

Index

Abkürzungsverzeichnis (S.3 – 4)

1 Zusammenfassung (S.5 – 6)

2 Einleitung

2.1 Kalzium (S.7 – 9)

2.1.1 Kalzium als Signalbotenstoff (S.7 – 9)

2.1.2 Apoptose (S.9)

2.2 TRP Kanäle (S.9 – 22)

2.2.1 TRPC Kanäle (S.12 – 18)

2.2.1.1 Das TRPC1 Membranprotein (S.13 – 14)

2.2.1.2 Das TRPC4 Membranprotein (S.14 – 16)

2.2.1.3 Das TRPC5 Membranprotein (S.16 – 18)

2.2.2 TRP assoziierte Erkrankungen (S.18 – 20)

2.2.2.1 TRPC-assoziierte Erkrankungen (S.18 – 19)

2.2.2.2 Andere TRP-assoziierte Erkrankungen (S.19 – 20)

2.2.3 Gain-of-function Mutationen im S4/S5 Segment von TRP Kanälen (S.21 – 22)

2.3 Ziel der vorliegenden Arbeit (S.22 – 23)

3 Material und Methoden

3.1 Material (S.24 – 28)

3.1.1 Geräte (S.24)

3.1.2 Kits (S.24)

3.1.3 Software (S.25)

3.1.4 Materialien (S.25)

3.1.5 Feinchemikalien (S.25)

3.1.6 H₂O_{steril} (S.25)

3.1.7 Puffer und Lösungen (S.26)

3.1.8 Enzyme (S.26)

3.1.9 Agarosegel (S.26)

3.1.10 Primer (S.26 – 27)

3.1.11 Plasmide (S.27)

3.1.12 Bakterienstamm (S.28)

3.2 Methoden (S.28 – 45)

3.2.1 Molekularbiologische Methoden (S.28 – 38)

3.2.1.1 Mutagenese (S.28 – 30)

3.2.1.2 Restriktionsverdau (S.30 – 31)

3.2.1.3 Ligation (S.31)

3.2.1.4 Präparation von kompetenten Zellen und Transformation (S.31 – 32)

3.2.1.5 Sequenzierung von DNA (S.32)

3.2.1.6 Klonierung und Subklonierung (S.33 – 34)

3.2.1.7 Detaillierte Beschreibung der verwendeten Vektoren (S.35 – 36)

3.2.1.7.1 pBluescript II Phagemid KS- (S.35)

3.2.1.7.2 pcDNA3 (S.35)

3.2.1.7.3 pcAGGS(-IRES-GFP) (S.35)

3.2.1.7.4 pcDNA5-FRT/TO (S.36)

3.2.1.8 Zellen, Transfizierte cDNA und Transfektion (S.36 – 38)

3.2.2 Fluoreszenz-basierte zytosolische Ca²⁺ Messungen (S.38 – 42)

3.2.2.1 Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie (S.39)

3.2.2.2 Fluoreszierende Kalziumindikatoren (S.39 – 40)

3.2.2.3 Durchführung der Ca²⁺ Imaging Experimente (S.41 – 42)

3.2.3 Durchflusszytometrie (S.42 – 44)

- 3.2.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie (S.42 – 44)
- 3.2.3.2 Durchführung Viability Assay mithilfe der Durchflusszytometrie (S.44)
- 3.2.4 Überleben visuell nach Kalzium-Pufferung durch EGTA (S.44 – 45)
- 3.2.5 Auswertung und Statistik (S.45)

4 Ergebnisse

- 4.1 Klonierung (S.46 – 52)
 - 4.1.1 Mutagenese und Subklonierung von mTRPC5_{G504S} (S.46 – 50)
 - 4.1.2 Mutagenese und Subklonierung von mTRPC1_{G506S} (S.50 – 51)
 - 4.1.3 Mutagenese und Subklonierung von mTRPC4_{G503S} (S.51)
 - 4.1.4 Übersicht (Sub-) Klonierungen (S.51 – 52)
- 4.2 Funktionelle Untersuchungen (S.52 – 67)
 - 4.2.1 Zellen die mTRPC5_{G504S} bzw. mTRPC4_{G503S} exprimieren weisen eine geringere Überlebensrate auf (S.52 – 61)
 - 4.2.2 Das Überleben der Zellen wird nicht von der G506S Mutation im TRPC1 Kanal beeinflusst (S.61 – 64)
 - 4.2.3 Kompensatorische Mutation in TRPC4 und TRPC5 (S.64 – 67)

5 Diskussion

- 5.1 Die Mutation G503S bzw. G504S in mTRPC4 bzw mTRPC5 führt zu einem konstitutiv aktiven Ionenkanal (S.68 – 69)
- 5.2 Das dreidimensionale Strukturmodell des Spannungsabhängigen Kaliumkanals als Vorlage für ein Modell von TRPC4 und TRPC5 (S.69 – 75)
- 5.3 Die Relevanz des S4-S5 Linkers für das Gating von TRPC4/TRPC5 und anderen TRP Kanälen (S.75 – 81)
- 5.4 Die Mutation des konservierten Glyzins 506 von TRPC1 (S.81 – 89)
- 5.5 Der Effekt von pharmakologischen Tools auf die Mutanten (S.89)
- 5.6 Schlussfolgerung und Ausblick (S.90)

6 Referenzen (S.91 – 114)

7 Publikationen (S.115)

8 Lebenslauf (S.116)

9 Danksagung (S.117)

Abkürzungsverzeichnis

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
5-HT	5-Hydroxytryptamin bzw. Serotonin
ADPKD	Autosomal Dominante Polycystische Nierenerkrankung
ANOVA	Analysis of Variance
AR	ankyrin-like repeats
BMP4	bone morphogenic protein 4
CaM	Calmodulin
CCD	Charge-Coupled-Device
cDNA	complementary DNA
CH1	connecting helix 1
CH2	connecting helix 2
CIRB	Calmodulin und IP3-Receptor Binding
CNS	Central Nervous System
CMV	Cytomegalievirus
cryo-EM	single-particle cryogenic electron microscopy
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N' tetraessigsäure
EPAC	Exchange factor directly activated by cAMP
EPSP	erregenden postsynaptischen Potential
Flp	Flippase
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxymethyl Ester
FSC	Forward Scatter
FSGS	Fokale Segmentale Glomerulosklerose
GABA	Gamma – Aminobuttersäure
GFP	Green Fluorescent Protein
GOF	Gain-of-Function
HEPES	2-ethansulfonsäure
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1 α
HSR	Hypomagnesinämie mit sekundärer Hypocalcämia
Hz	Hertz
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
ICC	Intestinal cell of Cajal
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
KOZ - Sequenz	Kozak - Sequenz
Kv Kanäle	Spannungs-aktivierten Kalium Kanäle
La ³⁺	Lanthan
LB	Lysogeny Broth
LPS	Lipopolysaccharide
M ₂ R	muskarinischer Rezeptor Subtyp 2
MCS	Multiple Cloning Site
mGluR	metabotroper Glutamat Rezeptor
mIcat	muskarinischer Rezeptor-induzierter Kationenstrom
MLIV	Mucopolysaccharidose Typ IV
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ Austauscher
NHERF1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory cofactor 1
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDZ	Postsynaptic density 95/disc-large/zona occludens
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat
PKC γ	Proteinkinase C γ
PLC	Phospholipase C

PMCA	Ca ²⁺ -ATPase
ROCs	Receptor-Operated Channels
ROI	Regions of Interest
ROS	Reactive oxygen species
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SCC	Side Scatter
SERCA	Sarko-Endoplasmatische Retikulum Calcium ATPase
SMOCs	Second Messenger-operated Channels
SOCCs	Store-operated Calcium Channels
SOCE	Store-operated Calcium Entry
STIM	Stromal Interaction Molecule
SV40	Simian-Virus 40
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TPT	Topotecan
TRP	Transient Receptor Potential
TZL	Tonantzitolon
VOCCs	voltage-operated calcium channels

1 Zusammenfassung (deutsch und englisch)

Die nicht selektiven Kationenkanäle Transient Rezeptor Potential Canonical (TRPC) 4 und 5 (TRPC4, TRPC5) sind nah miteinander verwandt und in ihrer Aminosäuresequenz zu 65% identisch. Aktiviert werden die Kanäle über die Phosphoinositol-Kaskade. In der vorliegenden Arbeit wurde ein evolutionär konservierter Glycinrest im zytosolischen S4-S5 Linker von den Proteinen durch polare Aminosäuren ersetzt. Diese Mutation zwingt die Kanäle in eine konstitutiv offene Konformation. Die Expression der TRPC4_{G503S} und TRPC5_{G504S} Proteine in HEK293 Zellen bewirkt eine Apoptose, diese konnte durch Reduktion des extrazellulären Ca²⁺ (Zugabe Kalziumchelator EGTA ins Medium) inhibiert werden. In fluoreszenz-basierten zytosolischen Ca²⁺ Messungen konnte nach Expression der Mutanten ein vermehrter Kalziumeinstrom gemessen werden. Vermutlich wird die Apoptose der Zellen durch eine Überladung mit Ca²⁺ Ionen ausgelöst. Der Zelltod konnte mit durchflusszytometrischen Apoptoseassays bestätigt werden und mit den unspezifischen TRP Kanalblockern SKF96365 und dreiwertigen Lanthan-Ionen reduziert werden. Im Gegensatz führt die Expression der TRPC1_{G506S} Mutante nicht zu einem erhöhten Kalziumeinstrom und die TRPC1_{G506S}-exprimierende Zellen werden nicht apoptotisch. Ein Homologiemodell, basierend auf der bekannten Struktur des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.2, zeigt als möglichen Interaktionspartner für die polaren Aminosäuren einen konservierten Serinrest in der C-terminalen S6 Helix des TRPC4 Proteins. Tatsächlich führt eine zweite Mutation S623A in der TRPC4_{G503S} Mutante in Patch Clamp Experimenten (Andreas Beck) wieder zu einer geringeren Kanalaktivität. Offensichtlich kann die Mutation S623A den Effekt der Mutation G503S in TRPC4 zumindest teilweise kompensieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der S4/S5 Linker kritisch für das Gating von TRPC4/5 Kanälen ist und dass eine Änderung seiner Sequenz zu einer Kanalöffnung unabhängig von anderen Faktoren führen kann.

Molecular cloning and functional characterization of TRPC1, 4 and 5 proteins containing a point mutation of a conserved glycine residue in the S4-S5 linker.

The nonselective cation channels Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) 4 and 5 (TRPC4, TRPC5) are closely related and share 65% amino acid sequence identity. They are activated by stimulation of receptors coupled to the phosphoinositide cascade. In this work we replaced a conserved glycine residue within the cytosolic S4-S5 linker of the aforementioned proteins by polar residues. This mutation forces the TRPC4 and TRPC5 channels into an open conformation. The expression of TRPC4_{G503S} and TRPC5_{G504S} mutants in HEK293 cells causes apoptosis, which could be prevented by reducing the extracellular Ca²⁺ concentration of the culture medium. Fluorescence-based cytosolic Ca²⁺ measurements showed increased Ca²⁺ Influx in the mutant TRPC4_{G503S} and TRPC5_{G504S}-expressing cells. Apoptosis is presumably triggered by Ca²⁺ overload. Apoptosis could be confirmed by flow cytometry and prevented by the unspecific channel blockers of TRP channels SKF96365 and trivalent Lanthanum ions. In contrast, expression of the TRPC1_{G506S} mutant does not lead to an increased calcium influx and TRPC1_{G506S}-expressing cells do not show apoptosis. Modeling of TRPC4, based on the known structure of the voltage-gated potassium channel Kv1.2, predicts a conserved serin residue within the C-terminal sequence of the S6 helix as potential interaction site. Introduction of a second mutation, S623A, into TRPC4_{G503S} suppressed the constitutive activation in patch-clamp experiments (Andreas Beck). Apparently, the mutation S623A is able to partly compensate the effects by the G503S mutation in TRPC4.

These results indicate that the S4-S5 linker is a critical constituent of TRPC4/C5 channel gating and that disturbance of its sequence allows channel opening independent of any sensor domain.

2 Einleitung

2.1 Kalzium

„In furnaces of the stars the elements evolved from hydrogen. When oxygen and neon captured successive α particles, the element calcium was born. Roughly 10 billion years later, cell membranes began to parse the world by charge, temporarily and locally defying relentless entropy. To adapt to changing environments, cells must signal, and signaling requires messengers whose concentration varies with time. Filling this role, calcium ions (Ca^{2+}) and phosphate ions have come to rule Ca^{2+} signaling.“ (Clapham et al. 1995)

Kalzium spielt als eines der zentralen Signalmoleküle eine herausragende Rolle für verschiedenste physiologische Prozesse. Es ist nicht nur wichtig für die einzelne Zelle, sondern genauso für die Homöostase des gesamten Organismus. 99% des Kalziums befinden sich im Knochen (ca. 1000 g) als Kalziumphosphatverbindung. Sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre Kalziumkonzentration unterliegt strengen Regulationsmechanismen, die für einen relativ konstanten Kalziumspiegel in beiden Kompartimenten sorgen. Mit Blick auf die Wichtigkeit eines konstanten Kalziumspiegels für die einzelne Zelle wird schnell klar wie essentiell der Pegel im Blut für den Organismus ist (Herold et al., 2011). Im Serum liegen 2.2 bis 2.6 mmol/L Kalzium vor. Davon sind 45% an Eiweiß gebunden, 5% Komplexgebunden an Anionen wie Bikarbonat, Zitrat und Phosphat und 50% liegen als freie Ionen (Ca^{2+}) vor. Viele unterschiedliche Erkrankungen sind mit dem Kalziumhaushalt des Körpers assoziiert. Zum Beispiel endokrine Erkrankungen wie Hypo- und Hyperparathyreodismus sowie Knochenerkrankungen wie Osteomalazie, Rachitis und Osteoporose.

2.1.1 Kalzium als Signalbotenstoff

Auf zellulärer Ebene spielt Kalzium vor allem eine Rolle als Signalbotenstoff (second messenger). Proteine werden in ihrer Funktion durch ihre Ladung und ihre Form beeinflusst. Die Fähigkeit von Kalzium (und Phosphat) das lokale elektrostatische Feld und somit die Konformation der Proteine zu beeinflussen ist der Mechanismus mit dem Kalzium als Signalmolekül agiert (Clapham et al. 1995). Diesbezüglich spielen beispielsweise Kalziumbindende Adapter-Proteine wie Calmodulin (CaM) eine herausragende Rolle. Daneben gibt es noch viele weitere Proteine und Strukturen, die Kalzium binden und somit an der Signalweiterleitung beteiligt sind (Elías et al. 2020).

Im Gegensatz zum Extrazellularraum ist die Kalziumkonzentration im Zytosol nicht-erregbarer Zellen mit etwa 100 nM in Ruhe um das 10.000-fache niedriger. Der riesige Gradient über der Zellmembran ist die Grundlage für die Signaleigenschaft von Ca^{2+} . Dieser Gradient wird durch Moleküle wie die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA), die Sarko-Endoplasmatische Retikulum Calcium ATPase (SERCA) und den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (NCX) aufrechterhalten. Dabei transportiert die Zelle ständig Ca^{2+} aus dem Zytosol in den Extrazellularraum und in die intrazellulären Ca^{2+} Speicher des Endo- bzw. Sarkoplasmatischen Retikulum. Hierfür verwendet sie einen Großteil ihrer Energie.

„Like Sisyphus, ATPase pumps are condemned to push Ca^{2+} uphill for eternity into the endoplasmatic reticulum (ER) or out of the cell.“ (Clapham et al. 1995)

Zu den Ca^{2+} -permeablen Ionenkanälen in der Plasmamembran gehören die Ca^{2+} -selektiven Spannungs-aktivierten Ca^{2+} Kanäle (VOCCs - voltage-operated calcium channels; L-, N-, P/Q-, R-, T-Typ), Speicher-aktivierten Ca^{2+} Kanäle (SOCCs – store-operated calcium channels; Orai1-3) sowie TRPV5 und TRPV6 aus der Familie der Transient Receptor Potential (TRP) Kanäle (siehe 2.2). Daneben gibt es noch eine Reihe nicht-selektiver Kationenkanäle, wie Second-messenger-aktivierte Kationenkanäle (SMOCs – second messenger-operated channels), Liganden- bzw. Rezeptorgesteuerte Kationenkanäle (ROCs – receptor-operated channels; z.B. nACh-R, NMDA-R, $\text{P}_2\text{X-R}$), mechanisch aktivierte Kationenkanäle (z.B. Piezo1) und weitere, nicht-selektive TRP Kanäle, die neben Na^+ auch für Ca^{2+} permeabel sind. Es existieren außerdem Zell-zu-Zell Kontakte (Gap-Junctions), die den Übertritt von Kalziumionen von einer Zelle in die Andere ermöglichen (Goodenough und Paul et al. 2009). Ionenkanäle stellen modifizierbare Verbindungen zwischen dem Intra- und Extrazellularraum einerseits und den verschiedenen Kompartimenten andererseits her. Sie reagieren auf eine Stimulation bzw. Inhibition indem sie Ihre Offenwahrscheinlichkeit ändern wobei sich der Ionenstrom, im Falle der Ca^{2+} -permeablen Ionenkanäle der Ca^{2+} -Strom, und somit die Ionen- bzw. Ca^{2+} -Konzentration in den verschiedenen Kompartimenten ändern. Diese Ströme und die Änderungen vor allem der intrazellulären Kalziumkonzentration sind es letztendlich, die die Informationen für die Zelle kodieren.

Neben Kalziumeinstrom kann ein zytosolischer Ca^{2+} Anstieg auch durch Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern stattfinden (Striggow und Ehrlich et al. 1996). So wird beispielsweise über Gq-gekoppelte Rezeptoren in der Plasmamembran die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Diese katalysiert eine Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 bewirkt eine Kalziumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum durch die Ca^{2+} -selektiven IP_3 -Rezeptorkanäle (Yoshida und Imai et al. 1997). Ein anderes Beispiel sind Ryanodinrezeptoren (RyR) in z.B. Muskelzellen, die Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum freisetzen. RyR Rezeptoren gibt es auch in anderen Zellen,

nicht nur in Muskelzellen, z.B. in den Purkinjezellen des Kleinhirns und in der Herzmuskulatur (Zucchi und Ronca-Testoni et al. 1997).

2.1.2 Apoptose

Kalzium spielt eine zentrale Rolle in der Signalverarbeitung und Signalweiterleitung im Organismus. Mittlerweile ist bekannt, dass die Überladung von Zellen mit Kalziumionen sowohl Apoptose als auch Nekrose auslösen kann.

Apoptose ist der physiologisch definierte Zelltod, der durch eine Volumenabnahme der Zellen, eine Aufteilung der Zellen in Plasmamembranbläschen und eine Kondensation sowie eine Fragmentation von Nukleinsäuren gekennzeichnet ist. Im Gegensatz dazu resultiert eine Nekrose, der so genannte einfachen Zelltod, aus einer homöostatischen Insuffizienz. Bei der Apoptose läuft der Zelltod geregelt ab. Dies dient zum Beispiel der Morphogenese des Organismus in der Embryonalentwicklung oder der Kontrolle des Umsatzes eines Gewebes beim erwachsenen Organismus, dem „Zellselfmord“ bei einem Virusbefall oder aber einer Begrenzung des Tumorwachstums (Robertson et al. 2000).

Kalzium als „Todestrigger“ (Orrenius et al. 2003), wurde erstmals von Fleckenstein et al. 1980 (Fleckenstein und Fleckenstein-Grün et al. 1980) beschrieben. Die Autoren erklärten, dass ein exzessiver Ca^{2+} -Einstrom in Myozyten im Herzen der Mechanismus sein könnte, durch den die Myozyten im Falle einer Ischämie zu Grunde gehen. Inzwischen ist bekannt, dass der Kalziumhaushalt der Zelle eng mit den sogenannten Caspasen verwoben ist. Die Caspasen sind Proteasen und die hauptausführenden Proteine der Apoptose. Kalzium kann auf verschiedenen Wegen zu deren Aktivierung und somit zur Einleitung der Apoptose beitragen (Elmore et al. 2007).

2.2 TRP Kanäle

Die 28 Mitglieder der Transient Rezeptor Potential Kanal (TRP) Familie bei Mäusen (bzw. 27 beim Menschen) (Flockerzi und Nilius 2007) sind Kationenkanäle und werden in verschiedene Subfamilien unterteilt (Abb. 2-1). Dazu gehören die Gruppen der „Canonical“ bzw. TRPC Kanäle, „Melastatin“ bzw. TRPM Kanäle, „Vanilloid“ bzw. TRPV Kanäle, „Ankyrin“ bzw. TRPA1 Kanal, „Polycystin“ bzw. TRPP Kanäle, und „Mucolipin“ bzw. TRPML Kanäle.

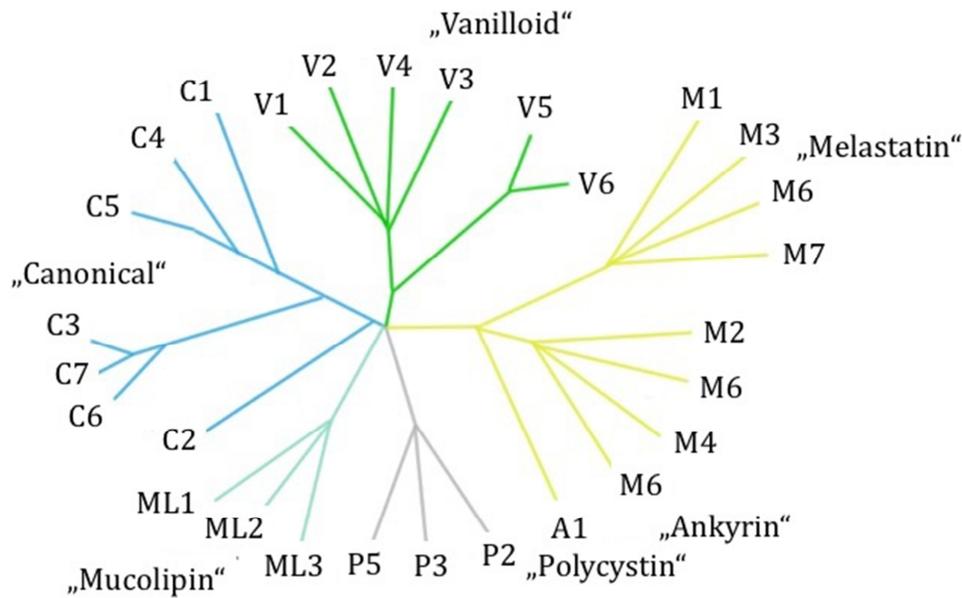


Abbildung 2-1: 28 Mitglieder der TRP Familie bei den Säugetieren (6 Subfamilien). (modifiziert nach Clapham 2003)

Das erste Mitglied der TRP Familie wurde bei einer Mutante der *Drosophila Melanogaster* Fliege entdeckt (Hardie und Minke et al. 1992). Im Elektretinogramm dieser Mutante wurde, solange ein Lichtreiz vorhanden war, statt einer andauernden Depolarisation (Einwärtsstrom) lediglich ein vorübergehendes (transientes) Rezeptorpotential bzw. ein transientser Strom gemessen. Diese Charakteristik der loss-of-function Mutanten war namensgebend für das TRP (Transient Rezeptor Potential) Gen (Hardie und Minke et al. 1992; Minke et al. 1977; Montell et al. 1985; Montell und Rubin et al. 1989) welches für ein kationenpermeables Ionenkanalprotein in der Plasmamembran von Photorezeptorzellen kodiert.

TRP Proteine wurden in den verschiedensten Organismen identifiziert. So sind bei der Fliege 16, beim Fisch 25 und bei der Maus 28 TRP Proteine bekannt. Beim Menschen sind 27 TRPs bekannt, da TRPC2 hier lediglich ein Pseudogen darstellt (Venkatachalam 2007). Es wird angenommen, daß die evolutionär ältesten TRP Kanäle in Protozoen, Chlorophyten (Grünalgen), Choanoflagellaten, Hefe und Pilzen primär reine Chemo-, Thermo- und Mechanosensoren sind (Cai et al. 2008; Fox et al. 2008; Chang et al. 2010; Wheeler und Brownlee et al. 2008). In Säugetieren übernehmen die TRP Proteine teils ähnliche Funktionen. Sie sind z.B. an der chemischen Reizdetektion und der elektrischen Impulsweiterleitung im Rahmen verschiedener sensorischer Prozesse wie z.B. der Schmerz- oder Temperaturwahrnehmung (Caterina et al. 1997; Clapham et al. 1995) bei der Regulation der Fertilisierung, des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung sowie der Regulation des Gefäßtonus (Freichel et al. 2001) beteiligt. Als Temperatursensoren werden z.B. TRPV1 (>43°), TRPV2 (>52°), TRPV3 (>30-39°), TRPV4 (>25-35°) und TRPM3 (>30-45°) an der Wahrnehmung von heißen und warmen Reizen, sowie TRPM8 (<20-28°) und TRPA1 (<17°)

an der Wahrnehmung von kalten und kühlen Reizen diskutiert (Caterina et al. 1997; Caterina et al. 1999; Güler et al. 2002; Peier et al. 2002b; Smith et al. 2002; Watanabe et al. 2002; Xu et al. 2002; Wagner et al. 2008; Vriens et al. 2011; McKemy et al. 2002; Peier et al. 2002a; Karashima et al. 2009; Story et al. 2003; Bandell et al. 2004; Sawada et al. 2007; López-González et al. 2017) Ausserdem wurde TRPM2 als hypothalamischer Temperatursensor im Zusammenhang mit Fiebersenkung und Hypothermie beschrieben (Song et al. 2016).

Die meisten TRP Kanäle sind in der Plasmamembran lokalisiert, manche sind jedoch in den Membranen der intrazellulären Organellen, wie z.B. in Endosomen und Lysosomen vertreten (Dong et al. 2010). Als funktionelle Regulatoren der intrazellulären Kalziumkonzentration spielen sie eine wichtige Rolle für viele verschiedene physiologische Prozesse.

Gemeinsam ist allen TRP Proteinen der grundsätzliche strukturelle Aufbau (Abbildung 2-2, oben). Sie bestehen aus 6 Transmembrandomänen (S1-S6) mit intrazellulärem N- und C-Terminus. Außerdem ist den Kanälen eine Schleife zwischen S5 und S6 gemeinsam (S5-S6 Loop) (Gaudet et al. 2008), die die Pore des Kanals formt. Die Länge der zytosolischen N- und C-terminalen Reste variiert stark. Typischerweise liegen bei den TRPC Kanälen am N-Terminus mehrere Ankyrinreste vor. C-terminal befindet sich die sogenannte TRP-Box, welche wahrscheinlich eine Interaktionsstelle für PIP_2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat) darstellt, eine CIRB-Domäne (Calmodulin und IP_3 Rezeptor binding domain), an die Calmodulin binden kann, eine EF-Hand, an die Kalzium direkt binden kann und – im Falle von TRPC4 und TRPC5 – eine PDZ-Domäne (Proteininteraktionsdomäne). Über die PDZ-Domäne interagieren TRPC4 und TRPC5 beispielsweise mit dem Na^+/H^+ -Austauscher oder Signalmolekülen wie $\text{PLC}\beta 1$ (Venkatachalam et al. 2007). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die PDZ-Domäne in TRPC4 die Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran kontrolliert (Mery et al. 2002) und als Interaktionsstelle für NHERF1 (Na^+/H^+ exchanger regulatory cofactor 1) die Diacylglycerol-abhängige Aktivität von TRPC4 und TRPC5 reguliert (Storch et al. 2017).

Mittlerweile ist die Kristallstruktur vieler TRP Proteine bzw. Kanäle bekannt (zur Übersicht siehe z.B. (Wang et al. 2020)). Die meisten TRP-Kanäle formen Tetramere aus vier gleichen Proteinen (Homotetramer), wobei die tetramere Struktur der TRP Kanäle sehr ähnlich denen der Spannungs-aktivierten Kalium (Kv) Kanäle ist. Es finden sich immer mehr Evidenzen, dass auch eine heteromultimere Zusammenlagerung einzelner Untereinheiten verschiedener Mitglieder einer TRP Subfamilie erfolgen kann, und zu funktionell einzigartigen Kanalkomplexen führt. Dies wurde z.B. im Falle von TRPC1 und TRPC4/TRPC5 in Neuronen und in heterologer Expression gezeigt (Strübing et al. 2001; Storch et al. 2012; Bröker-Lai et al. 2017b).

2.2.1 TRPC Kanäle

Die TRPC Unterfamilie ist wiederum in vier Subgruppen unterteilt: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5. Teils wird in der Literatur auch eine andere Einteilung vorgenommen und TRPC1 wird zu TRPC4/5 gezählt (Wu et al. 2010). Einige TRPs wurden anhand ihrer Funktion oder Assoziation mit Krankheiten entdeckt. Die meisten TRPC Kanäle wurden jedoch anhand Ihrer Sequenzhomologie zum *Drosophila* TRP Protein identifiziert. Die Einteilung erfolgte ebenfalls aufgrund der Strukturhomologie (Struktur siehe Abbildung 2-2). Grundsätzlich sind TRPC Kanäle Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle. Das Selektivitätsverhältnis $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ variiert hier allerdings stark zwischen den einzelnen Familienmitgliedern (Flockerzi und Nilius et al. 2007). Mit ein paar Ausnahmen werden die TRPC Kanäle breit, d.h. in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert. Die meisten Zelltypen enthalten verschiedene TRPC Kanäle (Montell et al. 2005). Die funktionelle Untersuchung der TRPC Proteine ist unter anderem durch die Möglichkeit der Bildung heteromerer Kanäle sehr komplex. Es konnte gezeigt werden, dass TRPC1 mit TRPC4 und TRPC5 und die Subfamilien TRPC4/5 und TRPC3/6/7 untereinander heteromerisieren. Dabei weichen die Eigenschaften der heteromeren Kanäle jeweils signifikant von den korrespondierenden homomeren Kanalkomplexen ab (Strübing et al. 2001; Goel et al. 2002; Hofmann et al. 2002; Strübing et al. 2003; Schilling und Goel et al. 2004).

Die Aktivierung von TRPC Kanälen erfolgt vorwiegend über verschiedene Isoformen der Phospholipase C (PLC). Die PLC katalysiert die Umwandlung von PIP_2 zu IP_3 und DAG und wird zum Beispiel aktiviert durch G_q -gekoppelte Rezeptoren und verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen. TRPC2/3/6/7 werden dabei sehr wahrscheinlich direkt durch das freigesetzte DAG aktiviert (Beck et al. 2006; Lucas et al. 2003). Mittlerweile gibt es jedoch auch Arbeiten, die auf eine DAG-vermittelte Aktivierung von TRPC4 und TRPC5 hinweisen (Mederos y Schnitzler et al. 2018; Storch et al. 2017). Die durch IP_3 vermittelte Kalziumfreisetzung aktiviert den sogenannten Speicher-aktivierten Ca^{2+} Einstrom (SOCE – store-operated calcium entry), der vorwiegend durch die Ca^{2+} -selektiven ORAI Kanäle (ORAI1-3) vermittelt wird (Vig et al. 2006). Diese werden durch direkte Interaktion mit dem Ca^{2+} -Sensor im Endoplasmatischen Retikulum, dem Stromal Interaction Molecule (STIM1, 2) aktiviert. Nach wie vor werden auch einige der TRPC Proteine zu den Speicher-aktivierten Kanälen gezählt, wobei diese vor Entdeckung der ORAI Proteine als die wichtigsten SOCE Kanäle in Betracht gezogen wurden. Möglicherweise interagieren ORAI, STIM1 und Vertreter der TRPC Kanäle miteinander und beeinflussen sich gegenseitig (Ambudkar et al. 2007; Lu et al. 2010; Liao et al. 2007).

Da es an gut funktionierenden Antikörpern mangelt wurde die Gewebedistribution der TRPC Isoformen bisher hauptsächlich mittels mRNA untersucht (Fowler et al. 2007; Li et al. 1999; Riccio et al. 2002). Neuere Studien verwenden Gentargeting-Strategien (z.B. über eine

Cre-Rekombinase) um Zellen, die bestimmte Proteine wie z.B. TRP Proteine exprimieren, in Reportermauslinien zu markieren (Wyatt et al. 2017). Zudem haben funktionelle Studien einen Beitrag zum Wissen über die Rolle von TRP Kanälen in Physiologie und Pathophysiologie geliefert. Darunter TRPC knockout Mäuse (Freichel et al. 2005), natürlich auftretende TRPC Mutationen in Mensch und Tier (Becker et al. 2009; Reiser et al. 2005; Winn et al. 2005) und neu entwickelte "small molecules" als Agonisten und Antagonisten (Just et al. 2018; Seo et al. 2014; Yang et al. 2015b; Zhou et al. 2018).

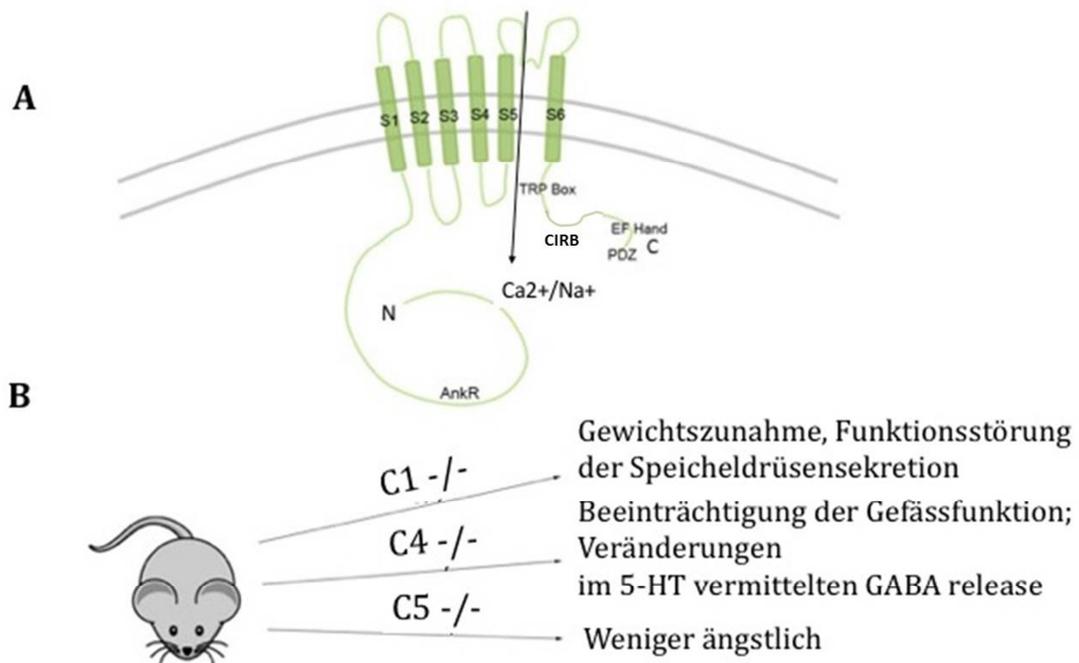


Abbildung 2-2: (A) Schematischer Aufbau eines TRPC Ionenkanals. Der Ionenkanal besteht aus 6 Transmembransegmenten (S1-S6). N-terminal befinden sich Ankyrinreste (AnkR). C-terminal befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite die TRP-Box, die Calmodulin und IP₃ Rezeptor Bindedomäne (CIRB), eine EF-Hand und die PDZ-Domäne. Die genaue Funktion der TRP-Box ist unklar, PIP₂ scheint hier zu binden. Die EF-Hand ist eine „helix-loop-helix“ Struktur, an der Kalzium binden kann. PDZ steht für postsynaptic density 95/disc-large/zona occludens und ist ein geläufiges Proteininteraktionsmotiv. **(B) Kurzübersicht zum Phänotyp von TRPC1, TRPC4 und TRPC5 Knockout Mäusen.**

2.2.1.1 Das TRPC1 Membranprotein

TRPC1 war das als erstes entdeckte Mitglied der Unterfamilie der TRPC Proteine. Erstmals beschrieben wurde der Kanal von 1996 von Zitt und Mitarbeitenden (Zitt et al 1996). Trotz der relativ frühen Entdeckung des Kanals wird immer noch debattiert, ob er selbst überhaupt homomere funktionierende Kanäle bilden kann oder nicht. TRPC1 wurde zunächst als Speicher-aktivierter oder Dehnungs-aktivierter Ionenkanal vorgeschlagen (Zitt et al. 1996; Maroto et al. 2005). Einige Arbeiten weisen darauf hin, dass TRPC1 über die Interaktion mit STIM1 und ORAI1 zum Speicher-aktivierten Ca²⁺ Einstrom beiträgt

(Ambudkar et al. 2007; Liu et al. 2007; Cheng et al. 2008). Eine Überexpression von TRPC1 hat keine messbaren Ströme zur Folge die von den Hintergrundströmen abgrenzt werden konnten (Lintschinger et al. 2000), und nur eine Hand voll Arbeiten beschreibt mögliche endogene (STIM-aktivierte) TRPC1-abhängige Ströme z.B. in Zellen aus der Speicheldrüse der Maus (Cheng et al. 2011; Ong et al. 2012).

Es gibt zunehmend Evidenzen, dass TRPC1 primär als heteromeres Interaktionspartner für andere TRPC Kanäle (Wu et al. 2010; Storch et al. 2012; Strübing et al. 2001; Beck et al. 2017), aber auch TRPP2 (Tsiokas et al. 1999), TRPV4 (Ma et al. 2010) und TRPV6 (Schindl et al. 2012) dient, und deren Eigenschaften und Aktivität moduliert. Der heteromere TRPC1/C4 Kanal weist z.B. eine geringere Permeabilität für Ca^{2+} auf als der homomere TRPC4 Kanal (Storch et al. 2012).

In hippocampalen Neuronen scheinen die heteromeren TRPC1/C4 bzw. TRPC1/C5 Kanäle am Zellkörper lokalisiert zu sein, während die homomeren TRPC4 und TRPC5 Kanäle sowohl am Zellkörper als auch in der Peripherie (Dendriten, Axone) zu finden sind (Clapham et al. 2001; Strübing et al. 2003). TRPC1 wird scheinbar über den metabotropen Glutamat Rezeptor (mGluR1) aktiviert und ist möglicherweise am erregenden postsynaptischen Potential (EPSP) beteiligt (Kim et al. 2003). TRPC1 hat ein breites Expressionsmuster und ist z.B. in Endothelzellen (Kamouchi et al. 1999; Nilius und Droogmans et al. 2001), Thrombozyten (Authi et al. 2007), glatter Muskulatur (Dietrich et al. 2006) und B-Lymphozyten (Mori et al. 2002) nachgewiesen. In TRPC1 knock-out Mäusen ist die Funktion der Speicheldrüsen sehr wahrscheinlich aufgrund verminderter Ausschüttung von Neurotransmittern herabgesetzt (Liu et al. 2007).

Aufgrund der Abwesenheit einer eindeutigen Aktivität homomerer TRPC1 Kanäle gibt es kaum Studien zur Pharmakologie von TRPC1. Maitotoxin scheint selektive TRPC1-abhängige Kationenströme in Säugerzellen und *Xenopus Oocyten* zu aktivieren, die nicht von TRPC4 abhängen (Brereton et al. 2001). HC-070 und HC-608 (Pico145) inhibieren in picomolaren Konzentrationen homomere TRPC4 und TRPC5 sowie heteromere TRPC1/C4 und TRPC1/C5 Kanäle (Rubaiy et al. 2017a; Just et al. 2018).

Zusammenfassend bleibt TRPC1 auch 24 Jahre nach seiner Entdeckung in vielen Dingen immer noch rätselhaft. Die Evidenz, dass der Kanal als Heteromerisierungs- und somit Regulationspartner für andere TRPC Kanäle dient verdichtet sich jedoch sehr.

2.2.1.2 Das TRPC4 Membranprotein

Der Selektivitätsquotient ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$) von TRPC4 beträgt etwa 1 (Montell et al. 2005). Es existieren zwei Splicevarianten des Kanals, TRPC4 beta/short und TRPC4 alpha/long (Cavalié et al. 2007). TRPC4 wird im Endothel glatter Muskulatur (Beech et al. 2005;

Tiruppathi et al. 2006) intestinalen Schrittmacherzellen (ICC) (Kim et al. 2006) in vielen Hirnregionen (Zechel et al. 2007), den Nebennieren (Philipp et al. 2000) und den Nieren (Freichel et al. 2001) exprimiert. In glatten Muskelzellen werden TRPC4 Kanäle durch muskarinische Acetylcholinrezeptoren aktiviert und sind zu 80% für den muskarinischen Rezeptor-induzierten Kationenstrom verantwortlich (mlcat) In TRPC4-/- Knock-out Mäusen konnten ein reduzierter Ca^{2+} -Einstrom und Vasorelaxation im Gefäßendothel nachgewiesen werden (Freichel et al. 2001) Auf makroskopischer Ebene zeigen die knock-out Mäuse keine Auffälligkeiten. In einer anderen Studie mit TRPC4-/- Mäusen wurde festgestellt, dass TRPC4 scheinbar an der 5-HT (5-Hydroxytryptamin bzw. Serotonin) abhängigen GABA Freisetzung in Thalamusneuronen beteiligt ist (Munsch et al. 2003).

Verschiedene Substanzen beeinflussen die Expression von TRPC4 Kanälen. EPAC (exchange factor directly activated by cAMP) bewirkt eine vermehrte Expression von TRPC3 und TRPC4 Proteinen und einen vermehrten SOCE in Kardiomyozyten bei einem insgesamt proarrhythmischen Effekt (Domínguez-Rodríguez et al. 2015) Lipopolysaccharide (LPS) und „bone morphogenic protein 4“ (BMP4) induzieren eine Proliferation von pulmonalarteriellen Muskelzellen durch die vermehrte Expression von TRPC1, TRPC6 und wahrscheinlich auch TRPC4 (Boucherat und Bonnet et al. 2015; Jiang et al. 2016; Wang et al. 2015; Zhang et al. 2014). Topotecan (TPT), ein Topoisomeraseinhibitor der in der Krebstherapie verwendet wird, zeigte eine Verbesserung der Hypoxie-induzierten pulmonalarteriellen Hypertonie durch Suppression der vermehrten Expression des „hypoxia-inducible factor 1 α “ (HIF-1 α) sowie TRPC1, C4 und C6 (Jiang et al. 2018). Inzwischen wurden diverse Modulatoren von TRPC4 beschrieben, die in Tabelle 2-1 zusammengefasst sind.

	Stimulation (EC ₅₀)	Inhibition (IC ₅₀)	Referenz
Englerin A	11.2 μ M		(Akbulut et al. 2015)
SKF 96365		10 μ M	(Zholos et al. 2000)
NO / SNAP	>300 μ M		(Yoshida et al. 2006)
[Ca ²⁺] _i (alleine nicht)	12 μ M	28 μ M	(Thakur et al. 2016)
PIP ₂ / Carbachol		7 μ M	(Otsuguro et al. 2008)
2-APB		3 μ M	(Ozaki et al. 2013)
Gd ³⁺		101nM	(Flemming et al. 2003)
HC-608 / Pico145		1.3 nM	(Rubaiy et al. 2017b)
La ³⁺	1 -100 μ M	>1 mM	(Schaefer et al. 2002)
ML204		1-3 μ M	(Miller et al. 2011)
M084		8-10 μ M	(Yang et al. 2015b)
HC-070		42.1 – 49.9 μ M	(Just et al. 2018)
A54		62nM	(Rubaiy et al. 2018a)
Tonantzilolon (TZL)	123 nM		(Rubaiy et al. 2018a)

Tabelle 2-1: Stimulierende und inhibierende Faktoren für den TRPC4 Kanal.

ML204 führte im Rattenmodell für Eingeweideschmerz (induziert durch Senföl) zu einer dosisabhängigen Schmerzreduktion ohne kardiovaskuläre- oder andere unerwünschte Arzneimittelwirkungen (Westlund et al. 2014). Zudem führte eine Mikroinjektion von ML204 in die Amygdala im Rattenmodell für neuropathischen Schmerz zu einer dosisabhängigen verminderten mechanischen Hypersensitivität des verletzten Beins und zu vermindertem Schmerzverhalten (Wei et al. 2015). Für TRPC4 und TRPC5 wurde gezeigt, dass sie eine Rolle bei Angstverhalten spielen (Riccio et al. 2009; Riccio et al. 2014). Tatsächlich führte eine intraperitoneale Einzeldosis von M084 in Mäusen zu einer antidepressiven und anxiolytischen Wirkung (Yang et al. 2015b). Auch HC-070, ein weiterer TRPC4/C5 Inhibitor, zeigte einen anxiolytischen und antidepressiven Effekt in Mäusen nach oraler Administration (Just et al. 2018). Der TRPC4/C5 Agonist (-)-Englerin A (gewonnen aus *Phyllanthus engleri*) wirkt schon im nanomolaren Konzentrationsbereich hochtoxisch auf Nierenzellkarzinomzellen (Akbulut et al. 2015). Neuerdings wird davon ausgegangen, dass die Zytotoxizität von Englerin A auf einem vermehrten Natriumeinstrom durch heteromere TRPC1/C4 Kanäle basiert (Ludlow et al. 2017). Tonantzitlon (TZL) aus *Euphorbiaceae* zeigt ähnlich wie Englerin A eine Zytotoxizität auf bestimmte Krebszellen einschliesslich Nierenzellkarzinomzellen, wobei auch hier die Aktivierung von TRPC4 bzw. TRPC1/C4 im Vordergrund steht (Rubaiy et al. 2018b).

Einzigartig für TRPC4 und TRPC5 ist das Vorhandensein einer extrazellulären Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen, die fünf Aminosäuren entfernt vom Linker zwischen S5 und der Porenhelix des gleichen Protomers lokalisiert sind, sowie eine intrazelluläre Kationenbindestelle (am ehesten für Natriumionen) die von zwei Resten (E417, Q420 in TRPC4; E418, E421 in TRPC5) in S2 und zwei weiteren Resten (N435, D438 in TRPC4; N436, D439 in TRPC5) in S3 gebildet wird (die angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf die TRPC4 bzw. TRPC5 Sequenz der Maus). Die Disulfidbrücke scheint wichtig für die Redox-Wahrnehmung von TRPC4 und TRPC5 zu sein, die funktionelle Signifikanz der Kationenbindestelle ist noch unklar. Interessanterweise zeigen TRPC4 und TRPC5 in elektrophysiologischen Experimenten grössere Einwärtsströme wenn die Zellen in Cs⁺-haltiger Badlösung gehalten wurden, statt in Na⁺-haltiger Lösung (Sung et al. 2011). Diese Tatsache wurde verwendet konstitutive Kanalaktivität zu messen, die mittels der normalen Na⁺-haltigen physiologischen Elektrolytlösung nicht detektiert werden kann (Jeon et al. 2012; Jeon et al. 2016). Möglicherweise bewirkt die Natriumbindestelle also eine Inhibierung von TRPC4/C5 durch intrazelluläres Natrium.

