

Die physiologische Variante von TRPC1 und der Einfluss von Punktmutationen auf die TRP-Kanalfunktion

Der Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Dr. rer. nat.

eingereichte Dissertation

von
Frau Laura Marie Hofmann
geb. am 19.03.1989
in
Heidelberg

Homburg, September 2017

„Anfang und Ende der Dinge werden dem Menschen immer ein Geheimnis bleiben: Er ist ebenso unfähig, das Nichts zu sehen, aus dem er stammt, wie die Unendlichkeit zu erkennen, die ihn verschlingen wird.“

(Blaise Pascal 1623-1662, französischer Mathematiker, Philosoph, Literat)

Die folgenden Konstrukte wurden von Dr. Ulrich Wissenbach kloniert: TRPC1-S- und TRPC1-VL pcAGGS-I-GFP, TRPC1-N-S und -VL im pcDNA3-Vektor sowie die Porenkonstrukte TRPC4-C1-Pore und TRPC1-VL-C4-Pore im pcAGGS-I-GFP-Vektor.

Dr. Andreas Beck hat die *Whole Cell Patch Clamp* Experimente der TRPC1 und TRPC1/TRPC4 exprimierenden Zellen in Teil 1 durchgeführt.

Die *Whole Cell Patch Clamp* Experimente in glatten Muskelzellen des Ileums der Maus wurden von Dr. Volodymyr Tsvilovsky durchgeführt.

Die massenspektrometrischen Analysen aus Hirn von Maus wurden von Sandra Plant und Dr. Claudia Fecher-Trost durchgeführt.

Herrn Prof. Chen und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit während meines Aufenthalts in seinem Labor in Edmonton, wo mir u.a. die Gelegenheit gegeben wurde mit *Xenopus* Oozyten zu arbeiten und die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme zu erlernen.

Zusammenfassung

Das TRPC1-Protein war das erste TRP-homologe Protein, das in Säugern identifiziert wurde. Danach wurden 27 weitere Vertreter der TRP-Kationenkanal-Familie in Säugern entdeckt. Über zwanzig Jahre nach der Klonierung von TRPC1 wird dessen Funktion, einen eigenständigen Kationenkanal zu bilden, nach wie vor kontrovers diskutiert. Zunächst fiel auf, dass das TRPC1-Protein, das endogen im Maushirn exprimiert wird, eine größere Masse aufweist, als rekombinantes TRPC1, das von einer cDNA gebildet wird, die mit dem ersten ATG-Triplett beginnt und einem Stoppcodon endet. Ich konnte zeigen, dass sich der Massenunterschied nicht durch post-translationale Glykosylierung des TRPC1-Proteins erklärt sondern dass die Translation des TRPC1-Proteins an einem nicht-ATG-Triplett mindestens 249 Basenpaare stromaufwärts des ersten ATG-Tripletts der cDNA stattfindet. Folglich wird ein Teil der vormals als 5' nicht translatierte Region bezeichneten cDNA translatiert. Die heterologe Expression des längeren TRPC1-Proteins (TRPC1-VL) führt aber nicht dazu, dass man dem Protein mittels Ca-Imaging oder *Whole Cell Patch Clamp* ohne Weiteres Kanaleigenschaften zuordnen kann. Es war bislang bekannt, dass TRPC1 mit TRPC4 und anderen TRP-Kanälen Multimere bilden kann und die TRPC4-Kanaleigenschaften im Vergleich zu homomultimeren Kanälen verändert. So verringert schon die Gegenwart des kürzeren TRPC1 (TRPC1-S) den TRPC4-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom, TRPC1-VL zeigt ähnliche Effekte. Die Einführung verschiedener Mutationen, die in anderen TRP-Kanälen zu konstitutiver Aktivität führen, hat in TRPC1-VL keinen Effekt. Ich konnte zeigen, dass das TRPC1-VL-Protein nach Überexpression weder in HEK-293 noch in Cos-7 Zellen in die Plasmamembran gelangt, weshalb es schwierig ist zu klären, ob die homomere TRPC1-Pore eine Leitfähigkeit für Ionen aufweist. Durch chimäre Konstrukte, die aus TRPC4 und der TRPC1-Porenregion bestehen, konnte ich zeigen, dass das chimäre Konstrukt in die Plasmamembran gelangt und eine Leitfähigkeit für Kationen aufweist, d. h. homomere TRPC1-Poren Ionen leiten. Weiterhin stellt sich die Frage ob es für den heteromeren TRPC4/TRPC1-Kanal ein physiologisches Korrelat *in vivo* gibt. In akut isolierten glatten Muskelzellen des Ileums von Maus werden beide Proteine exprimiert und, in Übereinstimmung mit den heterologen Expressionsversuchen *in vitro*, zeigen Wildtyp Muskelzellen nach Stimulation

einen kleineren Kationeneinstrom als TRPC1-defiziente Zellen. Demnach ist die physiologische Rolle des TRPC1-Proteins darin zu sehen, dass es die Ionenleitenden Eigenschaften von heteromeren TRP-Kanälen modulieren kann.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Punktmutationen auf die Aktivierbarkeit der TRP-Kanäle TRPC4, TRPM4, TRPM8 und TRPV6 untersucht. Es sind hoch auflösende Strukturen von TRPV1, TRPV2, TRPA1, TRPP2, TRPN und TRPV6 verfügbar, die implizieren, dass drei konservierte Bereiche der TRP-Proteine zueinander in räumlicher Nähe liegen, eine Helix vor der ersten Transmembrandomäne (prä S1-Helix), das Verbindungsstück zwischen der vierten und der fünften Transmembrandomäne (S4-S5 Linker) und die TRP-Domäne, die sich nach der Transmembrandomäne S6 befindet. Mutationen in der prä S1-Helix haben in Abhängigkeit vom untersuchten TRP-Kanal gegenläufige Effekte: Die untersuchten prä S1-Helix-Mutationen führen zu gesteigert konstitutiv aktiven TRPV6-Kanälen, zu TRPC4-Kanälen mit erhöhter Aktivität nach Stimulation mit einem Agonisten und zu verringerter Aktivität bzw. zur völligen Inaktivierung von TRPM4- und TRPM8-Kanälen. Die Mutation einer in fast allen TRP-Proteinen konservierten Aminosäure des S4-S5 Linkers führt zu konstitutiver Aktivität in TRPC4 (Beck et al. 2013) und TRPV6, nicht aber in TRPM8. Mutationen konservierter Aminosäuren innerhalb der TRP-Domäne führen in den Proteinen TRPC4, TRPM4 und TRPV6 zu konstitutiv aktiven Kanälen. Analoge Mutationen führen in TRPM8 dazu, dass der Kanal durch den Agonisten Menthol nicht mehr stimulierbar ist. Generell kann festgestellt werden, dass der Austausch konservierter Aminosäuren gegen nicht-homologe Aminosäuren in den Bereichen der prä S1-Helix, des S4-S5 Linkers und dem Bereich der TRP-Domäne zu drastischen Effekten hinsichtlich der funktionellen Eigenschaften aller untersuchten Kanäle führt und dass intra- und intermolekulare Wechselwirkungen von prä S1-Helix bzw. S4-S5 Linker mit der TRP-Domäne für die Regulation der Kanalfunktion essentiell sind.

Abstract

About the characteristics of physiological TRPC1 and similar gating procedures in TRP channels

TRPC1 was the first mammalian TRP channel member to be cloned. The TRP superfamily consists of 28 mammalian members divided into 6 subfamilies. Although the discovery of TRPC1 was more than two decades ago its function as a homomeric cation channel is still a matter of debate. By Western blot of brain microsomal membrane protein fractions from mice it was obvious that the brain TRPC1 protein runs slower in gel electrophoresis than the TRPC1 protein obtained by expression of its cDNA devoid of the putative 5' untranslated region in HEK-293 or Cos-7 cells. This raised the question if we are working with the correct cDNA. In the scope of this work, I could exclude that the difference in mass occurs due to post-translational glycosylation of TRPC1. I could show that the endogenous translation initiation site is located at a non-AUG codon within the 5' untranslated region. Furthermore I characterised the N-terminally extended TRPC1 protein in terms of distinct modes of action compared to the (annotated) short version. I could show that the subcellular localisation, the multimerisation with other TRPs as well as the functional interaction with TRPC4 does not differ between the two variants. While examining the physiological role of TRPC1, I could show that TRPC1 is present in ileal myocytes of mice and that the muscarinic receptor-induced cation current in these cells is mainly conducted by TRPC4/TRPC1 heteromultimers. In TRPC1-deficient mice the cation current increases which represents the phenotype of TRPC1 in heteromultimeric channels in the heterologous expression system. These results demonstrate that TRPC1 contributes to the channel pore of heteromeric TRPC4/TRPC1 channels.

The second part of this thesis deals with single point mutations which have a dramatic impact on the respective TRP channel function. The selection of amino acids was based on the recent discovery of high resolution structures of numerous TRP channels which indicate inter- and intramolecular interactions within the TRP channel complex. In this work I examined the impact of mutations within highly conserved motifs in TRPC4, TRPM4, TRPM8 and TRPV6 proteins. I could show that some mutations in the respective TRPs had similar

effects on the channel function which might be an indication of a shared gating process, but others did have controversial effects. Several mutations led to the so called gain-of-function phenotype which has prompted me to test the effect on TRPC1. The mutations did, like the discovery of the N-terminal extension, not lead to an functional homomeric TRPC1 channel which might be due to the fact that TRPC1 is not located in the plasma membrane. With the design of a chimeric construct consisting of TRPC4 and the TRPC1 pore region it was possible to translocate the TRPC1 pore to the plasma membrane and to measure an intrinsic cation conductance. This finding confirms that the homomeric TRPC1 pore conducts ions. Because homomeric TRPC1 complexes could not be identified in the plasmamembrane they may rather function as cation channels in subcellular compartments.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	TRP-Kanäle	1
1.1.1	TRPC-Subfamilie	4
1.1.2	TRPV-Subfamilie	6
1.1.3	TRPM-Subfamilie	6
1.1.4	TRPP-Subfamilie	7
1.2	Hoch-auflösende TRP-Strukturen	7
1.3	Translations-Initiation in Eukaryoten	8
1.3.1	Nicht-AUG Startcodons	9
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	10
2	Material und Methoden	13
2.1	Chemikalien	13
2.2	Puffer und Lösungen	13
2.2.1	Lösungen für molekularbiologische Experimente	13
2.2.2	Lösungen für proteinbiochemische Experimente	14
2.2.3	Lösungen für elektrophysiologische Experimente	17
2.2.4	Badlösungen für Ca-Imaging und Mikroskopie	19
2.3	Eukaryotische Zellkultur und Nährmedien	19
2.3.1	Zelllinien	19
2.3.2	Transfektion	20
2.4	Andere Organismen	21
2.4.1	Bakterienstämme	21
2.4.2	Mauslinien	21
2.4.3	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten	22
2.5	Molekularbiologische Methoden	22

2.5.1	Vektoren	22
2.5.2	Oligonukleotide	23
2.5.3	Polymerasekettenreaktion	27
2.5.4	Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme .	27
2.5.5	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.5.6	Elution von DNA aus Agarosegelen	29
2.5.7	Transformation	29
2.5.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	29
2.5.9	Sequenzierung	30
2.5.10	Klonierung von TRPC1-Konstrukten	30
2.5.11	Klonierung und Mutagenese von TRPC1-VL, TRPC4, TRPM4, TRPM8 und TRPV6	32
2.5.12	Im Rahmen dieser Arbeit klonierte Plasmide	32
2.6	Proteinbiochemische Methoden	36
2.6.1	Verwendete Antikörper	36
2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.6.3	Western Blot	38
2.6.4	Co-Immunpräzipitation	39
2.6.5	Proteinbestimmung	41
2.6.6	Glykosylierungsassay	41
2.7	Messung der intrazellulären Kalziumionen (Ca^{2+})-Konzentra- tionsänderung	42
2.8	Patch-Clamp-Technik	43
2.9	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	44
2.10	Biotinylierungsassay von Oozyten	45
2.11	Mikroskopie	46
2.12	Analyse und Statistik	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Teil 1: TRPC1-VL	49
3.1.1	Identifizierung des endogen exprimierten TRPC1-Proteins (TRPC1-VL) aus Maushirn	49
3.1.2	TRPC1 kann Komplexe mit anderen TRP-Kanälen bilden	55
3.1.3	Funktionelle Untersuchungen von TRPC1-VL	55
3.1.4	Subzelluläre Lokalisation von TRPC1-VL	60

3.1.5	Funktion von TRPC1-VL <i>in vivo</i>	63
3.2	Teil 2: Einfluss von Punktmutationen auf die TRP-Kanalfunktion	65
3.2.1	TRPC1	65
3.2.2	TRPV6	72
3.2.3	TRPM8	79
3.2.4	TRPM4	82
3.2.5	TRPC4	84
4	Diskussion	91
4.1	Diskussion Teil 1: TRPC1-VL	91
4.1.1	Identifizierung des nicht-AUG-Startcodons	91
4.1.2	Funktion von TRPC1-VL	93
4.2	Diskussion Teil 2: Einfluss von Punktmutationen auf die TRP-Kanalfunktion	98
4.2.1	Analyse von TRPC1-Mutationen	99
4.2.2	Analyse von TRPC4-, TRPM4-, TRPM8- und TRPV6-Mutationen	102
4.2.3	Ausblick	110
5	Literaturverzeichnis	113
5.1	Quellenverzeichnis	113
5.2	Eigene Veröffentlichungen	128
5.3	Eingereichte Manuskripte	128
	Abbildungsverzeichnis	129
	Tabellenverzeichnis	130
	Danksagung	133
	Lebenslauf	134

