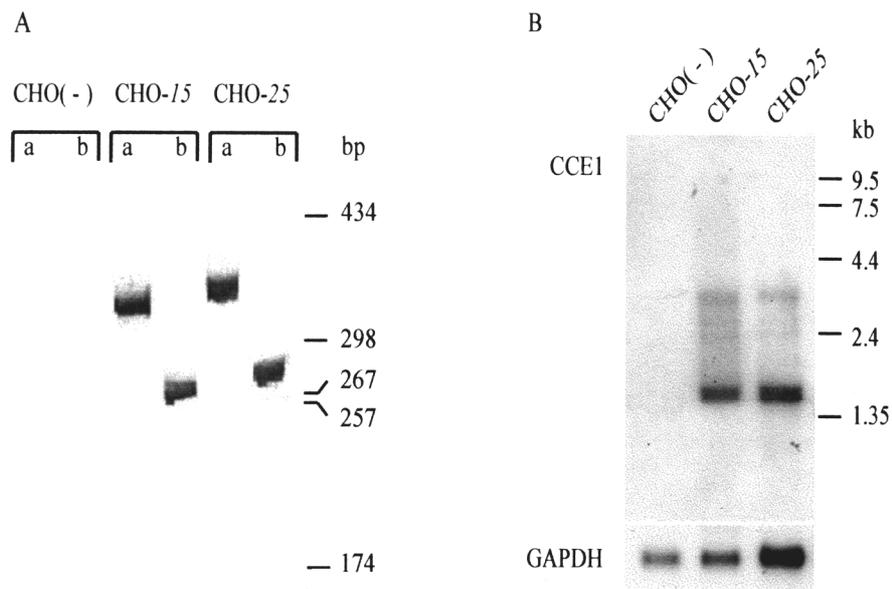


Abbildung 3A: RT-PCR Analyse nativer (CHO(-)) und TRPC4/CCE1 transfizierten Zellen (CHO(CCE1) und CHO(CCE1a)). Die PCR-Primer waren spezifisch für den Selektionsmarker Dihydrofolatreduktase (1) und TRPC4/CCE1 (2). **B: Northern-blot Analyse für TRPC4/CCE1 und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH).**

4.2 Aktivierung von Ionenströmen in CHO(-) und CHO(CCE)-Zellen durch IP_3

Abbildung 4 zeigt je eine repräsentative Messung an einer CHO-Wildtypzelle und einer Zelle des Klons CHO-25, im folgenden CHO(CCE1) genannt. Die Messung erfolgte unter den in Kapitel 2.1.6 beschriebenen Standardbedingungen. Die Pipettenlösung enthielt zusätzlich $10 \mu\text{M } IP_3$. Unmittelbar nach Beginn der Zelldialyse wurden die "Leckströme" (b, 1) aufgezeichnet. Die Messkurve b, 2 zeigt die maximale Aktivierung eines einwärts gerichteten Kationenstroms. Dieser ist bezüglich seiner Stromstärke bei nativen CHO(-) nahe der Auflösungsgrenze. Bei CHO(CCE1)-Zellen zeigt sich ein deutlich größerer Strom. Die Leckstromkurven wurden von den IP_3 -aktivierten Strömen subtrahiert und im Bereich -80 mV bis $+80 \text{ mV}$ dargestellt. Es fällt auf, dass sich das Umkehrpotential bei CHO(CCE1) in positive Bereiche verschiebt. Dies ist ansatzweise auch bei den Wildtypzellen beobachten, allerdings liegen letztere Veränderungen im Bereich der Messgenauigkeit. Auswärtsgerichtete Ströme ließen sich im Bereich von -80 mV bis $+80$

mV nicht nachweisen. Die mittlere Stromdichte bei -80 mV betrug $1,63 \pm 0,85$ pA/pF (n=17) in CHO(CCE1)-Zellen und $0,32 \pm 0,23$ pA/pF (n=18) in CHO(-)-Zellen.

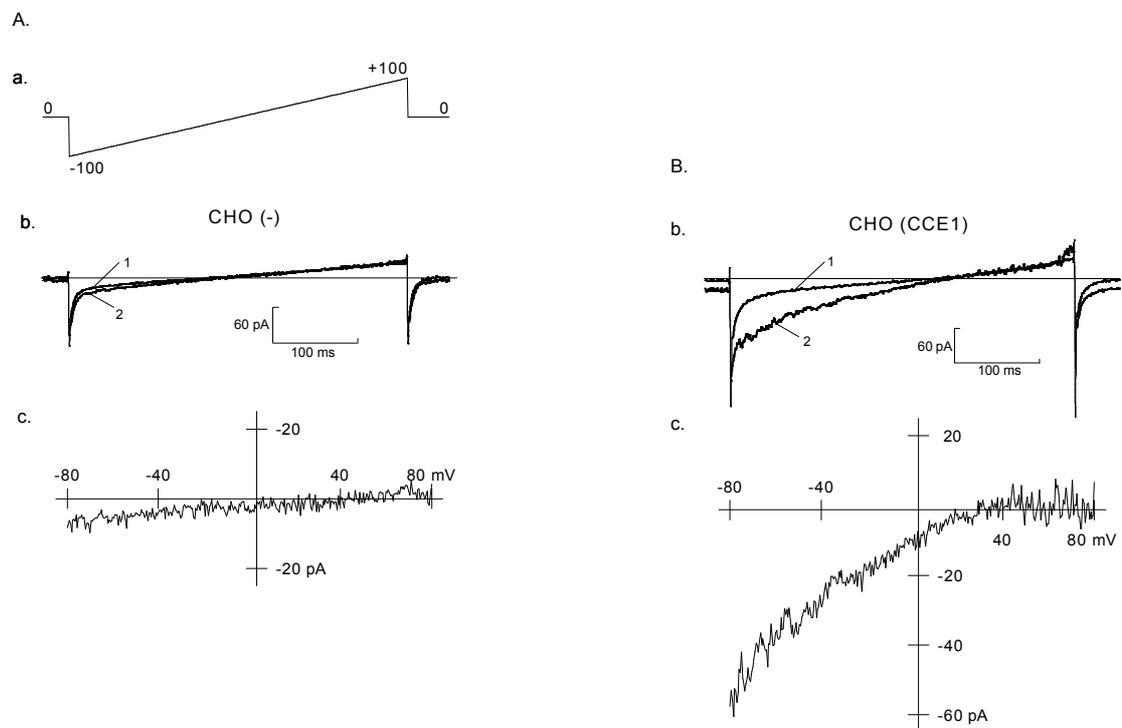


Abbildung 4: Aktivierung von Ionenströmen in nativen CHO(-) (A) und CHO(CCE1)-Zellen (B) durch intrazelluläres IP₃ (10 µM). A a: Standardmeßprotokoll mit Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV in 400 ms im Abstand von 5 Sekunden ausgehend vom Haltepotential von 0 mV. A b, B b: Unmittelbar nach Beginn der Zelldialyse wurden die "Leckströme" (Kurve 1) aufgezeichnet; die Kurve 2 zeigt die maximale Aktivierung. A c, B c: Die Leckstromkurven wurden von den IP₃-aktivierten Strömen subtrahiert und diese im Bereich -80 mV bis +80 mV als Strom-Spannungskennlinien dargestellt. Membrankapazität: 15 pF (A), 20 pF (B). Die intrazelluläre Lösung enthielt 115 mM Cs⁺ und 10 mM EGTA. Die extrazelluläre Lösung enthielt 120 mM Na⁺, 10 mM Ca²⁺ und 2 mM Mg²⁺.

4.3 Untersuchungen zu Aktivierungsmechanismen des Kationeneinstromes in CHO(CCE1)-Zellen

In den folgenden Experimenten zeigte sich, dass der mit IP₃ aktivierbare Strom auch bei Austausch des des in der intrazellulären Lösung verwendeten Kalziumkomplexbildenden

EGTA durch BAPTA ohne signifikanten Unterschied nachweisbar war. Die Stromdichte bei -80 mV betrug dabei $1,36 \text{ pA/pF}$ in 8 von 9 Zellen (Abb. 5A). Ausgehend vom Modell des speichergesteuerten Ionenkanals (Abb.2) sollte eine Stromaktivierung auch IP_3 -unabhängig durch Blockierung der ATPase mit Thapsigargin ($1\text{-}2 \text{ }\mu\text{M}$; Thastrup et al. 1990) möglich sein. Wie in Abb. 5B gezeigt, fanden sich Ströme, die vergleichbar waren mit denjenigen, die durch IP_3 aktiviert wurden ($1,19 \pm 0,40 \text{ pA/pF}$, $n=7$). Mit IP_4 statt IP_3 in der Pipettenlösung ließ sich kein von den endogenen Strömen unterscheidbarer Strom aktivieren (Abb. 5C; $0,30 \pm 0,12 \text{ pA/pF}$ in 4 von 6 Zellen). Bei Erhöhung des intrazellulären freien Calciums auf $\sim 400 \text{ nM}$ und Aktivierung mit IP_3 nahm die Stromdichte bei -80 mV auf $0,62 \pm 0,24 \text{ pA/pF}$ signifikant ($p < 0,02$) ab (Abb. 5D). Bei $[\text{Ca}^{2+}]_i \sim 1 \mu\text{M}$ konnte kein von den endogenen Strömen unterscheidbare Aktivierung festgestellt werden ($n=5$; dies ist nicht in Abbildungen dargestellt).