2.2.1.3 Das TRPC5 Membranprotein

TRPC5 wird vor allem im zentralen Nervensystem (Hippocampus, Cerebellum, Amygdala, sensorischen Neuronen und Retina) exprimiert (Hofmann et al. 2000; Zholos 2014). *In vitro*

und im ZNS kann TRPC5 mit TRPC1 heteromerisieren. Diese heteromere Kanäle spielen womöglich eine wichtige Rolle für die Hirnentwicklung (Strübing et al. 2001). In Neuronen wird TRPC5 in Vesikeln zum Ende des Axons transportiert, welche neben TRPC5 auch Synaptogamin und Stathmin-2 enthalten (Greka et al. 2003). Synaptogamine steuern als Ca^{2+} Sensoren die Freisetzung von Neurotransmittern. Stathmin-2 reguliert die Mikrotubulifunktion. TRPC5 ist außerdem am Arbeitsgedächtnis beteiligt (Zhang et al. 2011). Anhand einer TRPC5(-/-) Knock-out Maus konnte gezeigt werden, dass TRPC5 wichtig für die Funktion der Amygdala ist. Die Knock-out Mäuse zeigten signifikant weniger ängstliches Verhalten (Ricchio et al. 2009). Die vesikuläre, subzelluläre Lokalisation von TRPC5 wird über EGF-RKT, eine Rezeptor-Tyrosinkinase, gesteuert (Bezzarides et al. 2004). Dieser Prozess spielt eine Rolle in der Regulation der Länge von hippocampalen Neuronen und ihrer Morphologie (Zhang et al. 2011).

TRPC5 scheint wichtig für die Pathogenese von Nierenerkrankungen, inklusive der Fokalen Segmentalen Glomerulosklerose zu sein (FSGS; (Schaldecker et al. 2013; Zhou et al. 2017)). Es wird diskutiert, ob TRPC5 und TRPC6 sich bei der Entwicklung des Aktin-Zytoskeletts und somit der Podozytenkontraktilität via Rac1 und RhoA antagonisieren (Greka und Mundel et al. 2011). Allerdings wird in diesem Zusammenhang die Rolle von TRPC5 in der Nierenfunktion neu diskutiert, da in einer TRPC5 gain-of-function Maus keine Proteinurie, die typisch für eine FSGS ist, festgestellt werden konnte (Wang et al. 2018).

TRPC5 zeichnet sich durch einen besonderen Aktivierungs/Deaktivierungs Zyklus aus. Dabei ändert sich die Stromspannungskurve des Kanals je nach Phase des Zyklus (Obukhov und Nowycky et al. 2008). Der Phasenübergang kann durch La^{3+} modifiziert werden. Der Selektivitätsquotient (P_{Ca}/P_{Na}) von TRPC5 beträgt etwa 9 (Montell et al. 2005).

Zu den Studien und Effekten der gemeinsamen TRPC4/C5 Inhibitoren ML204 und HC-070 bzw. des gemeinsamen Aktivators (-)-Englerin A siehe 2.2.1.2 (TRPC4).

Bei einem Versuch die molekularen Targets von Ingwerextrakt zu erkunden (bekannt aus der Naturmedizin für seinen antioxidativen Effekt) wurde entdeckt, dass TRPC5 durch das Extrakt und eines seiner Bestandteile ((6)-Shogaol) inhibiert wird (Kim et al. 2016). Da TRPC5 Kanäle dafür bekannt sind, dass sie durch Oxidanzien (ROS) und NO in CNS Neuronen aktiviert werden können wird der antioxidative Effekt von Ingwerextrakt möglicherweise zumindest partiell durch TRPC5 bewirkt. Diese Tatsache liesse sich möglicherweise in der Behandlung von neurologischen Erkrankungen nutzen (Kim et al. 2016). Tabelle 2-2 zeigt pharmakologische Stimulatoren und Inhibitoren von TRPC5.

Einzigartig für TRPC4 und TRPC5 ist das Vorhandensein einer extrazellulären Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen, die fünf Aminosäuren entfernt vom Linker zwischen S5 und der Porenhelix des gleichen Protomers lokalisiert sind, sowie eine intrazelluläre Kationenbindestelle (siehe oben: Abschnitt 2.2.1.2).

	Stimulation (EC ₅₀)	Inhibition (IC ₅₀)	Referenz
Englerin A	7.6 nM		(Akbulut et al. 2015)
La ³⁺	1 – 100 µM	>1 mM	(Jung et al. 2003)
SKF 96365		30 µM	(Wang et al. 2007)
NO / H ₂ O ₂	100 – 1000 µM		(Yoshida et al. 2006)
[Ca ²⁺] _i	> 1 µM		(Blair et al. 2009)
Thioredoxin	0.20 µg.ml ⁻¹		(Xu et al. 2008)
2-APB		3 µM	(Ozaki et al. 2013)
Riluzol	9.2 µM		(Richter et al. 2014)
HC-608 / Pico145		1.3 nM	(Rubaiy et al. 2017a)
La ³⁺ (boost wenn aktiviert)	100 µM	3 µM	(Schaefer et al. 2000)
ML204		<10 µM	(Miller et al. 2011)
M084		8.2 µM	(Zhu et al. 2015)
HC-070		9.3 µM	(Just et al. 2018)
((6)-Shogaol)/ Ingwer		18 µM	(Kim et al. 2016)
Galangin		0.45 µM	(Naylor et al. 2016)
Kaempferol und Quercetin		3.9/ 6.5 µM	(Naylor et al. 2016)
Apigenin	10 µM		(Naylor et al. 2016)
AM12	(X)	0.28 µM	(Naylor et al. 2016)

Tabelle 2-2: Stimulierende und inhibierende Faktoren für den TRPC5 Kanal.

2.2.2 TRP assoziierte Erkrankungen

TRP-Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der Signalverarbeitung des Organismus. Diese Signalverarbeitung ist dabei eng mit der intrazellulären bzw. intrakompartimentären Kalziumkonzentration verwoben. Seit der Entdeckung des ersten TRP Kanals sind zahlreiche Krankheiten identifiziert worden, die auf einer Mutation in TRP-Genen beruhen. Diese Mutationen sind nicht nur deswegen von großem Interesse, weil sie einen einmaligen Einblick in die physiologischen Funktionen der Kanäle bieten, sondern auch weil sich dadurch neue therapeutische Optionen ergeben können. Im Folgenden wird eine Auswahl wichtiger TRP-assoziierter Erkrankungen dargestellt.

2.2.2.1 TRPC-assozierte Kanalerkrankungen

Zwar sind Mutationen in den TRP Kanälen mit den verschiedensten Fehlfunktionen im Organismus assoziiert, dennoch wurden bisher nur zwei Kanalerkrankung bei den TRPC Kanälen beschrieben.

Ein Beispiel ist die fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS). Sie beruht unter anderem auf verschiedenen Mutationen im TRPC6 Gen die i.d.R. zu einer gain-of-function des TRPC6 Kanals führen (Reiser et al. 2005; Winn et al. 2005; Möller et al. 2007; Krall et al. 2010; Hofstra et al. 2013). FSGS kann aber auch auf einer „loss-of-function“ von TRPC6

beruhen (Riehle et al. 2016). TRPC6 wird vor allem in den Podozyten der Niere exprimiert. Durch die Mutation kommt es zu einer Fehlfunktion der Podocyten und deren Fortsätzen, zum Beispiel durch einen Ca^{2+} induzierten Zelltod. Die Podozyten sind essentieller Bestandteil des Molekularsiebs für die glomeruläre Filtration. Die Zerstörung dieses Filters resultiert in einer Proteinurie und einem fortschreitenden Funktionsverlust der Niere.

Bei einer anderen TRPC-assoziierten Kanalerkrankung handelt es sich um die T635A Mutation im TRPC3 Gen (Becker et al. 2009). Aus ihr resultiert eine abnorme Entwicklung von Purkinjezellen im zerebellaren Cortex. Bei Mäusen führt sie zu einem als „Moonwalker“ bezeichneten Phänotyp, der sich durch einen ataktischen Gang manifestiert. Eine vermehrte Aktivität des Kanals, vermehrter Ca^{2+} -Einstrom und die Degeneration der Purkinjezellen im zerebellaren Cortex sind die Folge der Mutation. TRPC3 scheint auch eine Rolle in der Pathogenese der Myasthenia Gravis zu spielen. Die Krankheit ist durch eine Autoantikörperbildung gegen postsynaptische Acetylcholinrezeptoren gekennzeichnet, die in einer progredienten Muskelschwäche bei repetitiven Bewegungen resultiert. Es wurden aber auch Antikörper gegen TRPC3 gefunden (Takamori et al. 2008).

Daneben konnte für die Mutation I957V in TRPC4, die zu einer gain-of-function führt, ein reduziertes Risiko für Myokardinfarkte nachgewiesen werden (Jung et al. 2011). Es wird vermutet, dass $\text{TRPC4}_{\text{I957V}}$ leichter zugänglich für Tyrosinkinasen ist und eine Phosphorylierung die Insertion des Kanals in die Plasmamembran erhöht. Natürlich vorkommende Mutationen in TRPC Kanälen sind in (Liu et al. 2020) zur Übersicht zusammengefasst.

2.2.2.2 Andere TRP-assoziierte Erkrankungen

Die bekannten Kanalerkrankungen in der Unterfamilie der TRPV Kanäle sind z.B. die skelettalen Dysplasien, hervorgerufen durch Mutationen im TRPV4 Gen. TRPV4 wird unter anderem im Knochen und den Knorpelzellen exprimiert. Autosomal dominante Mutationen im TRPV4 Gen (R616Q und V620I in TM 5 - (Rock et al. 2008); R594H in TM4 - (Krakow et al. 2009)) sind mit sogenannten Brachyolmien assoziiert. Diese sind eine heterogene Gruppe skelettaler Dysplasien, die primär die Wirbelsäule betreffen und durch eine Skoliose, eine kleine Statur und einen relativ gesehen kleinen Oberkörper gekennzeichnet sind. Auch die Charcot-Marie-Tooth Krankheit Typ 2C beruht auf einer Mutation im TRPV4 Gen (R269C und R269H; (Landouré et al. 2010)). All diese Mutationen resultieren in einer gain-of-function des TRPV4 Kanals.

In TRPV3 wurde ebenfalls eine gain-of-function Mutation (G573S im S4-S5 Linker) identifiziert, die verantwortlich für einen haarlosen Phänotyp sowie Dermatitis bei Nagetieren ist ((Asakawa et al. 2006); (Xiao et al. 2008)). Bei histopathologischen Untersuchungen konnten Asakawa et al. in den betroffenen Ratten vermehrt Mastzellen im Gewebe

feststellen. Diese spielen eine wichtige Rolle im Entwicklungszyklus der Haare. Die gleiche Mutation führt beim Menschen zum sogenannten Olmstedt Syndrom mit palmoplantaren und periorifizierten Keratosen (Lin et al. 2012; Lai-Cheong et al. 2012).

In TRPV6 führen loss-of-function Mutationen zu skelettalen Dysplasien mit neonatalem Hyperparathyreodismus und zu einer Prädisposition zu einer chronischen Pankreatitis (Oracz et al. 2021).

Eine GOF Mutation (N855S) in Transmembrandomäne 4 von TRPA1 ist assoziiert mit dem familiären episodischen Schmerzsyndrom (Kremeyer et al. 2010).

Für 14 Mutationen im TRPM1 Kanal wurde gezeigt, dass sie zur sogenannten autosomal rezessiven kongenitalen stationären Nachtblindheit führen (Audo et al. 2009). Die TRPM2 P1018L Mutation wurde bei einem Teil von Patienten mit amyotropher Lateralsklerose und Parkinson Demenz (Guam-ALS, Guam-PD) nachgewiesen (Hermosura et al. 2008). Gain-of-function Mutationen in TRPM3 sind möglicherweise an epileptischer Aktivität beteiligt (van Hoeymissen et al. 2020). Mutationen in TRPM6 sind mit der sogenannten Hypomagnesinämie mit sekundärer Hypocalcämia (HSH) assoziiert (Schlingmann et al. 2005) und Mutationen in TRPM4 wurden beim autosomal dominanten progressiven familiären Herzblock Typ 1 (Kruse et al. 2009) bzw. bei progressiver symmetrischer Erythrodermie gezeigt (Wang et al. 2019).

Die sogenannte Va Mutation A419P im TRPML3 Kanal führt im Mausmodell zu einer Dysfunktion des vestibulären Systems, Taubheit und Veränderungen der Fellfarbe. Die Va Mutation befindet sich in der Transmembrandomäne 5 und führt zu einem konstitutiv offenen TRPML3 Kanal, vermehrtem Ca^{2+} -Einstrom und Zelltod (Cuajungco und Samie et al. 2008). Mutationen in TRML1 führen zur Mucopolidose Typ IV (MLIV), einer autosomal rezessiven neurodegenerativen Speicherkrankheit (Slaugenhaupt 2002).

Mutationen im TRPP2 Kanal führen zur autosomal dominanten polycystischen Nierenerkrankung (ADPKD) (Harris und Torres et al. 2009). Sie ist mit einer Inzidenz von 1:400 – 1:1000 eine der häufigsten monogenetisch vererbten Krankheiten. Die Krankheit geht mit einer progressiven Entwicklung von Nierenzysten einher. Ca. 50% der Patienten entwickeln eine chronische Niereninsuffizienz.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass TRP Kanäle in den verschiedensten Organsystemen vorkommen. Sie haben wichtige physiologische Funktionen in den unterschiedlichsten Geweben und stehen im Zentrum der verschiedenen komplexen Systeme. Besonders interessant sind einzelne Punktmutationen, die zu gravierenden Krankheitsbildern führen, denn diese können einerseits neue Erkenntnisse zur physiologischen Rolle des Kanals, andererseits aber auch neue Informationen über die Struktur und Funktion des Proteins liefern.

2.2.3 Gain-of function Mutationen im S4-S5 Segment von TRP Kanälen

Zahlreiche Mutationen sind bekannt, die zu offenen TRP Kanälen bzw. einer gain-of-function führen. Viele dieser Mutationen wurden im S4-S5 Linker von TRP Proteinen identifiziert. Dazu zählen *Drosophila* TRP F550I (Hong et al. 2002), Hefe Yvc1 F380L (Su et al. 2007b), diverse TRPV4 Mutationen beim Menschen, z.B. R594H, R616Q und V620I (Krakow et al. 2009; Rock et al. 2008), die TRPC3 T635A Mutation in der Maus (Becker et al. 2009) und die TRPV3 G573S und G573C Mutationen bei Mensch, Maus und Ratte (Asakawa et al. 2006; Lai-Cheong et al. 2012) (siehe oben).

Die GOF Mutation F550I des dTRP Proteins führt zu konstitutiv aktiven Kanälen und einer Degeneration der Sehzellen von *Drosophila* (Hong et al. 2002). Die F380L GOF Mutation des Yvc1 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* befindet sich genau wie die dTRP F550I Mutation auf der zytoplasmatischen Seite der fünften Transmembrandomäne (TM5) in einem über verschiedene TRP Subfamilien konservierten Cluster von Phenylalaninresten, die auch im entfernt verwandten Spannungs-aktivierten Shaker K⁺ Kanal zu finden sind (Su et al. 2007a). Die F380L Mutation in Yvc1 liegt exakt dort, wo auch die F550I Mutation im *Drosophila* TRP lokalisiert ist. Beide Mutationen wurden unabhängig voneinander bei großen Phänotypenscreenings identifiziert: Die Phototaxis der Fliege (Yoon et al. 2000) und die Antwort der Hefe auf den osmotischen Schock (Su et al. 2007b) stellen die jeweils betroffenen physiologischen Funktionen dar. Hieran ist erkennbar, dass die gain-of-function Mutationen nicht nur einen Einblick in den Zusammenhang von Struktur und Funktion einzelner Kanäle gewinnen lassen, sondern dass sie auch die Möglichkeit eröffnen, Funktionsprinzipien zu verstehen und zu verallgemeinern, die über verschiedene TRP Subfamilien hinaus Gültigkeit besitzen.

Auch beim Menschen konnten verschiedene Phänotypen bzw. Krankheiten auf gain-of-function Mutationen von TRP Kanälen zurückgeführt werden. Ein Beispiel ist die autosomal dominante Brachyolmie (siehe oben), bei der die Mutationen R594H, R616Q und die V620I des im Knorpel dominant exprimierten TRPV4 identifiziert wurden (Rock et al. 2008). Die R594H Mutation befindet sich in Transmembrandomäne 4 während die beiden anderen Mutationen in Transmembrandomäne 5 zu finden sind. Auffällig ist die räumliche Nähe der identifizierten GOF Mutationen zum S4-S5 Linker des Kanals. Diese Region des Proteins scheint also eine kritische Rolle in dessen funktioneller Regulation zu spielen. Ein anderes Beispiel für eine solche Mutation ist die T635A Mutation im TRPC3 Gen von Mäusen (Becker et al. 2009). Aus ihr resultiert eine abnorme Entwicklung von Purkinjezellen im zerebellaren Cortex (siehe oben). Threonin 635 dient dem TRPC3 Kanal als Phosphorylierungsstelle. Eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C γ (PKC γ) bewirkt hier normalerweise eine Inhibition der Kanalfunktion, bei Vorliegen der T635A Mutation wird der Kanal also enthemmt. Eine vermehrte Aktivität des Kanals, vermehrter Ca²⁺-Einstrom und die Degeneration der

Purkinjezellen im zerebellaren Cortex sind die Folge (Becker et al. 2009). Auch die in TRPV3 identifizierten gain-of-function Mutationen G573S und G573C, die in Nagetieren für den haarlosen Phänotyp sowie Dermatitis (Asakawa et al. 2006; Xiao et al. 2008) und bei Menschen zum Olmstedt-Syndrom führen (Lin et al. 2012; Lai-Cheong et al. 2012) befinden sich mitten im S4-S5 Linker. Weitere Mutationen von TRP Kanälen im S4-S5 Linker sind in (Hofmann et al. 2017b) zusammengefasst.

2.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

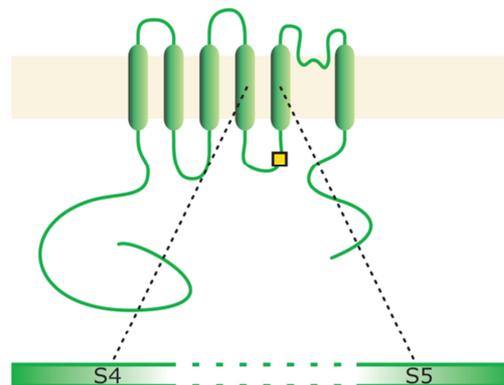
Wie für viele TRP Kanäle sind auch für TRPC1, TRPC4 und TRPC5 pharmakologische Werkzeuge zur Untersuchung und Charakterisierung ihre Eigenschaften und Funktionen nur begrenzt verfügbar. Es liegen aktuell keine wirklich spezifischen Aktivatoren und Inhibitoren für die einzelnen oben besprochenen TRPC Kanäle vor. Mittlerweile sind zwar einige Agonisten und Antagonisten für TRPC4 und TRPC5 verfügbar, diese diskriminieren jedoch nicht zwischen TRPC4 und TRPC5, wodurch das Studium der Kanäle erschwert wird.

Die Koinzidenz der beiden gain-of-function Phänotypen in der Hefe (F550I) und in Drosophila (F380L) lässt vermuten, dass das in TRP Proteinen evolutionär konservierte Phenylalanincluster im S4-S5 Linker benötigt wird, um die geschlossene Formation zu stabilisieren. Auch die weiteren gain-of-function Mutationen im S4-S5 Linker von TRPC3, TRPV3 und TRPV4 weisen darauf hin, dass dieser Proteinstruktur eine wichtige Rolle bei der Aktivierung bzw. Inaktivierung des Ionenkanals zukommt.

Im Vergleich der S4-S5 Linker verschiedener TRP Proteine fällt ein evolutionär stark konserviertes Glyzin auf (Abb. 2-3). Die GOF G573S und G573C Mutationen in TRPV3 betreffen dieses Glyzin. Durch Substitution dieses Glyzin durch ein Serin oder ein Cystein erhält das Molekül an dieser Position eine neue polare Aminosäure. Dies könnte durch Änderung der Bindungsverhältnisse zu einer Struktur- und Funktionsänderung des Moleküls und somit zur gain-of-function führen, was ein genereller Mechanismus in der Familie der TRP Kanäle sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit sollte die zu TRPV3 korrespondierende Punktmutation G zu S bzw. G zu C im Linker zwischen Transmembrandomäne 4 und 5 (S4/S5 Linker), die zu einer konstitutiven Aktivität (gain-of-function) des TRPV3 Kanals führt, in die cDNA der verwandten TRPC1, TRPC4 und TRPC5 Kanäle eingefügt und untersucht werden ob auch diese konstitutiv aktiv werden. Das entsprechende Glyzin ist hoch konserviert innerhalb der TRP Familie. Im Falle einer konstitutiven Aktivität der entsprechenden TRPC1, TPC4 und TRPC5 G zu S bzw. G zu C Mutanten bieten die fertig klonierten Mutanten die Möglichkeit zu weiterführenden Experimenten (z.B. einer knock-in Maus) um die physiologische Rolle der Proteine besser zu verstehen. Speziell für TRPC1 sollte dabei ein Beitrag zur Diskussion, ob

der Kanal sich in der Zellmembran befindet und ob er prinzipiell dazu in der Lage ist als Homomer funktionelle Kanäle zu bilden, geleistet werden.



Yvc1	YLESQRFI	GIMLVILK-HMMKESIVFF	FLL
dTRP	IFSINPHL	GPLQVSLG-RMIIDI	KFFIY
TRPV4	FT	RGLKLTGTYSIMIQILFKDL	FRLLVY
TRPV3	YTRGFQSM	GMYSVMIQKVLHDV	LKFLFVY
TRPC3	ILPANESFG	PLQISLG-RTVKDIF	KFMVLF
TRPC1	MYTTSSIL	GPLQISMG-QMLQDF	GKFLGMF
TRPC4	LFTANSHL	GPLQISLG-RMLLDIL	KFLFIY
TRPC5	LFTANSHL	GPLQISLG-RMLLDIL	KFLFIY

Abbildung 2-3: S4-S5 Linker Alignment. Die Transmembrantopologie von einem TRP Kanalprotein mit den Transmembranhelices S1 bis S6, intrazellulärem N- und C-terminus und dem Alignment von: Hefe Yvc1 (Accession Number NP_014730), Drosophila (d)TRP (NP_476768.1), hTRPV4 (NP_067638.3), mTRPV3 (NP_659567), mTRPC3 (NP_062383), mTRPC4 (NM_016984.3) und mTRPC5 (NM_009428.2). Die mit rot markierten Mutationen führen zu konstitutiv aktiven Kanälen. Die konservierten Glyzine sind gelb hinterlegt. Das Alignment wurde mit dem MUSCLE- und die Vorhersage der Transmembranhelices mit dem TMHMM Algorithmus berechnet (aus Beck et al., 2013).

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte, Kits, Software und Materialien sind in Tabellen 3-1 bis 3-4 gelistet.

3.1.1 Geräte

Ca ²⁺ Imaging Polychrome V CCD Kamera Fluoreszenzmikroskop Objektiv	TILL Photonics ANDOR iXON 885 (ANDOR Technology) Axiovert 200M (Zeiss) 20x Plan Neofluar (Zeiss)
Durchflusszytometer	Guava EasyCyte 8HT
Dispergiergerät	Polytron PT1200 (Kinematica)
DNA-Sequenziergeräte	ABI Prism 310 Sequenzer (Applied Biosystems) LI-COR DNA-Sequenzer 4200 (LI-COR Inc.)
Geldokumentationssystem	Herolab E.A.S.Y Win32
Gelelektrophorese- Apparaturen	Eigenbau (Martin Simon-Thomas)
Pipetten	Pipetman (Gilson)
Photometer	Gene quant II (Pharmacia Biotech)
Reinstwassersystem	Reinstwassersystem Clear plus (SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation)
Rührer	Heidolph MR3002
Thermocycler	ABI 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)
UV-Tisch	Transilluminator 4000 (Stratagene)
Schüttelinkubator	Scientific Series 25 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)
Zentrifugen	Tischzentrifuge Heraeus pico; J2-HS Zentrifuge (Beckman); 96-Well Plattenzentrifuge 4-15c (Sigma)

Tabelle 3-1: Die verwendeten Geräte

3.1.2 Kits

QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Quiagen)
Thermosequenzase Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech)
QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, LA Jolla, CA)
Guava Viacount

Tabelle 3-2: Die verwendeten Kits

3.1.3 Software

Abbildungen	Microsoft Power Point for Mac 2011; IGOR PRO; FlowJO; XPlasMap
DNA- Sequenzierung	310 Data Collection Software (Applied Biosystems) Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems) Accelrys Gene (Accelrys Software Inc.)
Ca ²⁺ Imaging	TILLvisION (TILL Photonics)
Durchflusszytometrie	Guava InCyte
Literaturrecherche	PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
Referenzmangment	Endnote X6
Textverarbeitung	Microsoft Word for Mac 2011
Kalziumkonzentration	WebmaxcS (https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/webmaxc/webmaxcS.htm)

Tabelle 3-3: Die verwendete Software

3.1.4 Materialien

Dialyseschläuche	Dialysis Tubing MWCO 12000 (Sigma)
PCR- Spritzen	Filter Tip FT 20,200,1000 (Greiner Bio One)
96- Well Platten	Greiner
Petrischalen	94 x 16 mm (Greiner Bio One)
Sterile Einmalgefäße	Falcon (BD Biosciences)
Sterile Einmalpipetten	Serological pipettes (Sarstedt)
Fura	Fura-2AM (TefLabs)
Zellfärbung	Guava ViaCount Reagent

Tabelle 3-4: Die verwendeten Materialien

3.1.5 Feinchemikalien

Alle verwendeten Salze und Chemikalien hatten einen analytischen Reinheitsgrad und wurden von den Firmen Sigma bzw. Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Es wurde weiterhin 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB; Sigma-Aldrich), SKF96365 (Sigma-Aldrich) und Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA; Sigma-Aldrich) verwendet.

3.1.6 H₂O_{steril}

Für die Ca²⁺ Imaging Experimente wurde entionisiertes Wasser (Milli-Q, Merck Millipore) verwendet. Ansonsten wurde, falls nicht anders angegeben, steriles, durch ein Reinstwassersystem (Clear plus) de-ionisiertes H₂O verwendet. Dieses wurde jeweils für 20 min bei 2.1 bar und 121°C dampfsterilisiert.

3.1.7 Puffer und Lösungen

Lysozymbilösung	10% (w/v) Lysozym. Die Lysozymbilösung wurde vor jeder Verwendung frisch angesetzt und auf Eis gelagert.
PBS-Puffer (pH 7.4)	138 mM NaCl, 8.09 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2.68 mM KCl, 1.46 mM KH ₂ PO ₄
B1-Puffer (Klonierung) (pH 7.2)	115 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 5 mM KCl, 10 mM HEPES
PCR-Reaktions-Puffer (Taq-Puffer 10x):	500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 100 mM Tris-HCl. Der Puffer wurde in 1.5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.
TBE-Puffer (1x, pH 8.0)	89 mM TRIS Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA-Na ₂
TSS-Puffer	1x LB-Medium pH 6.5, 10% PEG 8000, 5% DMSO, 30 mM MgCl ₂

Tabelle 3-5: Die verwendeten Puffer und Lösungen

3.1.8 Enzyme

Alle Enzyme wurden von New England Biolabs bezogen: Antartic Phosphatase, ApaI, BamHI, BclI, DpnI, EcoRV, BspDI, HindIII, MfeI, NheI, Phusion High-Fidelity-Polymerase, PvuI, SmaI, SstI, T4-DNA-Ligase, Taq Polymerase, XhoI, XmaI, XmnI.

3.1.9 Agarosegel

Für die Herstellung des 2% Agarosegels wurden 4 g Agarose in 200 ml TBE-Puffer verrührt und in einem Mikrowellengerät 2 Minuten bei voller Leistung aufgeköcht. Entsprechend wurde zur Herstellung des 0.8% Agarosegels 1.6 g Agarose in 200 ml TBE-Puffer aufgelöst und geköcht.

3.1.10 Primer

Name	5' Sequenz 3'	Primärer Verwendungszweck
UW987	tgcccactgcagatttcaatg	Mutagenese mTRPC1 (G->C)
UW988	agcccactgcagatttcaatg	Mutagenese mTRPC1 (G->S)
UW989	caaaatagagctggtgtatac	Mutagenese mTRPC1
UW990	tgccctctgcagatctcttgg	Mutagenese mTRPC5 (G->S)
UW991	agccctctgcagatctcttgg	Mutagenese mTRPC5 (G->C)
UW992	taaatgggagttggctgtgaac	Mutagenese mTRPC5
UW994	ctacctggcaactatttcc	Sequenzierung mTRPC5
UW995	aagtaaagctggttcagtcc	Sequenzierung mTRPC5
UW996	ccgccgccaccatggcacagctgtactacaag	mTRPC5 Blut Klonierung Forward (+Koz) ¹
UW997	ttagagccgagttgtaacttg	mTRPC5 Blut Klonierung Reverse
UW998	ctggccaagctgaaggtgg	Sequenzierung mTRPC5
UW999	gaacgtcatgctgacagcc	Sequenzierung mTRPC5

UW1000	ccgccgccaccatgggggccccgcctcc	mTRPC1 Blunt Klonierung Forward (+Koz) ¹
UW1001	ttaattcttgataaaacatagc	mTRPC1 Blunt Klonierung Reverse
UW1002	gtttcatgactttgctgacc	Sequenzierung mTRPC1
UW1003	cagtccttctgctcttgg	Sequenzierung mTRPC1
UW1004	gaatgattatgaagagctagc	Sequenzierung mTRPC1
TS01	tagaaggcacagtcgagg	Sequenzierung in pcDNA5 FRT/TO Reverse
TS02	atttcttgataaaacatagcatatttag	Sequenzierung in pcDNA5 FRT/TO Forward

Tabelle 3-6: Die verwendeten Primer und deren Verwendungszweck. Das Präfix „m“ steht für Maus. (1) Koz steht für die Kozak- Sequenz GCCGCCACC. Die Kozak-Sequenz oder eine ähnliche Nukleinbasenfolge wird von den Ribosomen erkannt und ist für den Start der Translation im Rahmen der Proteinbiosynthese von Bedeutung.

3.1.11 Plasmide

Ein Plasmid ist ein zirkuläres DNA-Molekül. Da Plasmide unter bestimmten Bedingungen von Zellen aufgenommen werden können, werden sie in der Molekularbiologie verwendet, um genetische Informationen in die Zielzellen einzuschleusen. Die Zelle exprimiert daraufhin das gewünschte Protein. Für die vorliegende Arbeit wurden die Plasmide pBluescript II Phagemid KS-, pcDNA3 (Invitogene), pCAGGS-IRES-GFP (Warnat et al. 1999) und pcDNA5-FRT/TO (Invitogene) verwendet (Tabelle 3-7). Die genetische Information für die untersuchten Kanalproteine wurde jeweils mittels Restriktionsendonukleasen in die „Multiple Cloning Site“ (MCS) der oben genannten Plasmide eingefügt. Die so neu entstandenen Konstrukte machen es möglich, verschiedene funktionelle Untersuchungen an den Ionenkanälen durchzuführen.

Plasmid	Eigenschaften (Auswahl)	Verwendungszweck
pBluescript II Phagemid KS-	Multiple Cloning Site, T7 und T3 RNA Polymerase Promotoren, β -Galactosidase Sequenz (lacZ'), Ampicillin Resistenz	Ausgangsplasmid, Klonierung, Sequenzierung
pcDNA3	Multiple Cloning Site, CMV Promotor, Neomycin Resistenz, Episomale Replikation in SV40 infizierten Zellen	Stabile Zelllinien*
pCAGGS (-IRES-GFP)	CMV-IE Enhancer, Chicken β -actin Promotor, IRES, GFP	Ca ²⁺ Imaging, Patch- Clamp*
pcDNA5 -FRT/TO	Multiple Cloning Site, Flp-in T-Rex System, Hybrid CMV/TetO2 Promotor, FLP Recombination Target (FRT), Hygromycin Resistenz	Stabile Zelllinien*

Tabelle 3-7: Die verwendeten Plasmide und deren Verwendungszweck. Die mit * markierten Versuche wurden nicht vom Doktoranden selbst durchgeführt (Personen siehe jeweilige Abschnitte).

3.1.12 Bakterienstamm

Es wurde der E. Coli Bakterienstamm XL 1-Blue (Stratagene, La Jolla, USA) zur Mutagenese und (Sub-)Klonierung verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Folgende Methoden wurden wie in (Green et al. 2012) beschrieben durchgeführt:

- Präzipitation von Nukleinsäuren
- Elektrophoretische Auftrennung in Polyacrylamid- und Agarosegelen
- Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen
- Dephosphorylierung geschnittener Plasmid-Vektoren
- Ligation von DNA- und cDNA-Fragmenten in Vektoren
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.2.1.1 Mutagenese

Zur Mutagenese wurde eine modifizierte Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Bei einer gewöhnlichen PCR wird zunächst die doppelsträngige Template-DNA denaturiert, sodass die DNA in Form von zwei Einzelsträngen vorliegt. Daraufhin wird durch eine Temperaturänderung die Anlagerung von zwei kurzen Oligonukleotiden, sogenannten Primern, ermöglicht. Im nächsten Schritt synthetisiert die DNA-Polymerase den jeweils komplementären DNA-Strang. Die Polymerase benötigt zur Elongation eine freie 3'OH Gruppe. Diese wird durch den Primer zur Verfügung gestellt. Gleichzeitig wird hierbei die Richtung der Elongation vorgegeben. Nach erfolgter Elongation ist ein Zyklus abgeschlossen. Es erfolgt die abermalige Denaturierung.

Im Regelfall werden 20-30 Zyklen durchgeführt. Nach jedem Zyklus verdoppelt sich theoretisch die DNA-Menge. Tatsächlich liegt der Multiplikationsfaktor bei ca. 1.6 bis 1.7. Am Ende ergibt sich eine Multiplikation der DNA-Menge um den Faktor 10^5 - 10^9 . Im Unterschied zur klassischen Variante ist bei einer Mutagenese einer der beiden Primer nicht vollständig komplementär zur Templatesequenz. An seinem 5' Ende wurden die Basen gezielt so verändert, dass er die gewünschte Mutation enthält. Der übrige, überwiegende Anteil des Oligonukleotids ist zum Template komplementär, sodass eine Hybridisierung erfolgen kann. Nach dem ersten PCR Zyklus entstehen zwei Produkte, wovon ein Produkt die gewünschte Mutation trägt. Die Basensequenz des Anderen ist identisch mit der des Templates. Im darauffolgenden Zyklus enthalten bereits alle neu entstandenen Produkte die gewünschte Mutation.

Zunächst wurden Strang- und Gegenstrangprimer designed. In der Tabelle 3-6 sind die Sequenzen der verwendeten Primer dargestellt. Tabelle 3-8 zeigt die für das jeweilige Konstrukt verwendete Primerkonstellation. Jeweils ein Primer trägt die gewünschte Mutation am 5'-Ende, der Andere beginnt unmittelbar daneben und hat die entgegengesetzte Leserichtung.

Konstrukt	Mutation	Primer 1	Primer 2
mTRPC1	G506S	UW988	UW989
mTRPC1	G506C	UW987	UW989
mTRPC5	G504S	UW990	UW992
mTRPC5	G504C	UW991	UW992

Tabelle 3-8: Primerkonstellation zur Mutagenese

Ein Problem stellt die Fehlerrate der gängigen Polymerasen dar. Deswegen wurde die Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet. Das Enzym besteht aus einer Pyrococcus furiosus DNA- Polymerase und einer Domäne, welche die Genauigkeit sowie die Geschwindigkeit der Polymerase verbessert. Die Fehlerrate der Phusion® Polymerase ist etwa 50-mal niedriger als die der klassischerweise verwendeten Taq-Polymerase.

Die PCR-Ansätze wurden nach dem in Tabelle 3-9 dargestellten Schema pipettiert. Die Polymerase-Kettenreaktionen wurde mit dem Cyler ABI 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Temperaturen und Zykluslängen werden in Tabelle 3-10 gezeigt. Es wurden jeweils 25 Zyklen durchgeführt. Um Fehlhybridisierungen zu vermeiden wurde ein „Hot Start“ durchgeführt. Hierbei wird die Polymerase erst nach Erreichen der Arbeitstemperatur (Denaturierung 98°C) hinzu pipettiert.

Menge [µl]	Substanz
1	Template-DNA
2.5	Primer 1
2.5	Primer 2
10	HF-Puffer
1	dNTP [10nM]
0.5	Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase
32.5	steriles H ₂ O

Tabelle 3-9: Pipettierschema für die Mutagenese PCR

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [s]
-	98	60
Denaturierung	98	51
Annealing	60	10
Elongation	72	195
-	72	300

Tabelle 3-10: Die verwendeten Temperaturen und die jeweiligen Zyklusdauern. Die Phasen „Denaturierung, Annealing, Elongation“ wurden 25 Mal wiederholt.

Nach dem erfolgreichen Durchlaufen aller Zyklen enthält das PCR-Gefäß außer der gewünschten Produkt-DNA noch das Template. Es trägt nicht die gewünschte Mutation. Um dieses Problem zu lösen wurde der PCR Ansatz mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Da das Template im Rahmen seiner Klonierung aus einem E. Coli mit DAM-Methylierungssystem isoliert wurde, liegt die DNA, im Gegensatz zum PCR-Produkt, methyliert vor. DpnI schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, nicht aber unmethylierte DNA. Wird der Inhalt des Reaktionsgefäßes nach erfolgter PCR mit DpnI verdaut, wird nur das Template geschnitten. Nach erfolgtem DpnI-Verdau wurde die Länge des PCR-Produktes gelelektrophoretisch überprüft. Anschließend erfolgte die Elektroelution und Aufreinigung der DNA. Das linear vorliegende PCR-Produkt wurde ligiert. Die entsprechenden Primer enthalten deswegen an Ihrem 5' Ende eine Phosphatgruppe. Die nun zyklische DNA wurde in E. Coli transfiziert. Die Bakterien wurden ausplattiert und mithilfe der Ampicillinresistenz des pBlue- Vektors selektioniert. Von jeweils 12 Klonen für jedes Konstrukt wurden Minipräparationen angefertigt. Mit den fertigen Minipräparationen wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Enzyme jeweils so gewählt, dass sense und antisense Klone voneinander unterschieden werden können. Von denen in der Restriktionsanalyse identifizierten sense-Klonen wurden Maxipräparationen angefertigt. Diese wurden vollständig sequenziert. Die cDNA der TRP-Kanäle enthält nun jeweils die gewünschten Mutationen. Zur weiteren Charakterisierung der Mutanten musste die cDNA jeweils in unterschiedliche Vektoren subkloniert werden.

3.2.1.2 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde verwendet zur Restriktionsanalyse nach Minipräparationen und Maxipräparationen zur Identifizierung und Verifizierung von (Sense-)Klonen nach Subklonierung und zum DpnI-Verdau des Template Moleküls nach der primären Mutagenese PCR. Die Enzyme und die zugehörigen Puffer wurden über New England Biolabs bzw. Finnzymes bezogen. Es wurden jeweils 0.5 – 1 µl DNA, 2 µl des gewünschten Enzyms sowie 5µl des empfohlenen Puffers mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1 h bei

37°C inkubiert. Bei präoperativen Ansätzen wurden größere DNA- Mengen verwendet (2-5 µl).
Tabelle 3-11 fasst das Pipettierschema zusammen.

Menge [µl]	Substanz
0.5 - 1	DNA
2	Enzym
5	Puffer
12.5 - 13	Steriles H ₂ O

Tabelle 3-11: Verwendetes Pipettierschema zum Restriktionsverdau.

3.2.1.3 Ligation

Tabelle 3-12 zeigt das verwendete Pipettierschema für die Ligation von Desoxyribonukleinsäuren. Der Ansatz wurde jeweils in einem Eppendorfgefäß über Nacht für ca. 12 h bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte die Transformation des Konstruktes in kompetente Zellen wie unten beschrieben.

Menge [µl]	Substanz
2	Insert-DNA
2	Vektor-DNA
2	Ligasepuffer
1	Ligase
13	Steriles H ₂ O

Tabelle 3-12: Verwendetes Pipettierschema zur Ligation.

3.2.1.4 Präparation von kompetenten Zellen und Transformation

a) Präparation kompetenter Zellen

Tag 1 - Zellen aus der Bakterienstammkultur (3.1.12) wurden mit einer sterilen Impföse auf eine Agarplatte ohne Antibiotikazusatz aufgetragen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Tag 2 - Mit einem sterilisierten Zahnstocher wurde eine Kolonie der Agarplatte gepickt und ein Vorkulturröhrchen mit 5 ml LB Medium beimpft. Der Kolben wurde über Nacht für 12-16 h bei 37°C und 200 U/min geschüttelt (Schüttelinkubator Scientific Series 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific). Die Platte wurde verschlossen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt, um bei Bedarf später darauf zurückgreifen zu können.

Tag 3 - Ein Erlenmayerkolben mit 100 ml LB-Medium wurde mit der Kultur des Vortages angeimpft. Dieser wurde bei 37°C und 200 U/min so lange geschüttelt, bis die Bakterienzellen bei einer Wellenlänge von 600 nm eine optische Dichte von 0.35-0.40

erreicht hatten (Photometer Gene quant II, Pharmacia Biotech). Als nächstes wurden die Bakterienkulturen in einem auf 4°C vorgekühlten Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 1000xg zentrifugiert (J2-HS Zentrifuge, Beckman). Das Bakteriensediment wurde in 15 ml auf Eis gekühltem TSS-Puffer resuspendiert und jeweils 300 µl der Suspension wurden in Eppendorfggefäße aliquotiert. Ein Aliquot wurde verwendet, um die Transformationskompetenz festzustellen. Die restlichen Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff (N₂) eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

b) Transformation von DNA in kompetente Zellen

Tag 1 - Ein 300 µl Aliquot der kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1 µl DNA des jeweiligen Plasmids zu den kompetenten Zellen gegeben. Der Reaktionsansatz wurde zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann eine weitere Minute bei 42°C und schließlich 5 Minuten auf Eis. Es wurde 1 ml LB-Medium dazu pipettiert und der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37°C mit 200 U/min geschüttelt (Schüttelinkubator Scientific Series 25 Inkubator Shaker). 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf eine Ampicillin-haltige (50 µg/ml) Agarplatte ausplattiert, der Rest wurde 5 Minuten bei 3000xg zentrifugiert (Tischzentrifuge Heraeus pico). Das entstandene Bakteriensediment wurde in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Dieses Resuspendat wurde auf eine weitere Agarplatte ausplattiert. Beide Platten wurden bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Tag 2 - Vorkulturröhrchen mit 5 ml Ampicillin (100 µg/ml) haltigem LB-Medium wurden mit je einer Kolonie der Platten angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 U/min geschüttelt (Schüttelinkubator Scientific Series 25 Inkubator Shaker).

Tag 3 - Mit 1 ml der Vorkultur wurden Minipräparationen angefertigt und somit geringe Mengen Plasmid-DNA gewonnen. Um größere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren wurde ein Erlenmeyerkolben mit 200 ml Ampicillin (100 µg/ml) haltigem LB-Medium mit 200 µl der Vorkultur angeimpft und der Kolben über Nacht bei 37°C und 200 U/min geschüttelt.

Tag 4 - Mit 200 ml der Hauptkultur wurden Maxipräparationen angefertigt und somit größere Mengen Plasmid-DNA gewonnen.

3.2.1.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukte wurde von der SEQ-IT GmbH&Co KG (Kaiserslautern) durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10 µl der DNA (10 µM) in ein 1.5 ml Eppendorfggefäß überführt und per Kurier versendet. Der Datenversand erfolgte per Email als *.seq und *.abl File.

3.2.1.6 Klonierung und Subklonierung

Nach dem erfolgreichen Einfügen der Mutationen in die verschiedenen TRP Kanäle (siehe 3.2.1.1) lag die mutierte cDNA der Kanäle jeweils im pBluescript II Phagemid KS-Vektor (Agilent Technologies) vor. Um nun weitere funktionelle Untersuchungen an den Proteinen vorzunehmen musste die cDNA jeweils subkloniert werden. TRPC5_{G504S/C}, TRPC4_{G503S/C} und TRPC1_{G506S/C} wurden dabei in die Vektoren pcDNA3, pCAGGS(-IRES-GFP) und pcDNA5-FRT/TO (alle Invitrogen) kloniert (siehe Abbildung 3-1):

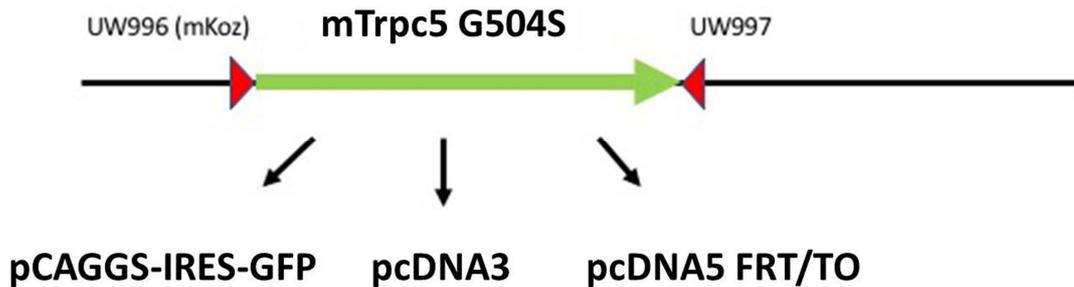


Abbildung 3-1: Subklonierung in die Vektoren pCAGGS-IRES-GFP, pcDNA3 und pcDNA5-FRT/TO am Beispiel mTRPC5_{G504S}. Die Entsprechenden Subklonierungen wurden auch mit den anderen in der Arbeit untersuchten Kanalgenen durchgeführt (siehe Ergebnisteil). Das Präfix m steht für „Maus“.

In Abbildung 3-2 wird schematisch das allgemeine Vorgehen beim Subklonieren dargestellt. Um eine weitere Subklonierung zu ermöglichen musste zunächst das lineare Insert (beispielsweise mTRPC5_{G504S}) mithilfe einer PCR unter Hinzunahme der beiden Primer UW996 (mKoz) (5' cgcgccaccatggcacagctgtactacaag 3') und UW997 (5'-ttagagccgagttgtaacttg-3') gewonnen werden. UW966 enthält die sogenannte Kozak Sequenz ((gcc)gccRccATGG). Diese Nukleinbasenfolge wird von den Ribosomen erkannt und ist für den Start der Translation im Rahmen der Proteinbiosynthese verantwortlich. Die Enden waren „blunt“, was bedeutet, dass das Restriktionsenzym ein stumpfes Ende hinterlässt (im Gegensatz hierzu ist bei sogenannten „sticky-ends“ einer der beiden komplementären Stränge länger als der Andere; Sambrook et al., 2001). Der PCR Ansatz wurde als nächstes auf ein 0.8% Agarosegel aufgetragen, die Bande mit der gewünschten Länge mit einem Skalpell ausgeschnitten und elektroeluiert. Nach dem Fällen der DNA erfolgte die Ligation mit dem Zielvektor. Auch die zirkulären Zielvektoren mussten vorbereitet werden. Dazu wurden der pCAGGS-IRES-GFP Vektor, der pcDNA5 FRT/TO und der pcDNA3 Vektor mit der Restriktionsendonuklease EcoRV in der multiple cloning Site geschnitten und anschließen mit dem Enzym Antarctic Phosphatase dephosphoryliert.