Abkürzungsverzeichnis

A Alanin

AITC Allylisoithiocyanat

AK Antikörper

ATP Adenosintriphosphat

AUC Fläche unter der Kurve

BCA Bicinchoninsäure

bp Basenpaare

C Cystein

Ca²⁺ Kalziumionen

Ca-Imaging Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentrations-Änderung

CCh Carbachol

cDNA komplementäre DNA

Cl⁻ Chloridionen

Cos-7 immortalisierte Nierenfibroblastenzelllinie aus *Chlorocebus aethiops*

DAG Diacylglycerol

DAMGO [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-Enkephalin

DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTPs Desoxyribonukleosidtriphosphate: dATP, dCTP, dGTP und dTTP

E. coli *Escherichia coli*

EA Englerin A

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

eGFP *enhanced* grün fluoreszierendes Protein

eIF eukaryotischer Initiationsfaktor

ER endoplasmatisches Retikulum

F Phenylalanin

FKS fetales Kälberserum

G Glycin

GFP grün fluoreszierendes Protein

HEK-293 humane embryonale Nierenzelllinie

HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

I Isoleucin

IgG Immunglobulin G

IP Immunpräzipitation

IRES interne ribosomale Eintrittsstelle

IV-Kurve Strom-Spannungs-Kennlinie

K Lysin

kb Kilobasen

L Leucin

La³⁺ Lanthanionen

LB Lysogeny Broth

M Methionin

M₂R muskarinischer Rezeptor Typ 2

M₃R muskarinischer Rezeptor Typ 3

mA Milliampere

Mg²⁺ Magnesiumionen

mRFP monomerisches rot fluoreszierendes Protein

mRNA *messenger* RNA

N Asparagin

Na⁺ Natriumionen

NMDG N-Methyl-D-glucamin

ns nicht signifikant

NSC-34 Fusionszelllinie aus murinen Motoneuronen und murinen Neuroblastomazellen

OAG 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol

μ-OR μ-Opioidrezeptor

PCR Polymerasekettenreaktion

PLC Phospholipase C

PNGase F Peptid N-Glykosidase F

R Arginin

RNA Ribonukleinsäure

RT Raumtemperatur

RT-PCR Reverse Transkriptase-PCR

s Sekunden

S Serin

SDS Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SERCA Ca^{2+} -Pumpe des SR und ER

SOCE speichervermittelter Ca^{2+} -Einstrom

SR sarkoplasmatisches Retikulum

STIM stromal interaction molecule

T Threonin

TEVC Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

TG Thapsigargin

TM Transmembran

TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

tRNA_i Initiator-tRNA

tRNA_i^{Met} Methionyl-Initiator-tRNA

TRP *transient receptor potential*

TRPC1-S S=*Short*, TRPC1 Protein welches mit dem ersten Methionin beginnt

TRPC1-VL VL=*Very Long*, TRPC1 Protein mit endogener N-terminaler Verlängerung

5' UTR 5' nicht translatierte Region

V_H Haltepotential

W Tryptophan

WB Western Blot

Whole Cell Patch Clamp Spannungsklemme im Ganzzell-Modus

WT Wildtyp

Kapitel 1

Einleitung

1.1 TRP-Kanäle

Der Name der TRP-Kanäle leitet sich von dem Begriff *transient receptor potential* (TRP) ab. Der Begriff beschreibt einen Effekt den man mittels Elektretinogramm nach Belichtung von Photorezeptorzellen von Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) darstellen kann. Eine Mutante zeigt auf einen starken Lichtreiz nur ein transientes Signal im Elektretinogramm, während Wildtyp (WT)-Fliegen ein hohes Rezeptorpotential für die Zeit des Lichtreizes aufrecht erhalten (Cosens und Manning 1969; Minke et al. 1975; Minke 1977; Minke 1982). Auf der Suche nach einer Erklärung für das beobachtete Phänomen wurde das *trp*-Gen kloniert und die dem Phänomen zugrunde liegende Mutation identifiziert (Montell et al. 1985). Das *trp*-Genprodukt ist ein nicht-selektiver Kationenkanal (Hardie und Minke 1992). Schließlich gelang es zwei Laboren gleichzeitig, das erste *trp*-homologe Gen in Mammalia, TRPC1, zu klonieren (Zhu, Chu et al. 1995; Wes et al. 1995).

Die Genprodukte der *trp*-Gene der Mammalia werden anhand der Sequenzhomologie in sechs Subfamilien unterteilt. In Mammalia wurden bis heute 28 TRP-Proteine identifiziert, die in die Subfamilien TRPC, -V, -M, -A, -P und -ML unterteilt sind (Abbildung 1.1 A). Der Name der Unterfamilien leitet sich meist von dem ersten identifizierten Vertreter ab und kommt in der TRPC-Subfamilie vom englischen *classical* oder *canonical*, da diese Familie den klassischen *Drosophila* TRP-Proteinen am ähnlichsten ist. Die TRPV-Familie wurde nach Inhaltsstoffen, die beispielsweise in Chilischoten vorkom-

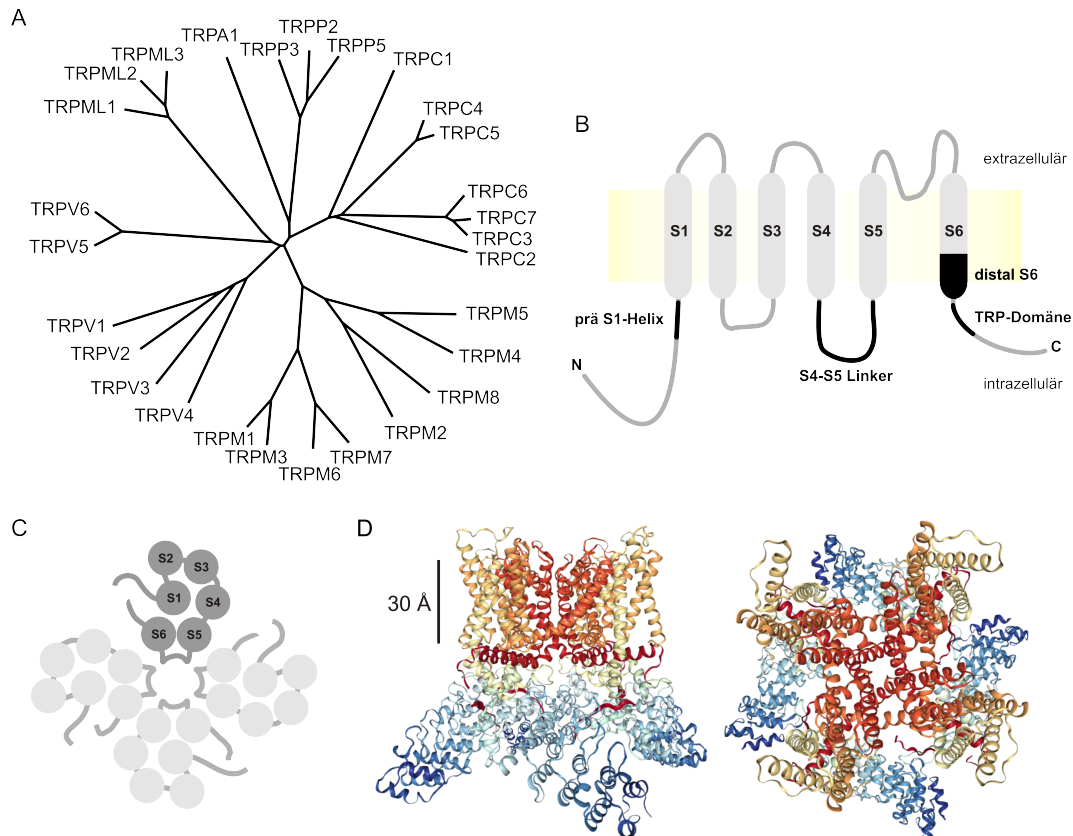


Abbildung 1.1: **TRP-Kanäle aus Mammalia.** **A**, Dendrogramm der TRP-Proteine aus Mammalia. **B**, Aufbau einer TRP-Kanal-Untereinheit. TRP-Proteine haben sechs TM-Domänen (S1-S6), die Kanalpore wird von dem Bereich zwischen S5 und S6 gebildet. TRP-spezifische Motive und konservierte Regionen sind in schwarz hervorgehoben. **C**, Schematische Darstellung eines TRP-Kanals, der sich aus vier TRP-Protein-Untereinheiten zusammensetzt. **D**, Struktur des TRPV1-Kanals (RCSB Proteindatenbank (Berman et al. 2000), PDB-ID: 3J5P), Ansicht von der Seite (links), hier ist der membrandurchspannende Teil markiert, und die Ansicht von oben auf den Kanal (rechts). Der Farbverlauf der einzelnen Untereinheiten geht vom N-Terminus (blau) bis zum C-Terminus (rot).

men, den Vanilloiden benannt. Der erste identifizierte Ionenkanal dieser Familie, TRPV1, kann durch das Vanilloid Capsaicin aktiviert werden (Caterina et al. 1997). Die TRPM-Subfamilie ist benannt nach dem ersten Vertreter TRPM1, dessen Gen als Tumorsuppressor in Melanomen identifiziert wurde und Melastatin genannt wird (Duncan et al. 1998). Die TRPA-Subfamilie wurde aufgrund einer Vielzahl N-terminaler Ankyrin-Reste benannt (Story et al. 2003). Die TRPP-Proteine werden auch Polycystin genannt, da Mutationen im PKD2-Gen die polyzystische Nierenkrankheit auslösen kann (Mochizuki et al. 1996). Mutationen im TRPML-Gen können eine lysosomale Speicherkrankheit, Mukolipidose Typ IV hervorrufen, entsprechend wurde das Genprodukt zunächst Mucolipin-1 genannt (Sun et al. 2000). Später stellte sich heraus, dass das TRPML1-Protein einen in Endosomen und Lysosomen vorkommenden Ionenkanal bildet, der durchlässig für Fe^{2+} als auch für Ca^{2+} ist (Dong et al. 2008). Gemeinsam ist den TRP-Proteinen, dass sie Membranproteine sind, mit einer Leitfähigkeit für Kationen. Sie besitzen sechs TM-Domänen sowie einen intrazellulären N- und C-Terminus. Die Regionen zwischen der fünften und sechsten TM-Domäne der Untereinheiten formen hierbei die Kanalpore (Abbildung 1.1 **B, C**). Durch hoch auflösende Strukturanalysen konnte gezeigt werden, dass sich TRP-Proteine zu Tetrameren zusammenlagern um funktionelle Ionenkanäle zu bilden (M. Liao et al. 2013). Die TRP-Kanäle können aus gleichen TRP-Untereinheiten zusammengesetzt sein oder, durch Zusammenlagerung von verschiedenen TRP-Proteinen, Heterotetramere bilden. So kann beispielsweise TRPC1 mit TRPC4 oder TRPC5 Kanalkomplexe bilden (Strübing et al. 2001; T. Hofmann, Schaefer et al. 2002; Broker-Lai et al. 2017).

Die Prozesse in die TRP-Kanäle involviert sind, sind sehr vielfältig. Durch den Einstrom von beispielsweise Ca^{2+} , was hierbei als sog. *second messenger* fungiert, oder Natriumionen (Na^+), was zur Depolarisation der Zellen führt, tragen sie zur Weiterleitung von Signalen innerhalb der Zelle bei. TRPV1-Kanäle sind an der Wahrnehmung von Hitze und Schmerz sowie der Temperaturregulation des Körpers beteiligt (Caterina et al. 1997; Cui et al. 2006; Gavva et al. 2008), während TRPM8-Kanäle an der Wahrnehmung von Kälte ($\leq 27^\circ\text{C}$) beteiligt sind (Tsavalier et al. 2001; McKemy et al. 2002; Peier et al. 2002). Ebenso die Vermittlung von Geschmack (TRPM5), mechanischen Reizen (TRPA1) und die Osmoregulation (TRPV4) wird über TRP-Proteine

vermittelt (Perez et al. 2002; Zhang et al. 2003; Corey et al. 2004; Strotmann et al. 2000; Wissenbach et al. 2000). Der Ca^{2+} -selektive Ionenkanal TRPV6 wiederum reguliert die intraluminale Ca^{2+} -Konzentration im Nebenhoden (*Epididymis*). Im Lumen der *Cauda epididymidis* findet die Spermienreifung statt. In TRPV6-defizienten Mäusen führt dann eine inadäquate Ca^{2+} -Konzentration zum Absterben der Spermien, mit der Folge, dass männliche TRPV6-defiziente Mäuse hypofertil sind (Weissgerber et al. 2011).

Obwohl TRP-Proteine in einer Kanalfamilie zusammengefasst werden haben die TRP-Proteine untereinander eine relativ niedrige Sequenzübereinstimmung. Dies gilt auch für Proteine innerhalb einer Subfamilie. So weisen die Proteine TRPV1 und TRPV6 ca. 27 % identische Aminosäuren auf, ähnliche Werte ergeben sich durch Vergleich von TRPC1 mit TRPC7 (28 % Sequenzidentität). Wird die Fragmentierung von Sequenzen im Algorithmus des Alignment-Programms (*gap penalty*) unterdrückt, dann ist die tatsächliche Ähnlichkeit noch geringer (TRPC1 und TRPC7: 24 % Sequenzidentität). Es gibt jedoch Bereiche, die in TRP-Proteinen Subfamilien übergreifend hohe Sequenzhomologien aufweisen (Flockerzi 2007). Hierbei sind die prä S1-Helix, der S4-S5 Linker, der Bereich distal S6 sowie die TRP-Domäne gemeint, die in Abbildung 1.1 **B** schwarz hervorgehoben sind. So weisen die Proteine TRPC1 und TRPV6 16 % identische Aminosäuren auf während die Sequenzidentität im Bereich der S4-S5 Linker 41% beträgt. Die Konserviertheit der Aminosäuren in diesen Motiven geben erste Anhaltspunkte wie essentiell die jeweiligen Bereiche oder einzelne Aminosäuren für die Kanalfunktion sein können.