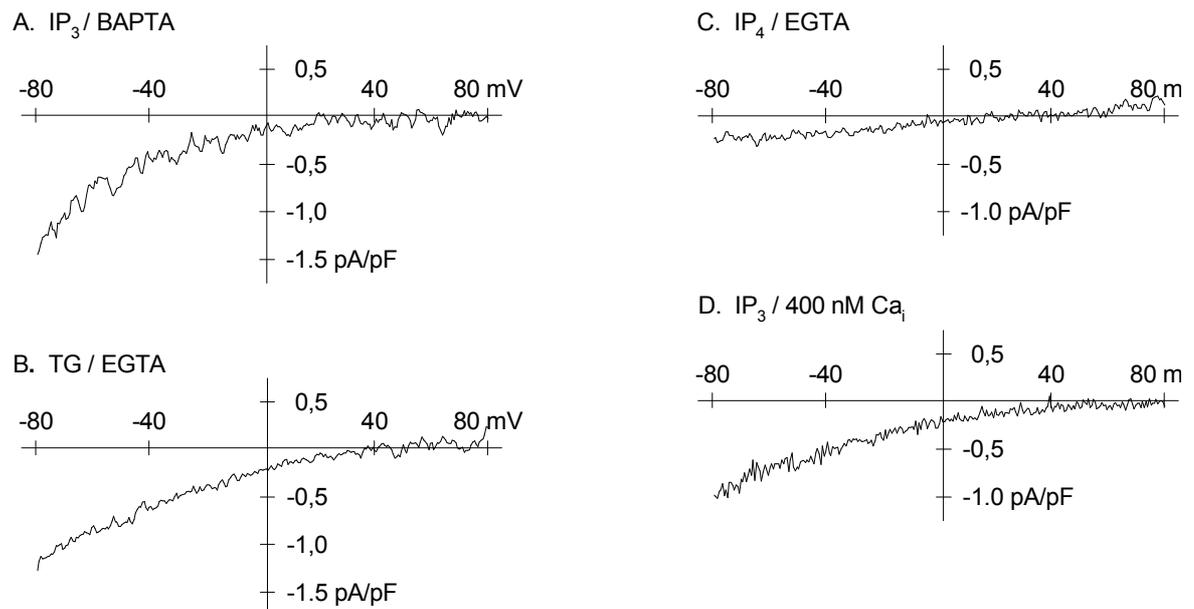


Abbildung 5: Aktivierungsmechanismen des Kationeneinstromes in CHO(CCE1)-Zellen. A: Zelldialyse mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ IP_3 sowie 10 mM BAPTA. B: Aktivierung mit $1 \text{ }\mu\text{M}$ Thapsigargin und intrazellulärer Pufferung mit EGTA. C: Intrazelluläre Applikation von $20 \text{ }\mu\text{M}$ IP_4 und 10 mM EGTA. D: Zelldialyse mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ IP_3 in einer Lösung mit 400 nM freies Kalzium. Basis für alle intrazelluläre Lösungen war 115 mM Cs^+ . Die extrazelluläre Lösung enthielt 120 mM Na^+ , 10 mM Ca^{2+} und 2 mM Mg^{2+} (Standardbadlösung).

Die Zeitdauer von der Zugabe des aktivierenden Agens wie z.B. Thapsigargin bzw. Beginn der Zelldialyse bis zum Erreichen der maximalen Aktivierung lag bei 140–330s. Die Dauer der Aktivierung war von Zelle zu Zelle sehr unterschiedlich, betrug allerdings immer mehr als 40s. In den Wildtypzellen betrug die Zeitdauer bis zur Aktivierung 49-189s. Abb. 6 zeigt eine repräsentative Messung mit dem Zeitverlauf der Stromstärke bei -80 mV, 0 mV und +80 mV (ohne Leakstrom-Korrektur). Es fließen fast ausschließlich einwärts gerichtete Ströme und die Stromstärke bei 0 mV wurde negativ als Zeichen für die Verschiebung des Umkehrpotentials in positive Bereiche.

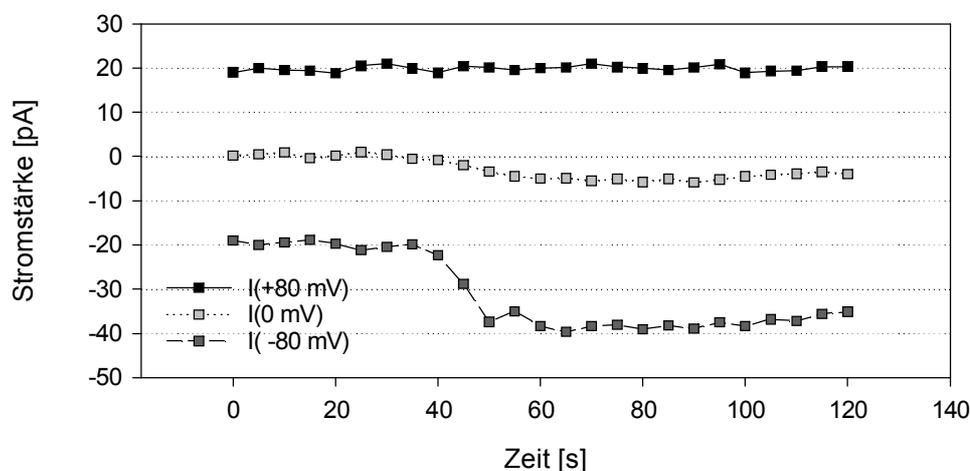


Abbildung 6: **Zeitverlauf der Stromstärken nach Gabe von Thapsigargin.** Zum Zeitpunkt Null wurde Thapsigargin ($1\mu\text{M}$) in der Badelösung appliziert. Strom-Spannungskurven wurden mittels Spannungsrampen von -100 bis 100 mV alle 5 s erhalten und wie beschrieben vom Leakstrom subtrahiert. Angegeben sind die Stromstärke bei -80, 0 und +80 mV im zeitlichen Verlauf ($I(-80\text{mV})$, $I(0\text{mV})$, $I(+80\text{mV})$). Der Versuch wurde mit Standard-Bad- und Pipettenlösungen durchgeführt.

4.4 Permeation von monovalenten und divalenten Ionen in IP_3 -aktivierten CHO(CCE1)-Zellen

Im Weiteren wurden biophysikalische Eigenschaften der Ionenkanäle untersucht, welche nach IP_3 -dialyse in CHO(CCE1)-Zellen aktiviert werden. Da TRPC4/CCE1-Kanäle möglicherweise Ca^{2+} -ionen selektiv leiten (Philipp et al., 1996), stellte sich die Frage, ob die Ca^{2+} -Selektivität durch eine Blockierung monovalenter Ionenströme durch Ca^{2+} - und/oder Mg^{2+} -Ionen zustande kommt, so wie bei den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, die Na^+ -Ionen nur in Abwesenheit von divalenten Kationen leiten (Hess und Tsien, 1984). Um die Wechselwirkung zwischen monovalenten und divalenten Ionen bei der

Permeation durch TRPC4/CCE1-Kanäle zu klären, wurde die Zusammensetzung der extrazellulären Lösung systematisch geändert. Bei Austausch der extrazellulären Ca^{2+} -Ionen gegen die ebenfalls divalenten Ba^{2+} -Ionen änderte sich der (wiederum mit IP_3) aktivierte Strom nicht signifikant ($1,88 \pm 0,51$ pA/pF, n=3; Abb. 7A). In Abwesenheit von extrazellulärem Natrium und weiterhin 10 mM extrazellulärem Kalzium veränderten sich die Ströme nicht signifikant im Vergleich zu den Ergebnissen mit den Standardlösungen ($1,29 \pm 0,14$ pA/pF, n=4); in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium und normaler Natriumkonzentration konnte allerdings kein Strom aktiviert werden (Abb. 7B; n=5). Nun galt es zu überprüfen, ob mögliche Natriumströme durch Magnesium blockiert wurden. Enthielt die Badlösung keine Magnesiumionen und nur sehr geringe Konzentrationen an Calcium (geschätzt 10^{-7} M und 10^{-9} M), d.h. Natrium verblieb als einziges extrazelluläres Kation, konnte ein relevanter Strom gemessen werden (Abb. 7C; $2,36 \pm 0,24$ pA/pF, n=7 und $1,01 \pm 0,13$ pA/pF, n=4). Da die Messungen in den Wildtypzellen ebenfalls in Anwesenheit von extrazellulärem Magnesium erfolgten, wurde das zuletzt genannte Experiment auch an diesen Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich ein zu den CHO(CCE1)-Zellen vergleichbares Verhalten (Abb. 7D). Auch hier konnten deutliche Ströme registriert werden, deren Stärke ebenfalls mit abnehmender Calciumkonzentration zunahm. Die absolute Stromdichte war allerdings kleiner als in den TRPC4/CCE1 exprimierenden Zellen ($1,18 \pm 0,16$ pA/pF, n=4 $0,76 \pm 0,05$ pA/pF n=3).