Zur Replikation des gewünschten DNA-Produktes in kompetenten Zellen wurde eine Transformation durchgeführt. Aus den so entstandenen Bakterienkulturen wurden Mini- und

Maxipräparationen angefertigt, um größere Mengen der DNA zu gewinnen. Da es sich um eine sogenannte Blunt-End-Klonierung handelte (siehe oben) und hier das Konstrukt zufällig entweder in sense- Richtung oder in antisense-Richtung eingebaut sein kann musste jeweils eine Restriktionsanalyse durchgeführt werden, um die sense-Klone zu identifizieren (siehe Ergebnisteil). Diese wurden mit der Software SnapGene geplant (exemplarisch Abbildung 4-4).

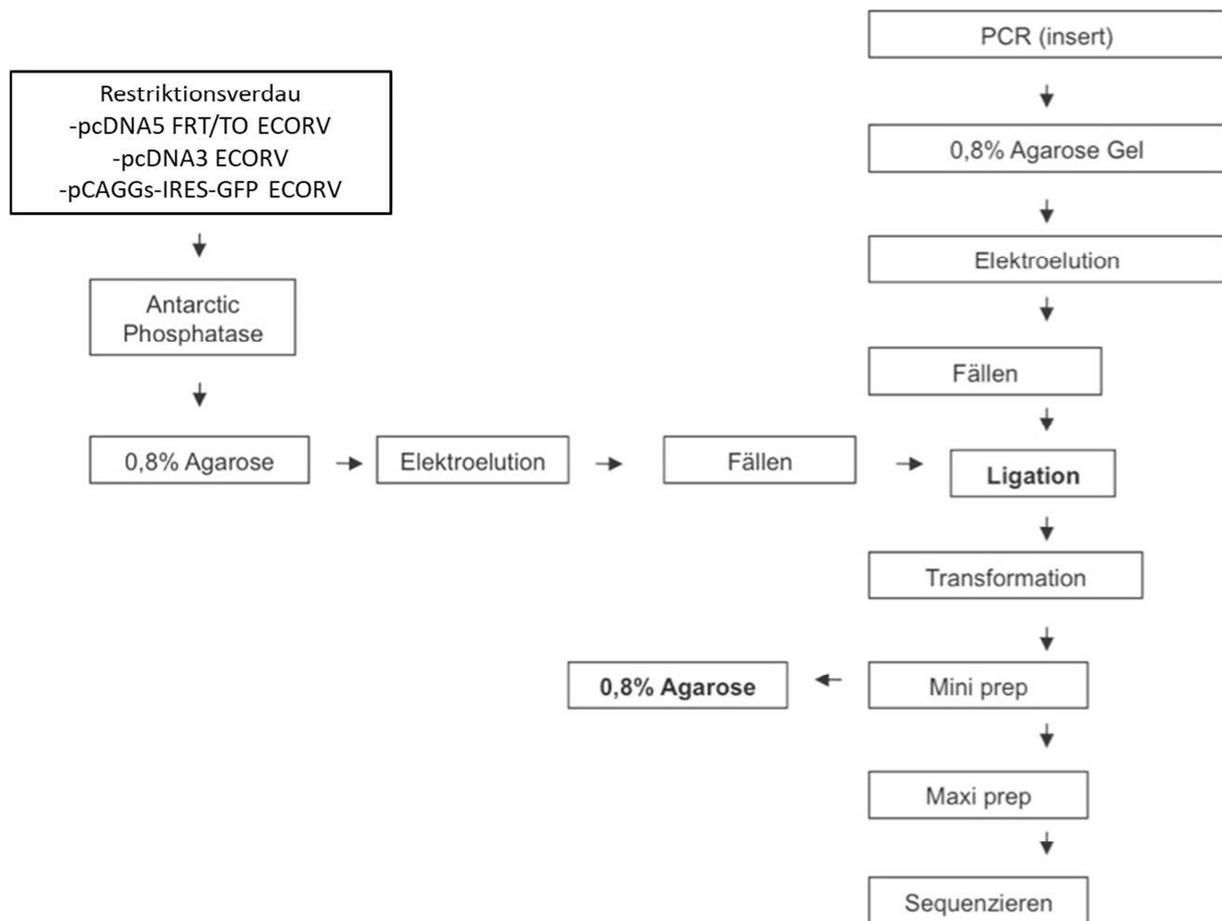


Abbildung 3-2: Das schematische Vorgehen beim Subklonieren der unterschiedlichen TRP Kanäle. Das Prozedere wurde in dieser Form angewandt um die Kanäle mTRPC5_{G504S}, mTRPC1_{G506S} und mTRPC4_{G503S} in die Vektoren pcDNA3, pCAGGS(-IRES-GFP) und pcDNA5-FRT/TO zu klonieren. Nachdem die Insert DNA in einer PCR mit den jeweiligen Primern (siehe 3.1.11) erzeugt wurde, erfolgte die Isolierung der DNA mittels 0.8% Agarosegel, Elektroelution und schließlich die Fällung der DNA. Die Vektoren wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRV linearisiert, mit dem Enzym Antarctic Phosphatase dephosphoryliert und schließlich wurde auch hier die DNA mittels Agarosegel und Elektroelution isoliert. Die beiden Komponenten wurden dann in einer Ligation miteinander verbunden (siehe 3.2.1.3), in kompetente Zellen transformiert und die DNA mittels Mini- und Maxipräparation aufgereinigt. Das Produkt wurde sequenziert.

3.2.1.7 Detaillierte Beschreibung der verwendeten Vektoren

3.2.1.7.1 pBluescript II Phagemid KS-

Es handelt sich um einen 3.0 Kilobasen langen Klonierungsvektor, der für diverse molekularbiologische Standardprozeduren genutzt wird (Klonieren, Sequenzieren, generieren von RNA-Transkripten *in vitro*, Punktmutationen und Genmapping). Er enthält eine multiple Cloning Site mit 21 Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen. Weitere Features siehe 3.1.12. In der vorliegenden Arbeit wurde der Vektor wegen seiner relativ geringen Größe zum Einfügen der Punktmutationen verwendet.

3.2.1.7.2 pcDNA3

Der Vektor mit einer Länge von 5.4 Kilobasen dient vorwiegend, wie auch in der vorliegenden Arbeit, zur transienten Expression von Genprodukten in eukaryotischen Zellen oder zur Etablierung stabil exprimierender Zelllinien. Diese wird durch einen CMV-Promotor ermöglicht. Er sorgt für eine Überexpression des gewünschten Proteins innerhalb der Zelle. Darüber hinaus enthält der Vektor eine Multiple Cloning Site, außerdem ein Neomycin Resistenzgen zur Selektionierung von den gewünschten Kolonien. Es wurden stabile Zelllinien aus den pcDNA3 Konstrukten gebildet. Dazu wurde die Eigenschaft des Vektors ausgenutzt sich in das Genom von Zellen zu integrieren, die latent mit dem SV40 Virus infiziert sind. Um stabile Zelllinien zu generieren wird der Vektor dabei normalerweise nicht linearisiert, da dieser schlechter transfiziert werden kann. Die Integration erfolgt dabei zufällig und nicht gerichtet an einer bestimmten Stelle.

3.2.1.7.3 pCAGGS(-IRES-GFP)

Der Vektor hat eine Länge von 7200 bp. Die IRES Sequenz (interne ribosomale Eintrittsstelle, engl. *internal ribosomal entry site*) ergibt nach Transkription eine mRNA-Sequenz, deren Sekundärstruktur aufgrund ihrer spezifischen Faltung ohne Initiationsfaktoren die Bindung der mRNA an die Ribosomen vermittelt. Dadurch kann die Translation eines Proteins unmittelbar initiiert werden. Im Falle des pCAGGS(-IRES-GFP) Vektors handelt es sich bei diesem Protein um das Green Fluorescent Protein (GFP) (Remington et al., 2011) sowie das jeweilig hineinklonierte Konstrukt. GFP ist ein Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, welches bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Vektor verwendet, um die zu untersuchenden Proteine transient in HEK293 Zellen zu exprimieren. Dabei wurden die Fluoreszenz des GFP genutzt, um die Zellen zu identifizieren, welche das Plasmid aufgenommen und das gewünschte Protein exprimiert haben.

3.2.1.7.4 pcDNA5-FRT/TO

Der pcDNA5-FRT/TO Vektor hat eine Länge von 5.1 kb. Er ist ein induzierbarer Expressionsvektor, der für die Benutzung mit dem Flp-In™ T-Rex™ System kreiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde er verwendet, um stabile Zelllinien zu generieren, die die gewünschten Kanalproteine exprimieren. Wird der Vektor mit dem pOG44 Flp Rekombinase Expressionsplasmid in einer Flp-In T-Rex Zelllinie kotransfiziert, so wird das pcDNA5-FRT/TO Plasmid mithilfe der Flp-Rekombinase (Zhu et al., 1995) in das Genom integriert. Die Expression des gewünschten Proteins kann dann durch Hinzugabe von Tetrazyklin induziert werden.

3.2.1.8 Kultivierung der Zelllinien, Transfizierte cDNA und Transfektion

Bei HEK293 Zellen handelt es sich um eine in den 70iger Jahren aus der Niere eines humanen Fötus gewonnenen Zelllinie, die mit Adenovirus DNA-Fragmenten transfiziert und immortalisiert wurde. Die HEK293 Zellen wurden von der American Type Culture Collection bezogen (ATCC, Manassas, VA, USA). In der vorliegenden Arbeit wurden zum Teil HEK Zellen verwendet, die stabil den muskarinischen Rezeptor Subtyp 2 (M_2R) exprimieren. Die stabilen HEK- M_2R und HEK- M_2R -TRPC4 β Zellen wurden unserem Institut von Michael X. Zhu (UT Health Science Center, Houston, TX, USA) zur Verfügung gestellt.

Die Flp-In™ 293 Zellen wurden von Invitrogen life technologies (Carlsbad, US) bezogen. Um stabil Tetrazyklin-induzierbare Flp-In™ Zelllinien zu generieren, wurde die mTRPC4_{G504S}, mTRPC5_{G504S} und mTRPC1_{G506S} cDNA in den pcDNA5/FRT/TO Vektor subkloniert (4.1.1). Von Dr. Ulrich Wissenbach, Dr. Stephan Philipp und Heidi Löhr (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes, Homburg) wurden so stabile Zelllinien generiert, die Tetrazyklin-induzierbar mTRPC4_{G504S}, mTRPC5_{G504S} oder mTRPC1_{G506S} cDNA exprimieren. Das Flp/FRT-System (Zhu et al., 1995) ist eine Methode zu Entfernung oder Einfügung von DNA-Sequenzen. Es verwendet die Rekombinase *Flippase (Flp)* um DNA-Sequenzen ortsspezifisch auszutauschen. Dieses Enzym bindet an die FRT-Sequenzen (die sich im Zielorganismus befinden muss) und rekombiniert sie. Die FRT-Sequenz lautet minimal 5'-GAAGTTCCTATTCTctagaaaGtATAGGAACTTC-3'. Dabei bindet das Enzym an beiden Enden der FRT-Sequenz. In der Mitte der Sequenz gibt es einen Platzhalter, der aus 8 Basenpaaren entsteht (tctagaaa). Auf dem Minusstrang erfolgt durch die Flippase eine Hydrolyse nach dem Abstandshalter, auf dem Plusstrang vor dem Abstandshalter. Teilweise besitzen die FRT-Sequenzen in 5'-Richtung eine zusätzliche DNA- Sequenz ((5'-GAAGTTCCTATTCC-3') eine Base vor der FRT-Sequenz welche notwendig für eine Insertion, aber nicht eine Deletion ist. Die Insertion erfolgt unter Inversion des DNA-Fragments. Nach der Rekombination verbleiben sogenannte FRT-Twins.

Alle HEK Zelllinien wurden in der Zellkultur kultiviert, wobei sie in 75 cm² Kulturflaschen (TC-Flasche T75, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) mit Kulturmedium (Tabelle 3-13) auf dem Boden der Flasche bei 37°C und 5% CO₂ wachsen. Sie wurden jede Woche nach Erreichen eines konfluenten (80-90% dichten) Zellrasen passagiert, d.h. mit Trypsin (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt) vom Boden und Nachbarzellen abgelöst und in verdünnter Zahl in neuen Kulturflaschen mit frischem Medium weiter gezüchtet.

Zelllinie	Medium
HEK293	MEM (31095/029), 10% FBS
HEK293-mTRPC5	DMEM (41966/029), 10% FBS, 400 µg/ml G418
HEK293-mTRPC1	DMEM (41966/029), 10% FBS, 400 µg/ml G418
HEK293-M ₂ R (M.X. Zhu, Houston)	DMEM, (41966/029), 10% FBS (hitzeinaktiviert), 100 µg/ml Hygromycin B
HEK293-M ₂ R-mTRPC4 β (M.X. Zhu)	DMEM (41966/029), 10% FBS (hitzeinaktiviert), 100 µg/ml Hygromycin B, 400 µg/ml G418
Flp-In T-Rex	DMEM (41965/39), 10% FBS
Flp-In T-Rex stabil mTRPC1 _{G506S}	DMEM (41965/39), 10% FBS, 100 µg/ml Hygromycin B, 2 mM Glutamax
Flp-In T-Rex stabil mTRPC4 _{G503S}	DMEM (41965/39), 10% FBS, 100 µg/ml Hygromycin B, 2 mM Glutamax
Flp-In T-Rex stabil mTRPC5 _{G504S}	DMEM (41965/39), 10% FBS, 100 µg/ml Hygromycin B, 2 mM Glutamax

Tabelle 3-13: Kultivierte Zelllinien und deren Medien. Alle Medien wurden von Gibco bzw. Thermo Fisher bezogen.

Zelllinie	Transfektion
HEK293	mTRPC5 _{G504S} -pCAGGS-IRES-GFP
HEK293	pCAGGS-IRES-GFP (Kontrolle)
HEK293-mTRPC1	mTRPC5 _{G504S} -pCAGGS-IRES-GFP
HEK293-M ₂ R	mTRPC4 _{G503S} -pCAGGS-IRES-GFP
HEK293-M ₂ R	mTRPC4 _{G503S-S623A} -pCAGGS-IRES-GFP
Flp-In T-Rex stabil mTRPC1 _{G506S}	mTRPC4 \square -pCAGGS-IRES-GFP
Flp-In T-Rex stabil mTRPC1 _{G506S}	mTRPC5-pCAGGS-IRES-GFP
Flp-In T-Rex stabil mTRPC1 _{G506S}	pCAGGS-IRES-GFP (Kontrolle)

Tabelle 3-14: Transiente Transfektionen verschiedener Zelllinien.

Für Kalziumimaging Experimente wurden verschiedene Zelllinien transient mit jeweils 3 µg cDNA eines pCAGGS(-IRES-GFP-)Konstruktes und 5 µl des PolyFect Reagenz (Qiagen, Hilden, Germany) transfiziert (siehe Tabelle 3-14). 24 h nach Transfektion wurden die Zellen auf Glas-Coverslips plattiert und die Experimente wurden nach den jeweils angegebenen

Zeiten durchgeführt. Die erfolgreich transfizierten Zellen konnten mithilfe von GFP identifiziert werden (3.2.1.7.3), dieses wurde bei einer Wellenlänge von 470 nm angeregt und die Emission bei 520 ± 15 nm (GFP Filterset mit Strahlenteiler bei 495 nm; AHF) gemessen.

Flp-InTM-293 Zellen die nach Induktion mit Tetrazyklin (10 $\mu\text{g/ml}$) mTRPC4_{G503S}, mTRPC5_{G504S} bzw. mTRPC1_{G506S} exprimieren wurden ebenfalls auf Glas-Coverslips wachsen gelassen und bis zu 48 h nach Induktion für die Kalziumimaging Experimente verwendet.

3.2.2 Fluoreszenz-basierte zytosolische Ca^{2+} Messungen

Einige chemische Substanzen besitzen die Eigenschaft nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge Licht einer anderen Wellenlänge zu emittieren. Diese Substanzen werden Fluorophore genannt. Dabei werden durch das Anregungslicht Elektronen auf ein höheres Energielevel gehoben (Abb. 3-3). Als Fluoreszenz wird die Emission von Licht bezeichnet, die beim Übergang aus dem ersten angeregten Singulett-Zustand in den Grundzustand entsteht. Die Wellenlänge des Anregungslichts ist dabei stets kleiner und somit energiereicher als die des emittierten (Fluoreszenz) Lichts (sog. Stokes-Verschiebung) (Grynkiewicz et al. 1985).

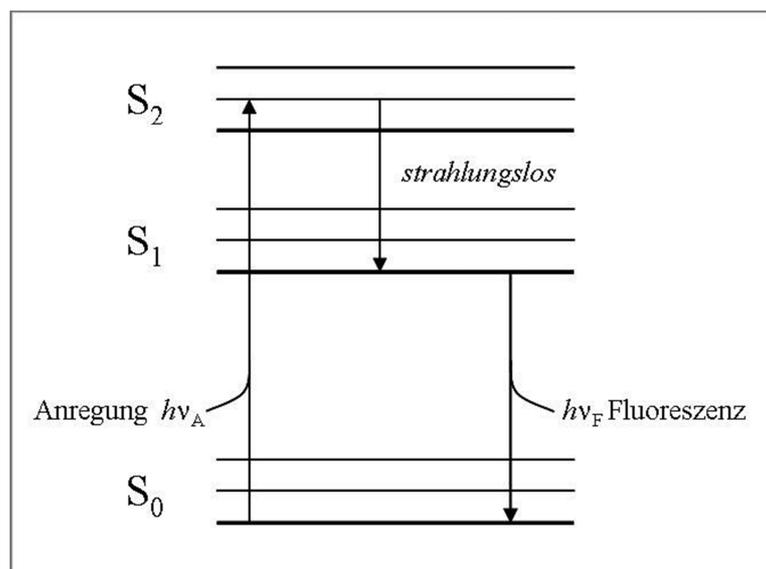


Abbildung 3-3. Einfache Darstellung eines Jablonski-Diagramms (Quelle: researchgate.net). Durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen werden Elektronen durch Energieabsorption des eingestrahlenen Photons aus ihrem Grundzustand in höherliegende Zustände angeregt (S_2). Es erfolgt der strahlungslose Übergang in den ersten angeregten Singulett Zustand (S_1), beim Übergang in den Grundzustand wird Licht emittiert, dies wird als Fluoreszenz bezeichnet.

3.2.2.1 Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird durch einen Anregungsfilter nur der Teil des Lichts einer Lichtquelle, der den für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs notwendigen Wellenlängenbereich umfasst Richtung Probe gesendet. Ein dichroischer Spiegel oder Strahlteiler spiegelt das Anregungslicht zum Objektiv, worauf im Präparat ein Fluorophor (Fluoreszenzfarbstoff) zur Fluoreszenz angeregt wird. Das emittierte Fluoreszenzlicht kann den dichroischen Spiegel passieren und trifft auf einen Detektor (Photomultiplier oder Kamera), wo es quantitativ erfasst werden kann. Um eine Detektion des Anregungslichtes am Detektor zu vermeiden wird ein Emissionsfilter verwendet, der nur Licht der emittierten Wellenlängen auf den Detektor auftreffen lässt (Abb. 3-4).

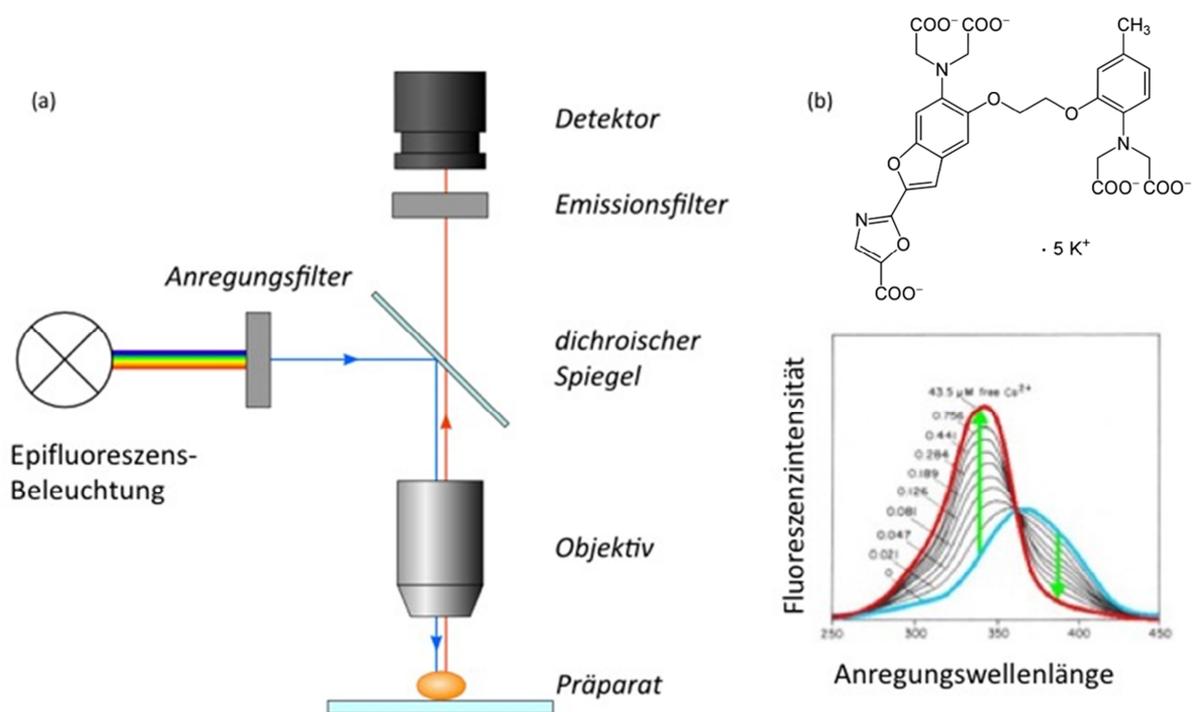


Abbildung 3-4: (a) Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie; Quelle: <https://ip.uni-goettingen.de/> (b) Fura-2 Struktur und Anregungsspektrum in Abhängigkeit verschiedener Ca^{2+} Konzentrationen. (Quelle <http://biologie.hu-berlin.de>).

3.2.2.2 Fluoreszierende Kalziumindikatoren

Es lassen sich prinzipiell zwei Klassen von fluoreszierenden Kalziumindikatoren unterscheiden. Bei den genetisch kodierten Proteinen handelt es sich zum Beispiel um Aequorin aus der Qualle *Aequorea victoria*. Dieses luminesziert (Lumineszenz – Emission von Licht nach Anregung durch chemische Energie und nicht durch Lichtenergie) nach dem Binden von Kalzium. Der besondere Vorteil der Proteine ist die Möglichkeit bestimmte Kompartimente gezielt zu markieren. Bei der anderen Gruppe, den chemischen Kalziumindikatoren, ist der Vorteil vor allem die leichte und schnelle Handhabung bei der

Beladung von Zellen. Unter den chemischen Kalziumindikatoren kann weiterhin zwischen Einzelwellenlängen-Indikatoren und ratiometrischen Kalziumindikatoren unterschieden werden. Im Gegensatz zu Einzelwellenlängen-Indikatoren kommt es bei ratiometrischen Indikatoren nach der Bindung von Kalzium nicht nur zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität, sondern auch zu einer Verschiebung der Anregungs- oder Emissionsspektren (Paredes et al. 2008).

Fura-2-Acetoxyethyl Ester oder Fura-2-AM kann als ratiometrischer Indikator dazu verwendet werden die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu messen (Clapham 1995; Grynkiewicz et al. 1985). Chemisch ist Fura-2 vom Kalziumchelator Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) abgeleitet (Abb. 3-4b, oben). Fura-2 hat dabei sein Anregungsmaximum in kalziumgebundener Form bei 340 nm und in seiner kalziumfreien Form bei etwa 380 nm (Abb. 3-4b, unten). Aus einem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten nach Anregung mit 340 nm und 380 nm kann somit unabhängig von der absoluten Fluoreszenzintensität, also auch unabhängig von der Farbstoffkonzentration, mithilfe der Ratio (F340/F380) auf die freie Kalziumkonzentration geschlossen werden.

Die Fähigkeit von Fura-2 Kalzium zu binden beruht auf 4 negativ geladenen Carboxylgruppen, zwischen denen sich wegen der Grösse bevorzugt ein Kalziumion einlagert. Fura-2 liegt somit als fünffach geladenes Anion vor und kann Zellmembranen nicht passieren. Sind die Carboxylgruppen jedoch mit Acetoxyethylgruppen verestert ist das ungeladene Derivat, Fura-2-AM, fähig die Zellmembran zu passieren. Intrazellulär werden die Acetoxyethylgruppen von endogenen Esterasen abgespalten und die geladenen Fura-2-Anionen reichern sich intrazellulär an (Ionenfalle; Abb. 3-5).

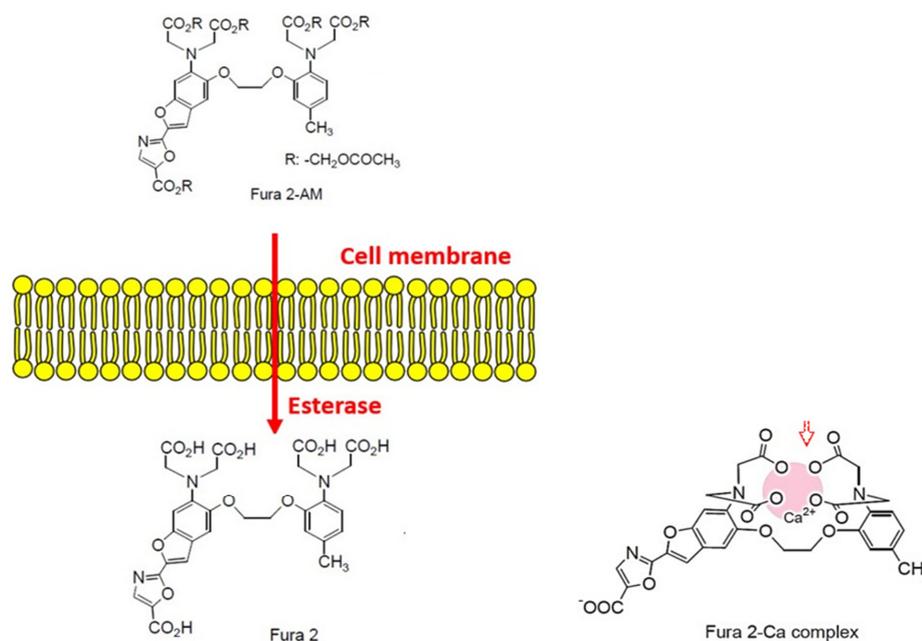


Abbildung 3-5: Beladung von Zellen mit Fura-2-Acetoxyethyl Estern (Fura-2-AM) (Modifiziert nach <http://jbmethode.org>)

3.2.2.3 Durchführung der Ca²⁺ Imaging Experimente

Die Kalziumimaging Experimente wurden an einem Imaging-System von TILL Photonics (Martinsried, Germany) mit Polychrome V (TILL Photonics, München) als Lichtquelle und einer CCD Kamera (ANDOR iXon 885, ANDOR Technology, South Windsor, USA) als Detektor, mithilfe eines Zeiss Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskops, ausgestattet mit einem 20x Zeiss Plan Neofluar Objektiv, sowie GFP (AHF) und Fura-2 (TILL Photonics) Fluoreszenzfilterblock, durchgeführt. Die Steuerung des Imaging-Systems und die Verarbeitung der digitalen Daten wurde mit der TILLvisION imaging Software von TILL Photonics bewerkstelligt.

Zunächst erfolgte die Transfektion bzw. Induktion der entsprechenden Konstrukte von TRPC1, TRPC4 und TRPC5 in HEK Zellen wie oben beschrieben (3.2.1.8). Vor Durchführung der Experimente wurden die jeweiligen Zellen für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur in Zellmedium mit 5 µM Fura-2-AM inkubiert. Daraufhin wurden die Glas-Coverslips, auf denen die Zellen sich befanden, in eine Messkammer (SKE Research Equipment, Bollate, Mailand, Italien) eingespannt, dreimal mit kalziumfreier Elektrolytlösung (B1F Lösung; Tabelle 3-15) gewaschen, um extrazelluläres Fura-2-AM zu entfernen und anschliessend mit 300 µl B1F Lösung überschichtet. Das Versuchsbad mit den Fura-2-beladenen Zellen wurde anschliessend auf dem Objektisch des Fluoreszenzmikroskops befestigt. Bei den mit IRES-GFP transient transfizierten Zellen wurde zunächst bei einer Anregung von 470 nm Licht die erfolgreich transfizierten grünen GFP-exprimierenden Zellen identifiziert und diese anschliessend bei einer Wellenlänge von 340 nm und 380 nm mit einer Frequenz von einem Hertz (1 Hz) die Fura-2 Fluoreszenz (>440 nm) bzw. die intrazellulären Ca²⁺ Änderungen detektiert (Belichtungsdauer 30 ms bei 340 nm, 30 ms bei 380 nm). Die stabilen mTRPC1, mTRPC4 bzw. mTRPC5 Tetrazyklin-induzierten Zellen exprimieren alle den entsprechenden TRPC Kanal, so dass keine Zellen aufgrund einer GFP Expression ausgewählt werden mussten. Vor dem eigentlichen Experiment wurden die grünen Zellen, bei transients Transfektion, oder jegliche Zellen bei Tetrazyklin-induzierter Expression mithilfe der Software als "regions of interest" (ROI) markiert und die Ratio der hintergrundkorrigierten Fura-2 Fluoreszenz der Zellen bei 340 und 380 nm (F340/F380) gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Nach 100 Sekunden wurden 300 µl B1 Lösung mit 5 mM Ca²⁺ hinzupipettiert, so dass sich eine finale extrazelluläre Kalziumkonzentration von 2.5 mM Ca²⁺ ergab.

Konzentration [mM]	Substanz
140	NaCl
5	KCl
1	MgCl ₂
10	HEPES
10	Glukose

Tabelle 3-15: Zusammensetzung der Kalzium-freien Elektrolytlösung (Buffer B1F). Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7.2 adjustiert.

3.2.3 Durchflusszytometrie

3.2.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technologie, die eine multiparametrische Analyse von einzelnen Zellen und Zellpopulationen ermöglicht. Hierbei werden Laser als Lichtquellen verwendet. Mithilfe von Detektoren wie Photodioden und Photomultiplier werden Streueffekte und Fluoreszenz von Zellen und Zellpopulationen gemessen. Diese Signale werden digitalisiert, in einem standardisierten Dateiformat gespeichert (.fcs) und dann analysiert. Zellpopulationen können auch auf Basis der Signale sortiert werden.

Es werden unterschiedlichste Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, darunter Antikörper, DNA-bindende Farbstoffe, Viabilitätsfarbstoffe, und fluoreszierende Proteine. Die Durchflusszytometrie findet in vielen Bereichen Anwendung: Z.b. im Bereich der Immunologie, Molekularbiologie, Bakteriologie, Virologie, Krebsbiologie und bei der Erforschung von Infektionserkrankungen. In den letzten 30 Jahren hat die Methode beeindruckende Fortschritte gemacht.

Zur Analyse einer Zellpopulation wird eine Zellsuspension durch eine hochpräzise Kapillare aus Glas oder Quarz geleitet. Der Durchmesser der Kapillare ist dabei so gering, dass jeweils nur eine Zelle gleichzeitig die Kapillare passieren kann. Jede Zelle bzw. jeder Partikel wird mithilfe von Streueffekten analysiert. Man unterscheidet zwei wesentliche Streueffekte: den sog. „Forward Scatter = FCS“ der einen Indikator für die relative Zellgröße darstellt und den sog. „Side Scatter = SSC“ der einen Indikator für die Komplexität (Membranfaltung und äußere Form) und Granularität der Zelle darstellt. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Brechung des Lichts rechtwinklig zum Laserstrahl (Abb. 3-6). Die Streueffekte sind unabhängig von den Fluoreszenzsignalen. Hierbei werden die Proben beispielsweise durch Transfektion und Expression von Fluoreszenzproteinen (z.B. GFP) , durch Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Propidium Iodid und DAPI interkalieren respektive binden an die DNA) oder mittels Antikörpern die an ein fluoreszierendes Agens gekoppelt sind zum Fluoreszieren gebracht.

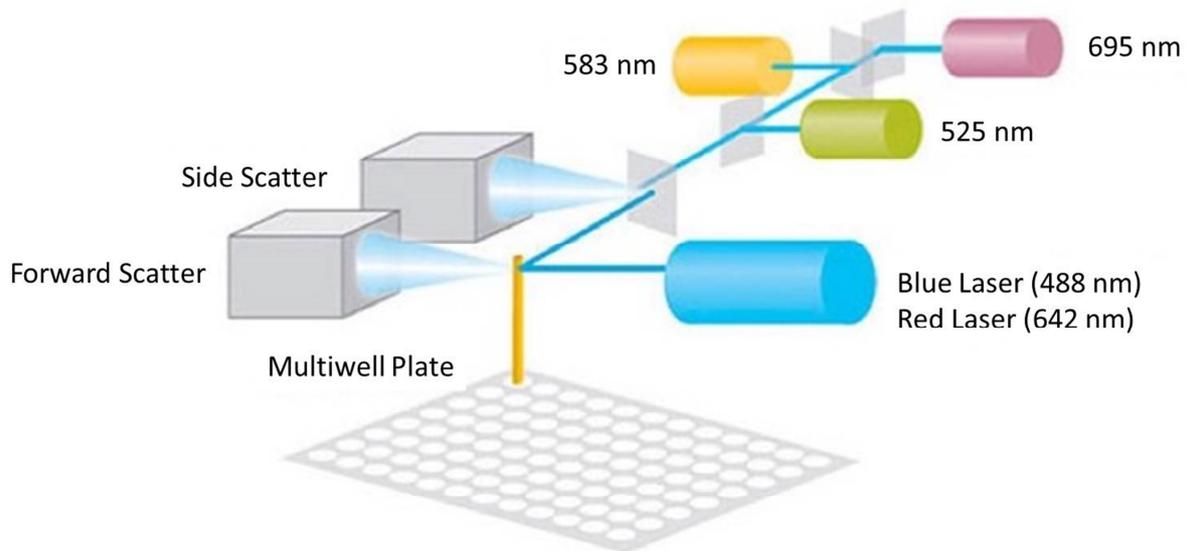


Abbildung 3-6: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. Modifiziert nach <http://www.luminexcorp.com>.

Zusätzlich kann mithilfe von teildurchlässigen Spiegeln und Filtern das ggf. von der Zelle emittierte Fluoreszenzlicht in unterschiedliche Spektren aufgeteilt werden. Mit verschiedenen Dioden können nun einzelne Fluoreszenzsignale gemessen werden.

Untersucht wird nicht nur eine einzelne Zelle, sondern jeweils eine ausreichend große Population. Somit kann der Einfluss von Artefakten und kleineren Störeffekten minimiert werden und es können statistisch signifikante Aussagen gemacht werden. Für jede einzelne Zelle werden die Informationen wie oben beschrieben gewonnen und digital gespeichert. Eine definierbare Menge solcher Zellen kann am Computer zu einer Population zusammengefasst werden und diese kann man mit einer geeigneten Software hinsichtlich ihrer Streu- und Fluoreszenzemission analysiert werden.

Die Durchflusszytometrie ist beispielsweise sehr effektiv für Studien des Immunsystems und seine Reaktion auf Infektionskrankheiten oder Krebs. Sie erlaubt die simultane Charakterisierung von gemischten Blutzellpopulationen, Knochenmarkzellpopulationen oder aus soliden Geweben wie Lymphknoten, Milz, Schleimhäute, Tumoren etc. welche in einzelne Zellen aufgeteilt werden können. Zusätzlich zur Zellanalyse ist eine weitere wichtige Anwendung die Sortierung der Zellen.

Die Geräte haben eine lange Entwicklung hinter sich. Multilasersysteme sind weit verbreitet sowie Systeme die mit 96-well Platten arbeiten, Kombinationen aus Mikroskopie und Durchflusszytometrie sowie Systeme die Massenspektroskopie /Durchflusszytometrie miteinander verbinden.

Die in den letzten Jahren zunehmend verfügbaren neuen Farbstoffe führen zu einer Explosion in den Untersuchungsparametern. Auch die Fluorochrome zum Binden an Antikörper sind vermehrt verfügbar. Zudem gibt es neue fluoreszierende Proteine die transfiziert werden können wie z.B. mCherry, mBanana, mOrange, mNeptune usw. Die Fortschritte haben zu Experimenten mit bis zu 30 Parametern geführt.

Der letzte Schritt ist die Datenanalyse. Dabei wird die traditionelle Methode des zweiparameter- histogram gatings weiterhin oft verwendet. Jedoch hat die Zunahme an Untersuchungsparametern zur zunehmenden Nutzung von Clusteralgorithmen wie PCA, SPADE und tSNE geführt.

3.2.3.2 Durchführung Viability Assay mithilfe der Durchflusszytometrie

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Guava easycyte 8HT Durchflusszytometer verwendet. Das Gerät arbeitet mit einem blauen (488 nm) und einem roten Laser (692 nm; Abb. 3-6). Die adhärenenten HEK293 waren vor Durchführung der Experimente 48 h bei 36°C auf einer 96-Well Platte gewachsen. Das Medium wurde vorsichtig abpipettiert. Die Zellen wurden mit je 100 µl PBS Puffer gewaschen. Zu jedem Well wurden 30 µl Trypsin gegeben. Trypsin ist eine Protease und löst die Zellen von ihrem Untergrund ab. Zum Inaktivieren des Enzyms wurde nach 5 Minuten 70 µl Zellmedium (mit Serum, welches Trypsin inaktiviert) dazugegeben. Als nächstes wurden 80 µl Guava ViaCount Reagenz in die Wells pipettiert, um die Zellen zu färben. Das Kit enthält zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe: 1) LDS751, was Membranpermeabel ist und an Strukturen des Zellkerns bindet - es kann verwendet werden, um zwischen kernhaltigen Zellen und Zellschrott bzw. kernlosen Zellen zu unterscheiden – und 2) Propidium Iodid, was in die DNA interkaliert. Unter physiologischen Bedingungen kann Propidium Iodid die Zellmembran nicht passieren. Verliert die Zelle – z.B. im Rahmen der Apoptose – ihre strukturelle Integrität so kann es in die Zelle gelangen und als Apoptosemarker fungieren. LDS751 färbt somit alle und Propidium Iodid lediglich die toten Zellen. Die Anteile der jeweils durch die Farbstoffe markierten lebenden und toten Zellen kann dann im Durchflusszytometer gemessen werden. Angeregt wurden die Zellen mit einem 488 nm Laser. Propidiumiodid hat sein Emissionsmaximum bei 590 nm und wurde mit dem 583 nm Emissionsfilter detektiert und LDS751 (eigentlich optimale Anregung bei 543 nm) hat sein Emissionsmaximum bei 712 nm und wurde mit einem 695 nm Emissionsfilter detektiert.

3.2.4 Visuelle Analyse der Überlebensrate nach Kalzium-Pufferung durch EGTA

Ausplattierte HEK293 Zellen wurden für das Experiment transient mit jeweils 3 µg cDNA des mTRPC5_{G504S} pCAGGS-IRES-GFP Konstruktes und 5 µl des PolyFect Reagenz (Qiagen,

Hilden, Germany) transfiziert. Zum Nährmedium (die Kalziumkonzentration wurde im Zentrallabor der Uniklinik des Saarlandes laborchemisch bestimmt und betrug 2 mmol/l) wurden jeweils die in Tabelle 3-16 angegebenen Konzentrationen des Kalziumchelators EGTA gegeben, um das extrazelluläre freie Kalzium auf bestimmte Konzentrationen einzustellen. Die entsprechende freie Kalziumkonzentration wurde mit dem Web-Tool Webmaxc Standard (<https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/webmaxc/webmaxcS.htm>) berechnet. Die durchschnittliche Zellzahl pro Blickfeld (24 h nach Transfektion) wurde für jeweils fünf Schälchen visuell an einem Durchlichtmikroskop ermittelt und als Mass für die Anzahl der lebenden Zellen gegen die extrazelluläre Ca^{2+} Konzentration aufgetragen.

	EGTA [mM]	Ca^{2+} [μM]
1	1.3	700
2	1.7	301
3	1.9	103
4	2.1	3.2
5	2.3	1.0
6	2.5	0.7

Tabelle 3-16: Freie Kalziumkonzentration im Medium (2 mmol/l Ca^{2+}) nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von EGTA.

3.2.5 Analysen und Statistik

Zur Auswertung der Daten aus der Durchflusszytometrie (Viability Assay) wurde die Guava InCyte Software verwendet.

Nach Verarbeitung der digitalen Helligkeitsrohdaten mit der TILLvision imaging Software wurden die hintergrundkorrigierten Ratiowerte in der Software IGOR PRO (Wavemetrics) analysiert und dargestellt.

Statistische Analysen wurden mit der Software Microsoft Excel (Microsoft Corporation) und SPSS durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der Student's t-Test und bei mehr als 2 Gruppen der One-Way ANOVA Test mit einer Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Signifikanzen wurden wie folgt angegeben: * => $p \leq 0.05$; ** => $p \leq 0.01$; *** => $p \leq 0.001$; nicht signifikant (ns) => $p > 0.05$.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung

Vieles deutet darauf hin, dass der S4-S5 Linker von verschiedenen TRP Kanälen ein Hotspot für das Gating der Kanäle darstellt (siehe oben Abschnitt 2.3). Im Vergleich der S4-S5 Linker verschiedener TRP Proteine fällt ein evolutionär stark konserviertes Glycin auf (Abb 2-3). Die bekannten GOF Mutationen G573S und G573C in TRPV3 betreffen beispielsweise dieses Glycin. Durch die Substitution dieses Glyzins durch ein Serin oder ein Cysteine erhält das Molekül an dieser Position eine polare Aminosäure. Dies könnte durch eine Änderung der Bindungsverhältnisse zu einer Struktur- und Funktionsänderung des Moleküls führen, was ein genereller Mechanismus in der Familie der TRP Kanäle sein könnte. In der vorliegenden Arbeit soll die entsprechende Mutation in den S4-S5 Linker von mTRPC1, mTRPC4 und mTRPC5 eingefügt werden. Danach wird überprüft ob die Kanäle ebenfalls konstitutiv aktiv sind. Zunächst wurden Punktmutationen in die cDNAs von TRPC1, TRPC4 und TRPC5 (m steht für Maus) im S4-S5 Linker eingefügt und eine Subklonierung in die verschiedenen Zielplasmide durchgeführt werden.

4.1.1 Mutagenese und Subklonierung von mTRPC5_{G504S}

Da die cDNA des mTRPC5 Kanals zu Beginn des Projektes im pCAGGS(-IRES-GFP) Vektor vorlag wurde zunächst versucht die Mutagenese (G504S und G504C) direkt in diesem Vektor durchzuführen (Abb. 4-1, Lane 3 und 4). Im Kontrollgel konnte keine entsprechende Bande bei 9082 bp gesehen werden. Da das Konstrukt relativ lang ist stellten wir die Hypothese auf, dass die PCR aufgrund der Länge der zu amplifizierenden Fragmente nicht funktioniert. Deswegen erfolgte die Umklonierung in den kürzeren pBluescript II Phagemid KS- Vektor. Hier war die Amplifikation erfolgreich (Abb. 4-1, Lane 1 und 2).

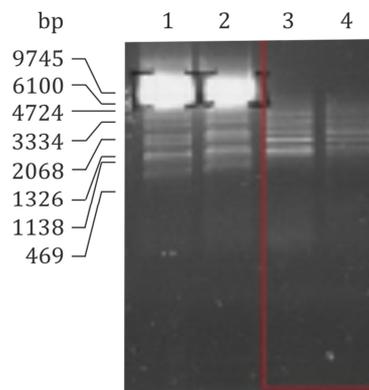


Abbildung 4-1: Nach erfolgter Mutagenese-PCR konnte für mTRPC5_{G504S} (Lane 3) und mTRPC5_{G504C} (Lane 4) im Vektor pCAGGS-IRES-GFP im 0.8% Agarosegel keine entsprechenden Banden bei 9082 bp abgegrenzt werden. Im Vektor pBluescript II Phagemid KS- konnten im 0.8% Agarosegel entsprechende Banden für G504S (Lane 1) und G504C (Lane 2) bei 5920 bp abgegrenzt werden.

Nach erfolgter Mutagenese wurden die Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, elektroeluiert, gefällt und re-ligiert. Die zyklische DNA wurde in *E. coli* XL 1 Blue transformiert. Die verschiedenen Klone wurden zur Kontrolle einer Restriktionsanalyse mit der Restriktionsendonuklease SST I unterzogen. Entsprechende Banden bei 3703 bp und 2217 bp konnten für mTRPC5_{G504S} (Abb. 4-2A) und mTRPC5_{G504C} (Abb. 4-2B) identifiziert werden. Maxi Präparationen wurden angefertigt und die Konstrukte wurden sequenziert.

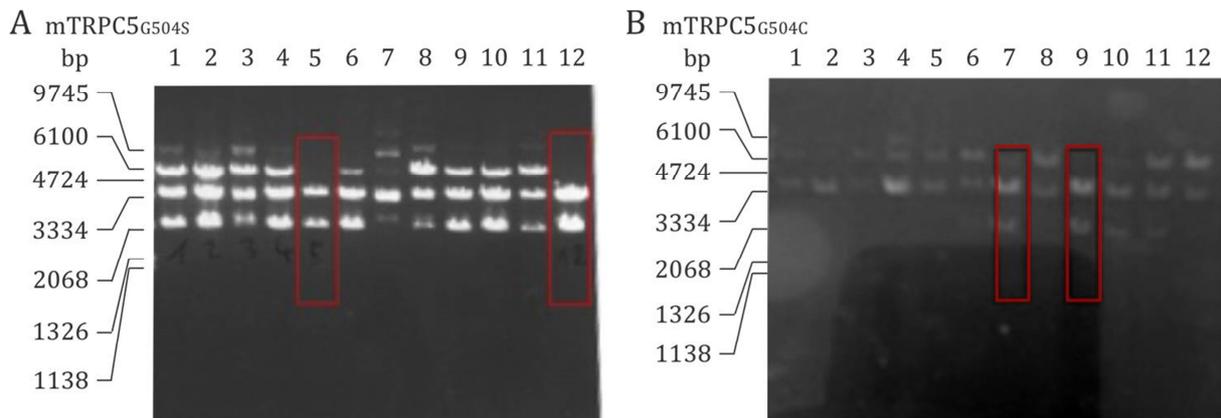


Abbildung 4-2: Restriktionsanalyse mit der Restriktionsendonuklease SST I. Nach erfolgter Mutagenese (G504S und G504C) im pBluescript II Phagemid KS-Vektor wurden die Banden mit einem Skalpell aus dem 0.8% Agarosegel ausgeschnitten, elektroeluiert, gefällt und ligiert. Die zyklische DNA wurde in *E. coli* transformiert. Die verschiedenen Klone wurden einer Restriktionsanalyse mit der Restriktionsendonuklease SST I unterzogen. A) von 12 Klonen mTRPC5_{G504S} zeigten 2 Klone (Lane 5 und 12) die entsprechenden erwarteten Banden bei 3703 bp und 2217 bp. B) Von 12 Klonen mTRPC5_{G504C} zeigten ebenfalls 2 Klone (Lane 7 und 9) die entsprechenden erwarteten Banden bei 3703 bp und 2217 bp.