1.1.1 TRPC-Subfamilie

Zu den Vertretern der TRPC-Subfamilie zählen die ersten in Säugern klonierten TRP-Proteine, die noch dazu die größte Sequenzidentität mit dem *Drosophila* TRP-Protein aufweisen. TRPCs sind im Gehirn sowie in diversen anderen Geweben wie Niere, Herz, Lunge, glatten Muskelzellen sowie in Gefäßendothelzellen exprimiert (Venkatachalam und Montell 2007; A. Dietrich et al. 2014). Die TRPC-Kanäle werden Phospholipase C (PLC)-abhängig aktiviert (Montell 2005). Sie lassen sich anhand von Sequenzhomologien und Aktivierungsmechanismen unterteilen in die TRPC1/TRPC4/TRPC5 sowie die TRPC3/TRPC6/TRPC7 Proteine. TRPC2 stellt ein Pseudo-Gen im Men-

schen dar, wogegen es in Maus und Ratte im vomeronasalen Organ gebildet wird. Für TRPC1 und TRPC4 wurde zunächst eine speicher-vermittelte Aktivierung postuliert (Wes et al. 1995; Zhu, Chu et al. 1995; S. Philipp et al. 1996). Dies wurde für TRPC4 und TRPC5 in späteren Arbeiten revidiert (Schaefer et al. 2000). Im Falle des TRPC1 sind verschiedene Aktivierungsmechanismen beschrieben worden (Zitt et al. 1996; Lintschinger et al. 2000). Dagegen gibt es Arbeiten, in denen TRPC1 nach heterologer Expression nicht durch G_q -gekoppelte Rezeptorstimulation mit Carbachol (CCh) aktiviert werden konnte, wohingegen heteromere Kanalkomplexe wie TRPC5/TRPC1 und TRPC4/TRPC1 dadurch aktiviert werden können (Strübing et al. 2003). Ebenfalls wurde gezeigt, dass die heteromeren Kanalkomplexe TRPC5/TRPC1 und TRPC4/TRPC1 endogen im Hirn von Maus vorkommen (Strübing et al. 2003; Broker-Lai et al. 2017). Die Bildung von heteromeren Kanalkomplexen von TRPC1 mit diversen TRP-Vertretern, auch mit Vertretern anderer Subfamilien, wurde mehrfach beschrieben (Ma et al. 2010; Schindl et al. 2012; Du et al. 2014). Es hat sich herausgestellt, dass TRPC1 in Abwesenheit anderer TRP-Kanäle nicht in die Plasmamembran gelangt, sondern im endoplasmatischen Retikulum (ER) verbleibt. Nach Co-Expression mit beispielsweise TRPC4 oder TRPV4 können TRPC1-Proteine in der Plasmamembran nachgewiesen werden (T. Hofmann, Schaefer et al. 2002; Ma et al. 2010). Eine inhibitorische Wirkung von TRPC1 auf den 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG)-induzierten TRPC3-Strom nach Überexpression in HEK-293 Zellen sowie eine Bestätigung der Interaktion *in vivo* (Astrozyten von Maus) konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Belkacemi et al. 2017). Es wurde eine Interaktion von TRPC1 mit Orail und die damit verbundene Rekrutierung von TRPC1 in die Plasmamembran beschrieben (M. S. Kim et al. 2009; Cheng et al. 2011; Y. Liao et al. 2008). In Skelettmuskelzellen wurde TRPC1 eine Funktion als Ca^{2+} -leak-Kanal im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) zugeordnet (Berbey et al. 2009). Ob TRPC1-Proteine tatsächlich homomere TRP-Kanäle bilden ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt und wird nach wie vor kontrovers diskutiert (A. Dietrich et al. 2014). TRPC4-Kanäle werden durch die simultane G_i - und G_q -Rezeptor Stimulation aktiviert (Schaefer et al. 2000; Tsvilovskyy et al. 2009; H. Kim et al. 2012). TRPC5-Kanäle werden ebenso durch G-Protein-gekoppelte Signalkaskaden als auch durch hohe intrazelluläre

Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert (Schaefer et al. 2000; Gross et al. 2009). Das Sesquiterpen Englerin A (EA) wurde kürzlich als selektiver potenter Aktivator für TRPC4 und TRPC5 identifiziert (Akbulut et al. 2015). Die Vertreter TRPC3/C6/C7 zählen zu den Diacylglycerol (DAG)-sensitiven TRP-Kanälen (T. Hofmann, Obukhov et al. 1999; Okada et al. 1999). Kürzlich wurde gezeigt, dass unter bestimmten Bedingungen auch TRPC4- und TRPC5-Kanäle DAG-sensitiv sein können (Storch, Forst, Pardatscher et al. 2017).

1.1.2 TRPV-Subfamilie

Die Vanilloid-Subfamilie zählt sechs Vertreter. Hierbei wird TRPV1, der bekannteste Kanal, durch das Vanilloid Capsaicin aktiviert. Einige Vertreter der TRPVs zählen zu den sog. thermo-TRPs, die durch Temperatur aktiviert werden. Beispielsweise wird TRPV1 von Temperaturen $\geq 43^\circ\text{C}$ und TRPV2 $\geq 52^\circ\text{C}$ aktiviert. TRPV4 kann durch Phorbolester, osmotisch bedingte mechanische Reize oder Temperaturen $\geq 27^\circ\text{C}$ aktiviert werden. Die Besonderheit von TRPV5 und TRPV6 ist, dass sie Ca^{2+} -selektive Kationenkanäle formen (Montell 2005). TRPV6-Kanäle werden aktiviert indem die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration abgesenkt wird. Nach Ca^{2+} -Addition nehmen dann TRPV6 über-exprimierende Zellen Ca^{2+} auf, in diesem Sinne zeigen TRPV6-Kanäle konstitutive Aktivität. Es ist bislang aber nicht gelungen TRPV6 exprimierenden Primärzellen eindeutig TRPV6-Aktivität nachzuweisen, weder mittels Spannungsklemme im Ganzzell-Modus (*Whole Cell Patch Clamp*) noch durch Ca-Imaging. TRPV6 kommt beispielsweise in Synzytiotrophoblasten der Plazenta, exokrinem Pankreas, Nebenhoden sowie Speichel- und Tränendrüsen vor.

1.1.3 TRPM-Subfamilie

Die TRPM-Familie enthält acht Vertreter, in meiner Arbeit habe ich mich mit TRPM4 und TRPM8 befasst. Der TRPM4-Kanal stellt einen Ca^{2+} -aktivierten Kationenkanal dar, der selektiv für monovalente Kationen ist. Der Kanal kann auch spannungs-abhängig aktiviert werden. TRPM8-Kanäle werden durch Agonisten wie Menthol und Icilin oder durch Temperaturen zwischen 23 und 28°C aktiviert (Montell 2005). Menthol wirkt in relativ geringen Mengen als

TRPM8-Aktivator in dem es an eine spezifische Bindungsstelle des Kanals bindet. Menthol aktiviert nicht TRPM8 durch das Erzeugen von Verdunstungskälte (McKemy et al. 2002; Peier et al. 2002; Bandell et al. 2006) sondern verschiebt die Aktivierungskurve des TRPM8-Kanals von stark depolarisierten Potentialen in Richtung des physiologisch vorliegenden Membranpotentials (Voets et al. 2004).

1.1.4 TRPP-Subfamilie

Die Polycystin-Subfamilie besteht aus drei TRP-Proteinen, TRPP2, TRPP3 und TRPP5. TRPP2, welches von dem PKD2-Gen exprimiert wird, bildet mit Polyzystin-1 (PKD1) einen durch das Signalprotein WNT9B aktivierbaren Kationenkanal in der Plasmamembran (S. Kim et al. 2016). Homomere TRPP2-Kanäle lokalisieren aufgrund eines Retentionsmotivs im ER und sind dort an der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt. Mutationen in PKD1 und TRPP2 können zu funktionsunfähigen Kanälen führen und dann im Menschen autosomal-dominante polyzystische Nierenkrankheit (ADPKD) auslösen. TRPP3 (PKD2L1) bildet einen Ca^{2+} -aktivierten Kationenkanal, der ohne PKD1 funktionsfähig ist und in der Plasmamembran lokalisiert ist. Über TRPP5 (PKD2L2) ist bis heute nicht viel bekannt, es wird vermutet, dass TRPP5-Untereinheiten auch Kationenkanäle bilden können (Islam 2011).

1.2 Hoch-auflösende TRP-Strukturen

Seit der Veröffentlichung der TRPV1-Struktur (M. Liao et al. 2013) gab es eine ganze Reihe an Strukturauflösungen von TRP-Vertretern. Bis heute sind hoch auflösende Strukturen von TRPA1, TRPV2, TRPV6, TRPP2 und TRPN, einem TRP-Kanal der in Insekten, Amphibien und Fischen vorkommt, dazu gekommen (Paulsen et al. 2015; Zubcevic et al. 2016; Saotome et al. 2016; Shen et al. 2016; Jin et al. 2017). Die tetramerische Kanalstruktur von homomeren TRP-Kanälen wurde bestätigt und es wurde angenommen, dass es auch in heteromultimeren Kanälen zu ähnlichen Wechselwirkungen kommen kann. Außerdem wurden intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren von verschiedenen Domänen aufgedeckt und teilweise TRP-Subfamilien übergreifende Mechanismen postuliert. Beispielsweise wird die Interaktion von

Aminosäuren des S4-S5 Linkers mit Aminosäuren der TRP-Domäne in allen Strukturen gefunden. Diese Interaktion ist in TRPV4 für die Stabilisierung der geschlossenen Konformation zuständig (Teng et al. 2015). Die TRP-Domäne enthält ein konserviertes Tryptophan, das in allen TRP-Proteinen konserviert ist und am letzteren Mechanismus beteiligt sein könnte (M. Liao et al. 2013; Jin et al. 2017). Die Strukturdaten zeigen noch eine weitere Domäne auf die intrazellulär vor der TM-Domäne S1 liegt (prä S1-Helix) und ebenfalls in räumlicher Nähe gelegen ist um mit dem S4-S5 Linker interagieren zu können. In dieser Arbeit wurden Mutationen in den TRP-Proteinen, TRPC1, TRPC4, TRPM4, TRPM8 und TRPV6 analysiert, die in den entsprechenden Domänen prä S1-Helix, S4-S5 Linker und TRP-Domäne liegen.

1.3 Translations-Initiation in Eukaryoten

Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Initiation der Translation des TRPV6-Proteins an einem ACG-Triplett stattfindet und nicht wie es beim Großteil aller eukaryontischen Proteine der Fall ist, an einem AUG-Triplett (Fecher-Trost et al. 2013). Das ACG-Triplett liegt stromaufwärts des ersten in der *messenger* RNA (mRNA) befindlichen AUG-Triplets und folglich ist das endogen vorkommende TRPV6-Protein größer als zuvor angenommen wurde. In meiner Arbeit habe ich untersucht ob es in der TRP-Familie weitere Proteine gibt, die an einem unüblichen Triplett initiiert werden. Die Translations-Initiation in Eukaryoten ist ein komplexer Prozess der das Zusammenspiel von einer Vielzahl an eukaryotischen Initiations-Faktoren (eIF) voraussetzt (M. Scharltl 2009; Voet et al. 2010). Die Initiator-tRNA ($tRNA_i$), welche in den meisten Fällen $tRNA_i^{Met}$ darstellt und an die Aminosäure Methionin (M) gebunden ist, wird mit Hilfe von eIF2 an die 40S-Untereinheit des Ribosoms geleitet, zusammen mit anderen eIFs, um den sog. 43S-Präinitiations-Komplex zu bilden. Die Erkennung der Startstelle beginnt mit der Bindung des eIF4F (stellt einen Komplex aus mehreren eIFs dar) an die m^7G -Kappe der mRNA. Dann kommt es zur Verbindung mit dem 43S-Präinitiations-Komplex und das ATP-abhängige Abtasten der mRNA in 5'-3' Richtung (das sog. *scanning*) beginnt. Wenn der Komplex auf ein Startcodon (AUG) stößt bindet die 60S-Untereinheit an den Komplex und es kommt zur Bildung des 80S-Initiations-Komplexes.

Ein idealer Sequenzkontext für die Initiations-Stelle auf der mRNA wurde als [A/G]XXAUGG, dem sog. Kozak-Kontext, beschrieben (Kozak 1981). Der Vergleich vieler mRNA-Sequenzen zeigte, dass in sehr vielen Protein-codierenden mRNAs, an der -3 Position stromaufwärts des ersten AUG-Codons (wenn A im AUG als +1 definiert wird) eine Purinbase und an der +4 Position ein Guaninrest die Initiation der Translation unterstützen.