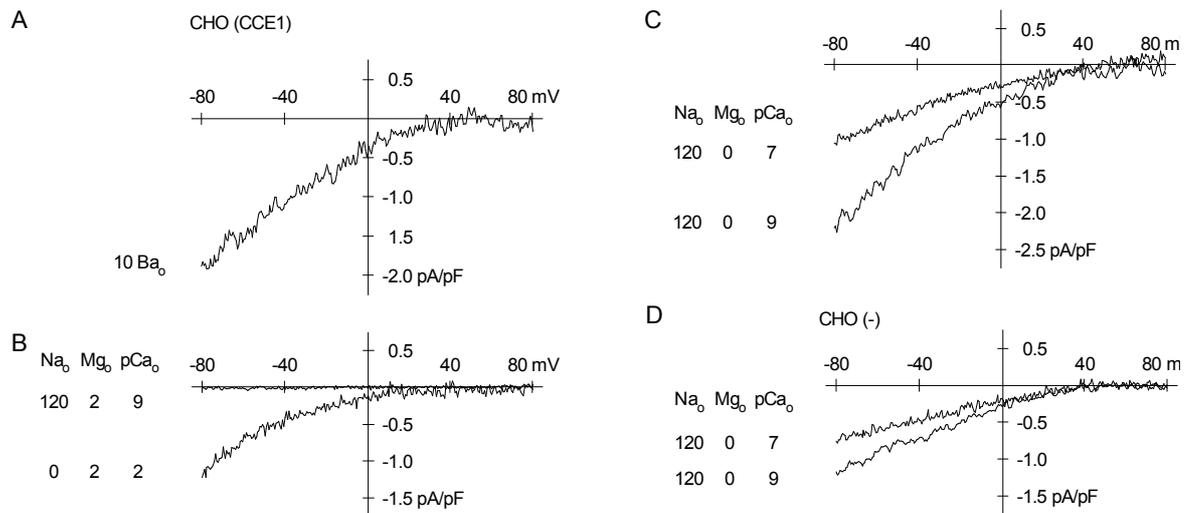


Abbildung 7: Permeation von monovalenten und divalenten Kationen durch IP₃-aktivierte Kanäle in CHO(CCE1) (A-C) und CHO(-)-Zellen (D). **A:** Austausch des extrazellulären Ca²⁺- gegen Ba²⁺-Ionen. **B:** Messung mit extrazellulärem Na⁺- oder Ca²⁺-Ionen als Ladungsträger in Anwesenheit von Mg²⁺. **C+D:** In Abwesenheit von extrazellulärem Mg²⁺ finden sich ein Natriumstrom, der mit sehr kleinen Konzentrationen von Ca²⁺ gehemmt werden kann. Konzentrationsangaben für Ba²⁺, Mg²⁺, Na⁺ in mM. (p[Ca_o] 7 entspricht 100 nM, p[Ca_o] 9 entspricht 1 nM).

Um die Kalziumabhängigkeit des Natriumstroms bei Abwesenheit von extrazellulärem Magnesium näher zu charakterisieren, wurden weitere Messreihen sowohl mit den Wildtypzellen CHO(-) als auch den CHO(CCE1)-Zellen bei extrazellulären Kalziumkonzentrationen von 2 μM und 5 μM durchgeführt (n=5-8). Unter diesen Bedingungen ließ sich in keinem Fall eine vom Leak-Strom zu unterscheidende Aktivierung beobachten. Abb. 8 fasst die Ergebnisse zusammen, bei denen die Stromdichte in Wildtyp und TRPC4/CCE1 exprimierenden Zellen nach Aktivierung mit IP₃ bei -80 mV in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des extrazellulären Milieus untersucht wurden. Dabei wurde die extrazelluläre Kalziumkonzentration in weiten Bereichen variiert und der Einfluß der extrazellulären divalenten Ionen dargestellt. Alle Messungen mit einer extrazellulären Calciumkonzentration von 10 mM (pCa_o=2) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, wohl aber von den Messungen mit pCa_o=9 (p<0,001).

Die Ergebnisse bei Abwesenheit von extrazellulärem Magnesium (zentraler Kasten in Abb. 8A) mit pCa_o=9 und pCa_o=2 unterscheiden sich jeweils von den Ergebnissen mit Ca_o=2 μM und pCa_o=5 μM signifikant (p<0,001). Ebenso verhält sich der Vergleich

zwischen den jeweiligen Messpunkten CHO(-) und CHO(CCE1) untereinander, mit Ausnahme der Messungen bei Kalziumkonzentrationen von 2 und 5 μM . Es zeigt sich also, dass die aktivierten Ströme in Anwesenheit von 1-10 mM extrazellulärem Kalzium unabhängig von zusätzlich anwesenden extrazellulärem Na^+ und Mg^{2+} - Ionen sind. Ohne extrazelluläres Mg^{2+} , aber mit 120 mM Na^+ sinken die gemessenen Stromdichten mit Abnahme der extrazellulären Kalziumkonzentration, bis bei 2-5 μM extrazellulärem Kalzium keine Ströme mehr gemessen werden konnten. Mit weiterer Reduktion der Kalziumkonzentration in den nanomolaren Bereich werden nun – offensichtlich durch Na^+ -Ionen getragene – Ströme gemessen. Diese Abhängigkeit der Leitungseigenschaften bzw. Selektivität eines Kanals von der Ionenzusammensetzung wird anomaler Molfraktionseffekt bezeichnet. Sie resultiert letztlich aus der Bindung mehrerer zu leitenden Ionen im Inneren der Pore des Kanals und ist typisch für z.B. die spannungsabhängigen Kalziumkanäle (Almers & McCleskey 1984, Hess & Tsien 1984).

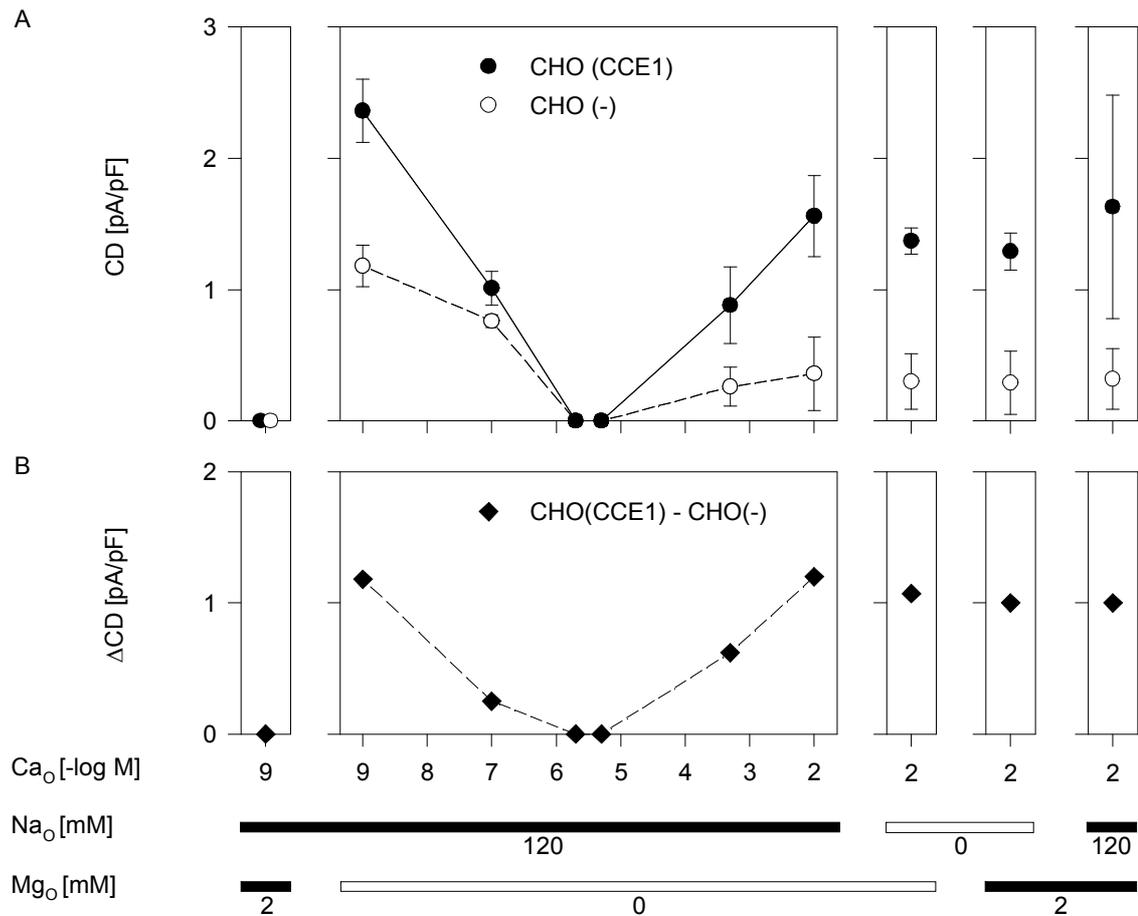


Abbildung 8: Natrium- und Kalziumströme nach Kalziumspeicherentleerung in CHO(CCE1) und CHO(-) Zellen. A: durchschnittlichen Stromdichten bei -80 mV nach Aktivierung mit IP₃ für CHO(-)-Zellen (○) und für CHO(CCE1)-Zellen (●) (A). B: Unterschied zwischen den beiden Zelllinien. An der X-Achse ist die Variation der extrazellulären Ionenzusammensetzung angegeben. Alle Konzentrationsangaben in mM außer der Angaben der Kalziumkonzentration. Extrazelluläre Kalziumkonzentration in p[Ca].