Um eine weitere Subklonierung in die Zielvektoren (Tabelle 4-1) zu ermöglichen musste zunächst das lineare Insert gewonnen werden. Erwartet wurde hier auf dem 0.8% Agarosegel ein DNA-Fragment mit einer Länge von 5920 bp. Das entsprechende Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und nach dem in Abbildung 3-2 beschriebenen Verfahren weiterverarbeitet. Es erfolgte die Subklonierung in die Zielvektoren wie im Methodenteil beschrieben.

Da die Enden des Inserts „stumpf“ sind, gibt es zwei mögliche Orientierungen, wie das DNA-Fragment in den Zielvektor eingebaut werden kann (Green et al., 2012). Da das gewünschte Protein nur gebildet wird, wenn das Fragment in der richtigen Ausrichtung eingebaut wird, müssen die Kolonien dahingehend untersucht werden, in welcher Richtung das Fragment nach der erfolgten Ligation eingebaut wurde. Dazu wurden Restriktionsanalysen der Kolonien durchgeführt. Tabelle 4-1 zeigt die für die verschiedenen

Zielvektoren verwendeten Restriktionsenzyme und Ihre spezifischen Schnittstellen, sowie die Größe der erwarteten Fragmente bei regelrechter Ausrichtung.

Konstrukt	Enzym	Schnittstelle	Sense [bp]
mTRPC5 _{G504S} pBlue	SST1	GAGCT/C	3703, 2217
mTRPC5 _{G504S} pcDNA3	BamH1	G/GATCC	6667, 1466, 241
mTRPC5 _{G504S} pCAGGs-IRES-GFP	NheI	G/CATGC	7030, 1970
mTRPC5 _{G504S} pcDNA5/FRT/TO	BamH1	G/GATCC	6306, 1466, 198
mTRPC5 _{G504C} pBlue	SST1	GAGCT/C	3703, 2217
mTRPC5 _{G504C} pcDNA3	BamH1	G/GATCC	6667, 1466, 241
mTRPC5 _{G504C} pCAGGs-IRES-GFP	NheI	G/CATGC	7030, 1970
mTRPC5 _{G504S} pcDNA5/FRT/TO	BamH1	G/GATCC	6306, 1466, 198

Tabelle 4-1: Die mTRPC5_{G504S} und mTRPC5_{G504C} Konstrukte nach Subklonierung in die verschiedenen Zielvektoren. Zur Überprüfung, ob das DNA-Fragment in der gewünschten Leserichtung eingebaut wurde, musste jeweils eine Restriktionsanalyse durchgeführt werden. Die jeweiligen Enzyme, Schnittstellen und im Falle eines adäquat ausgerichteten Fragmentes zu erwartende Fragmentlänge nach Restriktionsverdau sind in den restlichen Spalten aufgeführt.

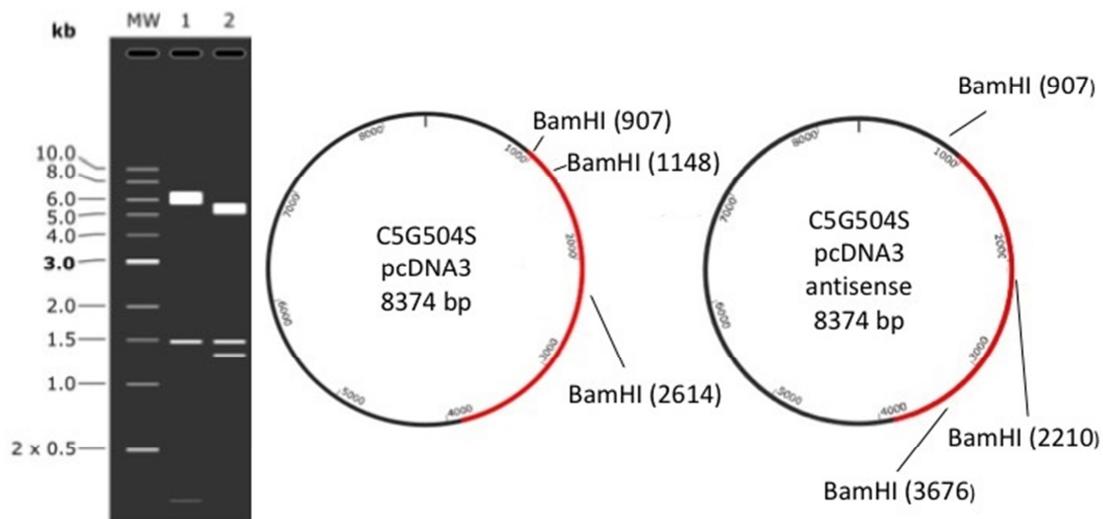


Abbildung 4-3: Die Restriktionsanalyse wurde mit der Software SnapGene geplant. Hier am Beispiel mTRPC5_{G504S} pcDNA3 mit dem Restriktionsenzym BamHI. Bei einer sense Ausrichtung werden im 0.8% Agarosegel Banden bei 6667 bp, 1466 bp und 241 bp (Lane 1) erwartet. Bei einer antisense Ausrichtung werden Banden bei 5605 bp, 1466 bp und 1303 bp (Lane 2) erwartet.

Zwei BamHI Schnittstellen befindet sich z.B. im mTRPC5 Insert und eine weitere im pcDNA3 Vektor (Abb. 4-3). Hierbei ist eine gewisse Asymmetrie wichtig, damit unterschiedlich lange Fragmente entstehen, je nachdem welche Ausrichtung das Insert innerhalb des Vektors hat. Wird die zu untersuchende DNA wie unter 3.2.1.2 beschrieben mit dem Enzym BamHI inkubiert, so sind in diesem speziellen Fall für die Sense-Klone die

folgenden Fragmentlängen zu erwarten: 6667 bp, 1466 bp und 241 bp (Abb. 4-4). Nach Identifizierung von zwei Sense Klonen konnte das Produkt sequenziert werden und wurde, falls die Sequenz sich als richtig herausgestellt hatte, zur funktionellen Analyse bzw. zum Generieren stabiler Zelllinien benutzt. Analog hierzu wurde eine Restriktionsanalyse der pCAGGS-IRES-GFP und der pcDNA5 FRT/TO Konstrukte durchgeführt (siehe Abbildung 4-5, 4-6)

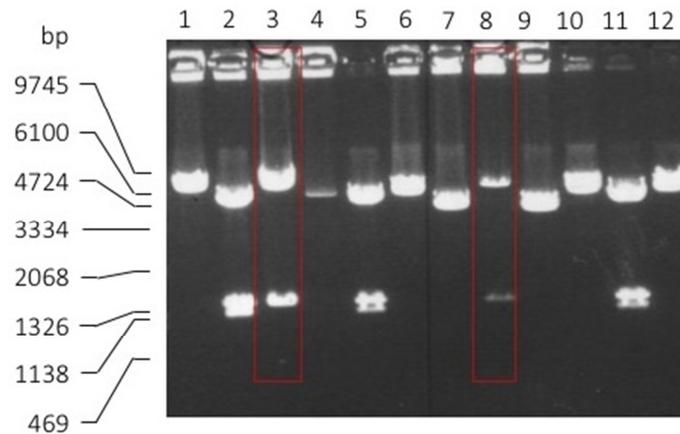


Abbildung 4-4: Restriktionsanalyse von mTRPC5_{G504s} pcDNA3 (Lane 1-6) und mTRPC5_{G504C} pcDNA3 (Lane 7-12) mit der Restriktionsendonuklease BamHI. Die sense-Klone sollen drei Fragmente von 6667 bp, 1466 bp und 241 bp aufweisen. In Lane 3 und Lane 8 sind die Banden bei 6667 bp und 1466 bp zu erkennen. Das 241 bp Fragment ist nicht erkennbar, da es wahrscheinlich aus dem Gel gelaufen ist.

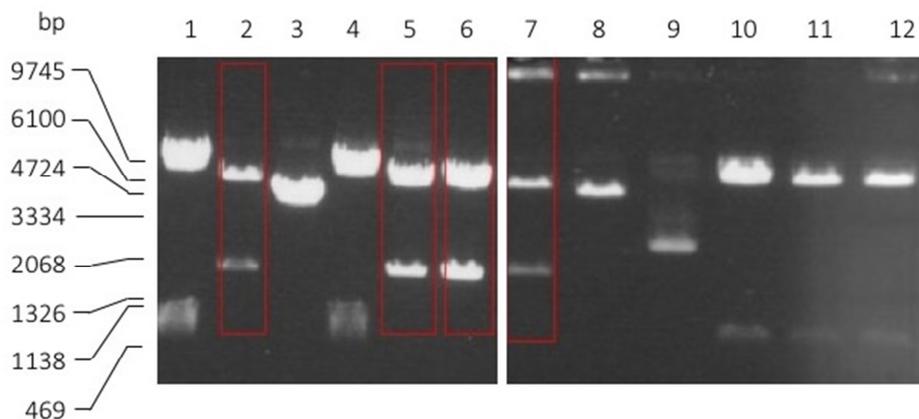


Abbildung 4-5: Restriktionsanalyse von mTRPC5_{G504s} pcAGGS-IRES-GFP (Lane 1-6) und mTRPC5_{G504C} pcAGGS-IRES-GFP (Lane 7-12) mit der Restriktionsendonuklease NheI. Die sense-Klone weisen zwei Banden bei 7030 bp und 1970 bp auf (Lane 2, 5, 6 und 7).

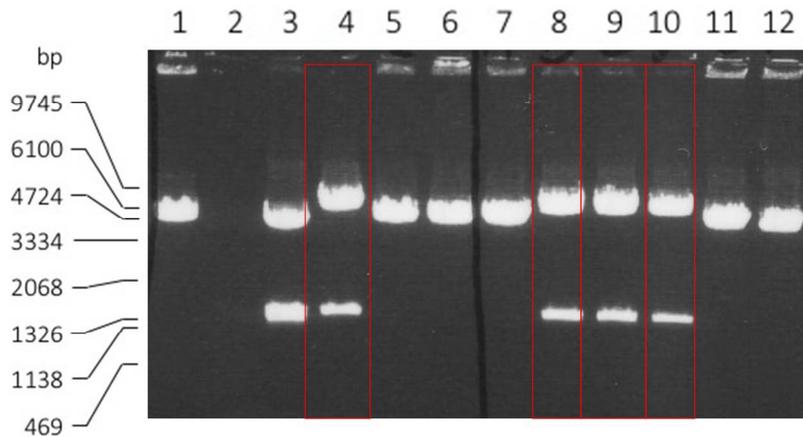


Abbildung 4-6: Restriktionsanalyse von mTRPC5_{G504S} pcDNA5 FRT/TO (Lane 1-6) und mTRPC5_{G504C} pcDNA5 FRT/TO (Lane 7 – 12) mit der Restriktionsendonuklease BamHI. Die sense-Klone sollten drei Fragmente von 6306 bp, 1466 bp und 198 bp aufweisen. In Lane 4, 8, 9 und 10 sind die Banden bei 6306 bp und 1466 bp zu erkennen. Das 198 bp Fragment ist nicht erkennbar, da es aus dem Gel gelaufen ist.

4.1.2 Mutagenese und Subklonierung von mTRPC1_{G506S}

Prinzipiell wurde hier vorgegangen wie unter 4.1.1. und im Methodenteil beschrieben. Auch hier diente als Ausgangsvektor ein Konstrukt mit dem Plasmid pBluescript II Phagemid KS-. Es wurde ebenfalls in einem ersten Schritt das Insert mithilfe einer PCR generiert, welches dann „blunt“ (siehe Methodenteil) in die Zielvektoren kloniert wurde. Zur Überprüfung, ob das Insert in der gewünschten Leserichtung eingebaut wurde, wurden wiederum Restriktionsanalysen mit der Software SnapGene durchgeführt. Tabelle 4-2 zeigt die mTRPC1 Konstrukte und die erwarteten Fragmentlängen nach der Restriktionsanalyse. Nach Identifizierung von sense Klonen konnte auch hier das Produkt sequenziert werden, um eventuell vorliegende unerwünschte Punktmutationen und die gewünschte Mutation nachzuweisen. Danach konnten die Konstrukte zur funktionellen Analyse bzw. zum Generieren stabiler Zelllinien benutzt werden.

Konstrukt	Enzym	Schnittstelle	Sense [bp]
mTRPC1 _{G506S} pBlue	XhoI	C/TCGAG	3306, 1983
mTRPC1 _{G506S} pcDNA3	XhoI	C/TCGAG	7311, 415
mTRPC1 _{G506S} pCAGGs-IRES-GFP	NheI	G/CTAGC	1622, 6778
mTRPC1 _{G506S} pcDNA5/FRT/TO	XhoI	C/TCGAG	414, 6956
mTRPC1 _{G506S} pBlue	XhoI	C/TCGAG	3306, 1983
mTRPC1 _{G506S} pcDNA3	XhoI	C/TCGAG	7311, 415
mTRPC1 _{G506S} pCAGGs-IRES-GFP	NheI	G/CTAGC	1622, 6778
mTRPC1 _{G506S} pcDNA5/FRT/TO	XhoI	C/TCGAG	414, 6956

Tabelle 4-2: Die mTRPC1_{G506S} Konstrukte nach Subklonierung in die verschiedenen Zielvektoren. Zur Überprüfung, ob das DNA-Fragment in der gewünschten Leserichtung eingebaut wurde, musste jeweils eine Restriktionsanalyse durchgeführt werden. Die jeweiligen Enzyme, Schnittstellen und im Falle eines adäquat ausgerichteten Fragmentes zu erwartende Fragmentlängen nach Restriktionsverdau werden in den restlichen Spalten aufgeführt.

4.1.3 Mutagenese und Subklonierung von mTRPC4_{G503S}

Auch der Kanal mTRPC4_{G503S} wurde zur weiteren funktionellen Analyse subkloniert. Das prinzipielle Vorgehen entsprach hierbei dem unter 4.1.1 und 4.1.2 beschriebenen. Tabelle 4-3 zeigt die erzeugten Konstrukte und die Daten zur jeweiligen Restriktionsanalyse. Das Konstrukt mTRPC4_{G503S} pCAGGS IRES-GFP wurde von Jasmin Zimmermann erstellt.

Konstrukt	Enzym	Schnittstelle	Sense [bp]
mTRPC4 _{G503S} pcDNA5- FRT	Mfe1	C/AATTG	2914, 4883
mTRPC4 _{G503S} pcDNA5 FRT/TO	Mfe1	C/AATTG	1482, 6382
mTRPC4 _{G503S} pcDNA3	Mfe1	C/AATTG	2900, 5273

Tabelle 4-3: Die mTRPC4_{G503S} Konstrukte nach Subklonierung in die verschiedenen Zielvektoren. Zur Überprüfung, ob das DNA-Fragment in der gewünschten Leserichtung eingebaut wurde, musste jeweils eine Restriktionsanalyse durchgeführt werden. Die jeweiligen Enzyme, Schnittstellen und im Falle eines adäquat ausgerichteten Fragmentes zu erwartende Fragmentlängen nach Restriktionsverdau sind in den restlichen Spalten aufgeführt.

4.1.4 Übersicht (Sub-) Klonierungen

Tabelle 4-4 zeigt eine Übersicht der in der vorliegenden Arbeit klonierten DNA-Konstrukte.

(Sub-)Klon	Kanal	Vektor	Ursprungsklon
C1 Klon 4 GC	mTRPC1 _{G506C}	pBlue	
C1 Klon 12 GS	mTRPC1 _{G506S}	pBlue	
C5 Klon 1 GC	mTRPC5 _{G504C}	pBlue	
C5 Klon 9 GS	mTRPC5 _{G504S}	pBlue	
mTRPC4short65635psGE M(M13.1)	mTRPC4 _{G503S}	pBlue	
C1 Klon 5D2	mTRPC1 _{G506C}	pcDNA ₃	C1 Klon 4 GC
C1 Klon 6A	mTRPC1 _{G506S}	pcDNA ₃	C1 Klon 12 GS
C1 Klon 9A	mTRPC1 _{G506C}	pCAGGS-IRES-GFP	C1 Klon 4 GC
C1 Klon 10C	mTRPC1 _{G506S}	pCAGGS-IRES-GFP	C1 Klon 12 GS
C1 Klon 13D	mTRPC1 _{G506C}	pcDNA ₅ -FRT/TO	C1 Klon 4 GC
C1 Klon 14A	mTRPC1 _{G506S}	pcDNA ₅ -FRT/TO	C1 Klon 12 GS
C1 Klon 14B	mTRPC1 _{G506S}	pcDNA ₅ -FRT/TO	C1 Klon 12 GS
C5 Klon 7C	mTRPC5 _{G504C}	pcDNA ₃	C5 Klon 1 GC
C5 Klon 8A	mTRPC5 _{G504S}	pcDNA ₃	C5 Klon 9 GS

C5 Klon 11E	mTRPC5 _{G504C}	pCAGGS-IRES-GFP	C5 Klon 1 GC
C5 Klon 12A2	mTRPC5 _{G504S}	pCAGGS-IRES-GFP	C5 Klon 9 GS
C5 Klon 15D	mTRPC5 _{G504C}	pcDNA ₅ -FRT/TO	C5 Klon 1 GC
C5 Klon 16B	mTRPC5 _{G504S}	pcDNA ₅ -FRT/TO	C5 Klon 9 GS
C5 Klon 16C	mTRPC5 _{G504S}	pcDNA ₅ -FRT/TO	C5 Klon 9 GS
C1WT Klon 5	mTRPC1 _{WT}	pCAGGS-IRES-GFP	
C1WT Klon 16	mTRPC1 _{WT}	pcDNA ₃ -IRES-GFP	
C4 Klon 11	mTRPC4 _{G503S}	pcDNA ₅ -FRT/TO	C4G503SpsGEM SP

Tabelle 4-4: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit klonierten DNA-Konstrukte.

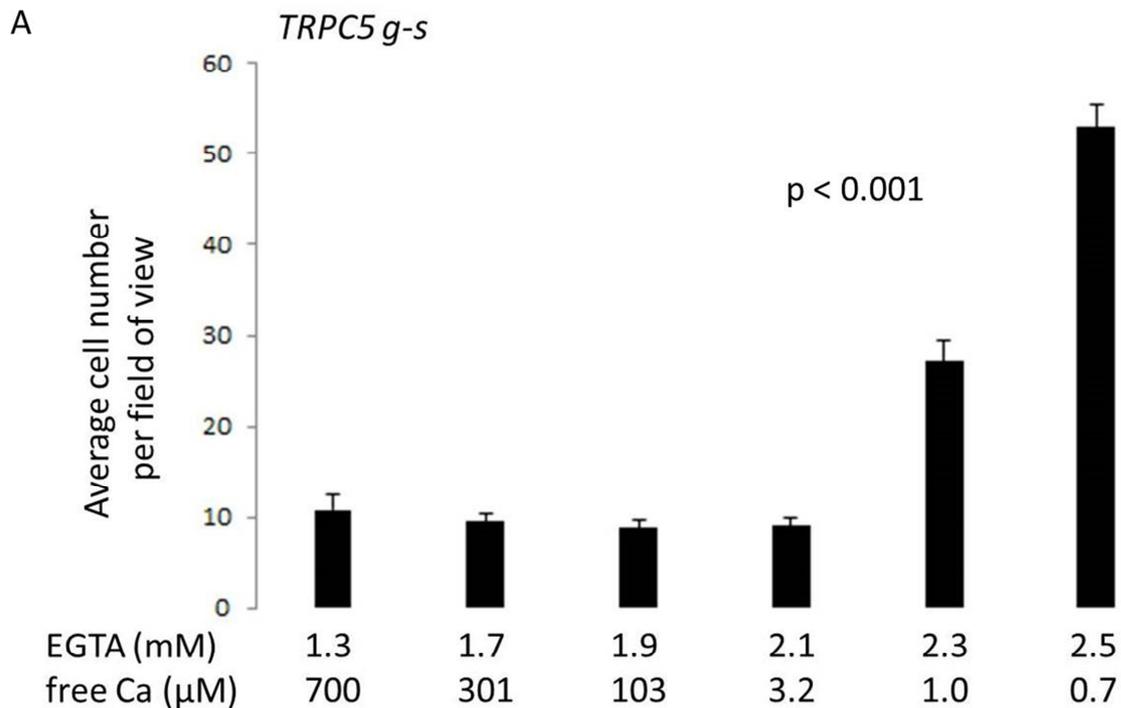
4.2 Funktionelle Untersuchungen

4.2.1 Zellen die mTRPC5_{G504S} bzw. mTRPC4_{G503S} exprimieren weisen eine geringere Überlebensrate auf.

Nach erfolgter Mutagenese und Subklonierung, wie oben beschrieben, wurde in einer ersten Serie von Experimenten die mTRPC5_{G504S} cDNA (mTRPC5_{G504S} pCAGGS-IRES GFP) in HEK293 Zellen transient für 24 h exprimiert. Dabei konnte im Vergleich zur Kontrolle (Zellen, die pCAGGS-IRES-GFP exprimieren) im Mikroskop eine geringere Anzahl intakter Zellen festgestellt werden. Für TRPV3 wurde gezeigt, dass die korrespondierende Mutation des konservierten Glyzins eine gain-of-function darstellt, wobei die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöht ist, was durch vermehrten Kalziumeinstrom zu konsekutiver Apoptose führt (Asakawa et al. 2006).

Dementsprechend stellten wir die Hypothese auf, dass hier im Falle der strukturell korrespondierenden Mutation im mTRPC5 ebenfalls ein erhöhter Ca²⁺ Einstrom für den Zelltod verantwortlich sein könnte.

Daher wurden in einer zweiten Serie von Experimenten in das Medium der transfizierten mTRPC5_{G504S} Zellen verschiedene Konzentrationen des Ca²⁺ Chelators EGTA gegeben um die extrazelluläre freie Ca²⁺ Konzentration im Medium, die 1,8 mM betrug, auf 100 µM, 3 µM, 1 µM, 62 nM und 44 nM zu senken. Bei Ca²⁺ Konzentrationen geringer als 1 µM nahm die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen signifikant zu (Abb. 4-7A,B). Das lässt darauf schliessen, dass der Zelltod kausal durch das Kalzium bedingt ist, am ehesten aufgrund der gain-of-function Mutation G504S im überexprimierten mTRPC5 Kanal.



B

One-way analysis of means (not assuming equal variances)

data: cells and EGTA group

F = 62.421, num df = 5.000, denom df = 24.719, p-value = 3.243e-13

Pairwise comparisons using t tests with pooled SD

data: data\$cells and data\$EGTAgroup

	1.3	1.7	1.9	2.1	2.3
1.7	1	-	-	-	-
1.9	1	1	-	-	-
2.1	1	1	1	-	-
2.3	7.6e-08	9.6e-09	3.2e-09	4.3e-09	-
2.5	< 2e-16	< 2e-16	< 2e-16	< 2e-16	3.2e-14

P value adjustment method: bonferroni

Abbildung 4-7: Die Anzahl grün fluoreszierender transient mTRPC5_{G504S} exprimierender HEK293 Zellen erhöht sich mit der Abnahme der extrazellulären Ca²⁺ Konzentration des Mediums. (A) Die durchschnittliche Zellzahl der grün fluoreszierenden Zellen (\pm S.E.M.) pro Blickfeld (zufällig eingestellt) wurde für jeweils 10 Schälchen (n=10) im Mikroskop ermittelt und gegen die extrazelluläre Ca²⁺ Konzentration aufgetragen. Die Konzentration des freien Ca²⁺ wurde durch eine Kombination aus der vorhandenen Ca²⁺ Konzentration im Medium (1,79 mM) und verschiedenen Konzentrationen des Ca²⁺ Puffers EGTA errechnet (Webmaxc) und eingestellt. **(B)** Die statistische Analyse wurde mit der Software Rstudio erstellt. Bei signifikant unterschiedlichen Varianzen wurde ein Welch-ANOVA Test mit anschließender Bonferroni Analyse durchgeführt.

Um einen intrazellulären Ca^{2+} Anstieg durch den Ca^{2+} Einstrom über eventuell konstitutiv aktive $\text{mTRPC5}_{\text{G504S}}$ Kanäle zu messen wurden Imaging Experimente mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2AM durchgeführt (siehe 3.2.2.3). Wie in Abbildung 4-8 dargestellt, zeigen die transient $\text{mTRPC5}_{\text{G504S}}$ -exprimierenden HEK293 Zellen im Vergleich zur Kontrollpopulation (Zellen die nur GFP exprimierten) einen größeren intrazellulären Ca^{2+} Anstieg. Die Baseline korreliert mit der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration vor Zugabe von Ca^{2+} (2.5 mM) ins Bad. Die maximale Steigung des Ca^{2+} Anstiegs, also der Ratio-Änderung ($\text{F}_{340}/\text{F}_{380}$) pro Zeit, ist ein guter Indikator für den Ca^{2+} Einstrom bezogen auf die gesamte Oberfläche der Zelle und die erreichte Peak Ratio korreliert mit der maximal erreichten intrazellulären Kalziumkonzentration. Es ist zu erkennen, dass der Ca^{2+} Einstrom ohne eine zusätzliche Stimulation mit der Zeit nach Transfektion von $\text{mTRPC5}_{\text{G504S}}$ (12 bis 48 h) zunimmt (Abb. 4-8). Die G504S Mutation hat also einen konstitutiv aktiven mTRPC5 Kanal zur Folge, dessen Dichte pro Membranoberfläche mit der Zeit nach Transfektion zunimmt und somit auch der Ca^{2+} Einstrom.

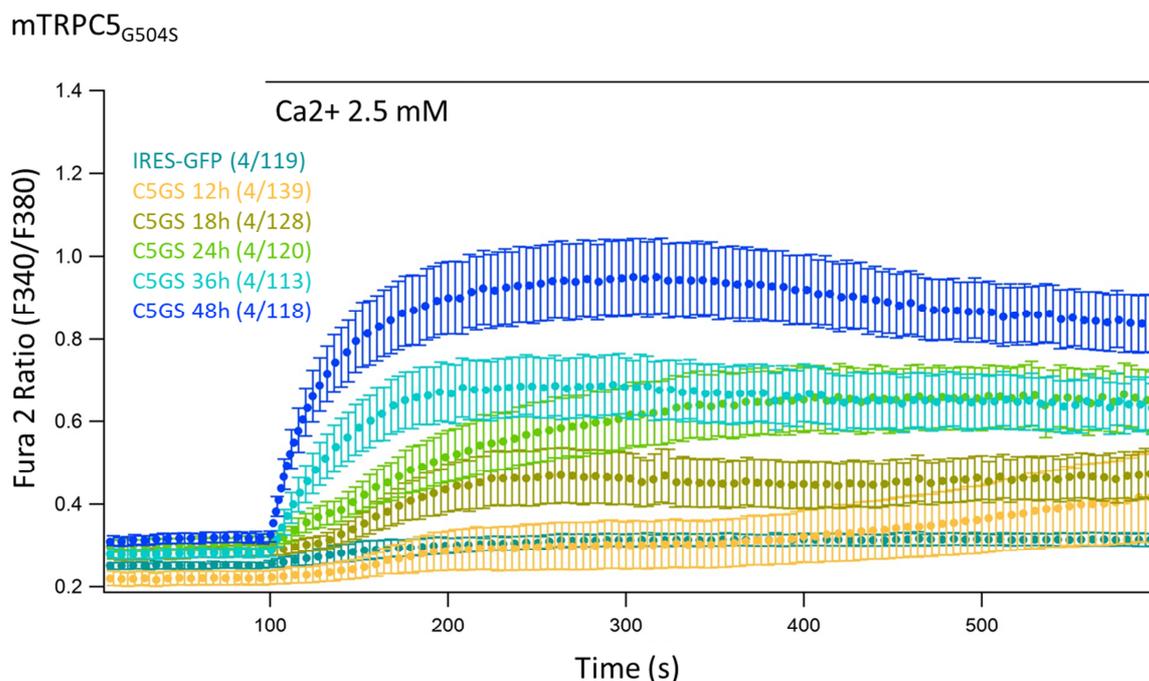
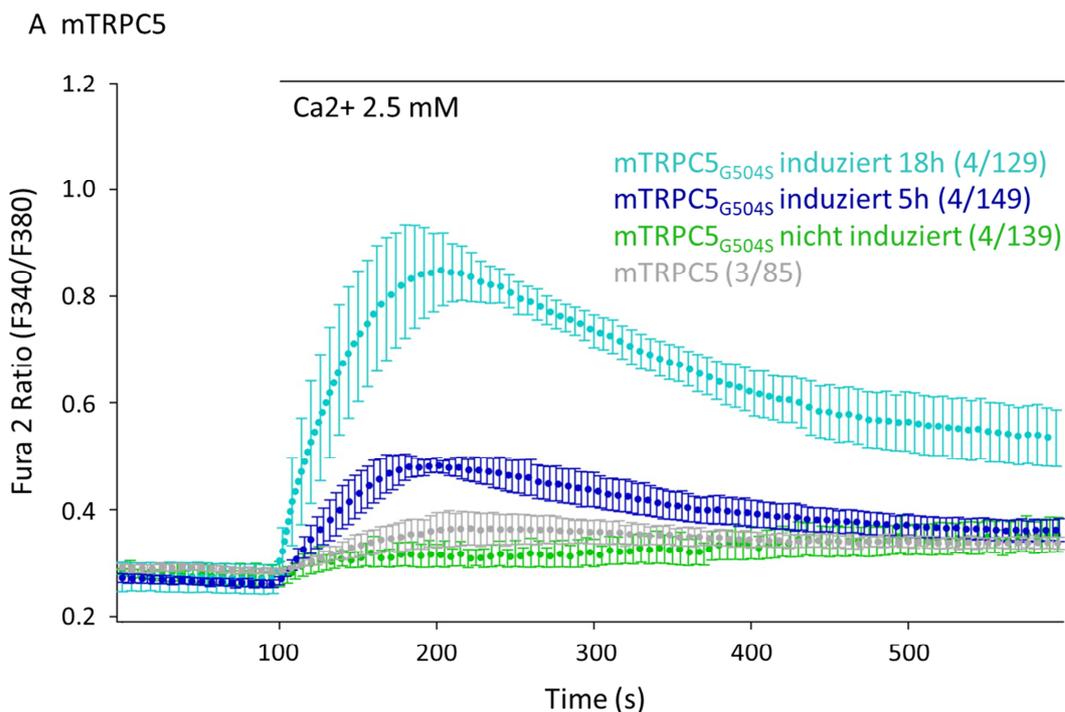


Abbildung 4-8 Der Kalziumeinstrom nimmt mit der Zeit nach Transfektion des $\text{TRPC5}_{\text{G504S}}$ Konstruktes ($\text{mTRPC5}_{\text{G504S}}$ pCAGGS-IRES-GFP) zu. Die HEK293 Zellen mit transient exprimiertem $\text{mTRPC5}_{\text{G504S}}$ wurden mit 2.5 mM externem EGTA wachsen gelassen. Zur Kontrolle wurden Zellen mit dem leeren IRES-GFP Vektor transfiziert und unter den gleichen Bedingungen kultiviert. 12 , 18 , 24 , 36 und 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Fura-2 beladen und intrazelluläre Ca^{2+} Änderungen nach Zugabe (bei 100 s; zu Beginn der Messung Zellen in nominell 0Ca Badlösung) von 2.5 mM Ca^{2+} gemessen. Die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration wurde als Fura-2 Fluoreszenzratio ($\text{F}_{340}/\text{F}_{380}$) gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus jeweils n unabhängigen Experimenten mit insgesamt x Zellen (n/x).

Als nächstes wurden von PD Dr. Ulrich Wissenbach, Dr. Stephan Philipp und Heidi Löhr (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes, Homburg) zwei stabile Zelllinien (Tetrazyklin-induzierbare Expression in Flip-In T-Rex HEK Zellen, siehe Methoden) mit induzierbarer mTRPC5_{G504S} bzw. mTRPC4_{G503S} cDNA generiert, um die bisherigen Ergebnisse zu verifizieren und weiterführende Untersuchungen an den Kanalproteinen durchführen zu können. Der Vorteil dieser Zelllinien ist eine gute Steuerbarkeit der Expression der konstitutiv aktiven Kanäle durch die Zugabe von Tetrazyklin.

Im Folgenden wurden mit den stabil induzierbaren FLP-In T-Rex mTRPC5_{G504S} und FLP-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zelllinien wiederum Ca²⁺ Imaging-Experimente durchgeführt (Abb. 4-12 A,B). Die Zellen wurden vorher mit Tetrazyklin (10 µg/ml) induziert und 0, 5 und 20 Stunden nach Induktion für Ca²⁺ Messungen verwendet. Es zeigte sich sowohl in den mTRPC4_{G503S}- als auch in den mTRPC5_{G504S}-exprimierenden Zellen ein intrazellulärer Ca²⁺ Anstieg nach Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺, der mit der Zeit nach Induktion zunimmt. Da mit der Zeit die Quantität der induzierten Proteine zunimmt, bestätigt dies die gewonnene Erkenntnis, dass sich der Ca²⁺ Einstrom kausal auf die mutierten Kanalproteine zurückführen lässt. Nicht induzierte FLP-In T-Rex mTRPC5_{G504S} und FLP-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen sowie Zellen, die stabil den Wildtyp von mTRPC5 bzw. mTRPC4β exprimieren weisen dagegen keinen bzw. nur einen geringen Ca²⁺-Anstieg nach extrazellulärer Zugabe von 2.5 mM Ca²⁺ auf (Abb. 4-9 A,B).



B mTRPC4

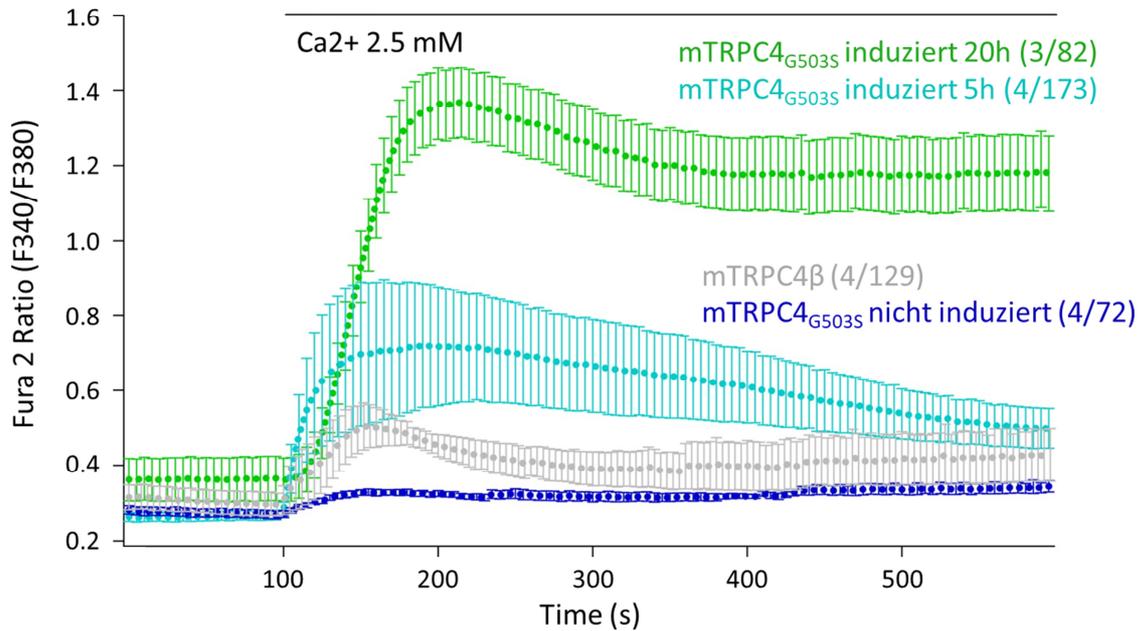
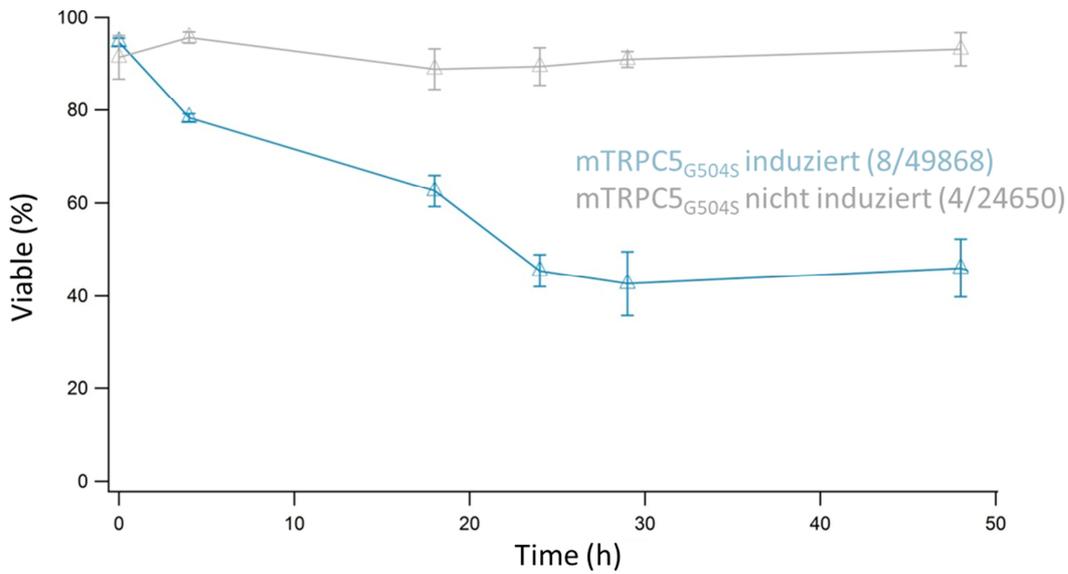


Abbildung 4-9: Der Ca^{2+} Einstrom in den induzierbaren mTRPC5_{G504S} und mTRPC4_{G503S} Zelllinien nimmt mit der Zeit nach Induktion zu. Intrazelluläre Ca^{2+} Signale in Flp-In T-Rex mTRPC5_{G504S} (A) und Flp-In T-Rex mTRPC4_{G503S} (B) Zellen, 5 und 18 h (A) bzw. 5 und 20 h (B) nach Induktion mit Tetrazyklin. Als Kontrollzellen, wurden nicht induzierte Flp-In T-Rex mTRPC5_{G504S} (A) bzw. Flp-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen (B) verwendet, sowie HEK Zellen die stabil den Wildtyp des jeweiligen Kanals exprimieren (A, mTRPC5; B, mTRPC4 β). Die Zellen wurden mit Fura-2-AM geladen und in nominell Ca^{2+} freier Badlösung gehalten (B1 Puffer). Nach 100 Sekunden wurde 2.5 mM extrazelluläres Ca^{2+} hinzugegeben. Die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration wurde als Fura-2 Fluoreszenzratio (F_{340}/F_{380}) gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus jeweils n Experimenten mit insgesamt x Zellen (n/x).

Mit den stabilen Flp-In T-Rex mTRPC5_{G504S} und Flp-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zelllinien wurden anschliessend durchflusszytometrisch Viabilitäts- bzw. Apoptose-Versuche durchgeführt (s. 3.2.3) um den Anteil der toten bzw. der lebenden Zellen unter verschiedenen Bedingungen (Zeit nach Induktion, Dosis-abhängiger Effekt von SKF96365 oder Lanthan) zu quantifizieren (Abbildung 4-10 A,B, 4-11 A,B und 4-12 A,B). Die Experimente wurden bei einer physiologischen extrazellulären Ca^{2+} Konzentration von etwa 2 mM im Kulturmedium durchgeführt.

Wie in Abbildung 4-10 zu erkennen ist nimmt der prozentuale Anteil der nicht-apoptotischen (viablen) Flp-In T-Rex Zellen nach Induktion der mTRPC5_{G504S} (A) bzw. mTRPC4_{G503S} Expression (B) mit der Zeit signifikant ab und beträgt 48 h nach Induktion in beiden Zelltypen nur noch ca. 40%. In der Kontrollpopulation (nicht induzierte Flp-In T-Rex mTRPC5_{G504S} (A) und Flp-In T-Rex mTRPC4_{G503S} (B) Zellen) konnte im Verlauf der 48 h dagegen keine Veränderung der Überlebensrate festgestellt werden.

A mTRPC5_{G504S}



B mTRPC4_{G503S}

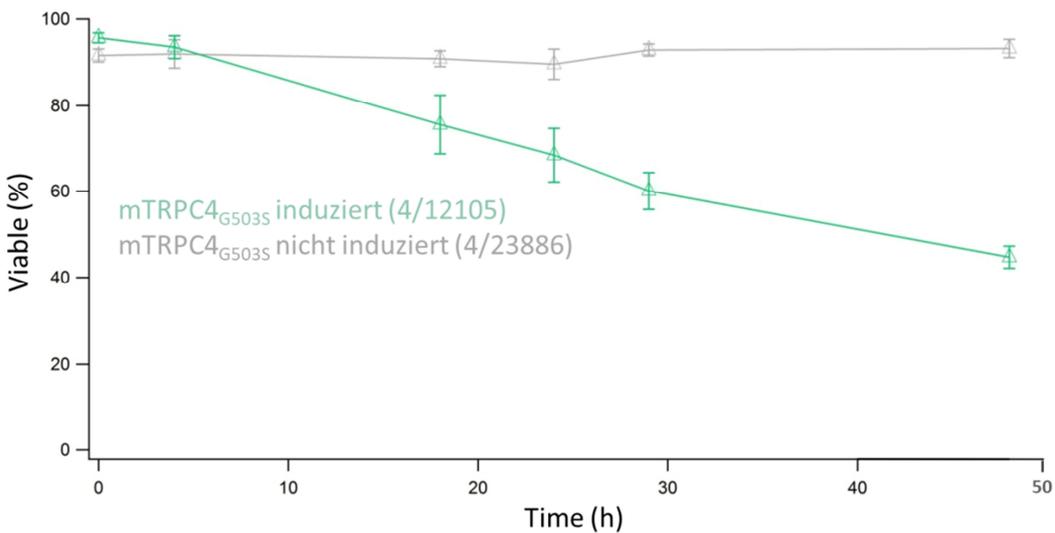
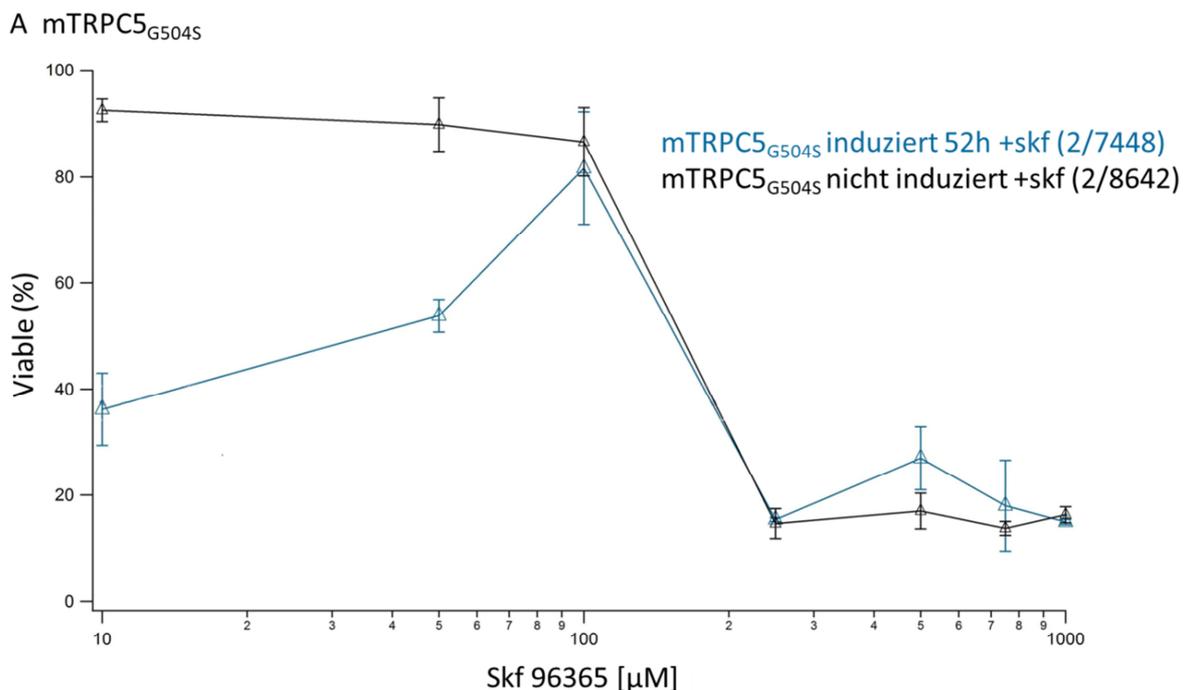


Abbildung 4-10: Die Expression von mTRPC5_{G504S} und mTRPC4_{G503S} führt zu einem vermehrten Zellsterben. Prozentualer Anteil von lebendigen (nicht-apoptotischen) Zellen nach unterschiedlich langer Induktion (0, 3, 18, 24, 29 und 48 h) von stabilen Flp-In T-Rex mTRPC5_{G504S} (A) und Flp-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen (B). Als Kontrolle wurden nicht induzierte Flp-In T-Rex mTRPC5_{G504S} (A) und Flp-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen (B) verwendet. Die adhärennten Zellen sind vor Durchführung der Experimente 48 h bei 37°C auf einer 96-Well Platte gewachsen, wurden mit Trypsin vom Untergrund abgelöst, mit dem Guava ViaCount Reagenz gefärbt und mit dem Durchflusszytometer Guava EasyCyte 8HT gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus jeweils n Experimenten (bzw. 96-Well Platten Wells) mit insgesamt x analysierten Zellen (n/x).

SKF96365 inhibiert die Calciumaufnahme in die Zelle durch Blockade verschiedener Ca^{2+} permeabler Ionenkanäle, darunter auch TRP Kanäle (Singh et al., 2010). Wachsen die mTRPC5_{G504S} bzw. mTRPC4_{G503S}-exprimierenden Flp-In T-Rex Zellen nach Induktion mit Tetrazyklin für 56 h in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von SKF96365, so zeigt sich sowohl in den Flp-In T-Rex mTRPC5_{G504} (Abb. 4-11A) als auch in den Flp-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen (Abb. 4-11B) bei Konzentrationen zwischen 50 und 100 μM SKF96365 eine signifikante Abnahme der Apoptoserate, d. h. es sind mehr überlebende Zellen vorhanden. Allerdings sinkt die Überlebensrate sowohl der induzierten als auch der nicht-induzierten (Kontrolle) Flp-In T-Rex mTRPC5_{G504} (Abb. 4-11A) und Flp-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen (Abb. 4-11B) signifikant bei Inkubation höhere Konzentrationen von SKF96365. Dies weist darauf hin, dass bei Konzentrationen zwischen 50 und 100 μM SKF96365 sehr wahrscheinlich durch Inhibition der konstitutiv aktiven mTRPC5_{G504S} und mTRPC4_{G503S} Kanäle die Überlebensrate der Zellen gesteigert wurde, wohingegen höhere Konzentrationen von SKF96365 vermutlich toxisch für die Zellen sind, so dass die Überlebensrate sowohl der induzierten als auch der nicht-induzierten FLP-In T-Rex Zellen signifikant reduziert war (Abb. 4-11).