1.3.1 Nicht-AUG Startcodons

In der Literatur sind einige Ausnahmen im Bereich der Translations-Initiation in Form von alternativen oder nicht-AUG-Startcodons zu finden. Schon früh wurde eine Initiation an einem ACG für ein Kapsidprotein des Adeno-Assoziierten Virus Typ 2 beschrieben (Becerra et al. 1985). Auch konnte gezeigt werden, dass die Translation der Dihydrofolat-Reduktase auch dann stattfand, wenn das Initiations-Triplett von AUG zu ACG verändert wurde. Die erste Aminosäure im Protein war jedoch in beiden Fällen Methionin (M) und nicht Threonin (T), was eigentlich von ACG codiert wird. Auch für eine erfolgreiche Translation an einem nicht-AUG-Codon war, wie bei einer AUG-Initiation, der Sequenzkontext von hoher Bedeutung. Das Vorhandensein einer Purinbase in Position -3 war essentiell, ein Austausch mit einer Pyrimidinbase bewirkte eine drastische Abnahme der Translations-Initiation. Das Guanin in Position +4 und die Cytosine in Position -1 und -2 waren auch wichtig, bewirkten jedoch nur eine milde Abnahme der Translations-Initiations-Ereignisse (Peabody 1987). Auch konnte in einer weiterführenden Arbeit gezeigt werden, dass die Translations-Initiation der Dihydrofolat-Reduktase auch an sieben weiteren der neun von AUG um eine Base abweichenden Codons stattfinden konnte. Hier konnte auch gezeigt werden, dass alle Proteine einen M-Aminoterminus besaßen, was dem allgemeinen Verständnis der $tRNA_i^{Met}$ als alleinige Initiator-tRNA entsprach (Peabody 1989). Ein Fehler in der Codon-Anticodon-Basenpaarung an einer der drei Positionen schien plausibel, auch weil nach der Wobble-Hypothese von Crick nur zwei der drei Basenpaarungen relevant sind (vor allem die erste und zweite Position) (Crick 1966). Eine stromaufwärts gelegene Initiation an einem CUG-Codon, die parallel zu der Initiation an dem stromabwärts gelegenen AUG-Codon im selben Leseraster stattfindet, kann verschiedenen Varianten des Transkriptionsfaktors c-Myc oder des Fibroblas-

ten Wachstumsfaktors bFGF hervorbringen (Hann et al. 1988; Prats et al. 1989). Eine Leucyl-tRNA, die als Initiator-tRNA dient, wurde an der mRNA von MHC-I-Peptiden in zytotoxischen T-Zellen entdeckt (Malarkannan et al. 1999; Schwab et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass ein CUG-Initiations-Codon nicht durch andere Leucin-codierende Tripletts wie CUC, CUA oder UUG ausgetauscht werden kann. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nach der Initiation an CUG-Codons MHC-I-Peptide entstehen, die entweder M oder Leucin (L) als N-terminale Aminosäure besitzen (Starck et al. 2012). Es wurde eine Leucyl-tRNA mit dem Anticodon 5' CAG 3' (Leu-tRNA-CAG) als Initiator-tRNA identifiziert. Da andere eIFs an der Initiation von CUG-Codons beteiligt sind als bei einer Initiation an AUG mit $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ und weil dieser Prozess sogar in Abwesenheit von $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ stattfinden kann, spekulierten die Autoren, dass die CUG-Initiation Stress-resistenter ist und beispielsweise bei einer viralen Infektion die verlässliche Translation von MHC-I-Peptiden sicherstellen könnte. In einer *ribosomal profiling*-Studie in der vom Ribosom verdeckte mRNA-Fragmente sequenziert wurden, konnte eine Vielzahl von nicht-AUG-Startcodons in embryonalen Stammzellen der Maus identifiziert werden (Ingolia et al. 2011). Dabei wurde die hohe, möglicherweise biologische Bedeutung von diesen, stromaufwärts gelegenen, nicht-AUG-Startcodons hervorgehoben, die eine N-terminale Verlängerung des betreffenden Proteins zur Folge haben. Hierbei ist anzumerken, dass über 95 % aller in Datenbanken vorhandenen Proteinsequenzen durch Programme vorhergesagt werden, die ausschließlich AUG-Codons als Initiations-Tripletts erkennen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hatten bereits gezeigt, dass das TRPC1-Protein, das von einer cDNA exprimiert wird, die mit dem ersten AUG-Codon der TRPC1 mRNA beginnt und einem die Translation terminierendem Triplet endet, eine kleinere Masse aufweist als das TRPC1-Protein, das im Maushirn endogen gebildet wird. Ich habe die Frage untersucht ob dieser Massenunterschied dadurch zu erklären ist, dass die Translation des endogen gebildeten TRPC1-Proteins an einem stromaufwärts gelegenen nicht-AUG-Triplett initiiert wird. Es gibt eine Reihe von Veröffentlichungen, die die Frage aufwerfen

ob TRPC1 als homomerer Kanal überhaupt eine eigene Ionenleitfähigkeit aufweist, oder ob TRPC1 nur eine akzessorische Untereinheit eines heteromeren Kanalkomplexes darstellt. Weiterhin habe ich die Rolle untersucht, die TRPC1 in einem Komplex mit TRPC4 spielt und ob die Kombination beider Kanäle *in vivo* vorkommt. Zusätzlich habe ich den Einfluss von Mutationen in konservierten Bereichen der TRP-Proteine TRPC1, TRPC4, TRPM4, TRPM8 und TRPV6 auf die Aktivierbarkeit dieser Kanäle analysiert.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), VWR International (Darmstadt) und AppliChem (Darmstadt) bezogen.

2.2 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders beschrieben, mit deionisiertem H₂O aus einer Millipore-Anlage angesetzt.

2.2.1 Lösungen für molekularbiologische Experimente

Lysogeny Broth (LB)-Medium:

1 % (w/v) Caseinhydrolysat (Trypton/Pepton)

1 % (w/v) NaCl

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

pH 7,0

Vor Gebrauch wurde das Medium autoklaviert (121°C, 2 bar für 20 min).

LB-Agar:

1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium

Antibiotika-Zusätze:

50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin in LB-Medium

25 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin in LB-Medium

1x TBE-Puffer:

89 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

89 mM Borsäure

1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

pH 8,0

10x DNA-Auftragspuffer:

40 % (w/v) Harnstoff

40 % (w/v) Glycerin, wasserfrei

50 mM EDTA pH 8,0

10 mM TRIS-HCl pH 7,0

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanol FF

2.2.2 Lösungen für proteinbiochemische Experimente

Trenngelpuffer:

1,5 M TRIS-HCl pH 8,8

0,4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

Sammelgelpuffer:

0,5 M TRIS-HCl pH 6,8

0,4 % (w/v) SDS

2x Lämmli:

120 mM TRIS-HCl pH 6,8

20 % (v/v) Glycerin

10 % (v/v) β -Mercaptoethanol

8 % (w/v) SDS

0,01 % (w/v) Bromphenolblau

RIPA-Puffer:

150 mM NaCl
50 mM TRIS-HCl pH 8
5 mM EDTA
1 % (w/v) Nonidet-P40
0,1 % (w/v) SDS
0,5 % (w/v) Na-Deoxycholat
zzgl. Proteaseinhibitoren

10x TBS:

0,5 M TRIS-HCl pH 7,5
1,5 M NaCl

1x TBST:

100 ml 10x TBS
0,1 % (v/v) Tween-20
ad 1000 ml H₂O

10x SDS:

0,25 M TRIS
1,92 M Glycin
1 % (w/v) SDS

***Blotting*-Puffer:**

100 ml 10x SDS
200 ml Methanol
ad 1000 ml H₂O

***Stripping*-Puffer:**

50 mM TRIS-HCl pH 6,8
2 % (w/v) SDS
0,7 % (v/v) β -Mercaptoethanol

PBS:

140 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,5 mM KH_2PO_4
8 mM Na_2HPO_4
pH 7,4

Endkonzentration der Proteaseinhibitoren:

90 mM Iodacetamid
1 mM Benzamidin
1 mM Phenanthrolin
2 μM Leupeptin
2 μM Pepstatin
1 μM Antipain
0,1 μM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
0,3 μM Aprotinin

5x SDS-Auftragspuffer:

0,6 mg SDS
3,75 ml TRIS
9 mg Bromphenolblau
1,16 mg Dithiothreitol (DTT)
4,5 ml Glycerol
ad 15 ml H_2O

NP40-Puffer:

4,38 g NaCl
3 g TRIS-HCL pH 7,4
5 ml Nonidet-P40
ad 500 ml H_2O

2.2.3 Lösungen für elektrophysiologische Experimente

STD:

100 mM NaCl
2 mM KCl
10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)
pH 7,5
+ 5 mM CaCl_2 (Ca)

Barth's-Puffer:

88 mM NaCl
1 mM KCl
0,33 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (fehlt in Ca^{2+} -freiem Barth's-Puffer)
0,41 mM CaCl_2 (fehlt in Ca^{2+} -freiem Barth's-Puffer)
0,82 mM MgSO_4
2,4 mM NaHCO_3
10 mM HEPES
2,5 mM Na-Pyruvat
Penicillin (100 I.E./ml)
Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
pH 7,5

Badlösung zum Messen von TRPC-Strömen:

140 mM NaCl
2,8 mM KCl
1 mM CaCl_2
2 mM MgCl_2
10 mM HEPES
10 mM Glukose
pH 7,2 eingestellt mit NaOH

Patchpipettenlösung zum Messen von TRPC-Strömen/NSC-34 Zellen:

120 mM Cs-Glutamate
8 mM NaCl
1 mM MgCl₂
10 mM Cs-Bapta
3,1 mM CaCl₂ (100 nM freies Ca²⁺)
10 mM HEPES
pH 7,2 eingestellt mit CsOH

Badlösung für Messungen in NSC-34 Zellen:

140 mM NaCl
1 mM CaCl₂
2 mM MgCl₂
10 mM HEPES
10 mM Glukose
pH 7,2 eingestellt mit NaOH

Badlösung mit N-Methyl-D-glucamin (NMDG):

150 mM NMDG-Cl
2,8 mM KCl
1 mM CaCl₂
2 mM MgCl₂
10 mM HEPES
10 mM Glukose
pH 7,2 eingestellt mit NMDG-OH

Badlösung zum Messen von TRPM4-Strömen:

140 mM Na-Aspartat
2,8 mM KCl
1 mM CaCl₂
2 mM MgCl₂
10 mM HEPES
10 mM Glukose
pH 7,2 eingestellt mit NaOH

Patchpipettenlösung zum Messen von TRPM4-Strömen:

120 mM Cs-Glutamate
8 mM NaCl
1 mM MgCl₂
10 mM Cs-Bapta
9,3 mM CaCl₂ (3 μ M freies Ca²⁺)
10 mM HEPES
pH 7,2 eingestellt mit CsOH

2.2.4 Badlösungen für Ca-Imaging und Mikroskopie**Ca-Imaging-Puffer:**

150 mM NaCl
6 mM KCl
1 mM MgCl₂
10 mM HEPES
10 mM Glukose
pH 7,4 eingestellt mit NaOH

B1-Puffer:

115 mM NaCl
5 mM KCl
2 mM MgCl₂
10 mM HEPES
pH 7,4 eingestellt mit NaOH

2.3 Eukaryotische Zellkultur und Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien und Zusätze wurden bei der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen. Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und mit 5 % CO₂ kultiviert.

2.3.1 Zelllinien

In den Experimenten dieser Arbeit wurde die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK-293) ATCC CRL-1573 verwendet (LGC Standards, Teddington,

UK). Die Zellen wurden in MEM 31095-029 Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Die immortalisierte Nierenfibroblastenzelllinie aus *Chlorocebus aethiops* (Cos-7) wurde in DMEM 41966-029 mit 10 % FKS kultiviert. Die Fusionszelllinie aus murinen Motoneuronen und murinen Neuroblastomazellen (NSC-34) CED-CLU 140 (Biozol, Eching) wurde in DMEM 41965-039 mit 10 % FKS kultiviert (Cashman et al. 1992).

Stabile Zelllinien

In dieser Arbeit wurden stabile Zelllinien auf Basis von HEK-293 Zellen verwendet. Die stabilen Zelllinien wurden von Michael X. Zhu, Houston, USA zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um HEK-293 Zellen, die den muskarinischen Rezeptor Typ 2 (M_2R) oder den μ -Opioidrezeptor (μ -OR) überexprimieren. Die Zellen wurden in DMEM 41966-029 mit 10 % hitze-inaktiviertem FKS sowie 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B (Roth, Karlsruhe) kultiviert. Beide Zelllinien wurden auch mit zusätzlicher Überexpression von TRPC4 α verwendet (HEK-293 M_2R TRPC4 oder HEK-293 μ -OR TRPC4). Das Medium dieser Zellen erhielt zusätzlich 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Geneticin (Merck, Darmstadt).

2.3.2 Transfektion

Die Transfektion, also das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen, erfolgte in allen Zellen transient. Zur Transfektion wurde das Prinzip der Lipofektion angewendet (Felgner et al. 1987). Hierbei wurde i. d. R. FuGENE HD Transfektionsreagenz (Promega, Fitchburg, USA) verwendet. Zur transienten Transfektion einer ca. 80 % konfluenten Zellkulturschale (3,5 cm Durchmesser) mit Zellen wurde 5 μl FuGENE HD mit 2 μg DNA in 100 μl OptiMEM gegeben, gemischt, und nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) tropfenweise auf die Zellen gegeben. Für die transiente Transfektion von Cos-7 Zellen zur anschließenden mikroskopischen Analyse wurde das Transfektionsreagenz Cos-7 Cell Avalanche (EZ Biosystems, Rockville, USA) verwendet. Hierbei wurde 3 μg DNA in 250 μl OptiMEM gegeben, gemischt und anschließend 3,5 μl Transfektionsreagenz hinzugegeben. Das Gemisch wurde nach 15 min Inkubation bei RT tropfenweise auf die Zellen gegeben. Bei einer Co-Transfektion wurde die Menge an DNA auf die beiden zu transfizierenden Konstrukte im

Verhältnis 1:1 aufgeteilt. NSC-34 Zellen wurden mit Lipofectamin 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) transfiziert. Hierzu wurden pro Transfektion zwei Ansätze vorbereitet: 125 μ l OptiMEM mit 4 μ l Lipofectamin 3000 und 125 μ l OptiMEM mit 4 μ l P 3000 zuzüglich 2,5 μ g DNA. Die Ansätze wurden jeweils gemischt und anschließend vereinigt. Das Gemisch wurde nach 5 min Inkubation bei RT tropfenweise auf die Zellen gegeben. Für die Transfektion von TRPM8 in die HEK-293 Zellen wurde das 293 Cell Avalanche Reagenz (EZ Biosystems) verwendet. Hierzu wurde 2,5 μ g DNA, aufgeteilt in 1,7 μ g TRPM8- und 0,8 μ g pcAGGS-I-GFP-Plasmid, in 200 μ l OptiMEM gegeben, gemischt und anschließend 2 μ l Transfektionsreagenz hinzugegeben. Das Gemisch wurde nach 15 min Inkubation bei RT tropfenweise auf die Zellen gegeben. In die Kontrollzellen wurde nur 0,8 μ g pcAGGS-I-GFP Plasmid transfiziert.