4.5 Kapazitative Kalziumströme in Nebennierenrindenzellen: TRPC4/CCE1 in ihrem natürlichen Umfeld

Die TRPC4/CCE1 cDNA wurde ursprünglich aus Nebennieren des Rindes isoliert (Philipp et al. 1996). Deshalb wurden für die folgenden Experimente Nebennierenrindenzellen des Rindes (SBAC) ausgewählt, um möglicherweise speichergesteuerte Ionenkanäle in ihrem nativen Umfeld zu untersuchen. Dies erfolgte unter identischen Bedingungen wie bei den bisher beschriebenen Versuchen mit CHO-Zellen. Mit IP₃ in der Pipettenlösung konnte ein

einwärts gerichteter, vom initialen Leckstrom (Abb.9 "leak") unterscheidbarer Strom aktiviert werden. (Abb. 9): „Ca+Na“. Die absoluten Stromstärken waren wiederum sehr gering. Um den Einfluß der extrazellulären Ionenzusammensetzung auf die Ströme zu bestimmen, wurde in einigen Experimenten die zu messende Zelle mit alternativen Badlösungen umspült. Verschiedene Badlösungen wurden an ein und derselben Zelle getestet, um die Unterschiede zwischen einzelnen Zellen als Fehlerquelle zu minimieren. Die Versuchsabfolge ist ebenfalls in Abb.9 angedeutet: Unmittelbar nach Eröffnung des Eingangs zu Zelldialyse wurde der Leckstrom aufgezeichnet („leak“). Anschließend erfolgte die Aktivierung eines zusätzlichen Stromes mit IP_3 („Ca+Na“). Dies ist als eine Senkung in den Strom-Spannungskennlinien zu erkennen, was auf das Erscheinen von einwärts gerichteten Strömen bei negativen Potentialen hindeutet. Nach Umspülung der Zelle mit einer calciumfreien Lösung (120 mM Na^+) gingen die Ströme nun auf das Niveau des Leckstroms zurück („Na“). Wurde nun natriumfreie Badlösung (mit 10 mM Ca^{2+}) angeboten, zeigte sich wieder der aktivierte Strom („Ca“). Dieser war im Rahmen der Messgenauigkeit nicht von dem zunächst in Anwesenheit von Natrium aktivierten Strom zu unterscheiden. Das Umkehrpotential des zusätzlich aktivierten Stromes deutlich im positiven Bereich bei ca. 30 mV. Dies wird insbesondere nach Subtraktion der Leckströme deutlich (Abb.9).

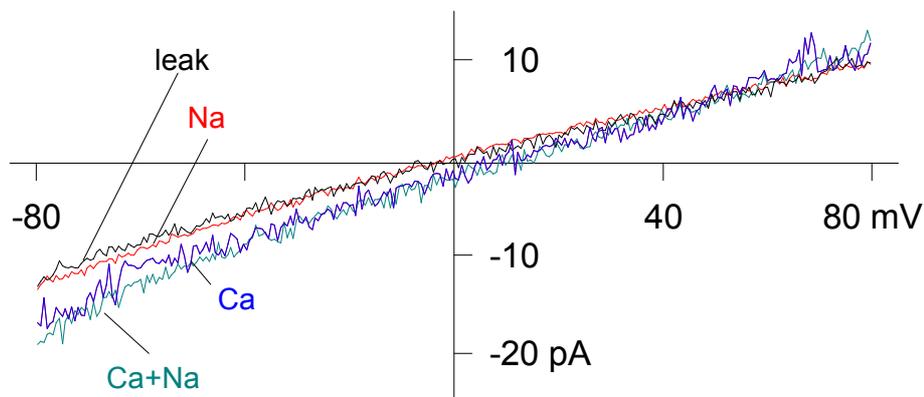


Abbildung 9: Aktivierung eines Kalziumeinstroms in SBAC-Zellen nach intrazellulärer Gabe von IP_3 . „leak“ Strom-/Spannungskurve unmittelbar nach Etablierung der Zelldialyse mit IP_3 (10 μM). „Ca+Na“: Maximaler Strom nach Aktivierung in der Standard Bad- und Pipettenlösung. (Die intrazelluläre Lösung enthielt 115 mM Cs^+ und 10 mM EGTA. Die extrazelluläre Lösung enthielt 120 mM Na^+ , 10 mM Ca^{2+} und 2 mM Mg^{2+}). „Ca“ und „Na“: Ströme in natrium- bzw. kalziumfreier Badlösung (115 mM NMDG, 10 mM Ca^{2+} und 2 mM Mg^{2+} bzw. 120 mM Na^+ , 1 mM EGTA und 2 mM Mg^{2+}). Umschaltung der Badlösung mit Perfusionsystem.

Vergleichbare Ergebnisse fanden sich auch bei Zugabe des Inhibitors der SERCA-Pumpen im ER Thapsigargin und Standardlösungen. Abb.10 zeigt wiederum die initialen Leckströme („leak“) und den aktivierten Strom („Ca+Na“) nach Zugabe von 1 μM Thapsigargin. Nach Umspülen der Zelle mit kalziumfreier Lösung gingen wiederum die Ströme auf das Niveau der Leckströme zurück („Na“). Wurde nun die Badlösung gegen eine natriumfreie (und weiterhin 10 mM Kalzium enthaltende) Lösung ausgetauscht, kam es wieder zu einer Aktivierung („Ca“). Auch in diesen Zellen ließ sich ein Natriumstrom bei Abwesenheit von divalenten Ionen beobachten (Abb.10, „Na/divalent frei“). In Tab. 4 sind die Stromdichten bei -80 mV im Vergleich angegeben.

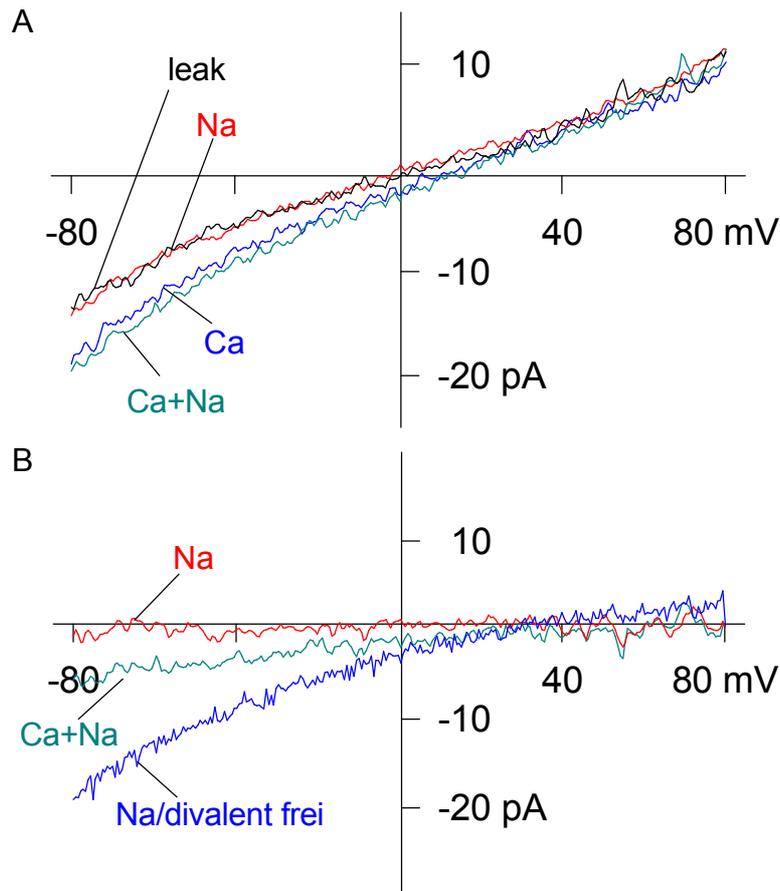


Abbildung 10: Aktivierung eines Kalziumeinstroms in SBAC-Zellen durch Thapsigargin in die Badlösung. **A:** Strom-Spannungskennlinien unmittelbar nach Etablierung der Gesamtzell-Messkonfiguration („leak“) und nach Thapsigargin Gabe ($1\mu\text{M}$) in der Standardbadlösung („Ca+Na“, 120 mM Na^+ , 10 mM Ca^{2+} und 2 mM Mg^{2+}). „Ca“ und „Na“ bezeichnen die Ströme nach umspülen der Zelle mit den natrium- bzw. kalziumfreien Badlösungen (115 mM NMDG , 10 mM Ca^{2+} und 2 mM Mg^{2+} bzw. 120 mM Na^+ , 1 mM EGTA und 2 mM Mg^{2+}). Umschaltung der Badlösung mit Perfusionsystem. **B:** Subtraktion des initial gemessenen Leckstromes „leak“ von den mit Thapsigargin aktivierten Strömen „Na“ und Ca+Na“. „Na/divalent frei“: „leak“-subtrahierter, mit Thapsigargin aktivierter Strom und Badlösung ohne divalente Ionen (115 mM NMDG , 1 mM EGTA).