B mTRPC4_{G503S}

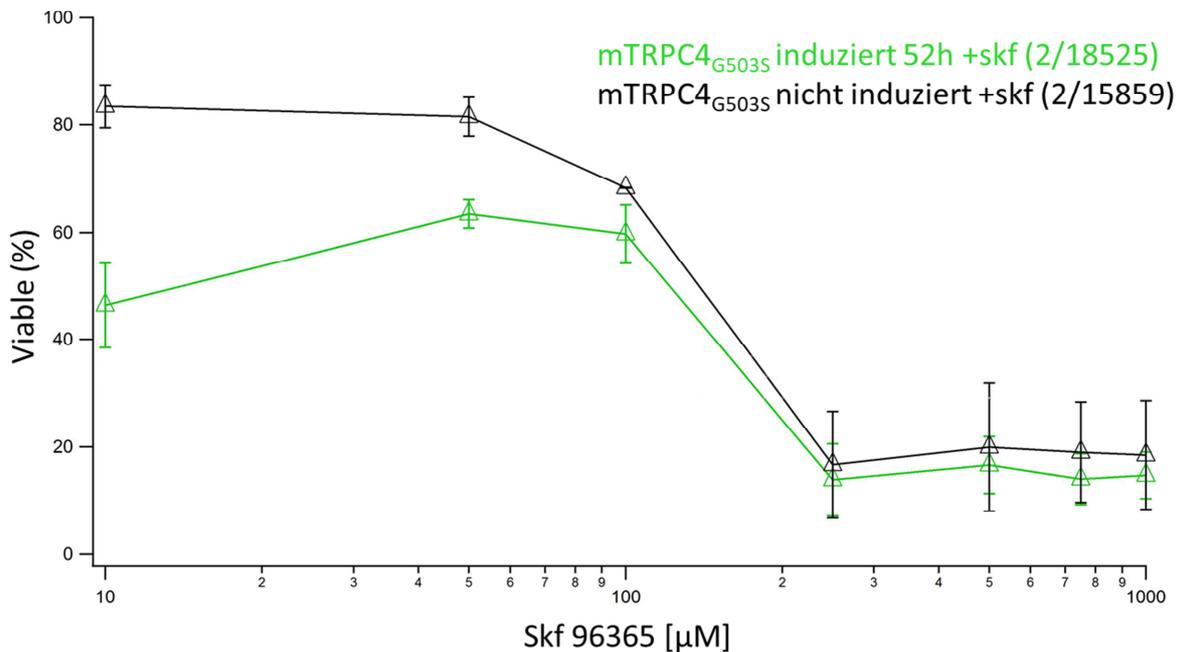
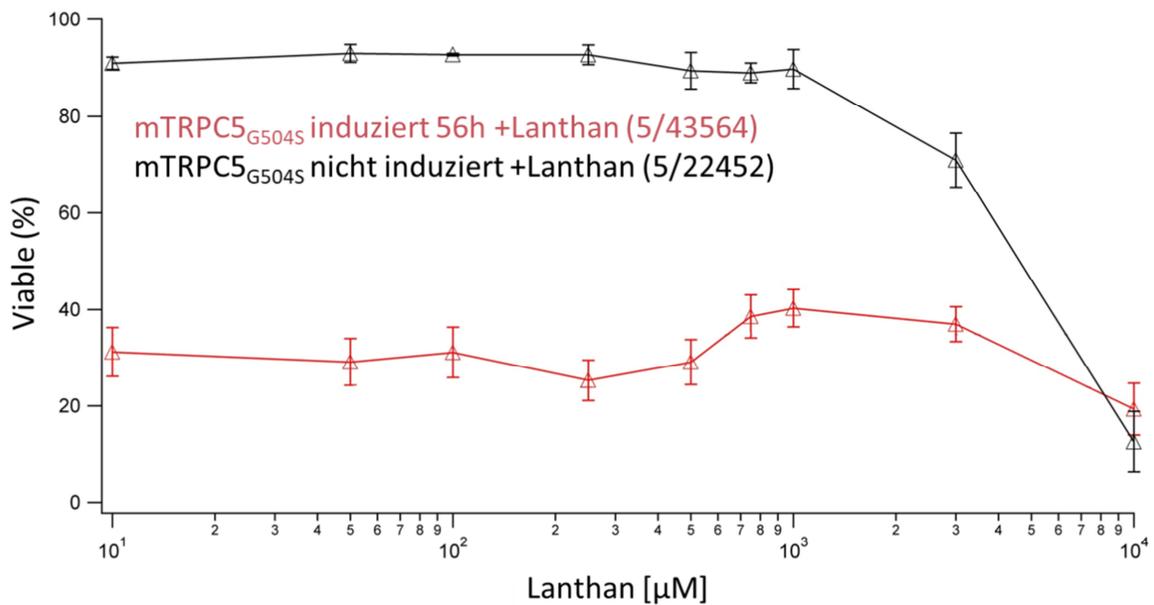


Abbildung 4-11: 50-100 µM SKF96365 erhöht die Überlebensrate von mTRPC5_{G504S} und mTRPC4_{G503S}-exprimierenden Zellen. Prozentualer Anteil von lebendigen (nicht-apoptotischen) FLP-In T-Rex mTRPC5_{G504S} (A) und FLP-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen (B) 56 h nach Induktion mit Tetrazyklin und Inkubation in verschiedenen Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM und 1000 µM) von SKF96365. Als Kontrolle wurden nicht induzierte FLP-In T-Rex mTRPC5_{G504S} (A) und FLP-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen (B) verwendet. Die adhärenen Zellen sind vor Durchführung der Experimente 56 h bei 37°C auf einer 96-Well Platte gewachsen, wurden mit Trypsin vom Untergrund abgelöst, mit dem Guava ViaCount Reagenz gefärbt und mit dem Durchflusszytometer Guava EasyCyte 8HT gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte ±S.E.M. aus jeweils n Experimenten (bzw. 96-Well Platten Wells) mit insgesamt x analysierten Zellen (n/x).

Ein anderer Inhibitor von TRP Kanälen ist das dreiwertige Kation Lanthan (La^{3+}). Wird dem Kulturmedium verschiedene Konzentrationen von Lanthan zugesetzt, so zeigt sich sowohl in den FLP-In T-Rex mTRPC5_{G504S} als auch in den FLP-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen 56 h nach Induktion durch Tetrazyklin und Inkubation mit Lanthan im Konzentrationsbereich zwischen 500 und 1000 µM eine leichte Abnahme der Todesrate (Abb. 4-12A und Abb. 4-12B). Es ist bekannt, dass La^{3+} in diesem Konzentrationsbereich z.B. TRPC5 Einwärtsströme blockiert (Jung et al. 2003). Höhere Konzentrationen von Lanthan (> 1 mM) führen, ebenso wie hohe Konzentrationen von SKF96365 (Abb. 4-12) zu einem vermehrten Zellsterben, sowohl in induzierten als auch nicht-induzierten FLP-In T-Rex mTRPC5_{G504S} und FLP-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen (Abb. 4.12).

A mTRPC5_{G504S}



B mTRPC4_{G503S}

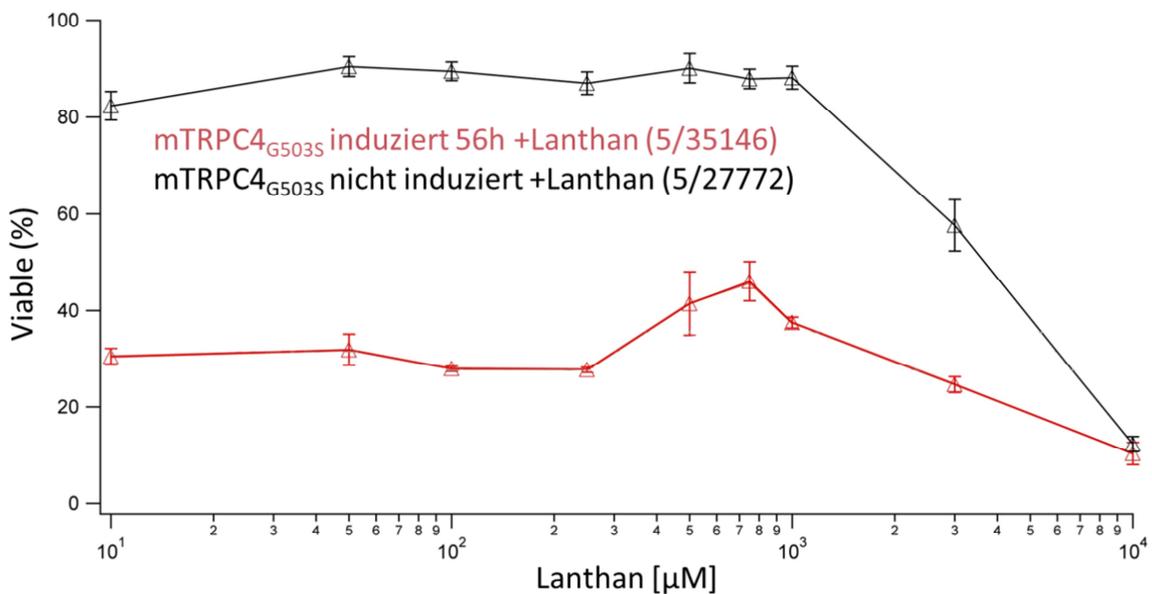


Abbildung 4-12: 0.5-1 mM La³⁺ erhöht die Überlebensrate von mTRPC5_{G504S} und mTRPC4_{G503S}-exprimierenden Zellen. Prozentualer Anteil von lebendigen (nicht-apoptotischen) FLP-In T-Rex mTRPC5_{G504S} (A) und FLP-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen (B) 56 h nach Induktion mit Tetrazyklin und Inkubation in verschiedenen Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM, 1 mM, 3 mM, 10 mM) von Lanthan (La³⁺). Als Kontrolle wurden nicht induzierte Flp-In T-Rex mTRPC5_{G504S} (A) und Flp-In T-Rex mTRPC4_{G503S} Zellen (B) verwendet. Die adhärenen Zellen sind vor Durchführung der Experimente 56 h bei 37°C auf einer 96-Well Platte gewachsen, wurden mit Trypsin vom Untergrund abgelöst, mit dem Guava ViaCount Reagenz gefärbt und mit dem Durchflusszytometer Guava EasyCyte 8HT gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte ±S.E.M. aus jeweils n Experimenten (bzw. 96-Well

Platten Wells) mit insgesamt x analysierten Zellen (n/x). Die gestrichelte Linie gibt jeweils den Gesamtdurchschnitt an lebendigen Zellen nach Induktion an.

Die bisherigen Experimente weisen darauf hin, dass sowohl die Mutation G504S in mTRPC5 als auch G503S in mTRPC4 zu einer konstitutiven Aktivität der entsprechenden Kanäle führt. Durch diese konstitutive Aktivität kommt es zu einem dauerhaften Ca^{2+} Einstrom in die Zelle, der die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration langfristig erhöht. Die Zellen gehen anschliessend sehr wahrscheinlich aufgrund der Ca^{2+} Überladung in Apoptose und sterben ab.

Die G zu C Mutationen führte in TRPC5 ebenfalls zu einem erhöhtem Kalziumeinstrom (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Die G506S Mutation in TRPC1 hat keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen

Auch im mTRPC1 Kanal wurde das konservierte Glyzin im S4-S5 Linker wie unter 3.2.1.1 beschrieben durch ein Serin bzw. Cystein ersetzt. TRPC1 ist das erste TRPC Protein bei dem diskutiert wurde, ob es sich um einen Ionenkanal handeln könnte (Zitt et al. 1996). Allerdings führt eine Überexpression von mTRPC1 z.B. in HEK293 Zellen experimentell zu keinem von Basalströmen unterscheidbaren messbaren Strom (Lintschinger et al. 2000; Strübing et al. 2001). Möglicherweise wäre mTRPC1 ein funktionsfähiger homotetramerer Kanal, jedoch fehlt der entsprechende Agonist. Die G506S Mutation könnte den Kanal möglicherweise öffnen wie bei mTRPC5 und mTRPC4. Ein messbares Ca^{2+} Signal bzw. ein messbarer Strom wären der Beweis für einen funktionsfähigen homomeren mTRPC1 Kanal.

Zunächst wurden stabile Zelllinien mithilfe des mTRPC1_{G506S} pcDNA5/FRT/TO Konstruktes generiert (PD Dr. Ulrich Wissenbach, Dr. Stephan Philipp und Heidi Löhr). Anschließend wurden Ca^{2+} Imaging Experimente mit der generierten stabilen FLP-In T-Rex mTRPC1_{G506S} Zelllinie durchgeführt. Hier zeigte sich jedoch kein vermehrter zytosolischer Ca^{2+} Anstieg 18 h nach Induktion mit Tetrazyklin bei Zugabe von 2.5 mM extrazellulärem Ca^{2+} (Abb. 4-13). Die Ca^{2+} Messungen waren von denen nicht-induzierter FLP-In T-Rex mTRPC1_{G506S} Zellen nicht zu unterscheiden. Demnach konnte keine konstitutive Aktivität des mTRPC1_{G506S} Kanals nachgewiesen werden.

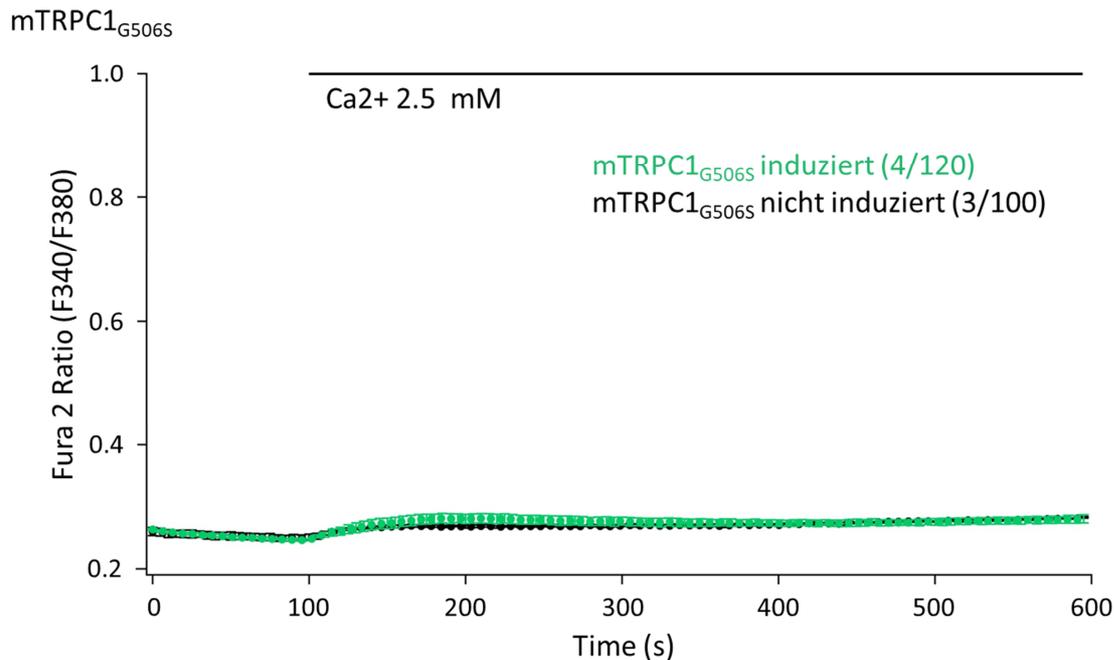


Abbildung 4-13: Zellen mit mTRPC1_{G506S} Mutation zeigen keinen vermehrten Ca²⁺ Einstrom. Die stabil induzierbaren FLIP-In T-Rex mTRPC1_{G506S} Zellen wurden mit Tetrazyklin für 18 h induziert. Zur Kontrolle wurden nicht induzierte Zellen unter den gleichen Bedingungen verwendet. Nach 100 Sekunden wurde 2.5 mM extrazelluläres Ca²⁺ hinzugegeben. Die Änderung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration wurde als Fura-2 Fluoreszenzratio (F₃₄₀/F₃₈₀) gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte ±S.E.M. aus jeweils n Experimenten mit insgesamt x Zellen (n/x).

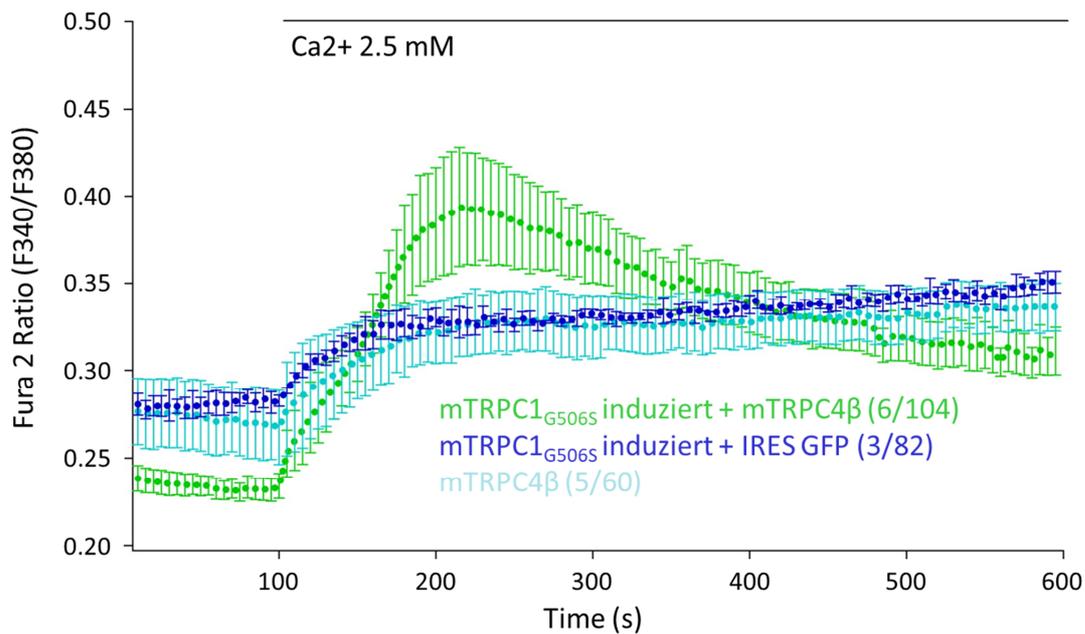
In einer weiteren Serie von Experimenten wurde mTRPC1_{G506S} mit mTRPC4 β bzw. mTRPC5 koexprimiert. Da für den mTRPC1_{G506S} Kanal in dem in Abbildung 4-13 dargestellten Experimenten keine Aktivität gemessen werden konnte, wurde versucht durch die Koexpression eine ggf. mögliche Translokation des Proteins als Heteromer mit TRPC4 bzw. TRPC5 in die Zellmembran zu erreichen (Strübing et al. 2001; Storch et al. 2012).

Tatsächlich konnte nach Expression von mTRPC4 β in FLP-In T-Rex mTRPC1_{G503S} Zellen 48 h nach Induktion und Transfektion ein signifikant erhöhter Ca²⁺ Einstrom im Vergleich zu FLP-In T-Rex mTRPC1_{G503S} Zellen, die mit IRES-GFP transfiziert wurden bzw. im Vergleich zu HEK293 Zellen, die lediglich stabil mTRPC4 β exprimieren gemessen werden (Abb. 4-14A). Zu erklären wäre dies z.B. durch eine subzelluläre Translokation eines homomeren mTRPC1_{G506S} Kanals, der dann eine gewisse konstitutive Aktivität besitzt oder alternativ einer Heterotetramerisierung von mTRPC1_{G506S} mit mTRPC4 β Untereinheiten, wobei der heteromere Kanal dann konstitutive aktiv wäre.

Im Vergleich zu den mit mTRPC4 β transfizierten Zellen weisen die mit mTRPC5 transfizierten Zellen alle einen stärkeren Ca²⁺ Anstieg bei Zugabe von 2.5 mM

extrazellulärem Ca^{2+} auf (Abb. 4-14). In zahlreichen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass nach heterologer Expression TRPC5 eine schwache konstitutive Aktivität besitzt (Zholos et al. 2014). Die Expression von mTRPC5 (C5_{WT}) in FLP-In T-Rex mTRPC1 $_{\text{G506S}}$ Zellen zeigte jedoch keinen zusätzlichen intrazellulären Ca^{2+} Anstieg 48 h nach Induktion und Transfektion (Abb. 4-14B). Der zytosolische Ca^{2+} Anstieg nach Zugabe von 2.5 mM Ca^{2+} fiel in induzierten FLP-In T-Rex mTRPC1 $_{\text{G506S}}$ Zellen nach Transfektion mit mTRPC5 cDNA, stabil mTRPC1-exprimierenden HEK293 Zellen mit und ohne Transfektion mit mTRPC5 cDNA sowie in HEK293 Zellen, die stabil mTRPC5 exprimieren vergleichbar hoch aus (Abb. 4-14B).

A



B

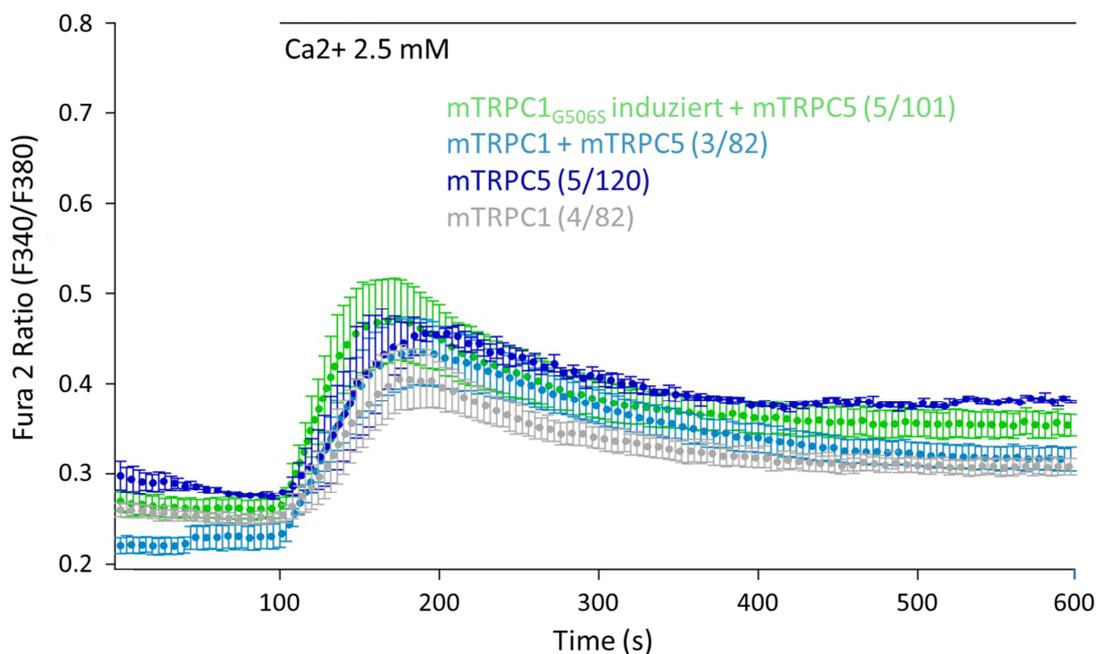


Abbildung 4-14: Koexpression von mTRPC1_{G506S} mit mTRPC4 (A) und mTRPC5 (B). Stabil TRPC1_{G506S} exprimierende FLP-In T-Rex Zellen wurden mit mTRPC4 β (A), IRES-GFP (A) bzw. mTRPC5 (B) cDNA transfiziert und 48 h nach Induktion und Transfektion zytosolische Ca²⁺ Messungen durchgeführt. Desweiteren wurden als Kontrollen stabil mTRPC4 β (A), stabil mTRPC5 (B) und stabil mTRPC1 (B) -exprimierende HEK293 Zellen, sowie stabil mTRPC1-exprimierende HEK293 Zellen, die zusätzlich mit mTRPC5 cDNA transfiziert wurden (B) verwendet. Nach 100 Sekunden wurde jeweils 2.5 mM extrazelluläres Ca²⁺ hinzugegeben. Die Änderung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration wurde als Fura-2 Fluoreszenzratio (F_{340}/F_{380}) gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus jeweils n Experimenten mit insgesamt x Zellen (n/x).

4.2.3 Kompensatorische Mutation in mTRPC4 und mTRPC5

Die Substitution des Glyzins von mTRPC4 an Position 503 bzw. von mTRPC5 an Position 504 durch ein Serin führte wie oben beschrieben zu einem konstitutiv aktiven Ionenkanal. Es ist naheliegend, dass dieses Serin im tetrameren mTRPC4 aber auch mTRPC5 Ionenkanal mit einer anderen Aminosäure interagiert und so die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöht. Um potentielle Interaktionspartner zu finden konnten wir ein strukturhomologes Modell basierend auf der bekannten Struktur des spannungsabhängigen Kaliumkanals (K_v) erstellen, der ebenfalls 6 Transmembrandomänen besitzt und dessen Struktur der von TRP Proteinen sehr ähnlich ist (Long et al. 2005) (Abb. 4-15A; Gruppe Prof. Volkhard Helms, Bioinformatik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken). Abbildung 4-15B und C zeigen die für die Mutation relevanten Segmente von mTRPC4 (Abb. 4-15B) und mTRPC5 (Abb. 4-15C). Beginnend mit dem S4-S5 Linker, über das Transmembransegment S5 (Gelb), die Pore (Orange) bis zum distalen Anteil von S6 (Rot). Aufgrund des Modells lässt sich ein möglicher Kontakt des S4-S5 Linkers zum distalen Ende vom Transmembransegment S6 des gleichen Proteins und eventuell zu den Helices S5 und S6 der benachbarten Untereinheiten vermuten. Das Glyzin 503 in mTRPC4 hat einen Abstand von 8 Ångström (Abbildung 4-15 B) von einem Serin in Position 623. Dieses befindet sich im Model am distalen Ende der Transmembrandomäne S6 des TRPC4 Kanals. Wird das Glyzin an der Stelle 503 durch ein Serin ersetzt, so könnte eine Wasserstoffbrückenbindung oder ein direkter Kontakt zwischen den beiden polaren Aminosäuren (Glyzin 503 und Serin 623) zu einer Interaktion der Aminosäurereste und somit einer Änderung der strukturellen Konformation des Moleküls führen. Somit könnte sich die Position des S4-S5 Linkers und die des distalen Anteils von S6 so verändern, dass der Kanal in eine offene Konformation gezwungen wird. Falls diese Hypothese zutrifft, sollte der Austausch des Serins an der Stelle 623 durch ein Alanin diese Konformationsänderung verhindern und somit den Einfluss der Glyzin 503 Mutation im mTRPC4 Kanal rückgängig machen.

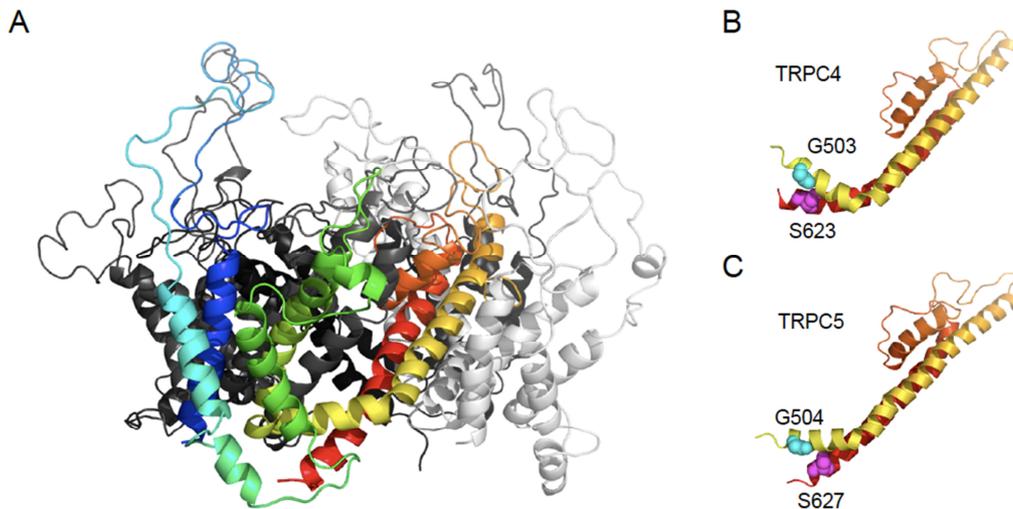


Abbildung 4-15: Die dreidimensionale Struktur des mTRPC4 und mTRPC5 Kanals. (A) Ein Homologiemodell von mTRPC4 wurde auf Basis der bekannten Struktur des spannungsabhängigen Kaliumkanals (K_v) erstellt. Dazu wurden die Primärsequenzen aus der Uniprot Database benutzt (<http://www.uniprot.org>). Als Template für das Homologiemodell wurde die Kristallstruktur 3LUT des $K_v1.2$ Kanals aus der Proteindatenbank <http://www.pdb.org> verwendet. Initial wurde die Struktur der Transmembrandomänen von jedem TRP Kanal mit dem TOPCONS Server vorhergesagt (Tsirigos et al., 2015). Dann wurden die Sequenzen, welche die Konsensregion der Transmembrandomäne repräsentieren als Input für ein Multiple Sequence Alignment zwischen Target Protein und 3LUT Template (Chen et al., 2010) verwendet. Dies wurde mit dem Programm ClustalW2 durchgeführt (Larkin et al., 2007). Das Programm Jalview (Procter et al., 2021) wurde verwendet um das resultierende Alignment zu inspizieren und es vom MSA in das Dateiformat pir zu konvertieren. Schließlich wurden dreidimensionale Modelle mithilfe des Modeller9 Pakets (Webb et al., 2016) erstellt. Für jede TRP Sequenz wurden 15 Modelle berechnet. Das Modell mit dem besten DOPE Score wurde verwendet um es mithilfe von Modeller weiter zu verfeinern. B und C zeigen die räumliche Nähe des mutierten Glyzins zum Serin623 im Falle von mTRPC4 und Serin 627 im Falle von mTRPC5. (Abbildung entnommen aus Beck et al., 2013)

Das Serin S623 im mTRPC4 Kanal wurde in der $mTRPC4_{G503S}$ Mutante durch ein Alanin ersetzt, sodass eine Doppelmutante entstand (PD Dr. Ulrich Wissenbach). Diese wurde transient ($mTRPC4_{G503S+S623A}$ -pCAGGS-IRES-GFP) in HEK293-M₂R Zellen exprimiert und es wurde wie oben beschrieben der Anteil der lebenden und toten Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 4-16). Wie in Abbildung 4-16 zu erkennen ist, hat die Expression der Doppelmutante $mTRPC4_{G503S+S623A}$, im Gegensatz zur $mTRPC4_{G503S}$ Mutation (siehe Abb. 4-10B), keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Als Kontrolle wurden die nicht-grünen Zellen aus der entsprechenden Transfektion verwendet.

HEK293-M2R

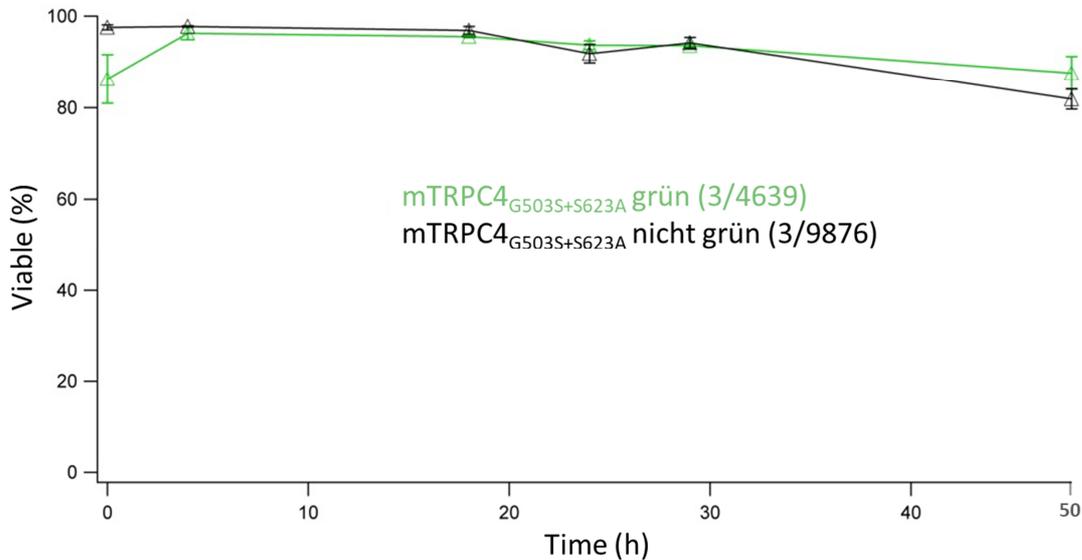


Abbildung 4-16: Die Expression von mTRPC4_{G503S+S623A} hat keinen Einfluss auf die Viabilität von Zellen. Prozentualer Anteil von lebenden (nichtapoptotischen) Zellen 0, 4, 18, 24, 29 und 48 h nach Transfektion von HEK293-M₂R Zellen mit mTRPC4_{G503S+S623A}-IRES-GFP. Nicht-grüne Zellen dienten als Kontrolle. Die adhärenenten HEK293-M₂R Zellen sind vor Durchführung der Experimente 48 h bei 36°C auf einer 96-Well Platte gewachsen, wurden mit Trypsin vom Untergrund abgelöst, mit dem Guava ViaCount Reagenz gefärbt und mit dem Durchflusszytometer Guava EasyCyte 8HT gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte ±S.E.M. aus jeweils n Experimenten (bzw. 96-Well Platten Wells) mit insgesamt x analysierten Zellen (n/x).

Des Weiteren wurden Ca²⁺ Imaging Experimente, Westernblot und Oberflächenbiotinylierungen durchgeführt, um nachzuweisen, dass das mTRPC4_{G503S+S623A} Protein in der Zellmembran zu finden ist (Dr. Christof Störger). Auch konnten in Fura-2 Ca²⁺ Imaging Experimenten (PD Dr. Ulrich Wissenbach) und Whole-Cell Patch-Clamp Experimenten (Dr. Andreas Beck) kein vermehrter Ca²⁺ Anstieg bzw. Ganzzellstrom, der auf eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des mTRPC4_{G503S+S623A} Kanals hindeutet nachgewiesen werden. Der mTRPC4_{G503S+S623A} Kanal konnte wie Wildtyp mTRPC4 β nach wie vor durch Applikation von Carbachol (Agonist an endogenen M₃ und stabil in den HEK Zellen exprimierten M₂ Rezeptoren) stimuliert werden.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die zweite Mutation S623A am distalen S6 Segment von mTRPC4, den Effekt der G503S Mutation im S4-S5 Linker von mTRPC4, d. h. die konstitutive Aktivität, wieder aufhebt. Somit ist eine Interaktion zwischen S4-S5 Linker und distalem S6 Segment wichtig für das Öffnen und Schließen des mTRPC4 Ionenkanals.

Die zuletzt beschriebenen Experimente wurden von den erwähnten Personen durchgeführt und sind, wie weitere Patch-Clamp Experimente (Dr. Andreas Beck), die die

Ergebnisse meiner Arbeit (4.2.1-4.2.3) bestätigen, in Beck et al., 2013, mit mir als Ko-Erstautor zusammengefasst und publiziert.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte eine zu TRPV3 korrespondierende Punktmutation (G573S in Maus und Mensch) im S4-S5 Linker, die zu einem konstitutiv aktiven Ionenkanal führt, in die cDNAs von mTRPC1 (G506S), mTRPC4 (G503S) und mTRPC5 (G504S) eingefügt werden. Es sollte überprüft werden, ob die Mutation im S4-S5 Linker auch hier zu konstitutiv offenen Kanälen führt. Im Falle einer konstitutiven Aktivität bieten die klonierten Mutanten die Möglichkeit zu weiterführenden Experimenten (z.B. einer knock-in Maus) um die physiologische Rolle der Proteine besser zu verstehen. Die Hypothese konnte im Fall von mTRPC4 und mTRPC5 anhand von Fura-2 Calcium Messungen, durchflusszytometrischen Viabilitäts- bzw. Apoptose-Untersuchungen und Patch Clamp Experimenten (Dr. Andreas Beck) bestätigt werden. Im Fall von mTRPC1 zeigte sich kein Hinweis auf eine konstitutive Aktivität der G zu S Mutation, allerdings konnte bei Koexpression von mTRPC1_{G506S} mit mTRPC4 β ein gering erhöhter Kalziueinstrom gemessen werden. Die mTRPC4 Doppelmutante G503S+S623A war nicht konstitutiv aktiv, somit beruht der Effekt der G503S Mutation z.B. auf einer Wasserstoffbrückeninteraktion mit S623 am distalen Transmembransegment S6.

5.1 Die Mutation G503S bzw. G504S in mTRPC4 bzw. mTRPC5 führt zu einem konstitutiv aktiven Ionenkanal

Wie im Ergebnisteil beschrieben zeigte sich nach Überexpression von mTRPC5_{G504S} bereits optisch ein vermehrtes Sterben der transfizierten Zellen. Die Hypothese war, dass die Zellen durch Ca²⁺-induzierte Apoptose wegen eines vermehrten Kalziueinstroms über die mutierten Kanäle zugrunde gehen. Nach Senkung der freien extrazellulären Ca²⁺ Konzentration des Kulturmediums über die Zugabe des Ca²⁺-Puffers EGTA, zeigten sich deutlich mehr lebendige Zellen, wodurch die Hypothese bestätigt werden konnte. Eine hohe Anzahl lebender Zellen war nur bei einer sehr geringen extrazellulären Kalziumkonzentration zu erkennen, was dafürspricht, dass ein starker Kalziumstrom in die mit mTRPC5_{G504S} cDNA transfizierten Zellen stattfindet. In den Fura2-Ca²⁺-Imaging-Experimenten (Abbildung 4-8) korreliert die Baseline vor Kalziumapplikation mit der basalen intrazellulären Ca²⁺ Konzentration. Diese war mit zunehmender Zeit nach Transfektion, und somit wahrscheinlich mit zunehmender Anzahl von membranständigen mTRPC_{5G504S} Ionenkanalproteinen, sukzessive höher. Die maximale Steigung der Fura-2 Ratio, also die intrazelluläre Ca²⁺-Änderung pro Zeit, ist ein guter Indikator für den Ca²⁺ Einstrom bezogen auf die gesamte Zelloberfläche. Auch diese nahm mit der Zeit nach Transfektion zu, was ebenfalls wahrscheinlich an der zunehmenden Membrandichte des Ionenkanals liegt. Die Peak Ratio, die erreicht wurde, korreliert mit der maximal erreichten intrazellulären Kalziumkonzentration, auch diese nahm mit der Zeit nach Transfektion zu. Zudem zeigte sich nach Applikation des

Kalziums bei den länger transfizierten Zellen ein Plateau, das zeigt, dass die Zellen nicht mehr in der Lage sind das intrazelluläre Kalzium aus der Zelle heraus zu transportieren. Diese Ergebnisse konnten anhand stabil induzierbarer mTRPC5_{G504S} und mTRPC4_{G503S} Zellen verifiziert werden (Abbildung 4-9). Hier zeigte sich, analog zur Transfektion, mit zunehmender Zeit nach Induktion ein schnellerer und höherer Ca²⁺ Anstieg. Insgesamt bestätigen die Fura-Experimente die Hypothese, dass der Kalziueinstrom und somit die Apoptose kausal durch das mTRPC5_{G504S}/mTRPC4_{G503S} Protein verursacht wurde. Die bereits subjektiv festgestellt erhöhte Apoptoserate der mTRPC5_{G504S} und mTRPC4_{G503S} exprimierenden Zellen wurde durch quantitative durchflusszytometrische Analysen des Verhältnisses von apoptotischen zu lebenden Zellen bestätigt (Abbildung 4-13), wobei die Zugabe von TRPC Inhibitoren (SKF96365 und Lanthan) die Rate der lebenden Zellen erhöhte („Rescue“ siehe Abschnitt 5.5). Das spricht dafür, dass der Inhibitionsmechanismus auf einer direkten Blockade der Pore beruht (siehe unten). Alle Experimente weisen darauf hin, dass es in den mTRPC5_{G504S} und mTRPC4_{G503S} exprimierenden Zellen ohne Stimulation zu einem massiven Ca²⁺ Einstrom kommt. Dies ist damit zu erklären, dass es sich bei der entsprechenden Mutation um eine sogenannte “gain-of-function” Mutation handelt, die im Falle der Ca²⁺-permeablen mTRPC5 und mTRPC4, wie für TRPV3 aus Maus und Mensch bei der entsprechenden Mutation beschrieben, (Lin et al. 2012; Lai-Cheong et al. 2012; Asakawa et al. 2006; Xiao et al. 2008) zu konstitutiv aktiven Ionenkanälen führt.

5.2 Das dreidimensionale Strukturmodell von spannungsabhängigen Kaliumkanälen als Vorlage für ein Modell von TRPC4 und TRPC5

Dank der Fortschritte der single-particle cryogenic electron microscopy (cryo-EM) wurden in den letzten Jahren immer mehr hochauflösende Strukturen (bis auf ca. 3 Ångström) verschiedener TRP Kanäle bekannt. TRPC Strukturen sind seit 2018 verfügbar. Die aktuellen cryo-EM Strukturen umfassen homomere TRPC3, TRPC4, TRPC5 und TRPC6 Kanäle (Duan et al. 2018; Fan et al. 2018; Vinayagam et al. 2018; Vinayagam et al. 2020; Duan et al. 2019; Tang et al. 2018; Azumaya et al. 2018; Sierra-Valdez et al. 2018) (Abb. 5-1). Zum Zeitpunkt der Experimente und der Erstellung des Homologiemodells aus den Kv1.2 Daten lagen noch keine Proteinstrukturen vor, deswegen wurde ein Homologiemodell auf Basis der bekannten Struktur von Kv1.2 erstellt.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten ergeben ein Modell für die Kanäle TRPC4 und TRPC5, welches zeigt, dass der im Zytosol lokalisierte S4-S5 Linker (Gaudet 2008) eine wichtige Rolle für die Regulation des Channelgatings spielt. Eine einzelne Punktmutation in diesem Linker kodiert für konstitutiv aktive Kanäle.

Die dreidimensionale Struktur des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.2 ist bekannt (Chen et al. 2010). Die grundlegende Struktur von TRP- Kanälen ist ähnlich zu der der Kv

Kanäle. Beide entstehen durch eine Zusammenlagerung von vier Untereinheiten mit je 6 Transmembrandomainen (α -Helices). Zudem umfasst bei den Proteinen der zytoplasmatische N-terminus jeweils die C-Termini. Die Kv Proteine besitzen mehrere positive Aminosäuren in S4, die je nach Spannung über der Membran den „offen“ Zustand der Pore regulieren. Die ersten 4 (S1-S4) α - Helices der mTRPC- Kanäle sind dabei ähnlich zu der Spannungssensordomain (voltage sensor domain) von Kv Kanälen, aber auch zu der Domäne von spannungsabhängigen Na^+ und Ca^{2+} Kanälen. Die beiden anderen α -Helices (S5-S6) formen eine evolutionär konservierte Ionenpore, die bei allen TRP-Kanälen, spannungsabhängigen Kanälen und verschiedenen K^+ sowie Na^+ Kanäle zu finden ist (Kuang et al. 2015; Payandeh et al. 2011; Huffer et al. 2020). Die beta- Untereinheiten von Kaliumkanälen sind akzessorische Proteine und nicht zwangsläufig Membranintegriert (Chen et al. 2010). Etwas vergleichbares gibt es bei TRP Kanälen nicht, es findet hier jedoch eine Heteromerisierung statt. Zwischen S1-S4 und S5-S6 befindet sich der S4-S5 Linker in dem sich die untersuchte Punktmutation befindet.

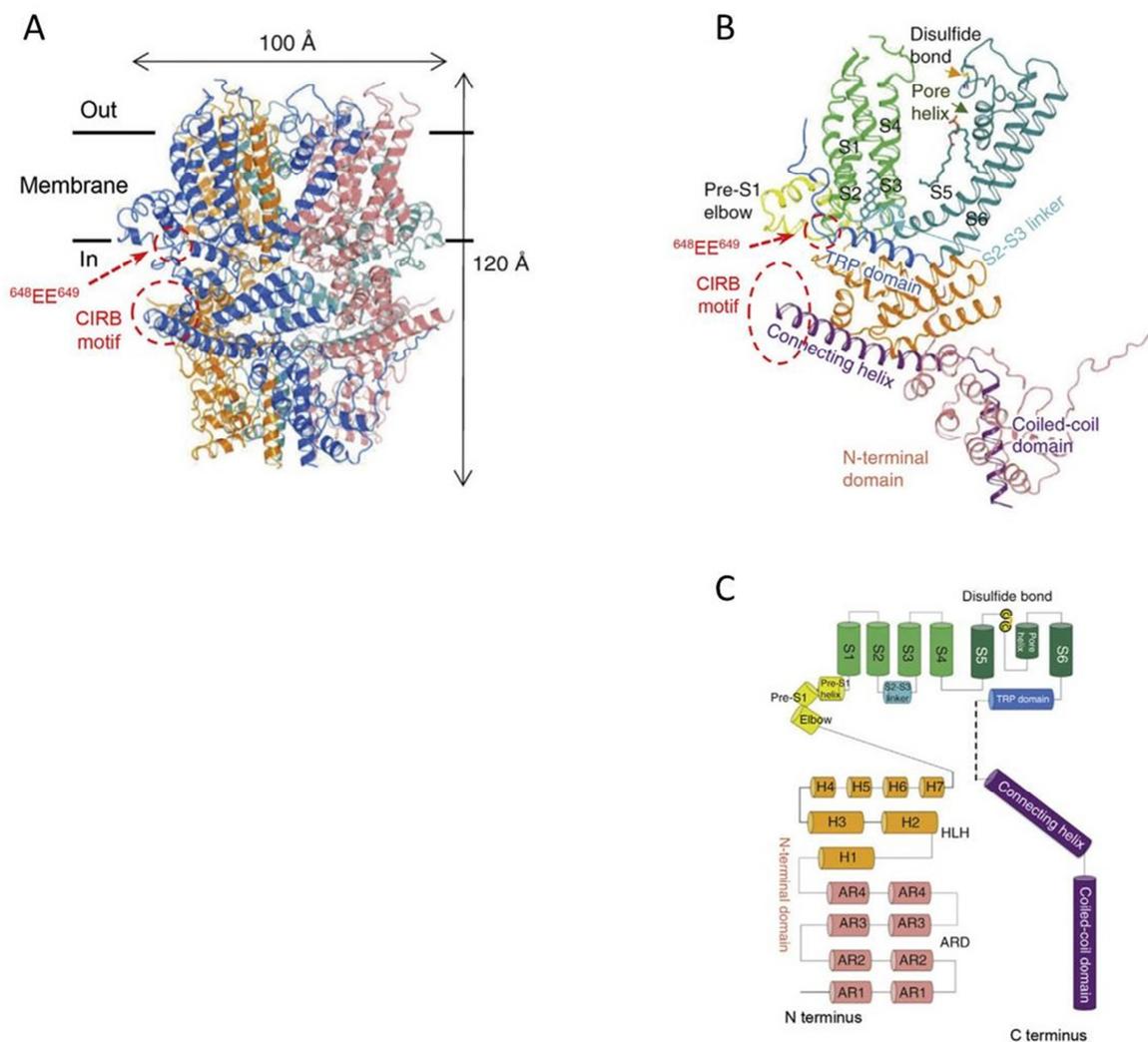


Abbildung 5-1: Struktur eines TRPC4 Proteins (B, C) und Kanals (A). Ein Kanal besteht aus 4 Untereinheiten (Wang et al., 2020).