Die anschließende funktionelle Charakterisierung, Mikroskopie oder der Aufschluss der Zellen erfolgte 48 h nach Transfektion, falls nicht anders beschrieben.

2.4 Andere Organismen

2.4.1 Bakterienstämme

Zur Herstellung von kompetenten Bakterien wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet (Chung et al. 1989). Für die Klonierungen im Rahmen der Mutagenese-Versuche wurden NEB 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency) Zellen (New England Biolabs, Ipswich, USA) verwendet.

2.4.2 Mauslinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden von der Experimentellen Pharmakologie hergestellt bzw. zur Verfügung gestellt. Die TRPC1-defizienten Mäuse wurden von Alexander Dietrich generiert, die TRPC4-defizienten Mäuse von Marc Freichel (Alexander Dietrich et al. 2007; Freichel et al. 2001). Beide sind auf dem C57BL/6N-Hintergrund (Charles River, Wilmington, USA) generiert worden und wurden zuvor mindestens zehn Generationen auf den

C57BL/6N-Hintergrund zurück gekreuzt. Die TRPC1/TRPC4-Doppel-defizienten Mäuse wurden durch Verpaarung der zuvor genannten Mauslinien erhalten. Als Wildtyp-Kontrolle wurden C57BL/6N-Mäuse verwendet.

2.4.3 *Xenopus laevis* Oozyten

Die Arbeiten an *Xenopus laevis* Oozyten wurden im Labor von Prof. Xing-Zhen Chen (Universität von Alberta, Edmonton, Kanada) durchgeführt. Nachdem Oozyten aus den weiblichen Krallenfröschen entnommen wurden, erfolgte ein Verdau mit 3 mg/ml Kollagenase Typ 4 (Worthington, Lakewood, USA) in Barth's-Puffer ohne Ca^{2+} (siehe Abschnitt 2.2.3) um die Follikelepithelzellen zu entfernen. Die Oozyten wurden mit Barth's-Puffer gewaschen und bei 16 °C gelagert. Zur Expression von rekombinanten Proteinen wird die jeweilige Ribonukleinsäure (RNA) direkt in die Oozyten injiziert. Zur Generierung der RNA wurden die Plasmide linearisiert (siehe Abschnitt 2.5.4) und mit Hilfe des mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben *in vitro* transkribiert. 24 h nach Isolation der Oozyten wurde 25 ng der gewünschten RNA mit Hilfe eines Picospritzer 3 und Mikroinjektionspipetten in die Oozyten injiziert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Vektoren

Vektoren die in dieser Arbeit verwendet wurden sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Die Vektoren besitzen ein Ampicillin-Resistenz-Gen, bis auf den pMax-Vektor, welcher ein Kanamycin-Resistenz-Gen enthält. Eine im Vektor enthaltene interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) wird im Vektornamen als -I bezeichnet. Dies ermöglicht die bizistronische Translation der mRNA, bei der die stromabwärts der IRES-Sequenz gelegene cDNA des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) oder des rot fluoreszierenden Proteins (RFP) ebenfalls translatiert wird. In den pcAGGS-Vektoren ohne IRES-Sequenz ist die cDNA von eGFP, pHluorin oder mRFP enthalten. Das *enhanced* grün fluoreszierende Protein (eGFP) ist eine Weiterentwicklung des GFP mit verbesserten Eigenschaften. Das ratiometrische pHluorin stellt eine pH-sensitive Variante von

GFP dar (Miesenbock 2012). Das monomerische rot fluoreszierende Protein (mRFP) stellt ein weiterentwickeltes RFP dar, welches nicht multimerisiert.

Tabelle 2.1: Vektoren

Name	Herkunft
pcAGGS-I-GFP	Dr. Stephan Philipp, Homburg
pcAGGS-I-RFP	Dr. Ulrich Wissenbach, Homburg
pcAGGS-eGFP	Dr. Ulrich Wissenbach, Homburg
pcAGGS-mRFP	Dr. Ulrich Wissenbach, Homburg
pcAGGS-pHluorin	Dr. Ulrich Wissenbach, Homburg
pcDNA3	Stratagene, La Jolla, USA
pcDNA3-eGFP	Dr. Ulrich Wissenbach, Homburg
pMax-I-GFP	Dr. Ulrich Wissenbach, Homburg
pBluescript II KS ⁻	Stratagene, La Jolla, USA
pBS MXT-MCS	Nathan Dascal, Universität Tel Aviv, Israel

2.5.2 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurden i. d. R. bei Eurofins Genomics, Ebersberg synthetisiert und sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Primer, die eine Sequenz des codogenen Strangs enthalten sind mit dem Zusatz *forward* (_F) gekennzeichnet, während Primer die eine Sequenz des Gegenstrangs enthalten mit *reverse* (_R) gekennzeichnet ist; m= *mus musculus* (Maus) und h= *homo sapiens* (Mensch).

Tabelle 2.2: Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Modifikation	Info
UW1001	TTAATTTCTTGGATAAAACATAGC (24)	5'-P	mTRPC1-VL Ende mit Stopp
UW1018	TCAGATCTGATATCCCAGCTC (22)	5'-P	hTRPV6 Ende mit Stopp
UW1094	GAATTCGCTAGCAGAGTCCTCGCTGGCTCTGCCAAG TGTAACAAA (45)	5'-P	hTRPV6 Start_F
UW1188	GCCAGGAGCCGCAGGGG (17)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_R
UW1189	ACT CCCCGCGCTCGGCTGC (20)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, ACG → ACT (T1)
UW1190	GGCGGCAGCCGAGCGCG (17)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_R
UW1191	TTAG CGCGCTCCACT TTAT CGTCCCC (26)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, CTG → TTA (L1+L2)
UW1192	GTTGGTGGCCGCGCTGGC (18)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_R
UW1193	TTAGGGTTAT CCGTGGAGGGCGAG (24)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, CTG → TTA (L4+L5)
UW2010	CCGCCGGCGCCCCGG (15)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_R
UW2011	TTAGG CAGAGGGCGCTGGCCC (21)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, CTG → TTA (L3)
UW2012	CGCCTCGCCCCGAAACC (17)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_R
UW2013	ACT CCCTTCGGGGCCAACG (19)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, ACG → ACT (T2)
UW2014	TCC GAC GGCG GAC ATCGGCGTG (21)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_R, GTG → GTC (V+V)
UW2015	ACT ACTCACCCTTTTCCAGC (21)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, ACG → ACT (T3)
UW2016	GGGCGCCGACCCCGACC (17)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_R
UW2017	TAC GGGGCCCCGCCTCCGTC (20)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, ATG → TAC (M+1)
UW2036	TTAG CGCGCTCCACTCTGTCGTCCCC (26)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, CTG → TTA (L1)
UW2037	CTGGCGCGCTCCACT TTAT CGTCCCC (26)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, CTG → TTA (L2)
UW2040	TGAG CCCCGCGCTCGGCTGC (20)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, ACG → TGA (T1)
UW2041	TGAG CGCGCTCCACTCCACTCTGTCGTCCCC (26)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, CTG → TGA (L1)
UW2042	CTGGCGCGCTCCACT TGAT CGTCCCC (26)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, CTG → TGA (L2)
UW2043	TGAG CGCGCTCCACT TGAT CGTCCCC (26)	5'-P	5' UTR von mTRPC1_F, CTG → TGA (L1+L2)
mC4a_for	CCGCCGCCACCATGGCTCAGTTCTATTACAA (31)	5'-P	Kozak+Start mTRPC4_F
mC4a_rev	TCACAATCTTGTGGTCACATAATCTTCGTGG (31)	5'-P	mTRPC4 Ende_R
mM4_for	CCGCCGCCACCATGGTGGGGCCGAGAAGGA (31)	5'-P	Kozak+Start mTRPM4_F
mM4_rev	TCAGTCTTTGGAACCAAGTGGGGCTCGGAGGG (31)	5'-P	mTRPM4 Ende_R
LH1	ATTCTTGGATAAAACATAGCATATTTAG (29)	5'-P	mTRPC1 Ende ohne Stopp_R
LH2	CTTCTGTGTCAGAAGAG (17)	5'-P	mTRPM4_R
LH3	GCGT GGGGGGAGATGGACAG (20)	5'-P	mTRPM4_F, Q5-Mutagenese W680A
LH4	CCACTTCTGTGTCAGAA (17)	5'-P	mTRPM4_R
LH5	GCG GGGGAGATGGACAGCAC (20)	5'-P	mTRPM4_F Q5-Mutagenese W681A
LH6	GTAGAGGTCGCTGTTGC (17)	5'-P	mTRPM4_R
LH7	GCGA AGGCACAGCGCTACAG (20)	5'-P	mTRPM4_F Q5-Mutagenese W1054A
LH8	GCGGGAAGCGAGCAGCT (17)	5'-P	mTRPC4α_R
LH9	GCGT ACGATGAGTTCCAGG (20)	5'-P	mTRPC4α_F Q5-Mutagenese W314A
LH10	GCCTGGGAACATCATCGT (17)	5'-P	mTRPC4α_R
LH11	GCG AGGAGAAGACACTGGGC (20)	5'-P	mTRPC4α_F Q5-Mutagenese W321A
LH12	TTCTATATCTGCATGGT (17)	5'-P	mTRPC4α_R
LH13	GCGA ATTTGCTCGAACAAA (20)	5'-P	mTRPC4α_F Q5- Mutagenese W635A

Name	Sequenz (5'-3')	Modifikation	Info
LH14	GAGCAGCTTCGTCAGCA (17)	5'-P	mTRPC1_R
LH15	GCG GCGATGCTTCACAAGAG (20)	5'-P	mTRPC1_F Q5-Mutagenese V741A
LH16	CGCCACGAGCAGCTTCG (17)	5'-P	mTRPC1_R
LH17	GCG CTTCACAAGAGCTTCCA (20)	5'-P	mTRPC1_F Q5-Mutagenese M743A
LH18	CTTGAGGCTCACCAGCT (17)	5'-P	hTRPV6_R
LH19	GCG AAGCGGTACGGGCGGCC (20)	5'-P	hTRPV6_F Q5-Mutagenese W361A
LH20	CAGCTCATCCCGCTCAT (17)	5'-P	hTRPV6_R
LH21	GCG AGGGCCCAGATTGTGGC (20)	5'-P	hTRPV6_F Q5-Mutagenese W633A
LH22	GTGAGAATTGGCAGTGAACAG (21)	5'-P	mTRPC4 α _R (Rückgrat für TRPC4-C1-Region)
LH22_neu	GTGAGAATTGGCAGTGAACAG (21)		s.o.
LH23	CCTACACCTTTCAATGTCATC (21)	5'-P	mTRPC4 α _F (Rückgrat für TRPC4-C1-Region)
LH23_neu	CCTACACCTTTCAATGTCATC (21)		s.o.
LH24	TTGGGCCCCACTGCAGATTC (20)	5'-P	mTRPC1_F (Insert für TRPC4-C1-Region)
LH24_neu	TTGGGCCCCACTGCAGATTC (20)	5'-P	bei Sigma bestellt
LH25	CAGTGACATTTGTCATCAAAG (22)	5'-P	mTRPC1_R (Insert für TRPC4-C1-Region)
LH25_neu	CAGTGACATTTGTCATCAAAG (22)	5'-P	bei Sigma bestellt
LH26	GCTGCTGCGGCTTATCCAAGAAATATCATGGTGAGC (36)	5'-P	mTRPC1_F Ende ohne Stopp mit Übergang in pMax-Vektor + Mutagenese YAMF→AAAA
LH27	TTTAGAAGTCCGAAAGCCAAG (21)	5'-P	mTRPC1_R
LH28	GCACGGATCCGGCCACTG (18)		mTRPM4_F
LH29	CAGGTAGAGAGGATCATGACC (21)		mTRPM4_F
LH30	CGGCGGAAGGATCTTGCTG (19)		mTRPM4_F
LH31	CCCACTGGCCAGGCTACC (18)		mTRPM4_R
LH32	GTAGCCTGGCCAGTGGGG (18)		mTRPM4_F
LH33	CAGCAAAGTGCACGGCAAC (19)		mTRPM4_F
LH34	GTTCAACAATATAGCTGCTG (20)		hTRPP2_F
LH35	GGTGAAGTCCAGTCGCGTGC (20)		hTRPP2_F
LH36	GTAGTGAAATAAATTGGTCC (20)		hTRPP2_R
LH37	GTACCATCGATTTAATTTCTTG (22)	5'-P	mTRPC1_R Ende + künstliche ClaI-Schnittstelle
LH38	ATGACGTGAGGAGAAAGCC (19)	5'-P	5' UTR mTRPC1-VL_F
LH39	AGGAACTGCTGGCAATTTG (19)		mTRPC1_R
LH40	GAACACGGTT GCG TTTGACAGATG (25)		mTRPC1_F Q5-Mutagenese W434A
LH41	TGTCCAAACCAAACCGTG(18)		mTRPC1_R
LH42	GATGTCAGGT GCC CGCGTAAGC (23)		mTRPC1_F Q5-Mutagenese Y441A
LH43	TCATGATTTGCTATCAGCTG (20)		mTRPC1_R
LH44	GGATAAAGA GCG AAGTTTGCTCGAGC (27)		mTRPC1_F Q5-Mutagenese W759A
LH45	AGCAGGACAACCAGAGAG (18)		mTRPC4 α _R
LH46	GAACATGTTAATTGCTATGATGAATAATTCTTACC (35)		falsch
LH46_neu	GAACATGTTA GCT GCTATGATGAATAATTCTTACC (35)		mTRPC4 α _F Q5-Mutagenese I617A
LH47	CTGGGGCCTCTGCAGATATC (20)	5'-P	mTRPC4_F (Insert für TRPC1-C4-Region)
LH48	CAGGGTACCTCCTTCTTCAAAG (22)	5'-P	mTRPC4_R (Insert für TRPC1-C4-Region)
LH49	AATAGAGCTGGTTGTATACATA (22)		mTRPC1-VL_R (Rückgrat für TRPC1-C4-Region)