Tabelle 4: Durchschnittliche Stromdichten bei -80 mV in SBAC-Zellen nach Aktivierung mit IP₃ oder Thapsigargin (TG). “Ca²⁺ + Na⁺”: Standardbadlösung („Ca+Na“, 120 mM Na⁺, 10 mM Ca²⁺ und 2 mM Mg²⁺). “Na⁺”: Standardbadlösung ohne Ca²⁺ (120 mM Na⁺, 1 mM EGTA und 2 mM Mg²⁺). “Ca²⁺”: Standardbadlösung ohne Na⁺ (115 mM NMDG, 10 mM Ca²⁺ und 2 mM Mg²⁺). Anzahl der Zellen in Klammern. Standardpipettenlösung.

	Stromdichte (pA/pF)	
	IP ₃	TG
Ca ²⁺ + Na ⁺	0,50 ± 0,26 (21)	0,71 ± 0,22 (8)
Na ⁺	< 0,1 (8)	< 0,1 (6)
Ca ²⁺	0,54 ± 0,13 (3)	0,62 ± 0,16(3)

4.6 Nachweis eines speichergesteuerten Kalziumeinstroms in SBAC-Zellen mit Fura-2-Fluoreszenzmessung

Die im vorigen Kapitel erhobenen Befunde eines speichergesteuerten Calciumeinstroms in SBAC-Zellen sollten nun mittels einer anderen unabhängigen Versuchsmethode untermauert werden. Mit Hilfe von der Kalziumsonde Fura-2 wurde der Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Zugabe von Thapsigargin (1 μM, n=30) und den Agonisten ATP (50 μM, n=12), Angiotensin II (100 nM, n=8) und ACTH (1 nM, n=17) beobachtet (Abb. 11). Die Fura-2 beladenen Zellen befanden sich zunächst in einer 2 mM Calcium enthaltenden Standardbadlösung. Anschließend wurde die Badlösung gegen eine kalziumfreie Lösung mit EGTA ausgetauscht und der Agonist zugegeben. Nach Wechsel der Badlösung kam es in den meisten Fällen zu einer Erniedrigung der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Zugabe des Agonisten resultierte in einem deutlichen und schnellen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, weit über das Basisniveau heraus. Die Ca²⁺-Ionen müssen dabei – in Abwesenheit extrazellulären Kalziums – aus intrazellulären Speichern freigesetzt worden sein. Anschließend kam es zu einem allmählichen Abfall der Kalziumkonzentration bis auf oder unter das Niveau vor Zugabe des Agonisten. Nun wurde die Badlösung wieder gegen die Kalziumlösung gewechselt. Daraufhin kam es zu einem erneuten schnellen Anstieg und anschließendem langsamen Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dabei blieb die

Kalziumkonzentration über einen längeren Zeitraum deutlich über dem Ausgangsniveau im Sinne einer „Plateauphase“ angehoben. Letzteres würde für einen speichergesteuerten Kalziueinstrom erwartet werden.

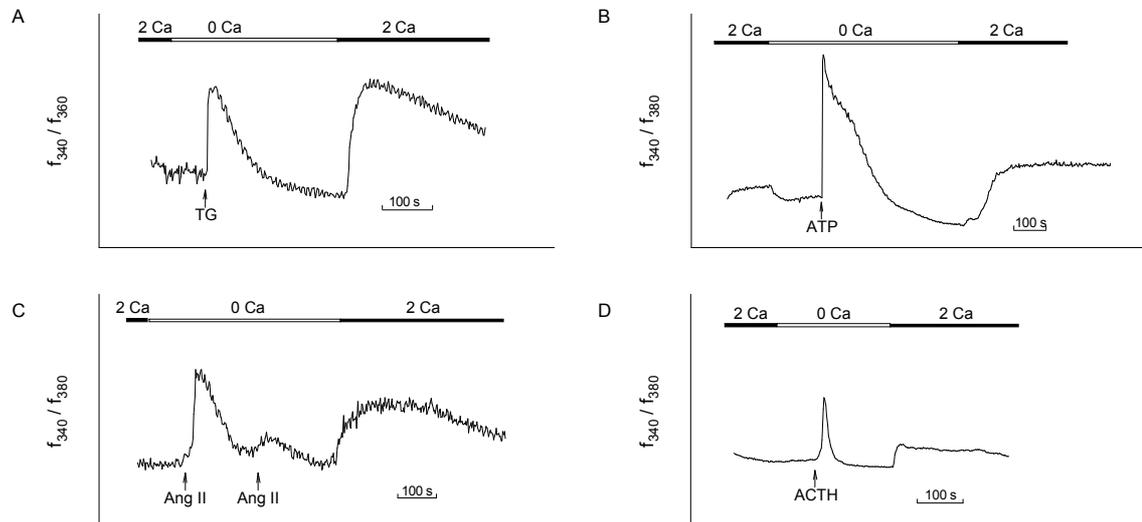


Abbildung 11: Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in SBAC –Zellen nach Stimulation mit Thapsigargin (TG, $1 \mu\text{M}$), ATP ($50 \mu\text{M}$), Angiotensin II (Ang II, 100 nM) und ACTH (1 nM). In kalziumfreien Medium kommt es zu einem starken Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und anschließendes Abfallen auf das Ausgangsniveau. Nach Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration auf 2 mM zeigt sich der typische „overshoot“ des intrazellulären Kalziums mit Plateauphase. Die Änderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration (mM) sind schematisch über den Fluoreszenzsignalen dargestellt. Y-Achse: Als Maß für die intrazelluläre Kalziumkonzentration wird Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 340nm und 380 nm Wellenlänge angegeben (f_{340}/f_{380}).

5 Diskussion

5.1 *Stabile Expression von TRPC4/CCE1 in CHO-Zellen*

In früheren Arbeiten war gezeigt worden, dass die transiente Expression des TRP-Homologen TRPC4/CCE1 in HEK-Zellen zu einem durch IP₃ und Thapsigargin aktivierbaren Kationeneinstrom durch die Zellmembran führt (Philipp et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß TRPC4/CCE1 stabil in CHO-Zellen exprimiert werden kann. Diese stabil TRPC4/CCE1-exprimierenden CHO-Zellen zeigen zu den TRPC4/CCE1-transfizierten HEK-Zellen vergleichbare elektrophysiologische Eigenschaften und eigneten sich für weitere Untersuchungen über deren Aktivierung und Ionenselektivität. Sie besitzen die wesentliche Eigenschaft eines speicher-gesteuerten Kanals: Ein einwärts gerichteter Strom lässt sich durch die Entleerung der zellulären Kalziumspeicher mit IP₃ oder Thapsigargin, nicht aber mit IP₄ bei gleichzeitiger starken Pufferung des intrazellulären Kalziums beobachten. Dies bestätigt auch die Ergebnisse der früheren Untersuchungen mit transient TRPC4/CCE1 exprimierenden HEK-Zellen (Philipp et al. 1996). Für die Aktivierung mit IP₃ scheint eine starke Pufferung des intrazellulären Kalziums notwendig zu sein, da bei Erhöhung des intrazellulären Kalziums auf etwa 400 nM zu einer Reduktion des Stroms und bei 1 µM freiem intrazellulärem Kalzium kein Strom zu beobachten war. Der Puffer selbst scheint keine spezifischen Effekte zu verursachen, da sich mit BAPTA statt EGTA als intrazellulärem Kalziumpuffer identische Ergebnisse fanden. In Wildtyp-Zellen finden sich unter identischen Messbedingungen sehr kleine endogene Einwärtsströme. Die in zwei TRPC4/CCE1-exprimierenden Zelllinien gemessene Stromdichte bei -80 mV unterscheidet sich signifikant von den Ergebnissen in den Wildtypzellen. Damit erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass Zellen mit ungewöhnlich großem endogenen Strom selektiert wurden, sondern vielmehr dass sich die geänderten elektrophysiologischen Eigenschaften auf die Expression von TRPC4/CCE1 zurückführen lassen. Darüber hinaus lag die Stromdichte in den Wildtyp-Einzelmessung immer unter der durchschnittlichen Stromdichte in den TRPC4/CCE1-exprimierenden Zellen.