Alle TRPC Strukturen enthalten eine helikale, sogenannte „preS1-elbow“ Region vor der S1 Helix (Duan et al. 2018; Vinayagam et al. 2018; Duan et al. 2019). Diese Region ist zum Teil in der Membran eingebettet, das N-terminale Ende befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite und ist mit eng gefalteten Linker-Helices verbunden. Unmittelbar N-terminal von diesen Linker-Helices befinden sich vier sogenannte „ankyrin-like repeats (AR)“ welche die Peripherie des zytoplasmatischen Anteils des Proteins bilden und die weit C-terminal gelegene, als „second C-terminal Helix (CH2)“ bezeichnete Region umschließen. N-terminal vor der CH2 Domäne befindet sich die CH1 Domäne (auch als „connecting helix“ oder „rib helix“ bezeichnet) (Azumaya et al. 2018; Tang et al. 2018; Duan et al. 2018; Duan et al. 2019). Die CH1 Domäne verläuft anti-parallel zu der sogenannten TRP-Domäne, die wahrscheinlich kritisch für das Kanal gating ist. Zwischen der TRP und CH1 Domäne befindet sich eine sogenannte „TRP re-entrant Helix“, die zur Hälfte in die Zellmembran eingebettet ist und in manchen Fällen eher wie ein kurzer Loop als eine Helix aussieht (Duan et al. 2019; Tang et al. 2018) sowie eine kurze nicht aufgelöste Region im zytoplasmatischen Anteil. Das C-terminale Ende der nicht aufgelösten Region und der Beginn der CH1 Domäne enthalten das charakteristische CIRB („Calmodulin und IP3-Receptor Binding“) Motif, das man in allen TRPC Isoformen inklusive der bei Wirbellosen vorkommenden TRP und TRPL (Tang et al. 2001; Zhang et al. 2001) findet. Hier befindet sich ein Hotspot für die Regulation des Proteins. Dabei ist denkbar, dass die Bindung des CIRB-Motifs mit seinen Partnern die CH1 Domäne wie einen Hebel bewegt und somit Konformationsveränderungen am „Gate“ des Kanals bewirkt (Friedlova et al. 2010). Wahrscheinlich interagiert der S4-S5 Linker in dem die Punktmutation eingefügt wurde mit der TRP-Domäne und beeinflusst so das Channelgating (zum Beispiel durch eine verminderte Flexibilität). Tatsächlich konnten wir im Fall von TRPC4 Anhand der Doppelmutante G504SS623A (siehe unten und Abschnitt 4.3.2) zeigen, dass die konstitutive Aktivität (zumindest partiell) durch eine Interaktion der Aminosäuren S504 und S623 zustandekommt. Das Serin 623 befindet sich im distalen Anteil von S6 und somit in der Nähe der TRP-Domäne, was eine regulatorische Interaktion der beiden Domänen nahelegt. Wahrscheinlich werden hochaufgelöste Strukturen im „offen“ Zustand und Strukturen inklusive den (CIRB) Bindungspartnern Einblicke darin ermöglichen, wie die relative Bewegung zwischen CH1, TRP-Domäne und S4-S5 Linker das Kanal gating genau beeinflussen (Abb. 5-2).

Der oben beschriebene „pre-S1 Elbow“ und die „pre-S1 Helix“ ziehen die intrazelluläre Hälfte von der S1-Transmembran-Helix vom Porezentrum weg und somit werden die intrazelluläre Hälfte der S4 Helix und des S4-S5 Linkers der Plasmamembranlipidumgebung exponiert. Dies könnte wichtig für das lipidabhängige Gating sein. In der TRPC3 Struktur wurden auch entsprechende Lipide gefunden, allerdings war die Auflösung nicht hoch genug um diese detaillierter zu charakterisieren (Fan et al. 2018). Eins von diesen Lipiden

interagiert tatsächlich mit dem pre-S1 Elbow, S1, S4 und dem S4-S5 Linker von TRPC3 und eine hier lokalisierte Mutation (T561A in S4) erhöht die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals einhergehend mit cerebellärer Ataxie in Mäusen (siehe 2.2.3 TRP-assoziierte Erkrankungen; (Becker et al. 2009)). Hier wurde initial bei der Mutante ein Fehlen der regulatorischen Phosphorylierung durch PKC γ als Mechanismus vorgeschlagen. Ein zweites Lipid wurde zwischen dem P-Loop und der S6 Domäne des benachbarten Protomers gefunden. Weil das G640 in S6 direkt mit dem Hydrocarbonschwanz des Lipids interagiert und kritisch für das Gating von TRPC3 ist, könnte diese Stelle durch die Lipide von extrazellulär im Sinne einer Kanalaktivierung beeinflusst werden. Lipide wurden auch in anderen TRPC Strukturen gefunden und als Cholesterylhemisuccinat sowie Phosphatidsäure identifiziert (Duan et al. 2018; Tang et al. 2018; Vinayagam et al. 2018).

Auch bei Kv Kanälen spielen Lipide eine Rolle für das Gating. Diese sind in enger Lagebeziehung zur Spannungssensordomäne und zur Porendomäne zu finden. Die Phospholipidköpfe interagieren z.B. mit positiv geladenen Resten von S4 in der aktivierten Struktur (Long et al. 2007). Funktionelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Lipidzusammensetzung eine Konfigurationsänderung der Spannungssensordomäne in KvAP Kanälen bewirkt. Phospholipide sind hier notwendig um in den aktivierten Zustand überzugehen und andere Lipide stabilisieren möglicherweise die Spannungssensordomäne im Ruhezustand (Zheng et al. 2011). Somit ist das Gating von Kv Kanälen lipid- und spannungsabhängig.

Auch eine Zusammenlagerung verschiedener (alpha-) Untereinheiten zu einem Heterotetramer mit neuen funktionellen Eigenschaften sind bei TRP und Kv Kanälen möglich (Tsiokas et al. 1999; Ma et al. 2010; Schindl et al. 2012; Gaudet et al. 2008; Rubaiy et al. 2018b; Rubaiy et al. 2017a). In der tetrameren Struktur interagiert bei TRP Kanälen und bei Kaliumkanälen die spannungssensorartige Domäne eines Protomers mit der Ionenporendomäne des benachbarten Protomers. Der K_v Kanal KCNQ1 bindet z.B. die beta-Untereinheit KCNE1. Dieser Komplex ist für den langsamen Kaliumstrom im Herzen (I_{KS}) verantwortlich. Bei diesem Kanal lagern sich 1-4 KCNE1 Untereinheiten von aussen an den tetrameren KCNQ1 Komplex an, dabei ist KCNE1 zwischen S1, S4 und S6 lokalisiert. Bei dem Kanalkomplex interagiert der S4-S5 Linker (S4S5_L) mit dem S6 C Terminus (S6_T) um das spannungsabhängige Gating zu ermöglichen. In den Kanälen triggert die Bewegung des Spannungssensors die Kanalöffnung mittels "Voltage Sensor Domain – Pore Domain – Coupling" (VSD-PD Coupling). Hou et al (Hou et al. 2017) schlagen vor, dass S4 sich dabei in zwei Schritten bewegt: Die S4 Bewegung aus dem Ruhezustand in einen Zwischenstatus und die Bewegung aus dem Zwischenstatus in die vollständig aktivierte Form. Im S4-Zwischenstatus interagiert das C-terminale Ende des S4-S5 Linkers mit der Porendomäne der gleichen Subunit. Im vollständig aktivierten Zustand interagiert das N-terminale Ende des

S4-S5 Linkers mit der Porendomäne einer benachbarten Subunit. In verschiedenen Experimenten mit kurzen S4S5_L und S6_T Peptiden konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion auch in spannungsunabhängigen Mutanten des Kanals stattfindet (Choveau et al. 2011). Insgesamt ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass im ähnlichen TRPC4 Protein eine Interaktion von S4-S5 und TRP- Domäne (welche sich unmittelbar C- terminal von S6 befindet) kritisch für das Gating sind. Die Mutation L353A in S6_T resultiert in Kv Kanälen, die nicht dazu in der Lage waren sich komplett zu schließen, ein konstitutiver Strom konnte gemessen werden (Interessant wäre in diesem Kontext auch wie es sich in der vorliegenden Arbeit mit einer Mutation S623A alleine verhält, diesbezüglich wurden keine Experimente durchgeführt). Man könnte das Phänomen dadurch erklären, dass der Aminosäurerest des Leucin selbst im KCNQ1 Kanal die Pore verschließt oder alternativ durch eine Veränderung des elektromechanischen Couplings des Proteins (Labro et al. 2011). Auch die Mutation V254A im S4S5_L resultierte in konstitutiv offenen Kanälen. Die Doppelmutante L353A V254L verhielt sich wieder wie der Wildtyp- Kanal. Das neu hinzugekommene Leucin an der Stelle 254 scheint also den Effekt der Leucinentfernung an Stelle 353 rückgängig zu machen. Dies zeigt, dass die Interaktion der beiden Aminosäurereste (ähnlich wie bei der Doppelmutante G504SS623A in der aktuellen Arbeit (hier jedoch polare Aminosäuren)) dafür verantwortlich ist, den Kv Kanal im „geschlossen“ Zustand zu fixieren.

Die vier Ionenporendomänen formen bei TRP Kanälen im Zentrum des Proteinkomplexes die Pore (Li et al. 2019). Der engste Teil der Pore bzw. das „Kanalgate“ findet sich nahe des C-terminalen Endes der vier S6-Helices und besteht für beinahe alle TRPC Strukturen aus Isoleucin (I), Asparagin (N) und Glutamin (Q) aus der stark konservierten Sequenz VLLNMLIAMXNXSXQ. Eine Ausnahme ist TRPC3, in dem L654 und I658 die engste Stelle bilden (Fan et al. 2018). Die engste Stelle des Selektivitätsfilters, oberhalb des Gates, wird von einem konservierten Glyzin gebildet, das drei Aminosäuren von einem Glutamat (E630 in TRPC3 und E686 in TRPC6) entfernt ist und sich am Eingang des Selektivitätsfilters befindet. Für TRPC3 wurde gezeigt, dass dieses Glyzin kritisch für die Kalzium-Permeabilität des Kanals ist (Poteser et al. 2006). Dieser Rest ist in TRPC4 (N580) und TRPC5 (N584) durch ein Asparagin substituiert, wobei für TRPC5-N584 wurde gezeigt, dass es ebenfalls wichtig für die Kalzium-Permeabilität und die Gadolinium-Sensitivität des Kanals ist (Chen et al. 2017). In Kv Kanälen bildet ebenfalls S6 die Auskleidung der inneren Pore. Mutationen von S6 im KCNQ1 zeigten eine Änderung der Stromamplituden und eine Veränderung der Spannungsabhängigkeit (Seeböhm et al. 2005; Panaghie et al. 2006). Der generelle Aufbau der Porendomäne entspricht dem Transmembrananteil von KcsA, einem Kaliumkanal mit zwei Transmembrandomänen aus *Streptomyces lividans* (Doyle et al. 1998)

Die Sequenz TVGYG (75-79) agiert hier als Selektivitätsfilter und lässt Kaliumionen passieren. Dabei werden die Ionen sehr effizient geleitet (10^7 Ionen / Sekunde). Im

Gegensatz zu TRP- Kanälen sind die Kaliumkanäle höchst selektiv (Es werden 10000 mal mehr Kaliumionen als Natriumionen durchgelassen) (Sansom et al. 2002). Neben der hohen Selektivität und Durchlässigkeit werden Kaliumkanäle streng reguliert. Eine weitere interessante Eigenschaft von Kaliumkanälen ist, dass sie inaktiviert werden können, was bedeutet, dass sie kurz nach der Kanalöffnung in einen stabilen nichtdurchlässigen Status übergehen. Dieses Phänomen lässt sich bei TRP Kanälen nicht beobachten.

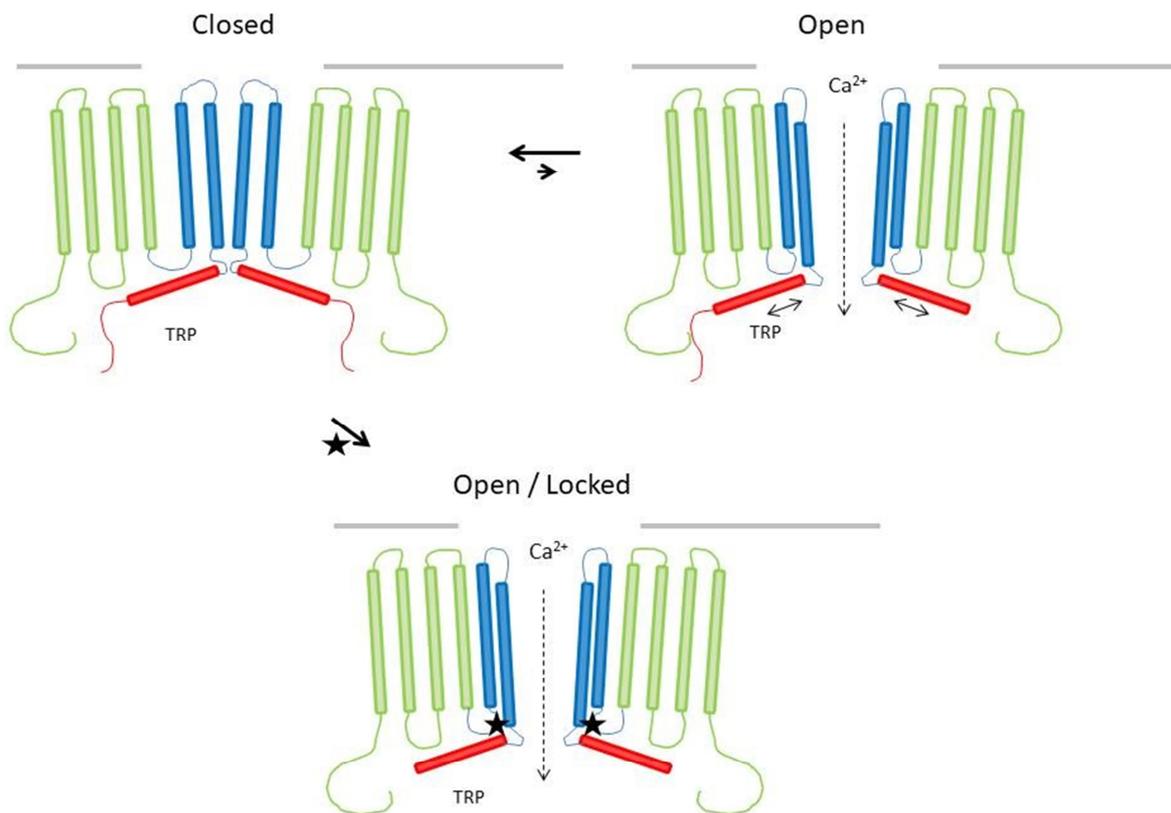


Abbildung 5-2: Die G503S Mutation im S4/S5 Linkers des TRPC4 Kanals führt zu konstitutiv offenen Kanälen. Schematischer Aufbau eines TRPC4 Kanals: ein Protomer besteht aus einer Spannungssensorartigen Domain (Grün, S1-S4) und einer zentralen Porendomain (Blau, S5-S6) TRP Kanäle können sich transient öffnen (z.B. nach Bindung eines Activators). Normalerweise erlaubt die Flexibilität des Proteins eine Rückkehr in den „geschlossen“ Zustand. Dabei spielen Bewegungen zwischen S4/S5 Linker, TRP Domäne und S6 eine Rolle. Die Mutation G503S im S4/S5 Linker fixiert den Kanal im „offen“ Zustand durch eine Interaktion mit dem Serin 623 in der distalen Transmembrandomaine S6.

Der Aufbau der TRP- und der Kv Kanäle ist also ähnlich. Daher war es möglich anhand der bekannten dreidimensionalen Struktur (Chen et al. 2010) des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.2 mittels Alignment der Proteinsequenzen ein dreidimensionales Homologiemodell von TRPC4 und TRPC5 zu berechnen (Abbildung 4-16A; Gruppe Prof. Volkhard Helms, Bioinformatik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken; zu diesem Zeitpunkt waren die dreidimensionalen Strukturen der TRPC Kanäle noch nicht verfügbar).

Dieses Modell diente in der vorliegenden Arbeit der (erfolgreichen) Vorhersage potentieller Interaktionspartner für das mutierte Glyzin 503 im TRPC4_{G503S} Protein.

Dabei wurde das Serin 623 in der Transmembrandomaine S6 als potentieller Interaktionspartner vorhergesagt (Abb. 5-2). In weiterführenden Experimenten wurde dieses Serin zu einem Alanin mutiert und so der Effekt der G503S Mutation rückgängig gemacht. Es konnte somit gezeigt werden, dass im Falle der G503S Mutation eine Interaktion mit dem Serin 623 stattfindet und dass das berechnete dreidimensionale Modell des TRPC4 Kanals valide genug ist eine solche Interaktion vorherzusagen.

5.3 Die Relevanz des S4-S5 Linkers für das Gating von TRPC4/TRPC5 und anderen TRP Kanälen

Der S4-S5 Linker von TRPC4 und TRPC5 befindet sich im Zytosol, und besteht aus der Sequenz GPLQISLGRMLLD. Dieses Sequenzmotiv ist über die verschiedenen Untergruppen von TRP Kanälen konserviert (Abbildung 2-3). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ersetzen des konservierten Glyzins durch ein polares Serin zu konstitutiv aktiven TRPC4 und TRPC5 Kanälen führt. Dieses Glyzin scheint also essentiell zu sein um den Kanal in einer „geschlossen“ Formation zu halten bzw. um in die „geschlossen“ Formation zurückzukehren. Der Kanal war vollständig offen, der Versuch ihn weiter zu stimulieren (Cch, Ca²⁺, 100µM La³⁺) (Jung et al. 2003) (Obukhov und Nowycky et al. 2008; Schaefer et al. 2002) (Beck et al. 2013) blieb ohne Erfolg.

Für den Mechanismus, durch den der Kanal konstitutiv aktiv wird, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Da mit dem neu vorhandenen Serinrest eine neue Hydroxy-Gruppe vorhanden ist, liegt eine Interaktion mit einem anderen polaren Aminosäurerest innerhalb des Moleküls nahe. Tatsächlich ist es uns gelungen anhand des Strukturmodells einen potentiellen Interaktionspartner zu identifizieren (Abbildung 4-16A; Gruppe Prof. Volkhard Helms, Bioinformatik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken; zu diesem Zeitpunkt waren die dreidimensionalen Strukturen der TRPC Kanäle noch nicht verfügbar). Das Serin 623 im distalen Anteil der S6 Domäne von TRPC4. Eine Mutation dieses Serins in TRPC4 zu einem Alanin (Dr. Ulrich Wissenbach) machte den Effekt der ursprünglichen Gain-of-Function Mutation rückgängig. Es entstand ein Kanal, der nicht mehr konstitutiv aktiv war. Trotzdem war der Kanal über die G-Protein gekoppelte Signaltransduktionskaskade aktivierbar. Der Kanal war also funktionstüchtig (Beck et al. 2013).

In weiteren Experimenten (PD Dr. Ulrich Wissenbach) wurde das Glyzin 503 im TRPC4 Kanal zu anderen diesmal non-polaren Aminosäuren mutiert (Methionin, Leuzin, Alanin) (Beck et al. 2013). Auch hier entstanden konstitutiv aktive Kanäle. Somit kann als weiterer Mechanismus eine „einfache“ Strukturänderung des Moleküls aufgrund der verschieden großen Reste diskutiert werden. Ähnlich verhält es sich auch im Falle des

spannungsabhängigen Kaliumkanals KCNQ1 (siehe oben) (Labro et al. 2011). Alternativ wäre es auch möglich, dass nur die große Flexibilität der Glyzin Peptidbindung eine entsprechende Bewegung im Molekül und so ein Schließen des TRPC4 Kanals möglich macht. Letztlich wäre auch eine Kombination verschiedener Mechanismen denkbar und ein möglicher Grund für die starke Konservierung des Glyzins.

Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Mutation des korrespondierenden Glycin 516 im TRPV6 Kanal (Hofmann et al. 2017a). Auch hier konnten konstitutiv offene Kanäle mit Fluoreszenzassays nachgewiesen werden. Im TRPV6 Kanal entspricht die Aminosäure Threonin 621 (T621) dem Serin 623 (S623) des TRPC4. Die Doppelmutante zeigte genau wie bei TRPC4 wieder einen reduzierten Kalziumeinstrom. Im Falle des Wildtyps besteht eine Interaktion von T621 mit den Seitenketten F518 und T519 des S4-S5 linkers. In der G516S Mutante interagiert der polare Serinrest möglicherweise mit anderen polaren Resten z.B. von H627, R629, D630, W633, L515 und P517. Diese Interaktionen zwingen den TRPV6 Kanal offenbar in eine „offen“ Konformation. Eine weitere Mutation D620V (distale S6 Domäne) im TRPV6 Gen führte ebenfalls zu konstitutiv offenen Kanälen. Die Doppelmutante G516S/D620V zeigte ein identisches Verhalten wie die Einzelmutanten. Die Trippelmutante G516S/D620V/T621A verhielt sich wie die Kontrolle (nicht transfizierte Zellen) obwohl das Protein nachweisbar war. Basierend auf den aktuell verfügbaren hochaufgelösten Strukturen von TRPV1, TRPV2, TRPV6 und TRPA1 sind der S4-S5 linker, die distale S6 Domäne und die TRP- Domäne sowie der Linker zwischen S6 und TRP- Domäne wichtig für das Gating dieser Kanäle. Dabei unterscheidet sich der S6- TRP Linker des TRPV6 Proteins von den übrigen Kanälen. Ein Vergleich der Interaktionen zwischen oben genannten Domänen bei TRPV6 und den anderen Kanälen ist nicht möglich, da die Struktur des Linkers bei TRPV6 nicht gut genug aufgelöst ist. In TRPV1 ist das Glutamat 571 im S4-S5 Linker kritisch für die Bindung von Capsaicin (Yang et al. 2015a). Der korrespondierende Rest in TRPV2 und TRPV6 ist ein Glutamin, was möglicherweise der Grund ist, dass die Kanäle nicht sensitiv für Capsaicin sind (Zubcevic et al. 2016). Während die TRP Domäne bei TRPV1 mit dem S4-S5 linker über polare Reste interagiert liegen bei TRPA hydrophobe Interaktionen vor (Paulsen et al. 2015).

Die Mutation G997S bzw. G997C im S4-S5 Linker des TRPM3 Kanals führt ebenfalls zu einer spontanen und signifikanten Kanalaktivität (Hofmann et al. 2017b). Hier interagiert möglicherweise das S997 mit den Seitenketten von K1122, N1126, K1130 sowie W1129 der TRP Domäne und reduziert somit die Flexibilität des S4-S5 Linkers. Es war eine weitere Stimulation der Kanalaktivität durch den Agonist Pregnenolonsulfat möglich, sodass der Kanal durch die Mutation offenbar nicht vollständig aktiviert wurde. Allerdings war der Strom, der durch den Agonisten hervorgerufen wurde, kleiner als der des Wildtyps. Pregnenolonsulfat aktiviert TRPM3 Kanäle von außen durch die Bindung an eine

spezifische Bindungsstelle (Drews et al. 2014). Die verminderte Flexibilität des mutierten S4-S5 Linkers stört hier möglicherweise die Kanalaktivierung.

Die Mutation N855S (N858 in der Maus) im S4-S5 Linker des humanen TRPA1 Kanals ist mit einem autosomal dominant vererbten episodischen Schmerzsyndrom assoziiert (Kremeyer et al. 2010). Die Mutation führt zu einem Shift der Gatingeigenschaften mit einem dramatisch vermehrten Einwärtsstrom und einer Kanalaktivierung bei normalem Ruhepotenzial. Intrazelluläres Kalzium hat einen bimodalen Effekt auf Wildtyp-TRPA1 mit einer Aktivierung bei niedrigen und Inhibierung bei hohen intrazellulären Konzentrationen. Es wurde gezeigt, dass die kalziuminduzierten Ströme der Mutante im Vergleich zum Wildtyp erhöht sind (Zima et al. 2015) und die Hypothese aufgestellt, dass der Effekt von der N855S Mutation auf einer vermehrten Wirksamkeit von Kalzium und einer reduzierten Inaktivierung durch bei negativem Membranpotenzial eindringendem Kalzium beruht. Basierend auf Homologiemodeling und elektrophysiologischen Analysen wurde vorgeschlagen, dass Salzbrückenbindungen zwischen den Untereinheiten den TRPA1 Kanal in seinem „offen“ Zustand stabilisieren. Wenn man das benachbarte Arginin R852 (R855 in Maus TRPA1) durch ein Glutamat ersetzt, kann man eine vermehrte basale Aktivität aber gleichzeitig einen Verlust der kalziumabhängigen Strompotenzierung beobachten. Beide Reste R852 und N855 sind im S4-S5 Linker von 22 Spezies konserviert und die Autoren schlagen vor, dass sie die Interaktionen zwischen den Untereinheiten stabilisieren und somit das Gating beeinflussen.

Gain-of-Function Mutationen im humanen TRPM4 außerhalb des S4-S5 Linkers wurden identifiziert und spielen eine Rolle in autosomal dominanten Formen von kardialen Reizleitungsstörungen (Liu et al. 2010). Bei (Stallmeyer et al. 2012) wurde die K914R Mutation in zwei Patienten aus der selben Familie mit unterschiedlichen Phenotypen identifiziert: ein Patient hatte einen AV-Block als zweijähriger, wobei der Andere einen asymptomatischen Rechtsschenkelblock bei normaler AV-Überleitung hatte. Der Lysinrest K914 im S4-S5 Linker des humanen TRPM4 (K910 in der Maus) ist Teil einer SUMOylyationsstelle (Stallmeyer et al. 2012) und ist im S4-S5 Linker von TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM5, TRPV4 und TRPP3 konserviert. Für die Mutante K914R wurde vorgeschlagen, dass es sich ebenfalls um eine gain-of-function Mutation handelt, da die Phenotypen ähnlich zu denen anderer bekannter gain-of-function Mutationen sind (E7K (Kruse et al. 2009), R164W (Liu et al. 2010), I346T (Daumy et al. 2016), A432T (Liu et al. 2010; Stallmeyer et al. 2012) und G884D (Stallmeyer et al. 2012)). Das Brugadasyndrom ist häufig mit Rechtsschenkelblock assoziiert und TRPM4 Mutationen sind zu 6% verantwortlich für das Syndrom. Hierrunter wurde von Liu et al (Liu et al. 2013) eine einzelne heterozygote non-sense Mutation identifiziert die zu einem Stopcodon führt (K914X). Das resultierende

gekürzte TRPM4 Protein produziert keinen Strom in HEK-293 Zellen (Liu et al. 2013) kann jedoch möglicherweise bei heterozygoten als dominante Subunit agieren.

Es wurden mehr als 50 pathogene Mutationen im menschlichen TRPV4 Gen identifiziert (Nilius und Owsianik et al. 2010; Nilius und Voets et al. 2013; Andreucci et al. 2011; Verma et al. 2010; Liu et al. 2010; Rock et al. 2008). Diese Mutationen bewirken skeletale Dysplasien mit kurzer Statur, Plattwirbelbildung, Defekte der Ossifikation sowie distale Neuropathien mit motorischen Störungen vor allem in den distalen Extremitäten aber auch im respiratorischen System, an den Stimmlippen und selten mit sensorischen Defekten (Nilius und Owsianik et al. 2010; Nilius und Voets et al. 2013; Andreucci et al. 2011; Verma et al. 2010; Liu et al. 2010; Rock et al. 2008). Mindestens 13 dieser Mutationen betreffen Aminosäuren im S4-S5 Linker. Die S4-S5 Mutationen Y591C (Andreucci et al. 2011) und R594H (Krakow et al. 2009) sowie die S5 Mutationen R616Q (Rock et al. 2008) und V620I (Liu et al. 2013; Zimoń et al. 2010) resultieren in konstitutiv aktiven Mutantenkanälen bei HEK-293 Zellen und *Xenopus* Oocyten. Loukin et al. haben anhand der Proliferationsinhibition bei der Hefe für weitere gain-of-function Mutationen gescreent (Loukin et al. 2010). Zwei Mutationen L619P und L623P befanden sich in der S5 Domäne. Diese bewirken wahrscheinlich einen Knick in der zytoplasmatischen Hälfte von S5 und beeinflussen somit das Gate.

Wie oben beschrieben waren die initialen Mutationen, die zur Entdeckung der TRP Kanäle geführt haben loss-of-function Allele: Das durch Licht induzierte Rezeptorpotential konnte nicht aufrecht erhalten werden („transient“) (Cosens und Manning et al. 1969; Minke et al. 1975; Montell und Rubin et al. 1989). Im Jahr 2000 wurde von Yoon et al (Yoon et al. 2000) eine neue Mutation in der Transmembranhelix des TRP-Gens beschrieben (Hong et al. 2002). Diese Mutante ist konstitutiv aktiv und führt wahrscheinlich zum kalziuminduzierten Zelltod. Diese Mutation ist in *Drosophila* TRPL konserviert, aber es ist nicht bekannt, ob Sie zu konstitutiv aktiven Kanälen führt. Zwei weitere korrespondierende Mutationen wurden bei Screenings gefunden: Im Hefe *Yvc1* wird das konservierte Phenylalanin durch ein Leuzin ersetzt (F380L) (Myers et al. 2008b). Diese Mutante ist konstitutiv aktiv, die Kalziumfreisetzung aus der Vakuole durch einen osmotischen Schock ist größer als beim Wildtyp Kanal (Myers et al. 2008b). Eine Mutation im Ratten TRPV1 (M581T, korrespondierend zu M582 in der Maus) wurde in einem weiteren Screening bei Expression von Ratten TRPV1 in der Hefe identifiziert (Myers et al. 2008a). Die TRPV1 M581T Mutante manifestiert sich durch einen vermehrten basalen Strom bei einem pH von 7,4 der weiter durch den Agonisten Capsaicin stimuliert werden kann (Myers et al. 2008a). Das M581 ist an den entsprechenden Stellen von TRPC2, TRPC3, TRPC6 und TRPC7 konserviert, aber es ist nicht bekannt ob hier ebenfalls konstitutiv aktive Kanäle entstehen, wenn man die entsprechenden Aminosäuren substituiert. An einer entsprechenden Stelle in der S5 Helix

von humanem TRPV4 führt die Mutation L618P zu skelettalen Dysplasien kombiniert mit fetaler Akinesie, die sich tödlich in der Neonatalperiode auswirkt (siehe Einleitung 2.2.2.2). Der Effekt dieser Mutation auf die Kanalleitfähigkeit wurde bisher nicht untersucht, aber die helixbrechenden Mutationen L619P und L623P im Ratten TRPV4 führen zu konstitutiv aktiven Kanälen (Loukin et al. 2010). Ähnlich verhält es sich bei den Mutationen M490P (TRPV5 (Lee et al. 2010)), M496P (TRPV6 (Grimm et al. 2007)), V432P und C430P oder C431P (TRPML1 (Grimm et al. 2007; Dong et al. 2008; Xu et al. 2007)), A424P (TRPML2 (Grimm et al. 2007; Dong et al. 2008)), A419P (TRPML3) sowie F604P im Mensch bzw. F602P in der Maus (TRPP2 (Arif Pavel et al. 2016)). Hier führte das eingefügte Prolin jeweils zu konstitutiv offenen Kationenkanälen. Die Prolinmutante TRPML3 A419P führt zu dem sog. Varitint-Waddler Phenotyp in Mäusen (Grimm et al. 2007; Xu et al. 2007; Di Palma et al. 2002; Nagata et al. 2008). Diese Mäuse sind taub, zeigen Pigmentationsstörungen, Sterilität und eine frühe, perinatale Sterblichkeit. Kanäle mit dieser Mutation sind konstitutiv aktiv in Haarzellen sowie in HEK-293 Zellen und LLC-PK1-CI4 Zellen (Grimm et al. 2007; Xu et al. 2007; Di Palma et al. 2002; Nagata et al. 2008). Als die entsprechende Mutation in TRPML1 eingefügt wurde änderte sich die subzelluläre Lokalisation des Kanals. Normalerweise befindet er sich im Lysosom und im späten Endosom, die Mutante befindet sich in vielen unterschiedlichen Kompartimenten unter anderem in der Plasmamembran (Grimm et al. 2007; Dong et al. 2008; Xu et al. 2007). Die Mutante war sowohl im Lysosom als auch in der Plasmamembran konstitutiv aktiv. Die entsprechende Mutation im TRPML2 (A424P) führt zu konstitutiv aktiven Kanälen in HEK-293 Zellen (Grimm et al. 2007; Dong et al. 2008; Lev et al. 2010). Bei einer kurzen Splicevariante in der Maus führte die entsprechende Mutation A396P ebenfalls zu konstitutiv aktiven Kanälen (Dong et al. 2008). Bei einer weiteren Mutagenese zu Prolinresten wurden zwei andere gain-of-function Mutationen in der Maus identifiziert: C430P und C431P (Dong et al. 2009). Diese Reste entsprechen L619 und V620 von TRPV4. Ersetzt man L619 durch ein Prolin resultieren konstitutiv aktive TRPV4 Kanäle (Loukin et al. 2010). Die V620I Mutation führt zu einer kanalassoziierten Erkrankung beim Mensch (siehe Abschnitt 2.2.2.2.).

Die Mutante F604P im humanen TRPP2 (in der Maus F602) stellt die erste gain-of-function Mutation in der TRPP Subfamilie dar. Die Mutation in S5 zeigt, dass die TRPP Kanäle offenbar einen ähnlichen Gatingmechanismus haben wie andere TRP- Kanäle und ist ein wichtiger Schritt die Eigenschaften von TRPP2 Kanälen näher zu erforschen. Der „endogene“ Aktivierungsmechanismus von TRPP2 ist weiterhin unklar. Die Mutante F604P erlaubt es nach Substanzen zu screenen, die mögliche Therapeutika gegen die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) darstellen. Diese Patienten leiden unter multiplen Zysten in den Nieren, die letztlich zur Niereninsuffizienz führen. In 15% der Patienten ist das TRPP2 (Synonym: polycystin-2, polycystic kidney disease 2, PKD2) mutiert.

Andere Mutationen, die diese Krankheit hervorrufen befinden sich im polycystin-1 Gen (polycystic kidney disease 1, PKD 1) welches nicht für einen TRP Kanal codiert. Die Einzeldelation von F605 führt offenbar zu einem loss-of-function Phenotyp durch Konformationsänderungen, die die Kanalpore schließen.

Beim Screening von N-ethyl-N-nitrosoharnstoff mutagenisierten Mäusen wurde eine Punktmutation im proximalen Teil von S5 angrenzend an den S4-S5 Linker des TRPC3 Proteins identifiziert (siehe Einleitung, Becker et al. 2009). Diese T635A Mutation ist mit einem Zelluntergang von zerebellären Purkinjezellen (Becker et al. 2009) und „type II unipolar brush cells“ (Sekerková et al. 2013) assoziiert. Sie bewirkt einen sog. „moonwalker“ Phenotyp bei cerebellärer Ataxie. Exprimiert man die TRPC3 Mutante in NSC-34 Zellen führt das zum Zelltod, wahrscheinlich durch einen exzessiven Kalziumeinstrom durch konstitutiv offene TRPC3 Kanäle (Becker et al. 2009). Das Threonin 635 stellt eine konservierte Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C (PKC) dar. Eine Phosphorylierung inhibiert die Kanalaktivität (Poteser et al. 2011). Die Autoren schließen (Poteser et al. 2011), dass die fehlende, inhibierende Phosphorylierung an dieser Stelle zu dem beobachteten gain-of-function Phenotyp beiträgt. Die Proteinkinase C inhibiert auch die TRPC6 Kanalaktivität, allerdings durch eine Phosphorylierung von S448 (Bousquet et al. 2010) und nicht von T629 (die zu T635/TRPC3 korrespondierende Aminosäure in TRPC6). Trotzdem ist T629 in TRPC6 konserviert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die meisten Mutationen im S4-S5 Linker und der angrenzenden S5 Helix in konstitutiv aktiven Kanälen resultieren. Dabei kann zwischen Mutanten unterschieden werden, die ohne Agonisten eine gering vermehrt basale Aktivität zeigen, die vermehrte basale und weiter stimulierbare Ströme aufweisen und die vermehrte basale Ströme aufweisen, welche durch einen Agonisten nicht weiter stimuliert werden können. Letzere stellt genaugenommen eine loss-of-regulation Mutation dar.

In allen TRP- Kanälen wurde sowohl die Verbindung des S4-S5-Linkers mit den S1-S4- und den S5-Pore-S6-Einheiten als auch seine helikale Konformation initial aus den Strukturen von Ratten- TRPV1, Kaninchen- TRPV2, humanem TRPA1 und TRPP2 abgeleitet, die durch Elektronenmikroskopie bestimmt wurden. Im Ratten- TRPV1 (Cao et al. 2013; Liao et al. 2013) interagiert der S4-S5 Linker mit der TRP Domäne und dem distalen Anteil der poren S6 Helix grade bei oder etwas unter dem Kanalgate, welches durch das Isoleucin 679 gebildet wird (Cao et al. 2013; Liao et al. 2013). In der Struktur des humanen TRPP2 (Shen et al. 2016) ist der S4-S5 Linker vermutlich an die S6-Helix gekoppelt, zum Beispiel durch eine Wasserstoffbrücke, die zwischen dem Glutamin 585 (Maus-Glutamin 583) im S4-S5-Linker und dem Lysin 688 in der S6 Domäne 11 Aminosäuren downstream des unteren TRPP2 Gates (L677) gebildet wird (Shen et al. 2016). Die beiden korrespondierenden Reste sind in TRPP2, TRPP3 und TRPP5 konserviert, jedoch nicht in

anderen TRP Kanälen, was dafür spricht, dass sich die Anordnung der intrazellulären Domänen unterscheidet.

5.4 Die Mutation des konservierten Glyzins 506 von TRPC1 und TRPC1 als Heteromerisierungspartner für TRPC4/5

TRPC1 ist das als erstes entdeckte Mitglied der Unterfamilie der TRPC Proteine. Erstmals beschrieben wurde der Kanal von Zitt et al. und Mitarbeitern (Zitt et al. 1996). TRPC1 wurde zunächst als store operated channel (SOC) vorgeschlagen oder als dehnungsaktivierter Kanal (Zitt et al. 1996; Maroto et al. 2005). Es wurde bisher noch kein Agonist gefunden, mit dem man den direkten Nachweis des funktionellen homomeren Kanals erbringen könnte.

Eine Überexpression von TRPC1 in HEK293 Zellen hat keine messbaren Ströme zur Folge gehabt die man hätte von den Hintergrundströmen abgrenzen können (Lintschinger et al. 2000). Gegen die Hypothese eines homomeren Kanals spricht auch die zunehmende Evidenz, dass der Kanal vorwiegend als heteromerer Interaktionspartner für andere TRPC Kanäle dient (Wu et al. 2010; Clapham et al. 2001) (Strübing et al. 2003; Tsiokas et al. 1999; Ma et al. 2010; Schindl et al. 2012). Ob nach Überexpression von TRPC1 Ströme gemessen werden können, scheint vom jeweiligen Zelltyp abzuhängen. Dabei variiert wahrscheinlich jeweils die subzelluläre Lokalisation des TRPC1 Proteins, das Expressionsmuster von anderen TRPC Kanälen, sowie die Aktivität verschiedener Signaltransduktionskaskaden.

Das konservierte Glyzin im S4-S5 Linker findet sich auch in TRPC1. Die potentielle Gain-of-function Mutation des Glyzins kann einen Beitrag zu der Frage liefern, ob das Gen für einen homomeren, funktionsfähigen Kanal kodiert oder nicht. Man würde von einem homomeren TRPC1 Kanal ein ähnliches Ergebnis wie bei den nahen verwandten TRPC Kanälen (TRPC4, TRPC5) erwarten. Also einen konstitutiv aktiven TRPC1 Kanal, der offen und somit Kalziumpermeabel ist.

Die Mutation des konservierten Glyzins im TRPC1 Gen ergab jedoch im Vergleich zur Kontrolle keinen vermehrten Kalziumeinstrom (Abbildung 4-13). Somit sprechen die Ergebnisse eher gegen die Hypothese eines einfachen homomeren Kalziumkanals in der Plasmamembran. Möglicherweise ist die subzelluläre Lokalisation ursächlich und die TRPC1 Proteine befinden sich beispielweise in der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Allerdings könnte mit geringerer Wahrscheinlichkeit auch die individuelle Struktur des TRPC1 Kanal für das Ergebnis verantwortlich sein. Die Tatsache, dass das Glyzin auch im TRPC1 Gen konserviert ist, spricht dafür, dass TRPC1 möglicherweise früher in der Evolution homomere Kanäle gebildet hat.

Die Koexpression von TRPC1 und TRPC5 in HEK293-M1 Zellen resultierte in einem nichtselektiven Kationenstrom, der durch Carbachol aktiviert werden konnte, aber nicht auf

eine Speicherentleerung reagierte (Strübing et al. 2001). Die Stromspannungskennlinie unterschied sich hier signifikant von der bekannten TRPC5 Kennlinie. Die Expression von TRPC1 alleine resultierte auch hier nicht in einem messbaren Strom. Ähnliche Ergebnisse ergab eine Koexpression von TRPC1 und TRPC4 (Strübing et al. 2001). Neben der Heteromerisierung scheint auch die Dislokation des TRPC1 Proteins in die Plasmamembran durch TRPC4 und TRPC5 beeinflusst zu werden (Hofmann et al. 2002).

Die Koexpression der TRPC1_{G506S} Mutante mit TRPC4 ergab in der vorliegenden Arbeit einen nur gering vermehrten Kalziumeinstrom wobei das basale Kalzium erniedrigt war. Der vermehrte Strom könnte durch einen heteromeren TRPC1/C4 Kanal erklärt werden. Dabei stellt sich jedoch die Frage, ob für einen konstitutiv offenen Kanal in jedem der Protomere die Mutation vorhanden sein muss (im Falle heteromerer Kanäle wäre nur in den TRPC1 Protomeren eine Mutation vorhanden). Alternativ wäre auch eine andere subzelluläre Lokalisation des TRPC1_{G506S} Proteins denkbar. Das würde bedeuten, dass die TRPC1_{G506S} Untereinheiten ihren Weg in die äußere Plasmamembran nur in Gegenwart von TRPC4 Kanälen findet. Dagegen spricht jedoch der im Vergleich zu den mTRPC5 und mTRPC4 Mutanten nur diskret vermehrte Kalziumeinstrom, man würde von einem konstitutiv offenen Kanal einen grösseren Kalziumeinstrom erwarten (wie im Falle der mTRPC4 und mTRPC5 Mutante). Das basale Kalzium war bei der Koexpression vermindert. Dazu passt die zunehmende Evidenz, dass TRPC1 als Negativregulator für TRPC4 agiert (siehe unten).

Bei der Koexpression mit TRPC5 konnte dagegen keine Änderung des Kalziumeinstroms, auch keine Negativregulation festgestellt werden.

TRPC1 wird vom neuronal metabotropic glutamate receptor 1 mGluR1 aktiviert und trägt einen Teil zum slow excitatory postsynaptic potential (EPSP) in Neuronen bei (Kim et al. 2003). Trotz der relativ frühen Entdeckung des Kanals wird immer noch debattiert, ob er selbst überhaupt homomere Kanäle formen kann oder nicht. In der Vergangenheit wurde zunächst nahegelegt, dass der Kanal sich in der Plasmamembran befindet und einen Beitrag zur Zelldepolarisation und einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration liefert. Zudem wurde nahegelegt, dass sich der Kanal im endoplasmatischen Retikulum (ER) befindet und an der Freisetzung von Kalzium beteiligt ist (Delmas et al. 2002; Liu et al. 2000; Rao et al. 2006; Sinkins et al. 1998; Sours et al. 2006; Yuan et al. 2003; Zitt et al. 1996). In letzter Zeit nimmt die Evidenz zu, dass der Kanal nicht in der Plasmamembran zu finden ist und der homomere Kanal nicht funktionstüchtig ist (Beech et al. 2004; Dietrich et al. 2014; Hofmann et al. 2002; Kim et al. 2014; Strübing et al. 2001). Die genannten Gruppen konnten kein TRPC1 Protein in der Plasmamembran nachweisen und keine spezifische Stromspannungskennlinie für TRPC1 messen. Dietrich et al. äußerten außerdem Bedenken bezüglich der Qualität von Antikörpern beim TRPC1- Nachweis (Dietrich et al. 2014) und schlagen vor die Antikörperqualität anhand von TRPC1 knock-out Mäusen zu überprüfen

(Dietrich et al. 2014; Zheng und Phelan 2014). Eine Kombination von einer falsch positiven Detektion von TRPC1 und eine begleitende Zunahme des Membranstroms kann schwierig zu beurteilen sein. Zunächst liegt dies am Fehlen eines selektiven pharmakologischen Blockers für den TRPC1 Kanal. Die konventionell benutzten TRPC1 Blocker wie 2-APB oder Cadmium sind nicht-selektive Kationenkanalblocker. Desweiteren macht die doppeldeutige Stromspannungskurve von TRPC1 die Interpretation noch schwerer. Auch wenn die Detektion von TRPC1 mittels Antikörper eindeutig positiv war sollte die Korrelation von Membranstrom und TRPC1 Strom mit größerer Vorsicht durchgeführt werden und eine Stromspannungskennlinie sollte begleitend akquiriert werden.