Name	Sequenz (5'-3')	Modifikation	Info
LH50	CCCCCACCTTTCAACATTATTC (22)		mTRPC1-VL_F (Rückgrat für TRPC1-C4-Region)
LH51	ACAGAAGGCG GC GGGGGAGATGG (23)		mTRPM4_F Q5-Mutagenese W680A+W681A (template: W680A)
LH52	GTCAGAAGAGACTGGACTC (19)		mTRPM4_R
LH53	GAAGGCACAG GC CTACAGCCTCATC (25)		mTRPM4_F Q5-Mutagenese R1058A
LH54	CAGTAGAGGTCGCTGTTG (18)		mTRPM4_R
LH55	GAAATTTGCT GCA ACAAAGCTTTGG (25)		mTRPC4a_F Q5-Mutagenese R639A
LH56	CATTCTATATCTGCATGGTC (20)		mTRPC4a_R
LH57	TGTGCTGACG AAC CTGCTCGTGG (23)		mTRPC1-VL_F Q5-Mutagenese K738N
LH58	ATCACAACCACAACATTGTAAGTTC (25)		mTRPC1-VL_R
SM244	GGCAGAATCATTACACACC (20)		mTRPC1_F
SM245	GAAGAGCTGCAGTCCTTCG (19)		mTRPC1_F
SM246	TGCTCTTTGGAAGTGTACCC (20)		mTRPC1_R
SM247	TTGACTGGGAGACAAACTCC (20)		mTRPC1_R

2.5.3 Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden gezielt Nukleinsäuren, beispielsweise Desoxyribonukleinsäure (DNA), vervielfältigt (Mullis et al. 1986; Saiki et al. 1988). Im Allgemeinen werden Anfang und Ende der gewünschten Nukleotidsequenz mit Oligonukleotiden, den sog. Primern, begrenzt. Die PCR-Maschine, hier der T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, USA), erzeugt ein Temperaturprofil wodurch die einzelnen Phasen der PCR gezielt durchlaufen werden. Zunächst kommt es in der Denaturierungsphase zu einer Trennung der komplementären DNA-Stränge, in der sog. *Annealing*-Phase kommt es zur Anlagerung der Primer an den jeweiligen Strang. Durch die Polymerase werden die komplementären Nukleinsäuren anschließend aufgefüllt, sodass die Nukleinsäuren wieder doppelsträngig vorliegen. Letztere wird als Elongationsphase bezeichnet. Diese drei Phasen wurden 25-mal wiederholt. In Tabelle 2.3 ist ein verwendetes Temperatur-Zeit-Profil beschrieben. Ein typischer Reaktionsansatz für die PCR ist in Tabelle 2.4 beschrieben. In dieser Arbeit wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA) verwendet. Desweiteren wurde ein GC-*Enhancer* mit dazugehörigem Reaktionspuffer (New England Biolabs, Ipswich, USA) zugesetzt, aufgrund des hohen GC-Anteils in der TRPC1-Sequenz. An die PCR schließt sich immer ein Restriktionsverdau mit dem Enzym DpnI an, das die methylierte Matritzen-DNA abbaut.

Tabelle 2.3: Temperaturprofil der PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	1 min
25 Zyklen	98 °C	5 s
	60 °C	10 s
	72 °C	20 s/kb
Finale Verlängerung	72 °C	2 min

2.5.4 Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme

Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs, Ipswich, USA bezogen. Ein Restriktionsverdau wurde wie in Tabelle 2.5 beschrieben angesetzt und für

Tabelle 2.4: Reaktionsansatz der PCR

Primer F (<i>forward</i>)	25 pmol
Primer R (<i>reverse</i>)	25 pmol
GC- <i>Enhancer</i>	5 μ l
5x GC Reaktionspuffer	10 μ l
Matritzen-DNA	50-1000 ng
dNTPs (10 mM)	1 μ l
Polymerase	0,5 μ l
H ₂ O	<i>ad</i> 50 μl

1 h bei 37 °C inkubiert. Die Ligation eines amplifizierten DNA-Fragments in den geschnittenen Vektor erfolgte im Verhältnis 3:1 (v/v) entweder mit Hilfe der T4 DNA Ligase bei 16 °C über Nacht oder mit dem Blunt/TA Ligase Master Mix für 15 min bei Raumtemperatur. Zur Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors wurde Antarctic Phosphatase nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 2.5: Restriktionsansatz

Plasmid/DNA	ca. 1 μ g
Reaktionspuffer	2 μ l
Enzym(e)	insg. 1 μ l
H ₂ O	<i>ad</i> 20 μl

2.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von linearisierter DNA durchgeführt. Hierfür wurden je nach Fragmentgröße 0,8 oder 2 %ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in gewünschter Konzentration (w/v) in TBE-Puffer (Abschnitt 2.2.1) gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf ca. 50 °C abgekühlt war wurde 0,05 % (w/v) Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel wurde gegossen. Zur Gelelektrophorese wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer, welche mit TBE-Puffer gefüllt war, gelegt. Die aufzutrennenden Proben wurden 1:10 mit 10x DNA-Auftragspuffer (Abschnitt 2.2.1) versetzt und in die Taschen des Gels gefüllt. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde eine Spannung von 130 V angelegt. Mit UV-Licht konnte die DNA durch das interkalierte Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

2.5.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurden die gewünschten Gelstücke mit 400 μl TBE-Puffer in einen Dialyseschlauch gegeben und in einer Gelelektrophorese-Kammer elektroeluiert. Die DNA wurde mit 140 mA bei 4 °C über 40 min eluiert. Anschließend wurde die DNA aus dem TBE-Puffer durch Ethanolpräzipitation gefällt. Hierzu wurden 400 μl des DNA-haltigen Puffers zunächst mit 40 μl 5 M NaCl-Lösung versetzt, gemischt und anschließend wurde 1 ml Ethanol hinzugegeben. Das Gemisch wurde bei 10000 g für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 15 min bei 10000 g zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde ca. 10 min getrocknet und anschließend in 20 μl H₂O resuspendiert.

2.5.7 Transformation

Zur Transformation von DNA in *E. coli* Bakterien wurden kompetente Bakterien aufgetaut. Anschließend wurde ca. 1 μg Plasmid-DNA oder der Ligationsansatz hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min. Danach wurden die Bakterien mit 1 ml LB-Medium versetzt und bei 37 °C für eine Stunde geschüttelt. Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde in transformierten *E. coli* Bakterien vervielfältigt und mittels eines Kits isoliert. Das Prinzip der Plasmidisolierung ist die alkalische Lyse (Bimboim und Doly 1979). Je nach Größe des Versuchsansatzes, beziehungsweise nach gewünschter Menge an Plasmid-DNA, wurde entweder das High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim), das QIAGEN Plasmid Plus Kit (Qiagen, Venlo, NL) oder das PureYield Plasmid Maxiprep System (Promega, Fitchburg, USA) verwendet.

2.5.9 Sequenzierung

Mit der Sequenzierung nach Sanger wurde die Firma Seq-IT (Kaiserslautern) oder die Firma LGC Genomics (Berlin) beauftragt. Alle verwendeten Plasmide wurden sequenziert.

2.5.10 Klonierung von TRPC1-Konstrukten

Die komplementäre DNA (cDNA) des TRPC1-„*Very Long*“ (TRPC1-VL)-Konstrukts wurde anhand der Sequenz NM_011643.3 der Nukleotid-Datenbank der NCBI (National Center for Biotechnology Information) aus Hirn von Maus kloniert (Dr. Ulrich Wissenbach). Die klonierte cDNA enthält Basenpaare 31-2901 aus der genannten Sequenz. Somit sind darin 441 Nukleotide aus der ursprünglich als 5' nicht translatierte Region (5' UTR) angenommenen Sequenz und 2430 Nukleotide der „codierenden“ Sequenz von TRPC1 enthalten. In den Vollängen-Konstrukten sind das Exon 3 sowie sieben Aminosäuren aus Exon 5, die in einer weiteren Spleißvariante (*epsilon*) nicht vorhanden sind, enthalten. Das klassische TRPC1-„*Short*“ (TRPC1-S)-Konstrukt enthält statt der 5' UTR eine Kozak-Sequenz (GCCGCCACC) vor dem ersten AUG-Triplett. Somit enthält die cDNA in dem TRPC1-S-Konstrukt nur die Nukleotide 472-2901 der Originalsequenz aus NM_011643.3. Die TRPC1 cDNA wurde in die EcoRV-Seite des pcAGGS-I-GFP Vektors ligiert. Bei dem TRPC1-art. (artifizuell)-Konstrukt, wurde ein AUG-Triplett an den Anfang der 5' UTR eingebracht, ansonsten ist das Konstrukt identisch mit dem TRPC1-VL-Konstrukt. Die IRES-Sequenz zwischen der TRPC1 cDNA und der cDNA des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) ermöglicht die bizistronische Translation der mRNA.

Klonierung von Fusionskonstrukten

Um die subzelluläre Lokalisation des TRPC1-Proteins zu untersuchen wurden TRPC1-VL- und TRPC1-S-Konstrukte kloniert, die an *enhanced* grün fluoreszierendes Protein (eGFP) oder monomerisches rot fluoreszierendes Protein (mRFP) fusioniert werden. In diesen Konstrukten wurde das TRPC1-Stoppcodon mit der cDNA von eGFP oder mRFP ersetzt und in den pcAGGS-Vektor ligiert. Eine Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit klonierten und verwendeten Konstrukte ist in Tabelle 2.6 zu finden.

Klonierung von TRPC1/TRPC4-Chimären

Die Poreenchimäre TRPC4-C1-Pore und TRPC1-VL-C4-Pore liegen im pcAGGS-I-GFP Vektor vor. In dem TRPC4-C1-Porenkonstrukt wurde die TRPC4-Pore gegen die putative TRPC1-Pore ausgetauscht (Abbildung 2.1). Ebenfalls wurde die Pore von TRPC4 in TRPC1-VL kloniert (TRPC1-VL-C4-Pore). In einem weiteren chimären Konstrukt wurde in TRPC4 eine längere Region gegen TRPC1-Sequenz ausgetauscht, diese beginnt im S4-S5 Linker und umfasst die TM-Domäne S5, die Pore, die TM-Domäne S6 und die TRP-Domäne (TRPC4-C1-Region). Dieses Konstrukt liegt im pMax-I-GFP Vektor vor.

```

                                Linker          -----S5-----
TRPC1-VL-C4-Pore  LGPLQISMGQMLQDFGKFLGMFLLVLFSTIGL-
TRPC4-C1-Pore    LGPLQISLGRMLLDILKFLFIYCLVLLAFANGL-
TRPC4-C1-Region  LGPLQISMGQMLQDFGKFLGMFLLVLFSTIGL-

                                Porenregion
NQLYFYEEETKGLS-CKGIRCEKQNNF-STLFTLQSLFWSIFGL--INLYVTNVKAQH-
TQLYDKGYTSKEQKDCVGIFCEQQSNDTFHSFIGTCFALFWYIFSLAHVAIFVTRFSYGE-
TQLYDKGYTSKEQKDCVGIFCEQQSNDTFHSFIGTCFALFWYIFSLAHVAIFVTRFSYGE-

-----S6-----          TRP-Motiv
ELQSFVGAVIVGTYNVVVVIVLTKLLVAMLHKSFQLIANHEDKEWKFARAKLWLSYFDDKCTL
EFTEFVGATMFGTYNVISLVVLLNMLIAMMNSYQLIADHADIEWKFARTKLWMSYFEEGGTL
ELQSFVGAVIVGTYNVVVVIVLTKLLVAMLHKSFQLIANHEDKEWKFARAKLWLSYFDDKCTL

```

Abbildung 2.1: **Sequenzausschnitt der chimären Konstrukte TRPC1-VL-C4-Pore, TRPC4-C1-Pore und TRPC4-C1-Region.** In der Darstellung ist ein Ausschnitt der jeweiligen Sequenzen gezeigt, TRPC1-Sequenzen sind in blau und TRPC4-Sequenzen in grün eingezeichnet.

Klonierung von TRPC1-N-eGFP-Fusionskonstrukten

In den TRPC1-N-eGFP-Fusionskonstrukten (C1-N) wurde die 5' UTR sowie die Sequenz 180 Basenpaare (bp) nach dem ersten AUG-Triplett der TRPC1 cDNA an eGFP fusioniert (C1-N-VL). Dieses Konstrukt diente als Basis zur Mutagenese von AUG-ähnlichen Triplets (z.B. ACG und CUG). In einem weiteren Konstrukt wurden die ersten 180 bp nach dem ersten AUG-Triplett an eGFP fusioniert (C1-N-S). Stromaufwärts des ersten AUG-Triplets wurde eine Kozak-Sequenz eingebracht (GCCGCCACC) (Kozak 1987). Die zur Mutagenese verwendeten Primer sind in Tabelle 2.2 zu finden.