5.2 Die Ionenkanaleigenschaften von TRPC4/CCE1

In nativen Zellsystemen, die CCEs besitzen, findet sich eine hohe Selektivität Speicher-gesteuerter Ionenkanäle für Kalzium im Vergleich zu Natrium (Hoth & Penner 1993, Zweifach & Lewis 1993, Yao & Tsien 1997). Es sind jedoch auch Speicher-gesteuerter Ionenkanäle beschrieben worden, die wenig oder gar nicht kalziumselektiv sind (Lückhoff & Clapham 1994, Vaca & Kunze 1994, Krause et al. 1996). Daher stellte sich die Frage, ob TRPC4/CCE1 für Kanalproteine codiert, die für einen kalziumselektiven, speichergesteuerten Kationeneinstrom verantwortlich sind. Dann sollte man für die rekombinanten TRPC4/CCE1-Kanäle Eigenschaften erwarten, die denen von kalziumselektiven Kanälen (Almers & McCleskey 1984, Hess & Tsien 1984, Hoth 1995, Lepple-Wienhues & Cahalan 1996) gleichen.

Die Untersuchung der Leitungseigenschaften der CHO(CCE1)-Zellen für Na^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} zeigten deutliche Ähnlichkeiten zu bekannten endogenen CCE-Kanälen und partiell auch zu spannungsabhängigen Kalziumkanälen. In Anwesenheit von intrazellulärem Cs^+ , welches Kaliumkanäle blockiert, fungierte sowohl Ca^{2+} als auch Ba^{2+} als Träger für einen einwärtsgerichteten, speichergesteuerten Strom. Ähnlicher Eigenschaften wurden für native CCE-Kanäle beschrieben (Hoth 1995). In Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium und Anwesenheit von Mg^{2+} wurde kein Strom gemessen. Wurde allerdings auch Mg^{2+} aus der extrazellulären Lösung entfernt, floss wieder ein Strom, der nun nur von Na^+ getragen werden konnte, wie es auch für andere native Zellsysteme gefunden wurde (Lepple-Wienhues & Cahalan 1996). Dies bedeutet, dass die Natriumströme durch TRPC4/CCE1-Kanäle sowohl durch Mg^{2+} als auch Ca^{2+} blockiert werden. Der blockierende Effekt von Ca^{2+} für Na^+ trat schon bei sehr geringen Konzentrationen auf und nahm mit steigender Kalziumkonzentration zu. Diese Eigenschaften sind typisch für spannungsabhängige und speichergesteuerte kalziumselektive Kanäle (Almers & McCleskey 1984, Hess & Tsien 1984, Hoth 1995, Lepple-Wienhues & Cahalan 1996). Dabei ist eine hohe Kalziumselektivität durch die s. g. „anomale Mol-Fraktions-Effekte“ gekennzeichnet (Dang & McCleskey 1998), wie sie auch hier beobachtet wurden. Die Leitungseigenschaften des untersuchten Kanals variiert mit dem Konzentrationsverhältnis der extrazellulären Ionen (Abb.8). Des Weiteren finden sich diese anomale Mol-Fraktions-Effekte auch geringer ausgeprägt in den CHO(-)-Zellen. In Abwesenheit sonstiger divalenter Kationen führt eine steigende Kalziumkonzentration bei konstanter

extrazellulärer Natriumkonzentration zu einer zunehmenden Hemmung des Natriumeinstroms bis dieser bei mikromolarer Kalziumkonzentration schließlich vollständig blockiert wird. Eine weitere Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration führt nun zu einem steigenden Kalziueinstrom. Der Kalziueinstrom bei extrazellulären Kalziumkonzentrationen in mM-Bereich ist dann aber unabhängig von Na^+ und Mg^{2+} . Diese Effekte wurden sowohl in native CHO-Zellen als auch in den CHO(CCE1)-Zellen beobachtet. Allerdings fand sich ein deutlicher Unterschied in der Stromdichte: Die Kalziumströme in TRPC4/CCE1-Zellen ($\text{Ca}_0=10$ mM) waren etwa fünfmal größer als in nativen CHO-Zellen. Die Natriumströme unterschieden sich bei $\text{pCa}_0=9$ um das Zweifache. Bildet man das Verhältnis aus jeweiliger Natriumstromdichte zu Kalziumstromdichte, so finden sich Verhältnisse von etwa 1 : 5 für CHO(CCE1) und 3 : 5 für CHO(-). Die Expression von TRPC4/CCE1 scheint also bevorzugt den speichergesteuerten Kalziueinstrom zu erhöhen.

Darüber hinaus lassen sich die Natriumströme in CHO(CCE)-Zellen schon mit abgeschätzt 100 nM extrazellulärem Kalzium, die in CHO(-)-Zellen erst mit etwa 500 nM zu etwa 50% blockieren.

Weitere Untersuchungen an einem bekannten CCE-System, basophilen Leukämiezellen der Ratte (RBL-Zellen), bestätigten o.g. Eigenschaften von TRPC4/CCE1 (Warnat et al. 1999). Dabei wurde TRPC4/CCE1 transient in RBL-Zellen exprimiert und Speichergesteuerte Ionenströme gemessen, die in dieser Zelllinie als CRAC-Ströme bezeichnet werden. Es zeigte sich, dass die endogenen speichergesteuerten Kalziueinstrome in RBL-Zellen signifikant durch die Expression von TRPC4/CCE1 erhöht werden.

5.3 SBAC-Zellen exprimieren TRPC4/CCE1 und haben einen speichergesteuerten Kalziumstrom

Da die TRPC4/CCE1 cDNA ursprünglich aus Nebennieren des Rindes isoliert wurde (Philipp et al. 1996) erfolgten weitere Experimente mit Nebennierenrindenzellen des Rindes (SBAC), um die vermuteten speichergesteuerten Ionenkanäle in ihrem nativen Umfeld zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die SBAC-Zellen einen speichergesteuerten Kalziueinstrom besitzen. Dafür spricht insbesondere die Aktivierbarkeit dieses Stroms mit Thapsigargin und IP_3 sowie dessen eindeutige

Selektivität für Kalzium. In Übereinstimmung zu den Experimenten mit CHO(CCE1)-Zellen fand sich auch hier ein durch sehr geringe Konzentrationen von Ca^{2+} oder von Mg^{2+} blockierbarer Natriumeinstrom im Sinne eines anomalen Molfraktionseffektes.

Die mit den CHO(CCE1)-Zellen vergleichbaren Aktivierungsmechanismen und biophysikalischen Eigenschaften des in SBAC-Zellen gemessenen Stroms sowie die Tatsache, dass die SBAC-Zellen TRPC4/CCE1 exprimieren (Philipp et al. 2000), lassen schließen, dass dies ein natives System mit TRPC4/CCE1-getragenen, speichergesteuertem Kalziumeinstrom sein könnte.

Die exemplarische Behandlung der SBAC-Zellen mit ATP, ACTH und AngII führten zu Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration, wie sie in ähnlicher Weise auch durch Thapsigargin hervorgerufen wurden. Dies soll hier als Hinweis für eine relevante physiologische Bedeutung des speichergesteuerten Kalziumeinstroms und der resultierenden intrazellulären Kalziumkonzentrationsänderungen in SBAC-Zellen angegeben werden (Abb. 11).

5.4 TRPC4/CCE1 – ein Mitglied der TRP-Familie

Berücksichtigt man, dass viele der rekombinanten TRP Homologen, z.B. TRPC1 und TRPC3 co-immunopräzipitieren (Xu et al. 1997) und native TRP-Proteine heteromultimere Kanäle bilden können (Hofmann et al. 2002), wäre es denkbar, dass native TRP-Proteine und TRPC4/CCE1 chimäre Kanäle in CHO(CCE1) und auch in TRPC4/CCE1-transfizierten RBL-Zellen bilden.

Frühere Expressionsstudien von anderen TRP-Homologen in CHO-Zellen zeigen andere funktionelle Eigenschaften im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen: TRPC1A (Zitt et al. 1996), TRPL (Zimmer et al. 1997) und TRPC5 (Plat et al. 2003) scheinen nicht selektive Kationenkanäle zu bilden. Verschiedene TRP-Homologe (in CHO-Zellen) führen also zu verschiedenen elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Eigenschaften – nicht selektiver Kationenkanal oder kalziumselektiver Kanal – auf die Expression der TRP-Homologe und nicht auf die endogenen TRP-Proteine zurückzuführen sind. Die beobachteten speichergesteuerten kalziumselektiven einwärts gerichteten Ionenströme in CHO(CCE1)-Zellen repräsentierten dann den Phänotyp von TRPC4/CCE1.

Die rekombinanten Ionenkanäle in CHO-Zellen, die TRPC4/CCE1 exprimieren, zeigen in zwei wichtigen Punkten Eigenschaften von kalziumselektiven Kanälen: 1. Na^+ kann durch den Kanal strömen in Abwesenheit von Ca^{2+} und anderen divalenten Ionen, wird aber von mikromolaren extrazellulären Kalziumkonzentrationen blockiert. 2. Bei millimolaren extrazellulären Kalziumkonzentrationen wird der Ioneneinstrom in die Zelle fast ausschließlich von Ca^{2+} getragen. Die Variation der extrazellulären Natriumkonzentration hat dann keinen Effekt auf den Kalziumstrom.