Ohne Zweifel ist die Patch-Clamp-Technik die sensitivste Methode für die Untersuchung von Ionenkanälen. Die TRPC Kanäle außer TRPC1 zeigen eine typische doppelt gleichgerichtete Stromspannungskennlinie. TRPC1 dagegen zeigt unterschiedliche Formen je nach Forschungsgruppe. TRPC1 Homomere wurden ursprünglich als Mediator für den SOCE (store-operated calcium entry) vorgeschlagen. Nachdem eine Interaktion von TRPC1 mit dem stromal interaction molecule (STIM) beobachtet wurde, wurde zudem der STIM-TRPC1 Komplex als ursächlich für den SOCE diskutiert (Sun et al. 2017). Die Stromspannungskennlinie des SOCE war ebenfalls je nach Forschungsgruppe unterschiedlich, wobei der Calcium Release Activated Channel (CRAC) bestehend aus ORAI und STIM die typische einwärtsrektifizierende Stromspannungskennlinie zeigte. Für das Studium des Zusammenhangs zwischen SOCE und TRPC1 wurden vielfach Tools wie 2-APB und Lanthan benutzt, die jedoch wie oben beschrieben, keine spezifischen Blocker sind. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde kein Unterschied zwischen HEK293 Zellen mit TRPC1 und leerem Vektor gemessen. Eine Oberflächenbiotinylierung zeigte im Vergleich zu TRPC4 und TRPC5 vernachlässigbare Mengen des homomeren TRPC1 in der Membran (Kim et al. 2019). Es ist nicht klar, ob TRPC1 nach Stimulation von Muskarinrezeptoren für einen Kalzium- oder Natriumeinstrom verantwortlich ist, da sich weder ein signifikanter Strom noch eine Änderung der Stromspannungskennlinie messen ließ. Einzelkanaluntersuchungen von homomeren TRPC5 und heteromeren TRPC1/5 Kanälen in HEK293 Zellen zeigten einen kleineren Steigungsleitwert (5pS) beim Heteromer im Vergleich zu den homomeren Kanälen (38pS) (Myeong et al. 2018; Strübing et al. 2001). Man kann jedoch insgesamt nicht ausschließen, dass die Leitfähigkeit von TRPC1 nicht einfach zu gering ist um sie zu messen.

Die Aktivität des SOCE wurde ursprünglich mit Kalziumindikatoren gemessen (Ambudkar et al. 2007). Hier wurde ein Kalziumeinstrom durch TRPC1 detektiert und genutzt, um eine TRPC1 Kanalaktivität nachzuweisen. Es wurde beschrieben, dass die Expression von TRPC1 das basale Kalzium oder die Größe des Einstroms vermehrte, wenn man das extrazelluläre Kalzium von 0 nM auf 2 nM oder 10 nM änderte. In letzter Zeit nehmen jedoch

konträre Berichte zu. Es gibt inzwischen Arbeiten, die eine Rolle von TRPC1 als speicheraktivierten Kanal verneinen (Belkacemi et al. 2017) (El-Hassar et al. 2011). In Astrozyten aus TRPC3/6 doppel knock-out Mäusen und TRPC1 knock-out Mäusen war der Kalziumeinstrom nach Speicherentleerung (SOCE) ohne extrazelluläres Kalzium nicht anders als mit extrazellulärem Kalzium. Anschließend war der Kalziumeinstrom nach Readdition des Kalziums unverändert zu den Wildtypzellen (Belkacemi et al. 2017). Andererseits wirkte TRPC1 als ein Negativregulator für TRPC3 in Kortexastrozyten (Belkacemi et al. 2017). In zerebellären Purkinjoneuronen zeigte sich eine Änderung des TRPC3-abhängigen Excitatory Postsynaptic Potential (EPSP) als Antwort auf eine Aktivierung von mGluR1 bei TRPC4 knock-out Mäusen (Tian und Zhu et al. 2018). Ob TRPC3 von TRPC1 oder TRPC4 negativ reguliert wird hängt offenbar vom Zelltyp ab.

Sowohl TRPC1/4 als auch TRPC1/5 heteromere Kanäle zeigen eine typische „outward rectifying“ Stromspannungskennlinie (Hong et al. 2015b; Kim et al. 2014; Myeong et al. 2018). Bei der Koexpression von TRPC1 mit TRPC4 oder TRPC5 musste das Verhältnis zwischen TRPC1 und den anderen Kanälen größer als zwei sein um vorwiegend heteromere Kanäle zu erhalten (Kim et al. 2014; Myeong et al. 2018). Im Vergleich zu der „double rectifying“ Stromspannungskennlinie von homomeren TRPC4 oder TRPC5 Kanälen zeigt die „outward rectifying“ Kennlinie, dass die heteromeren Kanäle die Zellerregbarkeit durch eine Abnahme des Einwärtsstroms und eine Zunahme des Auswärtsstroms reduzieren. Storch et al. (Storch et al. 2012) haben ebenfalls gezeigt, dass eine Heteromerisierung mit TRPC1 die Kalziumdurchlässigkeit von TRPC4 oder 5 reduziert. Eine Koexpression von TRPC1 mit TRPC4/5 hat auch in einer anderen Arbeit zu einem dramatisch reduzierten Kalziumeinstrom (gemessen mit dem genetisch encodierten Kalzium Indikator GcaMP) geführt (Ko et al. 2017). Unterschiede zwischen Homomeren und Heteromeren finden sich auch bei der Durchlässigkeit von monovalenten Kationen. Die Durchlässigkeit von TRPC1/4 hat die Sequenz $P_{Na} > P_{Li} > P_{Cs}$, was ein Hinweis auf ein starkes elektrisches Feld der Pore ist, während homomere TRPC4 Kanäle einen hohen P_{Cs} / P_{Na} Quotienten haben (Jeon et al. 2013; Kim et al. 2014; Minard et al. 2018). Die Änderung der Stromspannungskennlinie, der Kalziumpermeabilität und der relativen Durchlässigkeit für monovalente Kationen zeigt eindeutig, dass TRPC1 am Aufbau der Pore bei heteromeren Kanälen beteiligt ist. Schon länger wird anerkannt, dass die Aktivierung von TRPC Kanälen auf eine Aktivierung von heterotrimären G-Proteinen und den damit verbundenen Rezeptoren folgt (Philipp et al. 1996; Sakamoto et al. 2007; Schaefer et al. 2000) (Schaefer et al. 2002; Strübing et al. 2001; Tsvilovskyy et al. 2009; Zholos und Bolton 1997). Insbesondere das $G_{q/11}$ Protein und seine downstream Signalkaskade wie Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP_2) (Otsuguro et al. 2008; Tsvilovskyy et al. 2009) und das intrazelluläre Kalzium standen im Mittelpunkt der Untersuchungen (Inoue und Isenberg 1990; Kim et al. 2012; Schaefer et al. 2000). Kürzlich

wurde gezeigt, dass $G_{q/11}$ direkt an heteromere TRPC1/4 oder TRPC1/5 Kanäle bindet und die Kanäle aktiviert (Myeong et al. 2018). In dieser Arbeit war die Interaktion zwischen $G_{q/11}$ mit TRPC1/4 und TRPC1/5 stärker als die Bindung an $G_{i/o}$. Eine Co-Immunoprecipitation von TRPC1/4/5 mit $G_{q/11}$ konnte leichter als bei dem gleichen Experiment mit $G_{i/o}$ vollzogen werden. Eine Hydrolyse von PIP_2 induziert einen verminderten Kalziumeinstrom durch TRPC4/5 Kanäle (Ko et al. 2019; Myeong et al. 2018). Aufgrund der starken Bindung an $G_{q/11}$ scheint eine Hydrolyse von PIP_2 nach Aktivierung von $PLC\beta$ notwendig zu sein, um die physiologische Aktivität des Kanals aufrechtzuerhalten. Otsuguro und Hofmann und Mitarbeiter zeigten, dass eine Entfernung von PIP_2 TRPC4 α aber nicht TRPC4 β aktiviert. (Otsuguro et al. 2008)(Hofmann et al. 2002).

TRPC1/4/5 Komplexe sind an synaptischen Prozessen im Hippocampus beteiligt (Phelan et al. 2012; Phelan et al. 2013; Zheng und Phelan 2014; Bröker-Lai et al. 2017a; El-Hassar et al. 2011; Lepannetier et al. 2018) In einer Studie die einen $mGluR_5$ induzierten Kalziumeinstrom zeigte (Lepannetier et al. 2018) war die Kalziumantwort auf den $mGluR$ Agonist DHPG speicherunabhängig. Die Kalziumantwort war bei TRPC1^{-/-} Mäusen und nach Gabe von 1nM pico145 reduziert. Interessanterweise war DHPG nach Inhibition der $mGluR$ -induzierten PLC durch 5 μ M U-73122 weiterhin in der Lage einen Kalziumeinstrom zu induzieren (Lepannetier et al. 2018; Myeong et al. 2018). Diese Erkenntnis passt dazu, dass $G_{q/11}$ offenbar direkt Kanäle die TRPC1 enthalten aktiviert.

Trotz der vielen Originalartikel und Reviews bezüglich der biophysikalischen Funktion sowie der physiologischen Rolle von TRPC1/4/5 Kanälen ist die exakte Stoichiometrie von heteromeren Kanälen in der Plasmamembran weiterhin unbekannt. Die Splicevarianten verkomplizieren die Heteromerisierung zudem (Minard et al. 2018). Soweit bekannt gibt es keine Splicevarianten von TRPC5. Obwohl Co-IP und FRET Experimente eine Heteromerisierung von TRPC1/4/5 zeigen ist die exakte Konfiguration der Heteromere schwierig zu bestimmen (Minard et al. 2018). Eine Identifikation der Interaktionsdomäne zwischen TRPC1 und TRPC4/5 scheint vielversprechend (Myeong et al. 2016). Im TRPC1/4 Heteromer interagiert die N-terminale coiled-coiled Domäne (CCD) und die C-terminale 725-745 Region von TRPC1 mit der N-terminalen CCD und C-terminalen 700-720 Region von TRPC4. Im TRPC1/5 Heteromer interagiert die N-terminale CCD und C-terminale 673-725 Region von TRPC1 mit der N-terminalen CCD und C-terminalen Region von TRPC5 (Myeong et al. 2016). Obwohl die Interaktionsdomänen identifiziert werden konnten ist unbekannt, wo und wann die Heteromerisierung stattfindet. Um dieses Problem zu lösen wäre eine zeitabhängige Untersuchung von induzierbaren knock-out Mäusen sinnvoll. Bei Untersuchungen mit der FRET Methode wurde TRPC1 als Kalziumfreisetzungskanal im ER vorgeschlagen (Alicia et al. 2008). Im ER waren mindestens zwei TRPC1 Monomere im tetrameren Komplex. Die Autoren haben hier die Formierung von homomeren TRPC1

Kanälen vorgeschlagen, wobei auch eine Heteromerisierung von TRPC1 mit ORAI möglich scheint (Alicia et al. 2008; Minard et al. 2018). Ein anderer Ansatz die Stoichiometrie von tetrameren Kanälen aufzulösen sind die Concatemere. Ein ähnlicher Ansatz wurde im Falle von Kaliumkanälen genutzt (Dart et al. 1998). Von Beech et al wurden Concatemere von TRPC1/4 und TRPC1/5 hergestellt, die nützlich sein könnten die exakte Konformation von TRPC1/4 und TRPC1/5 Heteromeren herauszufinden (Ludlow et al. 2017). Beim Studium der Komplexbildung im Falle der C553S Mutante in TRPC5 war die Interaktion in der FRET Methode dramatisch reduziert. Im Golgiapparat zeigte das FRET- Signal dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und C553C Mutante (Hong et al. 2015b). Möglicherweise findet die Heteromerisierung statt, während die Proteine vom Golgiapparat zur Plasmamembran transferiert werden. Die Stoichiometrie unterscheidet sich möglicherweise zudem je nach Expressionslevel der verschiedenen TRPC Proteine (Minard et al. 2018). Es wurden bisher TRPC5-5, TRPC4-1 und TRPC5-1 Concatemere hergestellt (Hong et al. 2015b; Ludlow et al. 2017). Eine Co- Expression von diesen Concatemeren mit TRPC1, TRPC4 und TRPC5 kann interessante Informationen über die Stoichiometrie der Proteine liefern. Letztendlich wären auch Kombinationen wie TRPC4-1-4-1 und TRPC4-4-1-1 etc. hilfreich. Eine hochauflösende Struktur von mTRPC1 würde zudem beim Vergleich mit mTRPC4 und mTRPC5 möglicherweise einen Einblick darin erlauben, wie die Homo- bzw. Heteromerisierung zustande kommt.

TRPC4/5 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, wobei TRPC1 hauptsächlich im ZNS und in Neuronen exprimiert wird. Unter den vielen neurologischen Krankheiten, die mit TRPC Kanälen in Verbindung stehen sind Epilepsien und dabei vorallem idiopathische generalisierte Krampfanfälle von besonderem Interesse. Ursächlich ist hier ein vermehrter Kalziumeinstrom. Im Tiermodell werden Krampfanfälle meist durch eine repetitive elektrische Stimulation oder durch prokonvulsive Medikamente wie Pilocarpin induziert (Zheng und Phelan et al. 2014). Nach enttäuschenden klinischen Studien mit NMDA Antagonisten wuchs das Interesse an TRPC Kanälen als mögliche Targets (Zheng und Phelan et al. 2014). In hippocampalen Neuronen wurde gezeigt, dass der metabotrophe Glutamatrezeptor (mGluR) die Erregbarkeit der CA1 pyramidalen Neuronen via TRPC Kanälen reguliert (Bröker-Lai et al. 2017a; El-Hassar et al. 2011). Mit TRPC1/4/5 triple knock-out Mäusen zeigten Bröker-Lai, dass heteromere TRPC1/4/5 Kanäle die hippocampale synaptische Übertragung und das Arbeitsgedächtnis regulieren (Bröker-Lai et al. 2017a). Auf der anderen Seite wurde anhand von TRPC5^{-/-} Mäusen gezeigt, dass TRPC5 in Pilocarpin induzierte Krampfanfälle involviert ist (Phelan et al. 2013). Mithilfe von TRPC1/4 doppel knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass TRPC1/4 heteromere Kanäle für eine starke Depolarisation verantwortlich sind, die auf eine Stimulation von mGluR folgt (Phelan et al. 2012). Mithilfe von TRPC4^{-/-} und TRPC5^{-/-} Mäusen wurde gezeigt, dass TRPC4 an

ängstlichem Verhalten unter Beteiligung der Amygdala beteiligt ist (Ricchio et al. 2014), während TRPC5 Knockout Mäuse vermehrt Furcht-Verhalten zeigten (Ricchio et al. 2009). Nachdem ML204 als TRPC4/5 Inhibitor vorgestellt wurde wurden viele neue Agonisten und Antagonisten für TRPC4 und 5 gefunden (siehe Einleitung 2.2.1.2 und 2.2.1.3). In Zukunft wird es wichtiger werden dabei zwischen dem Effekt auf Homomere und Heteromere zu unterscheiden. Dabei inhibiert HC-070 Homomere und Heteromere (Just et al. 2018) während C-13 (Pico145) TRPC1/4 und TRPC1/5 inhibiert. Neben der neurologischen Relevanz sind TRPC1/4/5 heteromere wahrscheinlich auch wichtig für den Kalziumeinstrom in der Speicheldrüse (Ambudkar 2016) in glatter Muskulatur (Sung et al. 2014) in Kardiomyozyten (Malczyk et al. 2013; Morand et al. 2018; Sabourin et al. 2016; Sabourin et al. 2018) und im Lungengewebe (Bröker-Lai et al. 2017a; Xu et al. 2017). In der Speicheldrüse scheint TRPC1 wichtig für den Kalziumeinstrom zu sein (Ambudkar et al. 2017). TRPC1^{-/-} knock-out Mäuse entwickelten keine pulmonale Hypertonie als Antwort auf eine chronische Hypertonie und hatten eine schmalere Muscularis. Die rechtsventrikuläre Hypertrophie war jedoch unverändert zum Wildtyp (Malczyk et al. 2013). Die neurohumeral-induzierte kardiale Hypertrophie war in der TRPC1/4 double knock-out Maus reduziert, in den TRPC1 und TRPC4 single knock-out Mäusen jedoch nicht. Zudem verbesserten sich die druckinduzierte Hypertrophie und die interstitielle Fibrose in den doppel knock-out Mäusen.

TRPC1 agiert als negativer Regulator für TRPC5 in Morbus Huntington (HD) Zelllinien (Hong et al. 2015a). In STHdh^{Q7Q7} Wildtypzelllinien formt TRPC1 einen Komplex mit TRPC5 und reduziert den Kalziumeinstrom durch TRPC5. Andererseits war in den STHdh^{Q111/Q111} HD Zelllinien die Expression von TRPC1 stark reduziert. Als Resultat war der Kalziumeinstrom vermehrt und es kam zu einem vermehrten Zelltod (Hong et al. 2015a). Ähnlich verhält es sich bei Patienten mit Morbus Parkinson (PD). Hier konnten verminderte TRPC1 Expressionslevel gemessen werden (Selvaraj et al. 2012). In einem Mausmodell für neurotoxin induziertem Morbus Parkinson verhinderte eine Überexpression von TRPC1 ein Fortschreiten der Erkrankung.

In hippocampalen CA1 Neuronen ist eine aktionspotentialinduzierte Glutamatfreisetzung detailliert untersucht worden (Bröker-Lai et al. 2017a). Glutamat bindet und aktiviert Klasse I mGluR, einen GqPCR und aktiviert den G_{q/11} Signaltransduktionsweg. Der aktivierte GqPCR induziert eine nachhaltige Depolarisation. Diese wird durch Voltage- Gated- Calcium Channels (VGCC) und TRPC Kanäle bewirkt (El-Hassar et al. 2011; Phelan et al. 2012). Interessanterweise zeigt sich Stromspannungskennlinie eine Mischung aus VGCC und TRPC. In sog. lateral-septalen Neuronen war das Plateau der Aktionspotentiale in TRPC1/4 doppel knock-out Mäusen reduziert (Phelan et al. 2012). In der Amygdala war die EPSP Amplitude in TRPC4 und TRPC5 knock-out Mäusen reduziert (Ricchio et al. 2009; Ricchio et al. 2014). In Neuronen zeigte eine Deletion von TRPC4 homomeren Kanälen und TRPC1/4

heteromeren Kanälen ähnliche Effekte auf die Zellerregbarkeit. Die Depolarisation und die EPSP- Amplitude unterscheiden sich nicht zwischen Homomer und Heteromer (Phelan et al. 2012; Phelan et al. 2013). Die Rolle von TRPC4, 5, 1/4, 1/5 Kanälen bezüglich des basalen intrazellulären Kalziumlevels unterscheidet sich zwischen den Studien. Es ist daher wichtig, vorsichtig zwischen TRPC Kanälen und spannungsabhängigen Kalziumkanälen zu unterscheiden, wenn man die elektrische Aktivität von Zellen in TRPC knock-out Mäusen oder Zellen mit pharmakologisch inhibierten TRPC Kanälen untersucht. Da TRPC Kanäle per se kalziumdurchlässig sind, ist es schwierig eine einzelne Kalziumquelle zu untersuchen wenn VGCC und TRPC Kanäle exprimiert werden. Man muss deswegen den zeitlichen Verlauf des Stroms und die Stromspannungskennlinie eines elektrischen Events untersuchen. Zudem sind TRPC1/4 und TRPC1/5 Heteromere ebenfalls Membranpotential-Depolarisierer obwohl ihre Kalziumpermeabilität stark reduziert ist. Anders als VGCC zeigen TRPC Kanäle kaum eine tonische Aktivierung, sondern eher eine episodische Aktivität die funktionell mit gewebsspezifischen GPCR und ihren Agonisten/Antagonisten verbunden sind. Es scheint daher wahrscheinlich, dass TRPC Kanäle, insbesondere TRPC1/4 und TRPC1/5 Kanäle irrelevant für den tonischen Kalziumeinstrom sind. Dafür spricht auch, dass kein Unterschied diesbezüglich bei Wild-Typ und knock-out Mäusen gemessen werden konnte (Sun et al. 2017).

Es wurde vorgeschlagen, dass der Englerin-A (EA) induzierte Natriumeinstrom durch TRPC4/5 zytotoxisch wirkt (Ludlow et al. 2017; Muraki et al. 2017). Vormalig wurde angenommen, dass die Zytotoxizität auf einem Kalziumeinstrom beruht. In synovialen Sarkomzellen zeigte der Natriumeinstrom durch heteromere TRPC1/4 Kanäle eine EA-induzierte Zytotoxizität (Muraki et al. 2017). Interessanterweise induzierte die Deletion von TRPC1 die typische TRPC4 Stromspannungskennlinie. TRPC1^{-/-} und TRPC4^{-/-} verhinderten die Zytotoxizität (Muraki et al. 2017). Thalliumstrom durch TRPC wurde in TRPC4 exprimierenden und TRPC4/C1 Concatemer exprimierenden HEK T-Rex Zellen gemessen. Die Antwort in TRPC4 exprimierenden Zellen war schneller und hatte eine höhere Amplitude (Ludlow et al. 2017). SiRNA gegen TRPC1 und TRPC4 Kanäle reduzierten die Thalliumantwort in A498 und Ts578T Zellen (Ludlow et al. 2017). Der monovalente Einstrom in TRPC4 exprimierenden Zellen war ähnlich zu den Zellen mit TRPC4/C1 Concatemer Expression. Der Englerin-A aktivierte Kalziumeinstrom war in den TRPC4 exprimierenden Zellen grösser als in den TRPC4/C1 Zellen. Interessanterweise führte die siTRPC1 zu einem vermehrten Zelltod (Ludlow et al. 2017). SiRNA gegen TRPC4 führte zu einem vollständigen Verlust des EA- induzierten Kalziumeinstroms in A498 und HS578T Zellen. SiRNA gegen TRPC1 hatte keinen Effekt auf den EA induzierten Kalziumeinstrom in A498 Zellen wobei TRPC1 siRNA den EA induzierten Kalziumeinstrom im Vergleich zur Kontroll siRNA

vermehrte (Ludlow et al. 2017). Insgesamt ein weiterer Hinweis darauf, dass TRPC1 als Negativregulator fungiert.

Zusammenfassend verdichtet sich die Evidenz, dass TRPC1 keine funktionsfähigen Kanäle in der Plasmamembran bildet weiter. Auch die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit die potentielle Gain-of-function Mutation bei TRPC1 keinen vermehrten Kalziumeinstrom bewirkte spricht gegen funktionsfähige homomere TRPC1 Kanäle. Vielmehr scheint TRPC1 zumindest teilweise als Negativregulator durch Heteromerisierung mit TRPC4 und TRPC5 zu fungieren. Passend hierzu war die basale Kalziumkonzentration bei Co-Expression der TRPC1 Mutante mit TRPC4 niedriger als bei homomeren TRPC4 Kanälen. In neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Huntington und Morbus Parkinson schützt TRPC1 vor neuronalem Zelltod durch einen reduzierten Kalziumeinstrom. TRPC1 agiert zudem als Negativregulator für L-Typ Kalziumkanäle und TRPV6. In A498 und HS578T Zellen agiert TRPC1 als ein Negativregulator für den Natriumeinstrom. Dabei scheint es nicht so zu sein, dass TRPC1 exklusiv als Negativregulator agiert. In vielen Fällen tragen TRPC1/4 und TRPC1/5 heteromere Kanäle ein Teil zur Zellerregbarkeit bei. Die TRPC- Community hat grosse Fortschritte bei der Erforschung von TRPC4/5 homomeren Kanälen gemacht und dabei z.B. zahlreiche Proteininteraktionen aufdeckt. In Zukunft werden sich auch die Erkenntnisse über die heteromeren Kanäle mehren.

5.5 Der Effekt von pharmakologischen Tools auf die Mutanten

Im Ergebnisteil konnte gezeigt werden, dass im Falle der konstitutiv aktiven Mutanten mTRPC5_{G504S} und mTRPC4_{G503S} durch Zugabe von SKF96365 und Lanthan die Apoptoserate signifikant vermindert werden konnte. Trotz der Mutation, die den Kanal in den „offen“ Zustand zwingt, war der inhibitorische Effekt der Antagonisten vorhanden. Diese Tatsache, und der Fakt, dass beide Substanzen sehr unspezifische Blocker sind, spricht dafür, dass der Effekt am ehesten auf einer direkten Blockade der Pore beruht und eher nicht auf einer Konformationsänderung bzw. Modifikation des Gatings des Kanalproteins. Inzwischen sind viele neue Tools für TRPC4 und TRPC5 vorhanden (siehe 2.2.1.2. und 2.2.1.3), darunter zum Beispiel ML204, M084, HC-070, Pico145, (-)-Englerin A und TZL. Weitere Experimente mit den Mutanten könnten Rückschlüsse auf den Mechanismus der Tools und der Mutation erlauben. Inhibitoren von TRPC4 und TRPC5 zeigen wie oben beschrieben einen anxiolytischen und antidepressiven Effekt, interessant wäre es zu sehen wie sich die entsprechenden Mutanten verhalten.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine Mutation des über verschiedene TRP Kanäle evolutionär konservierte Glyzin im Falle von mTRPC4 und mTRPC5 zu konstitutiv offenen Kanälen, Kalziumeinstrom und zu einer Apoptose der Zellen führt. Die durchflusszytometrisch gemessene Apoptoserate der mTRPC5_{G504S} und mTRPC4_{G503S} exprimierenden Zellen konnte mithilfe von dem unspezifischen Kalziumkanalblocker SKF96365 und Lanthan verringert werden. Auch eine Verringerung des extrazellulären Kalziums mithilfe von EGTA führte zu einem größeren Anteil lebendiger Zellen.

Anhand eines dreidimensionalen Modells auf Basis des Kaliumkanals Kv1.2 konnte das Serin 623 im mTRPC4 Kanal (Serin 627 in mTRPC5) als Interaktionspartner mit dem konservierten Glyzin vorhergesagt werden. Die Mutation dieses Serins zu Alanin machte den Effekt der Mutation des Glyzins im S4-S5 Linker in mTRPC4 rückgängig. Es entstanden aktivierbare Kanäle, welche nicht mehr konstitutiv offen waren.

Bei der gleichen Mutation in mTRPC1, konnten keine konstitutiv offenen Kanäle nachgewiesen werden. Eine Koexpression von mTRPC1_{G506S} mit mTRPC4 β zeigte dagegen einen vermehrten Kalziumeinstrom. Diese Beobachtung lässt sich z.B. durch eine Heteromerisierung von mTRPC1_{G506S} mit mTRPC4 β erklären.

Die fertig klonierten Mutanten bieten die Möglichkeit zu weiterführenden Experimenten (z.B. einer knock-in Maus) um die physiologische Rolle der Proteine besser zu verstehen. Eine GOF- Mutation in den knock-in Mäusen würde hypothetisch zu einem Absterben der TRPC-exprimierenden Zellen führen, somit könnten Hinweise auf Lokalisation und Funktion der Kanäle gewonnen werden. Interessant wäre auch eine hochauflösende Struktur der Mutanten mit deren Hilfe Informationen über das Gating gesammelt werden könnten und weiterführende Experimente mit den neuen pharmakologischen Tools, die möglicherweise Rückschlüsse auf deren Wirkungsmechanismus und das Gating der Kanäle erlauben würden.

6 Referenzen

1. Akbulut Y, Gaunt HJ, Muraki K, Ludlow MJ, Amer MS, Bruns A, Vasudev NS, Radtke L, Willot M, Hahn S, Seitz T, Ziegler S, Christmann M, Beech DJ, Waldmann H (2015) (-)-Englerin A is a potent and selective activator of TRPC4 and TRPC5 calcium channels. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 54:3787–3791
2. Alicia S, Angélica Z, Carlos S, Alfonso S, Vaca L (2008) STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts. *Cell calcium* 44:479–491
3. Ambudkar IS (2016) Calcium signalling in salivary gland physiology and dysfunction. *The Journal of Physiology* 594:2813–2824
4. Ambudkar IS, Ong HL, Liu X, Bandyopadhyay BC, Bandyopadhyay B, Cheng KT (2007) TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell calcium* 42:213–223
5. Ambudkar IS, Souza LB de, Ong HL (2017) TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. *Cell calcium* 63:33–39
6. Andreucci E, Aftimos S, Alcausin M, Haan E, Hunter W, Kannu P, Kerr B, McGillivray G, McKinlay Gardner RJ, Patricelli MG, Sillence D, Thompson E, Zacharin M, Zankl A, Lamandé SR, Savarirayan R (2011) TRPV4 related skeletal dysplasias: a phenotypic spectrum highlighted by clinical, radiographic, and molecular studies in 21 new families *Orphanet journal of rare diseases* 6:37
7. Arif Pavel M, Lv C, Ng C, Yang L, Kashyap P, Lam C, Valentino V, Fung HY, Campbell T, Møller SG, Zenisek D, Holtzman NG, Yu Y (2016) Function and regulation of TRPP2 ion channel revealed by a gain-of-function mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:E2363-72
8. Asakawa M, Yoshioka T, Matsutani T, Hikita I, Suzuki M, Oshima I, Tsukahara K, Arimura A, Horikawa T, Hirasawa T, Sakata T (2006) Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. *The Journal of investigative dermatology* 126:2664–2672
9. Audo I, Kohl S, Leroy BP, Munier FL, Guillonneau X, Mohand-Saïd S, Bujakowska K, Nandrot EF, Lorenz B, Preising M, Kellner U, Renner AB, Bernd A, Antonio A, Moskova-Doumanova V, Lancelot M-E, Poloschek CM, Drumare I, Defoort-Dhellemmes S, Wissinger B, Léveillard T, Hamel CP, Schorderet DF, Baere E de, Berger W, Jacobson SG, Zrenner E, Sahel J-A, Bhattacharya SS, Zeitz C (2009) TRPM1 is mutated in patients with autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *American journal of human genetics* 85:720–729
10. Authi KS (2007) TRP channels in platelet function. *Handbook of experimental pharmacology*:425–443
11. Autzen HE, Myasnikov AG, Campbell MG, Asarnow D, Julius D, Cheng Y (2018) Structure of the human TRPM4 ion channel in a lipid nanodisc. *Science (New York, N.Y.)* 359:228–232
12. Azumaya CM, Sierra-Valdez F, Cordero-Morales JF, Nakagawa T (2018) Cryo-EM structure of the cytoplasmic domain of murine transient receptor potential cation channel subfamily C member 6 (TRPC6). *The Journal of biological chemistry* 293:10381–10391

13. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A (2004) Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. *Neuron* 41:849–857
14. Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt S-E, Julius D (2007) The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448:204–208
15. Beck A, Götz V, Qiao S, Weissgerber P, Flockerzi V, Freichel M, Boehm U (2017) Functional Characterization of Transient Receptor Potential (TRP) Channel C5 in Female Murine Gonadotropes. *Endocrinology* 158:887–902
16. Beck A, Speicher T, Stoerger C, Sell T, Dettmer V, Jusoh SA, Abdulmughni A, Cavalié A, Philipp SE, Zhu MX, Helms V, Wissenbach U, Flockerzi V (2013) Conserved gating elements in TRPC4 and TRPC5 channels. *The Journal of biological chemistry* 288:19471–19483
17. Beck B, Zholos A, Sydorenko V, Roudbaraki M, Lehen'kyi V, Bordat P, Prevarskaya N, Skryma R (2006) TRPC7 is a receptor-operated DAG-activated channel in human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 126:1982–1993
18. Becker EBE, Oliver PL, Glitsch MD, Banks GT, Achilli F, Hardy A, Nolan PM, Fisher EMC, Davies KE (2009) A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:6706–6711
19. Beech DJ, Muraki K, Flemming R (2004) Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP. *The Journal of Physiology* 559:685–706
20. Beech DJ (2005) Emerging functions of 10 types of TRP cationic channel in vascular smooth muscle. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 32:597–603
21. Belkacemi T, Niermann A, Hofmann L, Wissenbach U, Birnbaumer L, Leidinger P, Backes C, Meese E, Keller A, Bai X, Scheller A, Kirchhoff F, Philipp SE, Weissgerber P, Flockerzi V, Beck A (2017) TRPC1- and TRPC3-dependent Ca²⁺ signaling in mouse cortical astrocytes affects injury-evoked astrogliosis in vivo. *Glia* 65:1535–1549
22. Bevan S, Quallo T, Andersson DA (2014) TRPV1. *Handbook of experimental pharmacology* 222:207–245
23. Bezzerides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE (2004) Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nature cell biology* 6:709–720
24. Blair NT, Kaczmarek JS, Clapham DE (2009) Intracellular calcium strongly potentiates agonist-activated TRPC5 channels. *The Journal of general physiology* 133:525–546
25. Boente-Juncal A, Vale C, Alfonso A, Botana LM (2018) Synergistic Effect of Transient Receptor Potential Antagonist and Amiloride against Maitotoxin Induced Calcium Increase and Cytotoxicity in Human Neuronal Stem Cells. *ACS chemical neuroscience* 9:2667–2678
26. Boucherat O, Bonnet S (2015) NOGGIN: a new therapeutic target for PH? Focus on "Noggin inhibits hypoxia-induced proliferation by targeting store-operated calcium entry and transient receptor potential cation channels". *American journal of physiology. Cell physiology* 308:C867-8

27. Bousquet SM, Monet M, Boulay G (2010) Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. *The Journal of biological chemistry* 285:40534–40543
28. Brereton HM, Chen J, Rychkov G, Harland ML, Barritt GJ (2001) Maitotoxin activates an endogenous non-selective cation channel and is an effective initiator of the activation of the heterologously expressed hTRPC-1 (transient receptor potential) non-selective cation channel in H4-IIE liver cells. *Biochimica et biophysica acta* 1540:107–126
29. Bröker-Lai J, Kollwe A, Schindeldecker B, Pohle J, Nguyen Chi V, Mathar I, Guzman R, Schwarz Y, Lai A, Weißgerber P, Schwegler H, Dietrich A, Both M, Sprengel R, Draguhn A, Köhr G, Fakler B, Flockerzi V, Bruns D, Freichel M (2017) Heteromeric channels formed by TRPC1, TRPC4 and TRPC5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. *EMBO J* 36:2770–2789
30. Bröker-Lai J, Kollwe A, Schindeldecker B, Pohle J, Nguyen Chi V, Mathar I, Guzman R, Schwarz Y, Lai A, Weißgerber P, Schwegler H, Dietrich A, Both M, Sprengel R, Draguhn A, Köhr G, Fakler B, Flockerzi V, Bruns D, Freichel M (2017) Heteromeric channels formed by TRPC 1, TRPC 4 and TRPC 5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. *EMBO J* 36:2770–2789
31. Cai X (2008) Unicellular Ca²⁺ signaling 'toolkit' at the origin of metazoa. *Molecular biology and evolution* 25:1357–1361
32. Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D (2013) TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 504:113–118
33. Carson C, Raman P, Tullai J et al (2015) Englerin A Agonizes the TRPC4/C5 Cation Channels to Inhibit Tumor Cell Line Proliferation. *PloS one* 10:e0127498
34. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436–441
35. 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
36. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews* 57:411–425
37. Cavalié A (2007) Ionic Channels Formed by TRPC4. In: Flockerzi V, Nilius B (Hrsg) *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 93–108
38. Chang Y, Schlenstedt G, Flockerzi V, Beck A (2010) Properties of the intracellular transient receptor potential (TRP) channel in yeast, Yvc1. *FEBS letters* 584:2028–2032
39. Chen R-C, Sun G-B, Ye J-X, Wang J, Zhang M, Sun X-B (2017) Salvianolic acid B attenuates doxorubicin-induced ER stress by inhibiting TRPC3 and TRPC6 mediated Ca²⁺ overload in rat cardiomyocytes. *Toxicology letters* 276:21–30
40. Chen X, Wang Q, Ni F, Ma J (2010) Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:11352–11357

41. Cheng KT, Liu X, Ong HL, Ambudkar IS (2008) Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels. *Journal of Biological Chemistry* 283:12935–12940
42. Cheng KT, Ong HL, Liu X, Ambudkar IS (2011) Contribution of TRPC1 and Orai1 to Ca(2+) entry activated by store depletion. *Advances in experimental medicine and biology* 704:435–449
43. Choveau FS, Rodriguez N, Abderemane Ali F, Labro AJ, Rose T, Dahimène S, Boudin H, Le Hénaff C, Escande D, Snyders DJ, Charpentier F, Mérot J, Baró I, Loussouarn G (2011) KCNQ1 channels voltage dependence through a voltage-dependent binding of the S4-S5 linker to the pore domain. *The Journal of biological chemistry* 286:707–716
44. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001) The TRP ion channel family. *Nature reviews. Neuroscience* 2:387–396
45. Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell* 80:259–268
46. Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524
47. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285–287
48. Cuajungco MP, Samie MA (2008) The varitint-waddler mouse phenotypes and the TRPML3 ion channel mutation: cause and consequence. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 457:463–473
49. Dart C, Leyland ML, Barrett-Jolley R, Shelton PA, Spencer PJ, Conley EC, Sutcliffe MJ, Stanfield PR (1998) The dependence of Ag+ block of a potassium channel, murine kir2.1, on a cysteine residue in the selectivity filter. *The Journal of Physiology* 511 (Pt 1):15–24
50. Daumy X, Amarouch M-Y, Lindenbaum P, Bonnaud S, Charpentier E, Bianchi B, Nafzger S, Baron E, Fouchard S, Thollet A, Kyndt F, Barc J, Le Scouarnec S, Makita N, Le Marec H, Dina C, Gourraud J-B, Probst V, Abriel H, Redon R, Schott J-J (2016) Targeted resequencing identifies TRPM4 as a major gene predisposing to progressive familial heart block type I. *International journal of cardiology* 207:349–358
51. Delmas P, Wanaverbecq N, Abogadie FC, Mistry M, Brown DA (2002) Signaling Microdomains Define the Specificity of Receptor-Mediated InsP3 Pathways in Neurons. *Neuron* 34:209–220
52. Di Palma F, Belyantseva IA, Kim HJ, Vogt TF, Kachar B, Noben-Trauth K (2002) Mutations in *Mcoln3* associated with deafness and pigmentation defects in varitint-waddler (*Va*) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:14994–14999
53. Dietrich A, Chubanov V, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T (2006) Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacology & therapeutics* 112:744–760
54. Dietrich A, Fahlbusch M, Gudermann T (2014) Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator? *Cells* 3:939–962
55. Domínguez-Rodríguez A, Ruiz-Hurtado G, Sabourin J, Gómez AM, Alvarez JL, Benitah J-P (2015) Proarrhythmic effect of sustained EPAC activation on TRPC3/4 in rat ventricular cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 87:74–78

56. Dong X, Cheng X, Mills E, Delling M, Wang F, Kurz T, Xu H (2008) The type IV mucopolipidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel. *Nature* 455:992–996
57. Dong X, Shen D, Wang X, Dawson T, Li X, Zhang Q, Cheng X, Zhang Y, Weisman LS, Delling M, Xu H (2010) PI(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca(2+) release channels in the endolysosome. *Nature communications* 1:38
58. Dong X, Wang X, Shen D, Chen S, Liu M, Wang Y, Mills E, Cheng X, Delling M, Xu H (2009) Activating mutations of the TRPML1 channel revealed by proline-scanning mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 284:32040–32052
59. Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69–77
60. Drews A, Mohr F, Rizun O, Wagner TFJ, Dembla S, Rudolph S, Lambert S, Konrad M, Philipp SE, Behrendt M, Marchais-Oberwinkler S, Covey DF, Oberwinkler J (2014) Structural requirements of steroidal agonists of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) cation channels. *British journal of pharmacology* 171:1019–1032
61. Duan J, Li J, Chen G-L, Ge Y, Liu J, Xie K, Peng X, Zhou W, Zhong J, Zhang Y, Xu J, Xue C, Liang B, Zhu L, Liu W, Zhang C, Tian X-L, Wang J, Clapham DE, Zeng B, Li Z, Zhang J (2019) Cryo-EM structure of TRPC5 at 2.8-Å resolution reveals unique and conserved structural elements essential for channel function. *Science advances* 5:eaaw7935
62. Duan J, Li J, Zeng B, Chen G-L, Peng X, Zhang Y, Wang J, Clapham DE, Li Z, Zhang J (2018) Structure of the mouse TRPC4 ion channel. *Nature communications* 9:3102
63. El-Hassar L, Hagenston AM, D'Angelo LB, Yeckel MF (2011) Metabotropic glutamate receptors regulate hippocampal CA1 pyramidal neuron excitability via Ca²⁺ wave-dependent activation of SK and TRPC channels. *The Journal of Physiology* 589:3211–3229
64. Elíes J, Yáñez M, Pereira TMC, Gil-Longo J, MacDougall DA, Campos-Toimil M (2020) An Update to Calcium Binding Proteins. *Advances in experimental medicine and biology* 1131:183–213
65. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35:495–516
66. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and cellular biology* 20:929–935
67. Fan C, Choi W, Sun W, Du J, Lü W (2018) Structure of the human lipid-gated cation channel TRPC3. *eLife* 7
68. Fesus L, Piacentini M (2002) Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends in biochemical sciences* 27:534–539
69. Fleckenstein A, Fleckenstein-Grün G (1980) Cardiovascular protection by Ca antagonists. *European heart journal* 1:15–21
70. Flemming R, Xu SZ, Beech DJ (2003) Pharmacological profile of store-operated channels in cerebral arteriolar smooth muscle cells. *British journal of pharmacology* 139:955–965

71. Flockerzi V, Nilius B (Hrsg) (2007) Transient Receptor Potential (TRP) Channels. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
72. Fowler MA, Sidiropoulou K, Ozkan ED, Phillips CW, Cooper DC (2007) Corticolimbic expression of TRPC4 and TRPC5 channels in the rodent brain. *PLoS one* 2:e573
73. Fox AP, Cahill AL, Currie KPM, Grabner C, Harkins AB, Herring B, Hurley JH, Xie Z (2008) N- and P/Q-type Ca²⁺ channels in adrenal chromaffin cells. *Acta physiologica (Oxford, England)* 192:247–261
74. 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 biology* 3:121–127
75. Freichel M, Vennekens R, Olausson J, Stolz S, Philipp SE, Weißgerber P, Flockerzi V (2005) Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *The Journal of Physiology* 567:59–66
76. Friedlova E, Grycova L, Holakovska B, Silhan J, Janouskova H, Sulc M, Obsilova V, Obsil T, Teisinger J (2010) The interactions of the C-terminal region of the TRPC6 channel with calmodulin. *Neurochemistry international* 56:363–366
77. Garcia-Elias A, Mrkonjić S, Jung C, Pardo-Pastor C, Vicente R, Valverde MA (2014) The TRPV4 channel. *Handbook of experimental pharmacology* 222:293–319
78. Gaudet R (2008) TRP channels entering the structural era. *The Journal of Physiology* 586:3565–3575
79. Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *The Biochemical journal* 405:199–221
80. Goel M, Sinkins WG, Schilling WP (2002) Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *The Journal of biological chemistry* 277:48303–48310
81. Goodenough DA, Paul DL (2009) Gap junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:a002576
82. Gottlieb P, Folgering J, Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Bowman C, Bichet D, Patel A, Sachs F, Martinac B, Hamill OP, Honoré E (2008) Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 455:1097–1103
83. Greka A, Mundel P (2011) Balancing calcium signals through TRPC5 and TRPC6 in podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22:1969–1980
84. Greka A, Navarro B, Oancea E, Duggan A, Clapham DE (2003) TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nature neuroscience* 6:837–845
85. Grimm C, Cuajungco MP, van Aken AFJ, Schnee M, Jörs S, Kros CJ, Ricci AJ, Heller S (2007) A helix-breaking mutation in TRPML3 leads to constitutive activity underlying deafness in the varitint-waddler mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:19583–19588
86. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260:3440–3450

87. Güler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:6408–6414
88. Guo J, She J, Zeng W, Chen Q, Bai X-C, Jiang Y (2017) Structures of the calcium-activated, non-selective cation channel TRPM4. *Nature* 552:205–209
89. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY (1998) Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochimica et biophysica acta* 1366:79–94
90. Hardie RC, Minke B (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8:643–651
91. Harris PC, Torres VE (2009) Polycystic kidney disease. *Annual review of medicine* 60:321–337
92. Herold G (2021) *Innere Medizin*. Gerd Herold Verlag
93. Hermosura MC, Cui AM, Go RCV, Davenport B, Shetler CM, Heizer JW, Schmitz C, Mocz G, Garruto RM, Perraud A-L (2008) Altered functional properties of a TRPM2 variant in Guamanian ALS and PD. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:18029–18034
94. Hofmann L, Wang H, Beck A, Wissenbach U, Flockerzi V (2017) A conserved gating element in TRPV6 channels. *Cell calcium* 63:24–28
95. Hofmann L, Wang H, Zheng W, Philipp SE, Hidalgo P, Cavalié A, Chen X-Z, Beck A, Flockerzi V (2017) The S4---S5 linker - gearbox of TRP channel gating. *Cell calcium* 67:156–165
96. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2000) Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 78:14–25
97. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7461–7466
98. Hofstra JM, Lainez S, van Kuijk WHM, Schoots J, Baltissen MPA, Hoefsloot LH, Knoers NVAM, Berden JHM, Bindels RJM, van der Vlag J, Hoenderop JGJ, Wetzels JFM, Nijenhuis T (2013) New TRPC6 gain-of-function mutation in a non-consanguineous Dutch family with late-onset focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 28:1830–1838
99. Hong C, Kwak M, Myeong J, Ha K, Wie J, Jeon J-H, So I (2015) Extracellular disulfide bridges stabilize TRPC5 dimerization, trafficking, and activity. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 467:703–712
100. Hong C, Seo H, Kwak M, Jeon J, Jang J, Jeong EM, Myeong J, Hwang YJ, Ha K, Kang MJ, Lee KP, Yi EC, Kim I-G, Jeon J-H, Ryu H, So I (2015) Increased TRPC5 glutathionylation contributes to striatal neuron loss in Huntington's disease. *Brain : a journal of neurology* 138:3030–3047
101. Hong YS, Park S, Geng C, Baek K, Bowman JD, Yoon J, Pak WL (2002) Single amino acid change in the fifth transmembrane segment of the TRP Ca²⁺ channel causes massive degeneration of photoreceptors. *The Journal of biological chemistry* 277:33884–33889

102. Hou P, Eldstrom J, Shi J, Zhong L, McFarland K, Gao Y, Fedida D, Cui J (2017) Inactivation of KCNQ1 potassium channels reveals dynamic coupling between voltage sensing and pore opening. *Nature communications* 8:1730
103. Huang Y, Winkler PA, Sun W, Lü W, Du J (2018) Architecture of the TRPM2 channel and its activation mechanism by ADP-ribose and calcium. *Nature* 562:145–149
104. Huffer KE, Aleksandrova AA, Jara-Oseguera A, Forrest LR, Swartz KJ (2020) Global alignment and assessment of TRP channel transmembrane domain structures to explore functional mechanisms. *eLife* 9
105. Inoue R, Isenberg G (1990) Acetylcholine activates nonselective cation channels in guinea pig ileum through a G protein. *The American journal of physiology* 258:C1173-8
106. Jeon J-P, Hong C, Park EJ, Jeon J-H, Cho N-H, Kim I-G, Choe H, Muallem S, Kim HJ, So I (2012) Selective Gai subunits as novel direct activators of transient receptor potential canonical (TRPC)4 and TRPC5 channels. *The Journal of biological chemistry* 287:17029–17039
107. Jeon J-P, Roh S-E, Wie J, Kim J, Kim H, Lee K-P, Yang D, Jeon J-H, Cho N-H, Kim I-G, Kang DE, Kim HJ, So I (2013) Activation of TRPC4 β by Gai subunit increases Ca²⁺ selectivity and controls neurite morphogenesis in cultured hippocampal neuron. *Cell calcium* 54:307–319
108. Jeon J-P, Thakur DP, Tian J, So I, Zhu MX (2016) Regulator of G-protein signalling and GoLoco proteins suppress TRPC4 channel function via acting at Gai/o. *The Biochemical journal* 473:1379–1390
109. Jiang H-N, Zeng B, Chen G-L, Lai B, Lu S-H, Qu J-M (2016) Lipopolysaccharide potentiates endothelin-1-induced proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells by upregulating TRPC channels. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 82:20–27
110. Jiang Y, Zhou Y, Peng G, Liu N, Tian H, Pan D, Liu L, Yang X, Li C, Li W, Chen L, Ran P, Dai A (2018) Topotecan prevents hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension and inhibits hypoxia-inducible factor-1 α and TRPC channels. *The international journal of biochemistry & cell biology* 104:161–170
111. Jin P, Bulkley D, Guo Y, Zhang W, Guo Z, Huynh W, Wu S, Meltzer S, Cheng T, Jan LY, Jan Y-N, Cheng Y (2017) Electron cryo-microscopy structure of the mechanotransduction channel NOMPC. *Nature* 547:118–122
112. Jung C, Gené GG, Tomás M, Plata C, Selent J, Pastor M, Fandos C, Senti M, Lucas G, Elosua R, Valverde MA (2011) A gain-of-function SNP in TRPC4 cation channel protects against myocardial infarction. *Cardiovascular research* 91:465–471
113. Jung H-J, Im S-S, Song D-K, Bae J-H (2017) Effects of chlorogenic acid on intracellular calcium regulation in lysophosphatidylcholine-treated endothelial cells. *BMB reports* 50:323–328
114. Jung S, Mühle A, Schaefer M, Strotmann R, Schultz G, Plant TD (2003) Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *The Journal of biological chemistry* 278:3562–3571
115. Just S, Chenard BL, Ceci A, Strassmaier T, Chong JA, Blair NT, Gallaschun RJ, Del Camino D, Cantin S, D'Amours M, Eickmeier C, Fanger CM, Hecker C, Hessler DP, Hengerer B, Kroker KS, Malekiani S, Mihalek R, McLaughlin J, Rast G, Witek J, Sauer A, Pryce CR, Moran MM (2018) Treatment with HC-070, a potent inhibitor of