2.5.11 Klonierung und Mutagenese von TRPC1-VL, TRPC4, TRPM4, TRPM8 und TRPV6

Zur Expression von murinem TRPC1-VL (NM_011643.3) und humanem TRPV6 (NM_018646.5) in *Xenopus* Oozyten wurden die entsprechenden cDNAs in den pBS MXT-Vektor kloniert. Die cDNAs wurden aus bereits in der Arbeitsgruppe vorhandenen Vektoren amplifiziert und in die EcoRV-Schnittstelle ligiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Zur Expression in eukaryotischen Zelllinien wurden die codierenden Bereiche der cDNAs von TRPC4 (NM_016984.3), TRPM4 (NM_175130.4), TRPV6 (NM_018646.5) und TRPC1-VL (NM_011643.3) in die EcoRV-Seite des pMAX-I-GFP-Vektors kloniert. Die Klonierungen von TRPC1-VL in den pMax-I-GFP-Vektor hat Stefanie Buchholz durchgeführt. Die TRPC1-VL cDNA wurde zusätzlich in den pBluescript-Vektor subkloniert, in welchem die Mutagenese durchgeführt wurde und anschließend in die SacI/ClaI-Schnittstelle des pcAGGS-I-GFP-Vektors ligiert. Die TRPM8-Konstrukte aus Ratte (NM_134371.2) wurden von Dr. Wang Zheng (Edmonton, Kanada) in den pcDNA3-Vektor kloniert. Die Konstrukte wurden vor Gebrauch sequenziert. Da der pcDNA3-Vektor die cDNA von GFP nicht enthält, wurde der pcAGGS-I-GFP-Vektor in funktionellen Untersuchungen co-transfiziert (siehe Abschnitt 2.3.2). Zur Einführung der Mutationen in TRPC1-VL, TRPC4, TRPM4, TRPM8 und TRPV6 wurde das Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs, Ipswich, USA) nach Herstellerangaben benutzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.2 zu finden.

2.5.12 Im Rahmen dieser Arbeit klonierte Plasmide

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit klonierten oder verwendeten Plasmide aufgelistet. Die Nameskürzel stehen für den, der die Klonierung maßgeblich durchgeführt hat, wobei das Kürzel UW für Dr. Ulrich Wissenbach, LH für Laura Hofmann und SB für Stefanie Buchholz steht.

Tabelle 2.6: Plasmidliste

Bezeichnung, Klon	Kürzel, Datum	Beschreibung
TRPC1-N		
TRPC1-N-S pcDNA3-eGFP KI.13 = C1-N-S	UW, 30.05.12	TRPC1-N-Terminus-S, Kozak vor M(+1) bis KEEN(+60), fusioniert an eGFP
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP KI.8.8 = C1-N-VL	UW, 22.11.12	TRPC1-N-Terminus-VL, 5' UTR bis KEEN(+60), fusioniert an eGFP, Matritze für Mutanten
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 1188/1189 KI.2.1	UW, 22.11.12	C1-N-VL mit ACG → ACT (T1)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 1192/1193 KI.10.9	UW, 22.11.12	C1-N-VL mit CTG → TTA (L4 + L5)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 1190/1191 KI.4	UW, 29.11.12	C1-N-VL mit CTG → TTA (L1 + L2)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 1188/1189/1192/1193 KI.2	UW, 04.12.12	C1-N-VL mit ACG → ACT (T1) + CTG → TTA (L4 + L5)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 1190/1191/1192/1193 KI.12	UW, 04.12.12	C1-N-VL mit CTG → TTA (L1 + L2 + L4 + L5)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 1188/1189/1190/1191 KI.4	UW, 13.12.12	C1-N-VL mit ACG → ACT (T1) + CTG → TTA (L1 + L2)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 1188/1189/1190/1191/1192/1193 KI.5	UW, 13.12.12	C1-N-VL mit ACG → ACT (T1) + CTG → TTA (L1 + L2 + L4 + L5)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 2010/2011 KI.2	LH, 23.01.13	C1-N-VL mit CTG → TTA (L3)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 2012/2013 KI.16	UW, 23.01.13	C1-N-VL mit ACG → ACT (T2)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 2014/2015 KI.18	UW, 21.01.13	C1-N-VL mit GTG → GTC (V+V) + ACG → ACT (T3)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 2016/2017 KI.23	UW, 07.01.13	C1-N-VL mit M1Y Mutation
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 2036/1190 KI.1	LH, 26.03.13	C1-N-VL mit CTG → TTA (L1)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 2037/1190 KI.7	LH, 26.03.13	C1-N-VL mit CTG → TTA (L2)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 1188/2040 KI.3	LH, 07.06.13	C1-N-VL mit Stoppcodon (T1)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 1190/2041 KI.1	LH, 07.06.13	C1-N-VL mit Stoppcodon (L1)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 1190/2042 KI.8	LH, 05.06.13	C1-N-VL mit Stoppcodon (L2)
TRPC1-N-VL pcDNA3-eGFP 1190/2043 KI.2	LH, 05.06.13	C1-N-VL mit Stoppcodon (L1 + L2)
TRPC1-Volllänge		
TRPC1-VL pcAGGS-I-GFP korr. KI.1 = C1-VL	UW, 05.11.12	TRPC1-Volllängenkonstrukt, 5' UTR bis Stopp, enthält Exon 3 und 7 AS aus Exon 5
TRPC1 pcAGGS-I-GFP Exon3 KI.7 = C1-S	UW, 10.02.11	Kozak vor M(+1) bis Stopp, enthält Exon 3 und 7 AS aus Exon 5
TRPC1-VL pcAGGS-I-GFP ε-Variante KI.7 = C1- art.	UW, 22.08.12	Falsches M am Anfang der 5' UTR, ohne 7 AS aus Exon 5
TRPC1-S pcAGGS-I-RFP KI.2, KI.11	LH, 16.04.13	Kozak vor M(+1) bis Stopp, IRES-RFP Primer für C1-Insert: UW 1161/1001
TRPC1-VL pcAGGS-I-RFP KI.5	LH, 08.05.13	5' UTR bis Stopp, IRES-RFP Primer für C1-Insert: UW 1197/1001
TRPC1-VL-CTG pcAGGS-I-GFP KI.10	LH, 17.05.13	Kozak vor L1 bis Stopp, IRES-GFP Primer für C1-Insert: UW 2039/1001
TRPC1-VL-CTG pcAGGS-I-RFP KI.14	LH, 17.05.13	Kozak vor L1 bis Stopp, IRES-RFP Primer für C1-Insert: UW 2039/1001
TRPC1-Volllänge-Fusion		
TRPC1-VL pcAGGS-mRFP KI.2	LH, 01.03.13	5' UTR ohne Stopp, fusioniert an mRFP, Primer für C1-Insert: UW 1197/LH 1

Bezeichnung, Klon	Kürzel, Datum	Beschreibung
TRPC1-VL pcAGGS-R-pHluorin KI.2	LH, 01.03.13	5' UTR ohne Stopp, fusioniert an R-pHluorin, Primer für C1-Insert: UW 1197/LH 1
TRPC1-VL pcAGGS-eGFP KI.9	LH, 26.04.13	5' UTR ohne Stopp, fusioniert an eGFP, Primer für C1-Insert: UW 1197/LH 1
TRPC1-S pcAGGS-eGFP KI.3, KI.11	LH, 15.03.13	Kozak vor M(+1) ohne Stopp, fusioniert an eGFP, Primer für C1-Insert: UW 1161/LH 1
TRPC1-S pcAGGS-mRFP KI.3, KI.6	LH, 15.03.13	Kozak vor M(+1) ohne Stopp, fusioniert an mRFP, Primer für C1-Insert: UW 1161/LH 1
Porenkonstrukte		
TRPC1-VL-C4-Pore KI.4	UW, 08.07.13	mTRPC1-VL mit TRPC4-Pore
TRPC4-C1-Pore KI.1	UW, 21.11.14	mTRPC4 α mit TRPC1-Pore
mTRPC4-C1-Region pMax-I-GFP KI.5	LH, 13.04.16	TRPC4 α Rückgrat mit TRPC1-Region (S4-S5 Linker bis TRP-Domäne)
TRP-Konstrukte und TRP-Mutanten		
mTRPM4 pcDNA3 KI.18	UW, 25.06.08	Matritze für Klonierung des mTRPM4 pMax-I-GFP
mTRPM4 pMax-I-GFP KI.8	LH, 09.10.15	mTRPM4, Matritze für TRPM4-Mutanten
mTRPM4 W680A pMax-I-GFP KI.5	LH, 16.02.16	mTRPM4 W680A
mTRPM4 W681A pMax-I-GFP KI.13	LH, 23.11.15	mTRPM4 W681A
mTRPM4 W1054A pMax-I-GFP KI.25	LH, 27.11.15	mTRPM4 W1054A
mTRPM4 W680A+ W681A pMax-I-GFP KI.6	LH, 09.12.16	mTRPM4 W680A+ W681A
mTRPM4 R1058A pMax-I-GFP KI.5	LH, 18.11.16	mTRPM4 R1058A
mTRPC4 long pcAGGSM2-I-GFP KI.1-2	Dr. Stephan Philipp	Matritze für Klonierung des mTRPC4 α pMax-I-GFP
mTRPC4 α pMax-I-GFP KI.24	LH, 09.10.15	mTRPC4 α , Matritze für Mutanten
mTRPC4 α W314A pMax-I-GFP KI.42	LH, 23.11.15	mTRPC4 α W314A
mTRPC4 α W321A pMax-I-GFP KI.12	LH, 02.12.15	mTRPC4 α W321A
mTRPC4 α W635A pMax-I-GFP KI.3	LH, 27.11.15	mTRPC4 α W635A
mTRPC4 α R639A pMax-I-GFP KI.24	LH, 18.11.16	mTRPC4 α R639A
mTRPC4 α I617A pMax-I-GFP KI.4	LH, 11.04.16	mTRPC4 α I617A
mTRPC4 α I617N pMax-I-GFP KI.11	SB, 28.10.16	pSB_309_11, mTRPC4 α I617N
mTRPC1-VL pBluescript II KS ⁻ KI.8	LH, 05.02.16	Primer für C1-Insert: LH 37/38, Matritze für Mutanten
mTRPC1-VL W434A pBluescript II KS ⁻ KI.2	LH, Mini 18.02.16	mTRPC1-VL W434A, bei Zählweise ab M(+1): W351A
mTRPC1-VL Y441A pBluescript II KS ⁻ KI.21	LH, Mini 18.02.16	mTRPC1-VL Y441A, bei Zählweise ab M(+1): Y358A
mTRPC1-VL W759A pBluescript II KS ⁻ KI.11	LH, Mini 18.02.16	mTRPC1-VL W759A, bei Zählweise ab M(+1): W676A
mTRPC1-VL V741A pBluescript II KS ⁻ KI.31	LH, Mini 18.02.16	mTRPC1-VL V741A, bei Zählweise ab M(+1): V658A
mTRPC1-VL pcAGGS-I-GFP KI.1	LH, 04.04.16	SacI/ClaI, mTRPC1-VL

Bezeichnung, Klon	Kürzel, Datum	Beschreibung
mTRPC1-VL W434A pcAGGS-I-GFP KI.8	LH, 04.04.16	SacI/ClaI, mTRPC1-VL W434A, bei Zählweise ab M(+1): W351A
mTRPC1-VL Y441A pcAGGS-I-GFP KI.5	LH, 13.04.16	SacI/ClaI, mTRPC1-VL Y441A, bei Zählweise ab M(+1): Y358A
mTRPC1-VL W759A pcAGGS-I-GFP KI.14	LH, 04.04.16	SacI/ClaI, mTRPC1-VL W759A, bei Zählweise ab M(+1): W676A
mTRPC1-VL V741A pcAGGS-I-GFP KI.25	LH, 04.04.16	SacI/ClaI, mTRPC1-VL V741A, bei Zählweise ab M(+1): V658A
mTRPC1-VL pMax-I-GFP	SB, 20.02.17	pSB_355_7, Matritze für Mutanten
mTRPC1-VL V741Q pMax-I-GFP	SB, 20.02.17	mTRPC1-VL V741Q (pSB_356_8), bei Zählweise ab M(+1): V658Q
mTRPC1-VL V741N pMax-I-GFP	SB, 18.05.17	mTRPC1-VL V741N (pSB_367_17), bei Zählweise ab M(+1): V658N
mTRPC1-VL F639T pMax-I-GFP	SB, 20.02.17	mTRPC1-VL F639T (pSB_361_38), bei Zählweise ab M(+1): F556T
mTRPC1-VL E755S pMax-I-GFP	SB, 10.04.17	mTRPC1-VL E755S (pSB_362_1), bei Zählweise ab M(+1): E672S
hTRPV6 pcAGGS-I-GFP KI.12	UW, 07.09.11	Matritze für Klonierung der Mutanten, hTRPV6 pMax-I-GFP und hTRPV6 pBS MXT-MCS
hTRPV6-VL G516S pcAGGS-I-GFP KI.5	UW, 28.01.13	hTRPV6 mit G516S Mutation
hTRPV6-VL G516S + T621A pcAGGS-I-GFP KI.17	UW, 24.01.13	hTRPV6 mit G516S + T621A Mutation
hTRPV6-VL G516C pcAGGS-I-GFP KI.1	UW, 29.01.13	hTRPV6 mit G516C Mutation
hTRPV6-VL D620V pcAGGS-I-GFP KI.10	UW, 24.01.13	hTRPV6 mit D620V Mutation
hTRPV6-VL G516S + D620V pcAGGS-I-GFP KI.13	UW, 28.01.13	hTRPV6 mit G516S + D620V Mutation
hTRPV6-VL G516S + D620V + T621A pcAGGS-I-GFP KI.26	UW, 29.01.13	hTRPV6-VL mit G516S + D620V + T621A Mutation
hTRPV6-VL pMax-I-GFP KI.23	LH, 09.10.15	hTRPV6, Matritze für Mutanten
hTRPV6-VL W361A pMax-I-GFP KI.1	LH, 08.04.16	hTRPV6 W361A
hTRPV6-VL W633A pMax-I-GFP KI.27	LH, 26.11.15	hTRPV6 W633A
Sonstiges		
mKozTRPC5 pcAGGS-I-GFP KI.5-1	Dr. Stephan Philipp	mTRPC5 für Co-IP
mTRPC3 long pcAGGS-I-GFP KI.5	SB, 18.09.13	pSB_39_5, mTRPC3 für Co-IP
mTRPV6-VL pcAGGS-I-GFP KI.4	UW, 27.10.11	mTRPV6 für Co-IP
TMEM16a-mRFP pMax KI.5	UW, 08.06.16	Plasmamembranmarker
mTRPC4α pMax-eGFP N-term fus. KI.5	Dr. Jasmin Zimmermann	pJZ56, mTRPC4α N-terminal an eGFP fusioniert
GFP-TRPC4-C1-Pore pMax KI.3	UW, 11.01.17	mTRPC4α -C1-Pore N-terminal an eGFP fusioniert
hTRPV6 pBS MXT-MCS KI.6	LH, 29.04.15	hTRPV6 im Oozyten-Vektor
mTRPC1-VL pBS MXT-MCS KI.11	LH, 30.04.15	mTRPC1-VL im Oozyten-Vektor