Es wäre möglich, dass TRPC4/CCE1-Kanäle Multi-Ionen-Poren bilden und Kalziumbindungsstellen hoher Affinität besitzen. Aufgrund der hohen Kalzium-Affinität an die TRPC4/CCE1-Kanäle (und offensichtlich sehr schlechter Leitfähigkeit für intrazelluläre Cäsiumionen) ist der Ionenstrom durch TRPC4/CCE1-Kanäle einwärts gerichtet ohne Auswärtskomponente und besitzt ein positives Umkehrpotential. Die hohe Kalziumaffinität an den Kanal verhindert bei physiologischen Kalziumkonzentrationen den Fluß monovalenter Kationen durch den Kanal und bewirkt eine hohe Kalziumselektivität. Genau diese Eigenschaften sind es, die man für einen (speichergesteuerten) kalziumselektiven Kanal erwarten würde.

Die weiter wachsende Familie der nativen (Hoth & Penner 1993, Parekh et al. 1993, Zweifach & Lewis 1993, Lückhoff & Clapham 1994, Vaca & Kunze 1994, Krause et al. 1996, Yao & Tsien 1997) und rekombinanten (Zitt et al. 1996, Philipp et al. 1996, Yue et al. 2001, Vannier et al. 1999, Plant et al. 2003) speichergesteuerten Kanäle zeigen sehr unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften. Sollten Mitglieder der TRP-Familie (hetero-)multimere speichergesteuerte Kanäle bilden, dann ist TRPC4/CCE1 ein geeigneter Kandidat für die Rolle einer für die Kalziumselektivität verantwortlichen Untereinheit.

6 Literaturverzeichnis

Almers W. & McCleskey W (1984). Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle : calcium selectivity in a single file pore. *J Physiol* 353: 585-608

Amir N, Zlotogora J, Bach G (1987). Mucopolipidosis type IV: clinical spectrum and natural history. *Pediatrics* 79: 953-959

Bahnon TD, Pandol SJ, Dionne VE (1993). Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca²⁺ entry in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 268:10808-12

Berman ER, Livni N, Shapira E, Merin S, Levij IS (1974). Congenital corneal clouding with abnormal systemic storage bodies: a new variant of mucopolipidosis. *J. Pediatr.* 84: 519-526

Berridge MJ (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-25

Berridge MJ (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem J* 312: 1-11

Bird GSJ, Obie JF, Putney JW, Jr (1992). Functional homogeneity of the nonmitochondrial Ca²⁺-pool in intact mouse lacrimal acinar cells. *J Biol Chem* 267: 18382-6

Burgess GM, McKinney JS, Fabiato a, Leslie BA, Putney JW, Jr. (1983). Calcium pools in saponin-permeabilized guinea-pig hepatocytes. *J Biol Chem* 258: 15336-45

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313

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

Cosens DJ, Manning A (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285-7

Clapham, D.E., Runnels, L.W. and Strubing, C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2:387-96

Dolor RJ, Hurwitz LM, Mirza Z, Strauss HC, Whorton AR (1992). Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells: role of intracellular calcium pool. *Am J Physiol* 262: C171-81

Douglas WW (1974). Involvement of calcium in exocytosis and the exocytosis vesiculation sequence. *Biochem Soc Symp* 39: 1-28

Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.* 58: 1515-1520

Ely JA, Ambroz C, Baukal AJ, Christensen SB, Balla T, Catt KJ (1991). Relationship between agonist- and thapsigargin-sensitive calcium pools in adrenal glomerulosa cells. Thapsigargin-induced Ca^{2+} mobilization and entry. *J Biol Chem* 266:18635-41

Exton JH (1980). Mechanisms involved in alpha-adrenergic phenomena: Role of calcium ions in actions of catecholamines in liver and other tissues. *Am J Physiol* 238:3-12

Fanger CM, Hoth M, Crabtree GR, Lewis RS (1995). Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels. *J Cell Biol* 131:655-67

Fasolato C, Hoth M, Penner R (1993). A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *Biol Chem* 268:20737-40

Finch EA, Turner TJ, Goldin SM (1991). Calcium is a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science* 252:443-6

- Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weißgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B (2001). Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nature Cell Biol.* 3:121-127
- Freichel M, Philipp S, Cavalié A, Flockerzi V (2004): TRPC4 and TRPC4 deficient mice. *Novartis Found Symp* 258:189-99
- Garcia RL, Schilling WP (1997). Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239: 279-283
- Glennon MC, Bird GSJ, Kwan C-Y, Putney JW (1992). Actions of Vasopresin and the Ca²⁺- ATPase inhibitor, thapsigargin, on Ca²⁺-signalling in hepatocytes. *J Biol Chem* 267:8230-3
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1986). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Bio Chem* 260:3440-50
- Gunthorpe MJ, Peters JA, Gill CH, Lambert JJ, Lummis SC (2000).The 4'lysine in the putative channel lining domain affects desensitization but not the single-channel conductance of recombinant homomeric 5-HT_{3A} receptors. *J. Physiol.* 522: 187-198
- Hallam TJ, Jacob R, Merritt JE (1989). Influx of bivalent cations can be independent of receptor stimulation in human endothelial cells. *Biochem J* 259: 125-9
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:58-100
- Hess P & Tsien RW (1984). Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* 309: 453-6

Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397: 259-263

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7461-6

Hoth M (1995). Calcium and barium permeation through calcium release-activated calcium (CRAC) channels. *Pflügers Arch* 430:315-22

Hoth M, Penner R (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355:353-6

Hoth M, Penner R (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 465:359-86

Hunter J, Shao J, Smutko JS, Dussault BJ, Nagle DL, Woolf EA, Holmgren LM, Moore KJ, Shyjan AW (1998). Chromosomal localization and genomic characterization of the mouse melastatin gene (*Mln1*). *Genomics* 54: 116-123

Irvine RF (1990). "Quantal" Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry inositol phosphates - a possible mechanism. *FEBS Letters* 263: 5-9

Jackson TR, Patterson SI, Thastrup O, Hanley MR (1988). A novel tumorpromoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca²⁺ without generation of inositolphosphates in NG115-401L neuronal cells. *Biochem J* 253: 81-6

Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM (2001). Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nature Cell Biol.* 3: 499-502

Kraus-Friedmann N (1987). Effects of glucagon and vasopressin on hepatic Ca^{2+} release. Proc Nat Acad Sci USA 83: 8943-6

Krause E, Pfeiffer F, Schmid A, Schulz I (1996). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting non-selective cation current in mouse pancreatic acinar cells. J Biol Chem 271: 32523-8

Lepple-Wienhues A, Cahalan MD (1996). Conductance and permeation of monovalent cations through depletion-activated calcium channels (I_{CRAC}) in Jurkat T cells. Biophys J 67: 177-82

Li HS, Xu XS, Montell C (1999). Activation of a TRPC3-dependent cation current channel through the neurotrophin BDNF. Neuron 24:261-273

Lückhoff A, Clapham DE (1994). Ca^{2+} channels activated by depletion of internal calcium stores in A431 cells. Biophys J 67: 177-82

Ma HT, Patterson RL, Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL (2000). Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca^{2+} channels. Science 287: 1647-1651

Machen TE, Negulescu PA (1988). Release and reloading of intracellular Calcium stores after cholinergic stimulation of the parietal cell. Am J Physiol 254: C498-504

Mignery GA, Südhof TC, Takei K, De Camilli P (1990). Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. Nature 342: 192-5

Minke B, Wu C, Pak WL (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in Drosophila mutant. Nature 258:84-7

Minke B, Selinger Z, (1992). Inositol lipid pathway in fly photoreceptor excitation, calcium mobilization and retinal degeneration.

In: Osborne N, Chader G (ed.). Progress in Retinal Research. Oxford, Pergamon Press 11, 99-124

Montell C, Rubin GM (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313-23

Montell, C (1997). New light on TRP and TRPL. *Mol. Pharmacol.* 52:755-63

Montell, C., Birnbaumer L., Flockerzi, V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell.* 108:595-8.

Montell, C. (2003). The venerable inveterate invertebrate TRP channels. *Cell Calcium.* 33:409-17

Mori Y, Takada N, Okada T, Wakamori M, Imoto K, Wanifuchi H, Oka H, Oba A, Ikenaka K, Kurosaki T (1998). Differential distribution of TRP Ca²⁺ channel isoforms in mouse brain. *Neuroreport* 9: 507-515

Nilius, B. (2004). Store-operated Ca²⁺ entry channels: still elusive! *Sci STKE.* 243:36.