- TRPC4 and TRPC5, leads to anxiolytic and antidepressant effects in mice. *PloS one* 13:e0191225
116. Kamouchi M, Droogmans G, Nilius B (1999) Membrane potential as a modulator of the free intracellular Ca²⁺ concentration in agonist-activated endothelial cells. *General physiology and biophysics* 18:199–208
 117. Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T (2009) TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:1273–1278
 118. Kim BJ, So I, Kim KW (2006) The relationship of TRP channels to the pacemaker activity of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi* 42:1–7
 119. Kim H, Kim J, Jeon J-P, Myeong J, Wie J, Hong C, Kim HJ, Jeon J-H, So I (2012) The roles of G proteins in the activation of TRPC4 and TRPC5 transient receptor potential channels. *Channels (Austin, Tex.)* 6:333–343
 120. Kim J, Ko J, Myeong J, Kwak M, Hong C, So I (2019) TRPC1 as a negative regulator for TRPC4 and TRPC5 channels. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 471:1045–1053
 121. Kim J, Kwak M, Jeon J-P, Myeong J, Wie J, Hong C, Kim S-Y, Jeon J-H, Kim HJ, So I (2014) Isoform- and receptor-specific channel property of canonical transient receptor potential (TRPC)1/4 channels. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 466:491–504
 122. Kim SJ, Kim YS, Yuan JP, Petralia RS, Worley PF, Linden DJ (2003) Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* 426:285–291
 123. Kim Y-S, Hong CS, Lee SW, Nam JH, Kim BJ (2016) Effects of ginger and its pungent constituents on transient receptor potential channels. *International journal of molecular medicine* 38:1905–1914
 124. Ko J, Myeong J, Shin Y-C, So I (2019) Differential PI(4,5)P₂ sensitivities of TRPC4, C5 homomeric and TRPC1/4, C1/5 heteromeric channels. *Scientific reports* 9:1849
 125. Ko J, Myeong J, Yang D, So I (2017) Calcium permeability of transient receptor potential canonical (TRPC) 4 channels measured by TRPC4-GCaMP6s. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 21:133–140
 126. Kojima I, Nagasawa M (2014) TRPV2. *Handbook of experimental pharmacology* 222:247–272
 127. Krakow D, Vriens J, Camacho N, Luong P, Deixler H, Funari TL, Bacino CA, Irons MB, Holm IA, Sadler L, Okenfuss EB, Janssens A, Voets T, Rimoin DL, Lachman RS, Nilius B, Cohn DH (2009) Mutations in the gene encoding the calcium-permeable ion channel TRPV4 produce spondylometaphyseal dysplasia, Kozlowski type and metatropic dysplasia. *American journal of human genetics* 84:307–315
 128. Krall P, Canales CP, Kairath P, Carmona-Mora P, Molina J, Carpio JD, Ruiz P, Mezzano SA, Li J, Wei C, Reiser J, Young JI, Walz K (2010) Podocyte-specific overexpression of wild type or mutant *trpc6* in mice is sufficient to cause glomerular disease. *PloS one* 5:e12859
 129. Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S, Woods CG, Jones NG, Paterson KJ, Fricker FR, Villegas A, Acosta N, Pineda-Trujillo NG, Ramirez JD, Zea J, Burley M-W, Bedoya G, Bennett DLH, Wood JN, Ruiz-Linares A (2010) A gain-of-

- function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* 66:671–680
130. Kruse M, Schulze-Bahr E, Corfield V, Beckmann A, Stallmeyer B, Kurtbay G, Ohmert I, Schulze-Bahr E, Brink P, Pongs O (2009) Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *The Journal of clinical investigation* 119:2737–2744
 131. Kuang Q, Purhonen P, Hebert H (2015) Structure of potassium channels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72:3677–3693
 132. Kwon Y, Hofmann T, Montell C (2007) Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Molecular cell* 25:491–503
 133. Labro AJ, Boulet IR, Choveau FS, Mayeur E, Bruyns T, Loussouarn G, Raes AL, Snyders DJ (2011) The S4-S5 linker of KCNQ1 channels forms a structural scaffold with the S6 segment controlling gate closure. *The Journal of biological chemistry* 286:717–725
 134. Lai-Cheong JE, Sethuraman G, Ramam M, Stone K, Simpson MA, McGrath JA (2012) Recurrent heterozygous missense mutation, p.Gly573Ser, in the TRPV3 gene in an Indian boy with sporadic Olmsted syndrome. *The British journal of dermatology* 167:440–442
 135. Landouré G, Zdebik AA, Martinez TL, Burnett BG, Stanescu HC, Inada H, Shi Y, Taye AA, Kong L, Munns CH, Choo SS, Phelps CB, Paudel R, Houlden H, Ludlow CL, Caterina MJ, Gaudet R, Kleta R, Fischbeck KH, Sumner CJ (2010) Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nature genetics* 42:170–174
 136. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)* 23:2947–2948
 137. Lee KP, Jun JY, Chang I-Y, Suh S-H, So I, Kim KW (2005) TRPC4 is an essential component of the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in mouse visceral smooth muscle cells. *Molecules and cells* 20:435–441
 138. Lee KP, Nair AV, Grimm C, van Zeeland F, Heller S, Bindels RJM, Hoenderop JGJ (2010) A helix-breaking mutation in the epithelial Ca(2+) channel TRPV5 leads to reduced Ca(2+)-dependent inactivation. *Cell calcium* 48:275–287
 139. Lepannetier S, Gualdani R, Tempesta S, Schakman O, Seghers F, Kreis A, Yerna X, Slimi A, Clippele M de, Tajeddine N, Voets T, Bon RS, Beech DJ, Tissir F, Gailly P (2018) Activation of TRPC1 Channel by Metabotropic Glutamate Receptor mGluR5 Modulates Synaptic Plasticity and Spatial Working Memory. *Frontiers in cellular neuroscience* 12:318
 140. Lev S, Zeevi DA, Frumkin A, Offen-Glasner V, Bach G, Minke B (2010) Constitutive activity of the human TRPML2 channel induces cell degeneration. *The Journal of biological chemistry* 285:2771–2782
 141. Li H-S, Xu X-ZS, Montell C (1999) Activation of a TRPC3-Dependent Cation Current through the Neurotrophin BDNF. *Neuron* 24:261–273
 142. Li J, Zhang X, Song X, Liu R, Zhang J, Li Z (2019) The structure of TRPC ion channels. *Cell calcium* 80:25–28
 143. Liang M, Zhong W, Miao F, Wu H, Liu Y (2018) Effects of losartan on vasomotor function and canonical transient receptor potential channels in the aortas of sinoaortic

- denervation rats. *Clinical and experimental hypertension* (New York, N.Y. : 1993) 40:39–48
144. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y (2013) Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504:107–112
 145. Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L (2007) Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:4682–4687
 146. Lin Z, Chen Q, Lee M, Cao X, Zhang J, Ma D, Chen L, Hu X, Wang H, Wang X, Zhang P, Liu X, Guan L, Tang Y, Yang H, Tu P, Bu D, Zhu X, Wang K, Li R, Yang Y (2012) Exome sequencing reveals mutations in TRPV3 as a cause of Olmsted syndrome. *American journal of human genetics* 90:558–564
 147. Lintschinger B, Balzer-Geldsetzer M, Baskaran T, Graier WF, Romanin C, Zhu MX, Groschner K (2000) Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca²⁺-sensitive cation channels. *The Journal of biological chemistry* 275:27799–27805
 148. Liu H, Chatel S, Simard C, Syam N, Salle L, Probst V, Morel J, Millat G, Lopez M, Abriel H, Schott J-J, Guinamard R, Bouvagnet P (2013) Molecular genetics and functional anomalies in a series of 248 Brugada cases with 11 mutations in the TRPM4 channel. *PLoS one* 8:e54131
 149. Liu H, El Zein L, Kruse M, Guinamard R, Beckmann A, Bozio A, Kurtbay G, Mégarbané A, Ohmert I, Blaysat G, Villain E, Pongs O, Bouvagnet P (2010) Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circulation. Cardiovascular genetics* 3:374–385
 150. Liu X, Wang W, Singh BB, Lockwich T, Jadowiec J, O'Connell B, Wellner R, Zhu MX, Ambudkar IS (2000) Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca²⁺ influx mechanism in salivary gland cells. *Journal of Biological Chemistry* 275:3403–3411.
 151. Liu X, Yao X, Tsang SY (2020) Post-Translational Modification and Natural Mutation of TRPC Channels. *Cells* 9
 152. Liu X, Cheng KT, Bandyopadhyay BC, Pani B, Dietrich A, Paria BC, Swaim WD, Beech D, Yildirim E, Singh BB, Birnbaumer L, Ambudkar IS (2007) Attenuation of store-operated Ca²⁺ current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:17542–17547
 153. Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science (New York, N.Y.)* 309:903–908
 154. Long SB, Tao X, Campbell EB, Mackinnon R (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450:376–382
 155. López-González MJ, Luis E, Fajardo O, Meseguer V, Gers-Barlag K, Niñerola S, Viana F (2017) TRPA1 Channels Mediate Human Gingival Fibroblast Response to Phenytoin. *Journal of dental research* 96:832–839
 156. Loukin S, Su Z, Zhou X, Kung C (2010) Forward genetic analysis reveals multiple gating mechanisms of TRPV4. *The Journal of biological chemistry* 285:19884–19890
 157. Lu M, Bränström R, Berglund E, Höög A, Björklund P, Westin G, Larsson C, Farnebo L-O, Forsberg L (2010) Expression and association of TRPC subtypes with Orai1 and STIM1 in human parathyroid. *Journal of molecular endocrinology* 44:285–294

158. Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003) A Diacylglycerol-Gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron Dendrites Is Impaired in TRPC2 Mutant Mice. *Neuron* 40:551–561
159. Ludlow MJ, Gaunt HJ, Rubaiy HN, Musialowski KE, Blythe NM, Vasudev NS, Muraki K, Beech DJ (2017) (-)-Englerin A-evoked Cytotoxicity Is Mediated by Na⁺ Influx and Counteracted by Na⁺/K⁺-ATPase. *The Journal of biological chemistry* 292:723–731
160. Ma X, Qiu S, Luo J, Ma Y, Ngai C-Y, Shen B, Wong C, Huang Y, Yao X (2010) Functional Role of Vanilloid Transient Receptor Potential 4-Canonical Transient Receptor Potential 1 Complex in Flow-Induced Ca²⁺ Influx. *ATVB* 30:851–858
161. Malczyk M, Veith C, Fuchs B, Hofmann K, Storch U, Schermuly RT, Witzenrath M, Ahlbrecht K, Fecher-Trost C, Flockerzi V, Ghofrani HA, Grimminger F, Seeger W, Gudermann T, Dietrich A, Weissmann N (2013) Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 188:1451–1459
162. Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nature cell biology* 7:179–185
163. McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52–58
164. Mederos y Schnitzler M, Gudermann T, Storch U (2018) Emerging Roles of Diacylglycerol-Sensitive TRPC4/5 Channels. *Cells* 7
165. Mery L, Strauss B, Dufour JF, Krause KH, Hoth M (2002) The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface expression in HEK293 cells. *Journal of cell science* 115:3497–3508
166. Miede S, Bieberstein A, Arnould I, Ihdene O, Rütten H, Strübing C (2010) The phospholipid-binding protein SESTD1 is a novel regulator of the transient receptor potential channels TRPC4 and TRPC5. *The Journal of biological chemistry* 285:12426–12434
167. Miller M, Shi J, Zhu Y, Kustov M, Tian J, Stevens A, Wu M, Xu J, Long S, Yang P, Zholos AV, Salovich JM, Weaver CD, Hopkins CR, Lindsley CW, McManus O, Li M, Zhu MX (2011) Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels. *The Journal of biological chemistry* 286:33436–33446
168. Minard A, Bauer CC, Wright DJ, Rubaiy HN, Muraki K, Beech DJ, Bon RS (2018) Remarkable Progress with Small-Molecule Modulation of TRPC1/4/5 Channels: Implications for Understanding the Channels in Health and Disease. *Cells* 7
169. Minke B (1977) *Drosophila* mutant with a transducer defect. *Biophysics of structure and mechanism* 3:59–64
170. Minke B, Wu C, Pak WL (1975) Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258:84–87
171. Möller CC, Wei C, Altintas MM, Li J, Greka A, Ohse T, Pippin JW, Rastaldi MP, Wawersik S, Schiavi S, Henger A, Kretzler M, Shankland SJ, Reiser J (2007) Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18:29–36
172. Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G (1985) Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science (New York, N.Y.)* 230:1040–1043

173. Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313–1323
174. Montell C (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005:re3
175. Morand J, Arnaud C, Pepin J-L, Godin-Ribuot D (2018) Chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Scientific reports* 8:2997
176. Mori Y, Wakamori M, Miyakawa T, Hermosura M, Hara Y, Nishida M, Hirose K, Mizushima A, Kurosaki M, Mori E, Gotoh K, Okada T, Fleig A, Penner R, Iino M, Kurosaki T (2002) Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca²⁺ entry and Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 195:673–681
177. Munsch T, Freichel M, Flockerzi V, Pape H-C (2003) Contribution of transient receptor potential channels to the control of GABA release from dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:16065–16070
178. Muraki K, Ohnishi K, Takezawa A, Suzuki H, Hatano N, Muraki Y, Hamzah N, Foster R, Waldmann H, Nussbaumer P, Christmann M, Bon RS, Beech DJ (2017) Na⁺ entry through heteromeric TRPC4/C1 channels mediates (-)Englerin A-induced cytotoxicity in synovial sarcoma cells. *Scientific reports* 7:16988
179. Myeong J, Ko J, Hong C, Yang D, Lee KP, Jeon J-H, So I (2016) The interaction domains of transient receptor potential canonical (TRPC)1/4 and TRPC1/5 heteromultimeric channels. *Biochemical and biophysical research communications* 474:476–481
180. Myeong J, Ko J, Kwak M, Kim J, Woo J, Ha K, Hong C, Yang D, Kim HJ, Jeon J-H, So I (2018) Dual action of the Gαq-PLCβ-PI(4,5)P₂ pathway on TRPC1/4 and TRPC1/5 heterotetramers. *Scientific reports* 8:12117
181. Myers BR, Bohlen CJ, Julius D (2008) A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating. *Neuron* 58:362–373
182. Myers BR, Saimi Y, Julius D, Kung C (2008) Multiple unbiased prospective screens identify TRP channels and their conserved gating elements. *The Journal of general physiology* 132:481–486
183. Nagata K, Zheng L, Madathany T, Castiglioni AJ, Bartles JR, García-Añoveros J (2008) The varitint-waddler (Va) deafness mutation in TRPML3 generates constitutive, inward rectifying currents and causes cell degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:353–358
184. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98–103
185. Naylor J, Minard A, Gaunt HJ, Amer MS, Wilson LA, Migliore M, Cheung SY, Rubaiy HN, Blythe NM, Musialowski KE, Ludlow MJ, Evans WD, Green BL, Yang H, You Y, Li J, Fishwick CWG, Muraki K, Beech DJ, Bon RS (2016) Natural and synthetic flavonoid modulation of TRPC5 channels. *British journal of pharmacology* 173:562–574

186. Nerbonne JM, Kass RS (2005) Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews* 85:1205–1253
187. Nilius B, Droogmans G (2001) Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiological reviews* 81:1415–1459
188. Nilius B, Owsianik G (2010) Channelopathies converge on TRPV4. *Nature genetics* 42:98–100
189. Nilius B, Voets T (2013) The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO reports* 14:152–163
190. Obukhov AG, Nowycky MC (2008) TRPC5 channels undergo changes in gating properties during the activation-deactivation cycle. *Journal of cellular physiology* 216:162–171
191. Ong HL, Jang S-I, Ambudkar IS (2012) Distinct contributions of Orai1 and TRPC1 to agonist-induced Ca²⁺(i) signals determine specificity of Ca²⁺-dependent gene expression. *PloS one* 7:e47146
192. Oracz G, Zaród M, Ewers M, Laumen H, Gambin T, Kamiński P, Grabowska I, Drożak A, Kwiatkowski S, Wertheim-Tysarowska K, Kołodziejczyk E, Domaszewicz A, Dorożko B, Kosińska J, Głuszek S, Kozieł D, Płoski R, Rosendahl J, Witt H, Drożak J, Rygiel AM (2021) Loss of function TRPV6 variants are associated with chronic pancreatitis in nonalcoholic early-onset Polish and German patients. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 21:1434–1442
193. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4:552–565
194. Otsuguro K, Tang J, Tang Y, Xiao R, Freichel M, Tsvilovskyy V, Ito S, Flockerzi V, Zhu MX, Zholos AV (2008) Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 283:10026–10036
195. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S (2002) Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:1259–1263
196. Ozaki S, Suzuki AZ, Bauer PO, Ebisui E, Mikoshiba K (2013) 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) analogues: regulation of Ca²⁺ signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 441:286–290
197. Panaghie G, Tai K-K, Abbott GW (2006) Interaction of KCNE subunits with the KCNQ1 K⁺ channel pore. *The Journal of Physiology* 570:455–467
198. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. *Methods (San Diego, Calif.)* 46:143–151
199. Paulsen CE, Armache J-P, Gao Y, Cheng Y, Julius D (2015) Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 520:511–517
200. Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475:353–358
201. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* 108:705–715

202. Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296:2046–2049
203. Phelan KD, Mock MM, Kretz O, Shwe UT, Kozhemyakin M, Greenfield LJ, Dietrich A, Birnbaumer L, Freichel M, Flockerzi V, Zheng F (2012) Heteromeric canonical transient receptor potential 1 and 4 channels play a critical role in epileptiform burst firing and seizure-induced neurodegeneration. *Molecular pharmacology* 81:384–392
204. Phelan KD, Shwe UT, Abramowitz J, Wu H, Rhee SW, Howell MD, Gottschall PE, Freichel M, Flockerzi V, Birnbaumer L, Zheng F (2013) Canonical transient receptor channel 5 (TRPC5) and TRPC1/4 contribute to seizure and excitotoxicity by distinct cellular mechanisms. *Molecular pharmacology* 83:429–438
205. Philipp S, Cavalié A, Freichel M, Wissenbach U, Zimmer S, Trost C, Marquart A, Murakami M, Flockerzi V (1996) A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J* 15:6166–6171
206. 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 Ca²⁺-like channels in adrenal cells. *The Journal of biological chemistry* 275:23965–23972
207. Plato CC, Galasko D, Garruto RM, Plato M, Gamst A, Craig U-K, Torres JM, Wiederholt W (2002) ALS and PDC of Guam: forty-year follow-up. *Neurology* 58:765–773
208. Poteser M, Graziani A, Rosker C, Eder P, Derler I, Kahr H, Zhu MX, Romanin C, Groschner K (2006) TRPC3 and TRPC4 associate to form a redox-sensitive cation channel. Evidence for expression of native TRPC3-TRPC4 heteromeric channels in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 281:13588–13595
209. Poteser M, Schleifer H, Lichtenegger M, Schernthaner M, Stockner T, Kappe CO, Glasnov TN, Romanin C, Groschner K (2011) PKC-dependent coupling of calcium permeation through transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) to calcineurin signaling in HL-1 myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:10556–10561
210. Radtke L, Willot M, Sun H, Ziegler S, Sauerland S, Strohmam C, Fröhlich R, Habenberger P, Waldmann H, Christmann M (2011) Total synthesis and biological evaluation of (-)-englerin A and B: synthesis of analogues with improved activity profile. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 50:3998–4002
211. Rao JN, Platoshyn O, Golovina VA, Liu L, Zou T, Marasa BS, Turner DJ, Yuan JX-J, Wang J-Y (2006) TRPC1 functions as a store-operated Ca²⁺ channel in intestinal epithelial cells and regulates early mucosal restitution after wounding. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 290:G782-92
212. Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature genetics* 37:739–744
213. Remington SJ (2011) Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Science* 20:1509–1519
214. Riccio A, Li Y, Moon J, Kim K-S, Smith KS, Rudolph U, Gapon S, Yao GL, Tsvetkov E, Rodig SJ, Van't Veer A, Meloni EG, Carlezon WA, Bolshakov VY, Clapham DE

- (2009) Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. *Cell* 137:761–772
215. Riccio A, Li Y, Tsvetkov E, Gapon S, Yao GL, Smith KS, Engin E, Rudolph U, Bolshakov VY, Clapham DE (2014) Decreased anxiety-like behavior and Gαq/11-dependent responses in the amygdala of mice lacking TRPC4 channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:3653–3667
 216. Riccio A, Medhurst AD, Mattei C, Kelsell RE, Calver AR, Randall AD, Benham CD, Pangalos MN (2002) mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Molecular Brain Research* 109:95–104
 217. Richter JM, Schaefer M, Hill K (2014) Riluzole activates TRPC5 channels independently of PLC activity. *British journal of pharmacology* 171:158–170
 218. Riehle M, Büscher AK, Gohlke B-O, Kaßmann M, Kolatsi-Joannou M, Bräsen JH, Nagel M, Becker JU, Winyard P, Hoyer PF, Preissner R, Krautwurst D, Gollasch M, Weber S, Harteneck C (2016) TRPC6 G757D Loss-of-Function Mutation Associates with FSGS. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 27:2771–2783
 219. Robertson JD, Orrenius S, Zhivotovsky B (2000) Review: nuclear events in apoptosis. *Journal of structural biology* 129:346–358
 220. Rock MJ, Prenen J, Funari VA, Funari TL, Merriman B, Nelson SF, Lachman RS, Wilcox WR, Reyno S, Quadrelli R, Vaglio A, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Ikegawa S, Nagai T, Rimoin DL, Nilius B, Cohn DH (2008) Gain-of-function mutations in TRPV4 cause autosomal dominant brachyolmia. *Nature genetics* 40:999–1003
 221. Rubaiy HN, Ludlow MJ, Bon RS, Beech DJ (2017) Pico145 - powerful new tool for TRPC1/4/5 channels. *Channels (Austin, Tex.)* 11:362–364
 222. Rubaiy HN, Ludlow MJ, Henrot M, Gaunt HJ, Miteva K, Cheung SY, Tanahashi Y, Hamzah N, Musialowski KE, Blythe NM, Appleby HL, Bailey MA, McKeown L, Taylor R, Foster R, Waldmann H, Nussbaumer P, Christmann M, Bon RS, Muraki K, Beech DJ (2017) Picomolar, selective, and subtype-specific small-molecule inhibition of TRPC1/4/5 channels. *The Journal of biological chemistry* 292:8158–8173
 223. Rubaiy HN, Ludlow MJ, Henrot M, Gaunt HJ, Miteva K, Cheung SY, Tanahashi Y, Hamzah N, Musialowski KE, Blythe NM, Appleby HL, Bailey MA, McKeown L, Taylor R, Foster R, Waldmann H, Nussbaumer P, Christmann M, Bon RS, Muraki K, Beech DJ (2017) Picomolar, selective, and subtype-specific small-molecule inhibition of TRPC1/4/5 channels. *The Journal of biological chemistry* 292:8158–8173
 224. Rubaiy HN, Ludlow MJ, Siems K, Norman K, Foster R, Wolf D, Beutler JA, Beech DJ (2018) Tonantzitolone is a nanomolar potency activator of transient receptor potential canonical 1/4/5 channels. *British journal of pharmacology* 175:3361–3368
 225. Rubaiy HN, Seitz T, Hahn S, Choidas A, Habenberger P, Klebl B, Dinkel K, Nussbaumer P, Waldmann H, Christmann M, Beech DJ (2018) Identification of an (-)-englerin A analogue, which antagonizes (-)-englerin A at TRPC1/4/5 channels. *British journal of pharmacology* 175:830–839
 226. Sabourin J, Bartoli F, Antigny F, Gomez AM, Benitah J-P (2016) Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)/Orai1-dependent Store-operated Ca²⁺ Channels: NEW TARGETS OF ALDOSTERONE IN CARDIOMYOCYTES. *The Journal of biological chemistry* 291:13394–13409
 227. Sabourin J, Boet A, Rucker-Martin C, Lambert M, Gomez A-M, Benitah J-P, Perros F, Humbert M, Antigny F (2018) Ca²⁺ handling remodeling and

- STIM1L/Orai1/TRPC1/TRPC4 upregulation in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 118:208–224
228. Sakamoto T, Unno T, Kitazawa T, Taneike T, Yamada M, Wess J, Nishimura M, Komori S (2007) Three distinct muscarinic signalling pathways for cationic channel activation in mouse gut smooth muscle cells. *The Journal of Physiology* 582:41–61
229. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning; A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y
230. Sansom MS, Shrivastava IH, Bright JN, Tate J, Capener CE, Biggin PC (2002) Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1565:294–307
231. Sawada Y, Hosokawa H, Hori A, Matsumura K, Kobayashi S (2007) Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain research* 1160:39–46
232. Schaefer M, Plant TD, Obukhov AG, Hofmann T, Gudermann T, Schultz G (2000) Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *The Journal of biological chemistry* 275:17517–17526
233. Schaefer M, Plant TD, Stresow N, Albrecht N, Schultz G (2002) Functional differences between TRPC4 splice variants. *The Journal of biological chemistry* 277:3752–3759
234. Schaldecker T, Kim S, Tarabanis C, Tian D, Hakrrouch S, Castonguay P, Ahn W, Wallentin H, Heid H, Hopkins CR, Lindsley CW, Riccio A, Buvall L, Weins A, Greka A (2013) Inhibition of the TRPC5 ion channel protects the kidney filter. *The Journal of clinical investigation* 123:5298–5309
235. Schilling WP, Goel M (2004) Mammalian TRPC channel subunit assembly. *Novartis Foundation symposium* 258:18-30; discussion 30-43, 98-102, 263-6
236. Schindl R, Fritsch R, Jardin I, Frischauf I, Kahr H, Muik M, Riedl MC, Groschner K, Romanin C (2012) Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca²⁺ influx. *The Journal of biological chemistry* 287:35612–35620
237. Schlingmann KP, Sassen MC, Weber S, Pechmann U, Kusch K, Pelken L, Lotan D, Syrrou M, Prebble JJ, Cole DEC, Metzger DL, Rahman S, Tajima T, Shu S-G, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M (2005) Novel TRPM6 mutations in 21 families with primary hypomagnesemia and secondary hypocalcemia. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16:3061–3069
238. Seebohm G, Westenskow P, Lang F, Sanguinetti MC (2005) Mutation of colocalized residues of the pore helix and transmembrane segments S5 and S6 disrupt deactivation and modify inactivation of KCNQ1 K⁺ channels. *The Journal of Physiology* 563:359–368
239. Sekerková G, Kim J-A, Nigro MJ, Becker EBE, Hartmann J, Birnbaumer L, Mugnaini E, Martina M (2013) Early onset of ataxia in moonwalker mice is accompanied by complete ablation of type II unipolar brush cells and Purkinje cell dysfunction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:19689–19694
240. Selvaraj S, Sun Y, Watt JA, Wang S, Lei S, Birnbaumer L, Singh BB (2012) Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves downregulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling. *The Journal of clinical investigation* 122:1354–1367

241. Seo K, Rainer PP, Shalkey Hahn V, Lee D-I, Jo S-H, Andersen A, Liu T, Xu X, Willette RN, Lepore JJ, Marino JP, Birnbaumer L, Schnackenberg CG, Kass DA (2014) Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:1551–1556
242. Shen PS, Yang X, DeCaen PG, Liu X, Bulkley D, Clapham DE, Cao E (2016) The Structure of the Polycystic Kidney Disease Channel PKD2 in Lipid Nanodiscs. *Cell* 167:763-773.e11. doi:10.1016/j.cell.2016.09.048
243. Shi YF, Sahai BM, Green DR (1989) Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 339:625–626
244. Sierra-Valdez F, Azumaya CM, Romero LO, Nakagawa T, Cordero-Morales JF (2018) Structure-function analyses of the ion channel TRPC3 reveal that its cytoplasmic domain allosterically modulates channel gating. *The Journal of biological chemistry* 293:16102–16114
245. Singh A, Hildebrand ME, Garcia E, Snutch TP (2010) The transient receptor potential channel antagonist SKF96365 is a potent blocker of low-voltage-activated T-type calcium channels. *British journal of pharmacology* 160:1464–1475
246. Sinkins WG, Estacion M, Schilling WP (1998) Functional expression of TrpC1: a human homologue of the Drosophila Trp channel. *The Biochemical journal* 331 (Pt 1):331–339
247. Slaugenhaupt SA (2002) The molecular basis of mucopolipidosis type IV. *Current molecular medicine* 2:445–450
248. Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin J-P, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418:186–190
249. Song K, Wang H, Kamm GB, Pohle J, Reis FdC, Heppenstall P, Wende H, Siemens J (2016) The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science* 353:1393–1398
250. Sours S, Du J, Chu S, Ding M, Zhou XJ, Ma R (2006) Expression of canonical transient receptor potential (TRPC) proteins in human glomerular mesangial cells. *American journal of physiology. Renal physiology* 290:F1507-15
251. Stallmeyer B, Zumhagen S, Denjoy I, Duthoit G, Hébert J-L, Ferrer X, Maugenre S, Schmitz W, Kirchhefer U, Schulze-Bahr E, Guicheney P, Schulze-Bahr E (2012) Mutational spectrum in the Ca(2+)-activated cation channel gene TRPM4 in patients with cardiac conductance disturbances. *Human mutation* 33:109–117
252. Storch U, Forst A-L, Pardatscher F, Erdogmus S, Philipp M, Gregoritzka M, Mederos y Schnitzler M, Gudermann T (2017) Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:E37-E46
253. Storch U, Forst A-L, Philipp M, Gudermann T, Mederos y Schnitzler M (2012) Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *The Journal of biological chemistry* 287:3530–3540
254. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S,

- Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* 112:819–829
255. Striggow F, Ehrlich BE (1996) Ligand-gated calcium channels inside and out. *Current opinion in cell biology* 8:490–495
 256. Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29:645–655
 257. Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2003) Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *The Journal of biological chemistry* 278:39014–39019
 258. Su Z, Zhou X, Haynes WJ, Loukin SH, Anishkin A, Saimi Y, Kung C (2007) Yeast gain-of-function mutations reveal structure-function relationships conserved among different subfamilies of transient receptor potential channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:19607–19612
 259. Su Z, Zhou X, Haynes WJ, Loukin SH, Anishkin A, Saimi Y, Kung C (2007) Yeast gain-of-function mutations reveal structure-function relationships conserved among different subfamilies of transient receptor potential channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:19607–19612
 260. Sun Y, Zhang H, Selvaraj S, Sukumaran P, Lei S, Birnbaumer L, Singh BB (2017) Inhibition of L-Type Ca²⁺ Channels by TRPC1-STIM1 Complex Is Essential for the Protection of Dopaminergic Neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37:3364–3377
 261. Sung HH, Choo SH, Ko M, Kang SJ, Chae MR, Kam SC, Han DH, So I, Lee SW (2014) Increased expression of TRPC4 channels associated with erectile dysfunction in diabetes. *Andrology* 2:550–558
 262. Sung TS, Jeon JP, Kim BJ, Hong C, Kim SY, Kim J, Jeon JH, Kim HJ, Suh CK, Kim SJ, So I (2011) Molecular determinants of PKA-dependent inhibition of TRPC5 channel. *American journal of physiology. Cell physiology* 301:C823-32
 263. Takamori M (2008) Autoantibodies against TRPC3 and ryanodine receptor in myasthenia gravis. *Journal of neuroimmunology* 200:142–144
 264. Talavera K, Startek JB, Alvarez-Collazo J, Boonen B, Alpizar YA, Sanchez A, Naert R, Nilius B (2020) Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiological reviews* 100:725–803. doi:10.1152/physrev.00005.2019
 265. Tang J, Lin Y, Zhang Z, Tikunova S, Birnbaumer L, Zhu MX (2001) Identification of Common Binding Sites for Calmodulin and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors on the Carboxyl Termini of Trp Channels. *Journal of Biological Chemistry* 276:21303–21310
 266. Tang Q, Guo W, Zheng L, Wu J-X, Liu M, Zhou X, Zhang X, Chen L (2018) Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell research* 28:746–755
 267. Thakur DP, Tian J, Jeon J, Xiong J, Huang Y, Flockerzi V, Zhu MX (2016) Critical roles of Gi/o proteins and phospholipase C- δ 1 in the activation of receptor-operated TRPC4 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:1092–1097

268. Tian J, Zhu MX (2018) GABAB Receptors Augment TRPC3-Mediated Slow Excitatory Postsynaptic Current to Regulate Cerebellar Purkinje Neuron Response to Type-1 Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *Cells* 7
269. Tiruppathi C, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB (2006) Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability. *Microcirculation* (New York, N.Y. : 1994) 13:693–708
270. Tsiokas L, Arnould T, Zhu C, Kim E, Walz G, Sukhatme VP (1999) Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:3934–3939
271. Tsirigos KD, Peters C, Shu N, Käll L, Elofsson A (2015) The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic acids research* 43:W401-7
272. Tsvilovskyy VV, Zholos AV, Aberle T, Philipp SE, Dietrich A, Zhu MX, Birnbaumer L, Freichel M, Flockerzi V (2009) Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology* 137:1415–1424
273. van Hoeymissen E, Held K, Nogueira Freitas AC, Janssens A, Voets T, Vriens J (2020) Gain of channel function and modified gating properties in TRPM3 mutants causing intellectual disability and epilepsy. *eLife* 9
274. Vanags DM, Pörn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S (1996) Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 271:31075–31085
275. Venkatachalam (2007) TRP channels:387–417.
276. Verma P, Kumar A, Goswami C (2010) TRPV4-mediated channelopathies. *Channels* (Austin, Tex.) 4:319–328. doi:10.4161/chan.4.4.12905
277. Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet J-P (2006) CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Science* 312:1220–1223
278. Vinayagam D, Mager T, Apelbaum A, Bothe A, Merino F, Hofnagel O, Gatsogiannis C, Raunser S (2018) Electron cryo-microscopy structure of the canonical TRPC4 ion channel. *eLife* 7
279. Vinayagam D, Quentin D, Yu-Strzelczyk J, Sitsel O, Merino F, Stabrin M, Hofnagel O, Yu M, Ledebor MW, Nagel G, Malojcic G, Raunser S (2020) Structural basis of TRPC4 regulation by calmodulin and pharmacological agents. *eLife* 9
280. Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T (2011) TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70:482–494
281. Vriens J, Voets T (2018) Sensing the heat with TRPM3. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 470:799–807
282. Wagner TFJ, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, Düfer M, Lis A, Flockerzi V, Philipp SE, Oberwinkler J (2008) Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nature cell biology* 10:1421–1430

283. Wang H, Cheng X, Tian J, Xiao Y, Tian T, Xu F, Hong X, Zhu MX (2020) TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. *Pharmacology & therapeutics* 209:107497
284. Wang H, Xu Z, Lee BH, Vu S, Hu L, Lee M, Bu D, Cao X, Hwang S, Yang Y, Zheng J, Lin Z (2019) Gain-of-Function Mutations in TRPM4 Activation Gate Cause Progressive Symmetric Erythrokeratoderma. *The Journal of investigative dermatology* 139:1089–1097
285. Wang J, Fu X, Yang K, Jiang Q, Chen Y, Jia J, Duan X, Wang EW, He J, Ran P, Zhong N, Semenza GL, Lu W (2015) Hypoxia inducible factor-1-dependent up-regulation of BMP4 mediates hypoxia-induced increase of TRPC expression in PSMCs. *Cardiovascular research* 107:108–118
286. Wang M, Bianchi R, Chuang S-C, Zhao W, Wong RKS (2007) Group I metabotropic glutamate receptor-dependent TRPC channel trafficking in hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry* 101:411–421
287. Wang X, Dande RR, Yu H, Samelko B, Miller RE, Altintas MM, Reiser J (2018) TRPC5 Does Not Cause or Aggravate Glomerular Disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 29:409–415
288. Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B (2002) Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 277:47044–47051
289. Webb B, Sali A (2016) Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current protocols in protein science* 86:2.9.1-2.9.37
290. Wei H, Sagalajev B, Yüzer MA, Koivisto A, Pertovaara A (2015) Regulation of neuropathic pain behavior by amygdaloid TRPC4/C5 channels. *Neuroscience letters* 608:12–17
291. Westlund KN, Zhang LP, Ma F, Nesemeier R, Ruiz JC, Ostertag EM, Crawford JS, Babinski K, Marcinkiewicz MM (2014) A rat knockout model implicates TRPC4 in visceral pain sensation. *Neuroscience* 262:165–175
292. Wheeler GL, Brownlee C (2008) Ca²⁺ signalling in plants and green algae--changing channels. *Trends in plant science* 13:506–514
293. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB (2005) A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Science* 308:1801–1804
294. Wu L-J, Sweet T-B, Clapham DE (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacological reviews* 62:381–404
295. Wyatt A, Wartenberg P, Candlish M, Krasteva-Christ G, Flockerzi V, Boehm U (2017) Genetic strategies to analyze primary TRP channel-expressing cells in mice. *Cell calcium* 67:91–104
296. Xiao R, Tian J, Tang J, Zhu MX (2008) The TRPV3 mutation associated with the hairless phenotype in rodents is constitutively active. *Cell calcium* 43:334–343
297. Xu F, Liu X-C, Li L, Ma C-N, Zhang Y-J (2017) Effects of TRPC1 on epithelial mesenchymal transition in human airway in chronic obstructive pulmonary disease. *Medicine* 96:e8166

298. Xu H, Delling M, Li L, Dong X, Clapham DE (2007) Activating mutation in a mucolipin transient receptor potential channel leads to melanocyte loss in varint-waddler mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:18321–18326
299. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418:181–186
300. Xu S-Z, Sukumar P, Zeng F, Li J, Jairaman A, English A, Naylor J, Ciurtin C, Majeed Y, Milligan CJ, Bahnasi YM, Al-Shawaf E, Porter KE, Jiang L-H, Emery P, Sivaprasadarao A, Beech DJ (2008) TRPC channel activation by extracellular thioredoxin. *Nature* 451:69–72
301. Yang F, Xiao X, Cheng W, Yang W, Yu P, Song Z, Yarov-Yarovoy V, Zheng J (2015) Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nature chemical biology* 11:518–524
302. Yang L-P, Jiang F-J, Wu G-S, Deng K, Wen M, Zhou X, Hong X, Zhu MX, Luo H-R (2015) Acute Treatment with a Novel TRPC4/C5 Channel Inhibitor Produces Antidepressant and Anxiolytic-Like Effects in Mice. *PloS one* 10:e0136255
303. Yang P, Zhu MX (2014) TRPV3. *Handbook of experimental pharmacology* 222:273–291
304. Yin Y, Wu M, Zubcevic L, Borschel WF, Lander GC, Lee S-Y (2018) Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8. *Science (New York, N.Y.)* 359:237–241
305. Yoon J, Ben-Ami HC, Hong YS, Park S, Strong LL, Bowman J, Geng C, Baek K, Minke B, Pak WL (2000) Novel mechanism of massive photoreceptor degeneration caused by mutations in the *trp* gene of *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:649–659
306. Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y (2006) Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature chemical biology* 2:596–607
307. Yoshida Y, Imai S (1997) Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Japanese journal of pharmacology* 74:125–137
308. Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, Dehoff MH, Schwarz MK, Seeburg PH, Muallem S, Worley PF (2003) Homer Binds TRPC Family Channels and Is Required for Gating of TRPC1 by IP3 Receptors. *Cell* 114:777–789
309. Zechel S, Werner S, Bohlen Und Halbach O von (2007) Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain. *Cell and tissue research* 328:651–656
310. Zhang Y, Wang Y, Yang K, Tian L, Fu X, Wang Y, Sun Y, Jiang Q, Lu W, Wang J (2014) BMP4 increases the expression of TRPC and basal Ca²⁺ via the p38MAPK and ERK1/2 pathways independent of BMPRII in PSMCs. *PloS one* 9:e112695
311. Zhang Z, Tang J, Tikunova S, Johnson JD, Chen Z, Qin N, Dietrich A, Stefani E, Birnbaumer L, Zhu MX (2001) Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:3168–3173
312. Zhang Z, Reboreda A, Alonso A, Barker PA, Séguéla P (2011) TRPC channels underlie cholinergic plateau potentials and persistent activity in entorhinal cortex. *Hippocampus* 21:386–397

313. Zheng F, Phelan KD (2014) The role of canonical transient receptor potential channels in seizure and excitotoxicity. *Cells* 3:288–303
314. Zheng H, Liu W, Anderson LY, Jiang Q-X (2011) Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel. *Nature communications* 2:250
315. Zholos AV, Bolton TB (1997) Muscarinic receptor subtypes controlling the cationic current in guinea-pig ileal smooth muscle. *British journal of pharmacology* 122:885–893
316. Zholos AV, Tsytsyura YD, Philyppov IB, Shuba MF, Bolton TB (2000) Voltage-dependent inhibition of the muscarinic cationic current in guinea-pig ileal cells by SK&F 96365. *British journal of pharmacology* 129:695–702
317. Zholos AV (2014) TRPC5. *Handbook of experimental pharmacology* 222:129–156
318. Zhou B, Wang Y, Zhang C, Yang G, Zhang F, Yu B, Chai C, Cao Z (2018) Ribemansides A and B, TRPC6 Inhibitors from *Ribes manshuricum* That Suppress TGF- β 1-Induced Fibrogenesis in HK-2 Cells. *Journal of natural products* 81:913–917
319. Zhou H, Iwasaki H, Nakamura T, Nakamura K, Maruyama T, Hamano S, Ozaki S, Mizutani A, Mikoshiba K (2007) 2-Aminoethyl diphenylborinate analogues: selective inhibition for store-operated Ca²⁺ entry. *Biochemical and biophysical research communications* 352:277–282
320. Zhou Y, Castonguay P, Sidhom E-H, Clark AR, Dvela-Levitt M, Kim S, Sieber J, Wieder N, Jung JY, Andreeva S, Reichardt J, Dubois F, Hoffmann SC, Basgen JM, Montesinos MS, Weins A, Johnson AC, Lander ES, Garrett MR, Hopkins CR, Greka A (2017) A small-molecule inhibitor of TRPC5 ion channels suppresses progressive kidney disease in animal models. *Science (New York, N.Y.)* 358:1332–1336
321. Zhu XD, Sadowski PD (1995) Cleavage-dependent ligation by the FLP recombinase. Characterization of a mutant FLP protein with an alteration in a catalytic amino acid. *The Journal of biological chemistry* 270:23044–23054
322. Zhu Y, Lu Y, Qu C, Miller M, Tian J, Thakur DP, Zhu J, Deng Z, Hu X, Wu M, McManus OB, Li M, Hong X, Zhu MX, Luo H-R (2015) Identification and optimization of 2-aminobenzimidazole derivatives as novel inhibitors of TRPC4 and TRPC5 channels. *British journal of pharmacology* 172:3495–3509
323. Zíma V, Witschas K, Hynkova A, Zímová L, Barvík I, Vlachova V (2015) Structural modeling and patch-clamp analysis of pain-related mutation TRPA1-N855S reveal inter-subunit salt bridges stabilizing the channel open state. *Neuropharmacology* 93:294–307
324. Zimoń M, Baets J, Auer-Grumbach M, Berciano J, Garcia A, Lopez-Laso E, Merlini L, Hilton-Jones D, McEntagart M, Crosby AH, Barisic N, Boltshauser E, Shaw CE, Landouré G, Ludlow CL, Gaudet R, Houlden H, Reilly MM, Fischbeck KH, Sumner CJ, Timmerman V, Jordanova A, Jonghe P de (2010) Dominant mutations in the cation channel gene transient receptor potential vanilloid 4 cause an unusual spectrum of neuropathies. *Brain : a journal of neurology* 133:1798–1809
325. Zitt C, Zobel A, Obukhov AG, Harteneck C, Kalkbrenner F, Lückhoff A, Schultz G (1996) Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* 16:1189–1196
326. Zubcevic L, Herzik MA, Chung BC, Liu Z, Lander GC, Lee S-Y (2016) Cryo-electron microscopy structure of the TRPV2 ion channel. *Nat Struct Mol Biol* 23:180–186

327. Zucchi R, Ronca-Testoni S (1997) The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. Pharmacological

7 Publikationen

Originalarbeiten

*Beck A, ***Speicher T**, Stoerger C, Sell T, Dettmer V, Jusoh SA, Abdulmughni A, Cavalié A, Philipp SE, Zhu MX, Helms V, Wissenbach U and Flockerzi V (2013). Conserved gating elements in TRPC4 and TRPC5 channels. *J Biol Chem*; 288: 19471-19483.

*gemeinsame Erstautorschaft

Poster

22nd Ion Channel Meeting Canaux, Presqu'île de Giens, France: Beck A, **Speicher T**, Wissenbach U, Cavalié A and Flockerzi V (2011). A single point mutation leads to constitutive open TRP channel.

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

9 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Flockerzi für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die immerwährende Diskussionsbereitschaft; PD Dr. Ulrich Wissenbach und Dr. Andreas Beck für die Unterstützung bei Klonierung, Fura und beim wissenschaftlichen schreiben; PD Dr. Ulrich Wissenbach und PD Dr. Stephan Philipp für die Herstellung der stabilen Zelllinien; Karin Wolske und Heidi Löhr für das praktische Know- How sowie die Unterstützung bei Klonierung und Zellkultur.

Zudem danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung: meinen verstorbenen Großeltern Anton Speicher und Agnes Speicher; meinen Eltern Sabine und Matthias; Anne und Frank sowie meinen Brüdern Phineas, Anuk und Matti.

Tag der Promotion: 23.05.2023
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter: PD Dr. Ulrich Wissenbach
Jun.-Prof. Dr. Marcel Lauterbach