Ohuchi K, Sugawara T, Watanabe M (1987). Stimulation of arachidonic acid metabolism in rat peritoneal macrophages by thapsigargin, a non(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) (TPA)-type tumor promoter. *J Cancer Res Clin Oncol* 113: 319-24

Okada T, Shimizu S, Wakamori M, Maeda M, Kurosaki T, Takada N, Imoto K, Mori Y (1998). Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain. *J. Biol. Chem.* 273: 10279-10287

Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K, Mori Y (1999). Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca²⁺-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 27359-27370

Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P (1989). Role of Ca²⁺ in toxic cell killing

Trends Pharmacol Sci 10: 281-5

O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM (2000). Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. Mol. Biol. Cell 11: 1571-1584

Parekh AB, Terlau H, Stühmer W (1993). Depletion of InsP₃ stores activates a Ca²⁺ and K⁺ current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. Nature 364: 814-8

Patterson RL, Rossum DB, Gill DL (1999). Store-operated Ca²⁺ entry: evidence for a secretion-like coupling model. Cell 98: 487-499

Peretz A, Sandler C, Kirschfeld K, Hardie RC, Minke B (1994). Genetic dissection of light-induced Ca²⁺ influx into Drosophila photoreceptors. J Gen Physiol 104:1057-77

Peretz A, Suss-Toby E, Rom-Glas A, Arnon A, Payne R, Minke B (1994). The light response of Drosophila photoreceptors is accompanied by an increase in cellular calcium: effects of specific mutations. Neuron 12:1257-67

Petersen CC, Berridge MJ, Borgese MF, Bennett DL (1995). Putative capacitative calcium entry channels: expression of Drosophila trp and evidence for the existence of vertebrate homologues

Biochem J 311:41-4

Philipp S, Cavalié A, Freichel M, Wissenbach U, Zimmer S, Trost C, Marquart A, Murakami M, Flockerzi V (1996). Structural basis of capacitative calcium entry in mammals. EMBO J 15: 6166-71

Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L, Schroth G, Freichel M, Murakami M, Cavalié A, Flockerzi V (1998). A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* 17: 4274-82

Philipp S, Trost C, Warnat J, Rautmann J, Himmerkus N, Schroth G, Kretz O, Nastainczyk W, Cavalié A, Hoth M, Flockerzi V (2000). TRP4 (CCE1) Protein Is Part of Native Calcium Release-activated Ca^{2+} -like Channels in Adrenal Cells. *J Biol Chem* 275: 23965-72

Phillips AM, Bull A, Kelly LE (1992). Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 1992 8:631-42

Plant T.D. and Schaefer, M (2003). TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca^{2+} -permeable nonselective cation channels. *Cell Calcium*. 33:441-50

Putney JW, Jr, Poggioli J, Weiss SJ (1981). Receptor regulation of calcium release and calcium permeability in parotid gland cells. *Phil Trans R Soc Lond* 296: 37-45

Putney JW, Jr (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11: 611-24

Putney JW, Jr, Bird GSJ (1993). The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocrine Rev* 14: 610-31

Putney JW, Jr (1993). Excitement about calcium signaling in inexcitable cells. *Science* 262: 676-8

Putney JW, Jr (1997). Capacitative calcium entry. Springer. New York.

Rohacs T, Bago A, Deak F, Hunyady L, Spat A (1994). Capacitative Ca^{2+} influx in adrenal glomerulosa cells: possible role in angiotensin II response. *Am J Physiol* 267:C1246-52

Ryazanov AG, Ward MD, Mendola CE, Pavur KS, Dorovkov MV, Wiedmann M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Parmer TG, Prostko CR, Germino RF, Hait WN (1997). Identification of a new class of protein kinases represented by eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 4884-4889

Schilling WP, Cabello OA, Rajan L (1992). Depletion of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive intracellular Ca²⁺ store in vascular endothelial cells activates the agonist-sensitive Ca(2+)-influx pathway. *Biochem J* 284:521-30

Sinkins WG, Vaca L, Hu Y, Kunze DL, Schilling WP (1996). The COOH-terminal domain of *Drosophila* TRP channels confers thapsigargin sensitivity. *J Biol Chem* 271:2955-60

Somasundaram B, Norman JC, Mahaut-Smith MP (1995). Primaquine, an inhibitor of vesicular transport, blocks the calcium-release-activated current in rat megakaryocytes. *Biochem. J.* 309: 725-729

Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nature Cell Biol.* 2: 695-702

Suppattapone S, Worley PF, Baraban JM, Snyder SH (1988). Solubilization, purification and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 263:1530-4

Takemura H, Putney JW, Jr. (1989). Capacitative calcium entry in parotid acinar cells. *Biochem J* 258:409-12

Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW, Jr. (1989). Activation of calcium entry by the tumor promoter, thapsigargin, in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool, and not an inositol phosphate, regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* 264:12266-71

Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci* 87:2466-70

Tiruppathi C, Freichel M, Vogel SM, Paria BC, Mehta D, Flockerzi V, Malik AB (2002) Impairment of store-operated Ca^{2+} entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ Res* 91:70-6

Vaca L & Kunze DL (1994). Depletion of intracellular Ca^{2+} stores activates a Ca^{2+} -selective channel in vascular endothelium. *Am J Physiol* 267: 920-5

Vaca L, Sinkins WG, Hu Y, Kunze DL, Schilling WP (1994). Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am J Physiol* 267: 1501-5

Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L (1999). Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca^{2+} entry channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2060-2064

Wang X, Pluznick JL, Wei P, Padanilam BJ, Sansom SC (2004) TRPC4 forms store-operated Ca^{2+} channels in mouse mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C357-64

Warnat J, Philipp S, Zimmer S, Flockerzi V, Cavalie A (1999). Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca^{2+} . *J Physiol* 518:631-8

Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995). TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9652-6

Wissenbach U, Bödding M, Freichel M, Flockerzi V (2000). Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett.* 485: 127-134

Xu XZS, Li HS, Guggino WB, Montell C (1997). Co-assembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell* 89: 1155-64

Yao Y & Tsien RY (1997). Calcium current activated by depletion of calcium stores in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 109: 703-15

Yue, L., Peng, J.B., Hediger, M.A., and Clapham, D.E. (2001). *Nature* 410: 705–709

Zhu X, Chu PB, Peyton M, Birnbaumer L (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* *trp* gene. *FEBS Lett* 373:193-8

Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1996). *trp*, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* 85:661-71

Zimmer S, Trost C, Cavalié A, Philipp S, Flockerzi V (1997). The TRPL protein is a Ca^{2+} -calmodulin activated non-selective cation (CAN) channel. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 355: R67

Zitt C, Obukhov AG, Srübing C, Zobel A, Kalkbrenner F, Lückhoff A, Schultz G (1997). Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *J cell Biol* 138: 1333-41

Zitt C, Zobel A, Obukhov AG, Harteneck C, Kalkbrenner F, Lückhoff A, Schultz G (1996). Cloning and functional expression of a human Ca^{2+} -permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* 16: 1189-96.

Zweifach A, Lewis RS (1993). Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6295-9

Zweifach A, Lewis RS (1995). Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (I_{CRAC}) due to local calcium feedback. *J Gen Physiol* 105:209-26

7 Publikationen

Warnat J, Philipp S, Zimmer S, Flockerzi V, Cavalie A (1999). Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca. *Journal of Physiology (London)* 518: 631-638

Warnat J, Philipp S, Zimmer S, Flockerzi V, Cavalie A (1998). Selective permeation of calcium through a recombinant store operated ion-channel.

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, Suppl. to Vol. 435, No. 6

Philipp S, Trost C, Warnat J, Rautmann J, Himmerkus N, Schroth G, Kretz O, Nastainczyk W, Cavalie A, Hoth M, Flockerzi V (2000). TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca²⁺-like channels in adrenal cells. *Journal of Biological Chemistry* 275: 23965-72

Cavalie A, Warnat J, Philipp S, Schroth G, Hambrecht J, Wissenbach U, Freichel M, Flockerzi V (1998). Selective permeation of calcium through a recombinant store operated ion-channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Suppl. to Vol. 357, No. 4*

Schroth G, Warnat J, Philipp S, Freichel M, Cavalie A, Flockerzi V (1998). Tissue specific expression of the capacitative calcium entry channel CCE1 and comparison of its functional properties with native CCEs. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Suppl. to Vol. 357, No. 4*

Flockerzi V, Philipp S, Schroth G, Warnat J, Freichel M, Wissenbach U, Braslavski L, Cavalie A (1998). Expression of capacitative calcium entry channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Suppl. 2 to Vol. 358, No. 1*

8 Lebenslauf

Name: Jan Warnat

Geburtsdatum: 20. April 1971

Geburtsort: Neustadt a.d. Weinstraße

Adresse: Hans-Huber-Str. 4
93049 Regensburg

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1977-1981 Grundschule Neustadt-Hambach
1981-1990 Käthe-Kollwitz-Gymnasium Neustadt, Abitur

Wehrdienst: 1990-1991

Studium: 1991-1993 Elektrotechnik, Universität Karlsruhe
1993-1999 Medizin, Universität Heidelberg
1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr: 1998-1999 Klinikum Heilbronn und
Luisiana State University, USA
11/99 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Facharztausbildung: Seit 12/99 Assistent an der Klinik und Poliklinik für
Neurochirurgie der Universität Regensburg