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Verwendete Antikörper

Primärantikörper

Einige der Primärantikörper, die in der Arbeitsgruppe hergestellt wurden, entstanden nach Immunisierung von Kaninchen mit Peptiden oder Fusionsproteinen, die von den jeweiligen Primärsequenzen abgeleitet wurden. Die Fusionsproteine wurden rekombinant in *E. coli* aufgereinigt, die Peptide von Martin Jung in der Arbeitsgruppe von Prof. Richard Zimmermann zum Selbstkostenpreis synthetisiert und an *keyhole limpet* Hämocyanin gekoppelt. Die Immunisierung von Kaninchen und die Blutentnahme wurde von Sabine Pelvay und Martin Jung zum Selbstkostenpreis durchgeführt. Die Affinitätsreinigung und Charakterisierung der Antikörper erfolgte in unserer Arbeitsgruppe. Die übrigen Antikörper wurden Extern in Auftrag gegeben oder von der angegebenen Firma bezogen. Im Folgenden sind die verwendeten Antikörper mit ihrer Bezeichnung, der Spezies in der sie generiert wurden, der Herkunft (Firma oder eigene Herstellung) und die jeweils eingesetzten Konzentrationen angegeben. Für den Einsatz auf dem Western Blot (WB) wurden die Antikörper in 1 % (w/v) BSA in TBS-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.2) mit 0,05 % NaN_3 in der jeweils angegebenen Konzentration verdünnt. Die für die Immunpräzipitation (IP) eingesetzte Menge ist ebenso angegeben.

- anti-TRPC1
 - Antikörper (AK) 1F1; Maus; Neuromab; WB: 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 - AK LQ9F2E4; Ratte; eigene Herstellung; WB: 1:100
 - AK 4921; Kaninchen; eigene Herstellung; WB: 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 - AK 1030; Kaninchen; eigene Herstellung; IP: 9 μg
- anti-TRPC4
 - AK PK2D2A2; Maus; eigene Herstellung; WB: 1:200
 - AK SUN 113; Kaninchen; eigene Herstellung; WB: 1:200
 - AK 869; Kaninchen; eigene Herstellung; IP: 6 μg

- anti-TRPV6
 - AK 20C6; Maus; eigene Herstellung; WB: 1:30
 - AK 429; Kaninchen; eigene Herstellung; WB: 1:100, IP: 5 μg
- anti-TRPM4
 - AK 578; Kaninchen; eigene Herstellung; WB: 1:100
- anti-TRPM8
 - AK 797; Kaninchen; eigene Herstellung; WB: 1:200
- anti-TRPV4
 - AK 711; Kaninchen; eigene Herstellung; WB: 1:1000
- anti-TRPC3
 - AK 45/47; Kaninchen; eigene Herstellung; WB: 1:200, IP: 5 μg
- anti-TRPC5
 - AK 3B3A5; Ratte; eigene Herstellung; WB: 1:200
 - AK 777; Kaninchen; eigene Herstellung; IP: 7 μg
- anti-GFP
 - AK anti-GFP; Maus; Roche; WB: 1:1000
- anti- α -Tubulin
 - AK α -Tubulin sc-5286; Maus; Santa Cruz Biotechnology; WB: 1:200
- anti-CaV β 3
 - AK 828; Kaninchen; eigene Herstellung; WB: 1:200

Sekundärantikörper

Zum Inkubieren der Western Blots wurden die Sekundärantikörper in 5 % Magermilchpulver (w/v) in TBS-Puffer in der angegebenen Konzentration verdünnt. Im Folgenden sind die verwendeten Sekundärantikörper mit Name, Bezugsfirma, der Spezies in der sie generiert wurden und der eingesetzten Verdünnung aufgelistet.

- Detektion von Kaninchen-IgGs
 - Amersham ECL Rabbit IgG; GE Healthcare; Esel; 1:50000
- Detektion von Maus-IgGs
 - Amersham ECL Anti-Mouse IgG; GE Healthcare; Schaf; 1:20000
- Detektion von Ratten-IgGs
 - Amersham ECL Anti-Rat IgG; GE Healthcare; Ziege; 1:10000

2.6.2 SDS-PAGE

Zellysate, die mit 2x Lämmli-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.2) hergestellt worden waren, wurden bei 60 °C für 20 min denaturiert und anschließend mit dem Bandelin Sonopuls (Bandelin electronic, Berlin) sonifiziert. SDS-Polyacrylamidgele wurden in 8 oder 15 %iger Acrylamidkonzentration im Trenngel, beziehungsweise 4 %iger Konzentration im Sammelgel angefertigt. In Tabelle 2.7 ist das Pipettierschema zur Herstellung der verwendeten Polyacrylamidgele beschrieben. Für die Gelelektrophorese wurde eine Spannung von 80 V, beziehungsweise nach 15 min von 150 V, für 1-3 h angelegt. Die Auftrennung der TRP-Vollängen-Konstrukte erfolgte in 8 %igen Trenngelen, die der C1-N-Konstrukte in 15 %igen Trenngelen.

2.6.3 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine im Gel wurden die Proteine in einer *Blotting*-Kammer (Bio-Rad) auf eine Nitrozellulosemembran mit 0,2 μ m Porenweite in *Blotting*-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.2) transferiert. Es wurde ein Strom

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Trenngel	Trenngelpuffer	40 % Aa 29:1 (Acrylamid:Bisacrylamid)	H₂O	10 % APS	TEMED
8 %	2,5 ml	2 ml	5,41 ml	75 µl	15 µl
15 %	2,5 ml	3,75 ml	3,66 ml	75 µl	15 µl

Sammelgel	Sammelgelpuffer	40 % Aa 29:1 (Acrylamid:Bisacrylamid)	H₂O	10 % APS	TEMED
4 %	1,25 ml	0,5 ml	3,21 ml	37,5 µl	7,5 µl

von 350 mA über eine Dauer von 1,5 h angelegt. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde in 5 % Magermilchpulver (w\ v) in TBS-Puffer blockiert. Nach 3-maligem Waschen mit TBS-Puffer (je 10 min) wurde der jeweilige Erstantikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde 3-mal mit TBS-Puffer gewaschen, wobei der zweite Waschschritt mit TBS-T-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.2) erfolgte. Der Zweitantikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Western Blot wieder 3-mal mit TBS-Puffer gewaschen, wobei der zweite Waschschritt mit TBS-T-Puffer erfolgte. Zum Detektieren wurde der Blot mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer, Waltham, USA) für 1 min inkubiert und die Luminol Chemolumineszenz anschließend im LAS 3000 Imager (Fujifilm, Nikkei, Japan) detektiert (max. 1 h). Um gebundene Antikörper wieder zu entfernen, wurde der Blot für 30 min bei 50 °C in *Stripping*-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.2) und anschließend 3-mal mit TBS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte erneute Inkubation mit 5 % Magermilchpulver (w\ v) in TBS-Puffer für 1 h. Anschließend kann nach einem Waschschritt mit TBS-Puffer, eine erneute Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper erfolgen.

2.6.4 Co-Immunpräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitations-Experimente wurden Cos-7 Zellen in Kulturflaschen (75 cm²) mit den jeweiligen TRP cDNAs, die in pcAGGS-I-GFP-Vektoren vorlagen, im Verhältnis 1:1 co-transfiziert. Für Co-Immunpräzipitations-Experimente von TRPC1-VL mit TRPC4 wurde die TRPC1-VL cDNA in Kulturflaschen mit HEK-293 M₂R TRPC4 Zellen transfiziert. Nach 48 h

wurde die erfolgreiche Transfektion durch die grüne Fluoreszenz des GFP im Zytosol der Zellen am Fluoreszenzmikroskop überprüft. Die Zellen wurden mit PBS (siehe Abschnitt 2.2.2) gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin (10x Trypsin/EDTA (Sigma Aldrich) in PBS verdünnt) suspendiert. Die Trypsin-Wirkung wurde durch Zugabe von 7 ml Medium und das darin enthaltene FKS gestoppt. Die Zellsuspension wurde gemischt, geschert und in ein Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden für 5 min bei 200 g zentrifugiert, im Anschluss wurde mit 10 ml PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei -80 °C gelagert oder direkt verwendet. Aus den Zellen wurde ein Lysat mit RIPA-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.2) hergestellt. Dieser Schritt und auch die Folgenden wurden bei 4 °C durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 1 ml RIPA-Puffer, der mit Proteaseinhibitoren versetzt war, resuspendiert. Die Suspension wurde 10-mal durch eine 0,4 mm Kanüle geschert. Anschließend wurde für 15 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (Lysat) wurde abgenommen und bei 4 °C aufbewahrt.

Äquilibrierung von Protein G-Sepharose

80 μ l Protein G-Sepharose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurde mit 1 ml RIPA-Puffer mit einem Vortexer gemischt. Anschließend wurde bei 4 °C und 3000 g für 3 min zentrifugiert, wobei der Überstand danach verworfen wurde. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Für eine Co-Immunpräzipitation wurden vier Ansätze äquilibriert.

Präabsorption

Lysate wurden auf zwei äquilibrierte Protein G-Sepharose-Ansätze aufgeteilt und anschließend 1 h bei 4 °C geschüttelt. Danach wurde 3 min bei 3000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zu den Überständen wurde anschließend 5-9 μ g des jeweiligen Antikörpers gegeben und 2 h bei 4 °C geschüttelt. Die verwendeten Antikörper und deren eingesetzte Menge sind in Abschnitt 2.6.1 angegeben. Das Gemisch wurde anschließend auf zwei vorbereitete Ansätze äquilibrierter Protein G-Sepharose gegeben und erneut für 1 h bei 4 °C geschüttelt. Im Anschluss wurde das

Gemisch 3 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde 3-mal mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend in 60 μ l 2x Lämmli-Puffer resuspendiert und hitzedenaturiert. Die Denaturierung erfolgte 20 min bei 60 °C, allerdings wurde bei der Co-Immunpräzipitation von TRPV6 mit TRPC1-VL eine Temperatur von 37 °C gewählt, da das TRPV6-Protein bei höheren Temperaturen Konglomerate bildet.

2.6.5 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in Zelllysaten wurde die Bicinchoninsäure (BCA)-Methode angewendet (Smith et al. 1985). Hierfür wurde der Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Die kalorimetrische Messung der Proben bei 540 nm erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten an einem Platten-Reader (Tecan, Männedorf, CH).

2.6.6 Glykosylierungsassay

Proteine können im Rahmen post-translationaler Modifikationen glykosyliert vorliegen. Glykosidische Seitenketten können mit N-Glykosidase F (PNGase F) entfernt werden (Tarentino et al. 1985). Es wurde ein PNGase F-Kit (New England Biolabs, Ipswich, USA) verwendet. Transfizierte Zellen wurden in Denaturierungspuffer (im Kit enthalten) aufgenommen (ein Schälchen mit 3,5 cm Durchmesser in 100 μ l Puffer) und 10-mal durch eine 0,4 mm Kanüle geschert. Anschließend wurde denaturiert (20 min, 60 °C). Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 14000 g für 15 min. Der Überstand wurde für die Proteinbestimmung und anschließende Deglykosylierung verwendet. Der Deglykosylierungsansatz ist in Tabelle 2.8 beschrieben. Zur Deglykosylierung wurden jeweils 1-20 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit jeweils 10 μ l 2x Lämmli-Puffer versetzt und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Tabelle 2.8: Deglykosylierungsansatz

	+ PNGaseF	- PNGaseF
Lysat	1 μ l	1 μ l
10x G7-Puffer	2 μ l	2 μ l
10 % NP-40	2 μ l	2 μ l
PNGase F	2 μ l	/
H ₂ O	ad 20 μ l	ad 20 μ l

2.7 Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationsänderung

Die Experimente zur Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationsänderung (Ca-Imaging) wurden mit dem ratiometrischen Ca²⁺-sensitiven Farbstoff Fura-2 durchgeführt. Hierbei wurde Fura-2-AM, ein membrangängiges Acetoxymethylester-Derivat (TEV Labs, Austin, USA), eingesetzt. Es wird nach Aufnahme in das Zytosol durch zellulären Esterasen hydrolysiert, sodass das resultierende, hydrophilere Fura-2 Molekül nicht mehr aus der Zelle heraus diffundieren kann und sich in der Zelle anreichert. Die Anregungswellenlänge des Ca²⁺-gebundenen Fura-2 hat ein Maximum bei 340 nm, die des Ca²⁺-ungebundenen Fura-2 bei 380 nm. Der isosbestische Punkt liegt bei 360 nm. Die Emission von Fura-2 hat in beiden Fällen ein Maximum bei 510 nm. Somit kann nach alternierender Anregung mit 340 nm und 380 nm ein Quotient der detektierten Emissionen gebildet werden (F340/F380) welcher sich proportional zu der Ca²⁺-Konzentration im Zytosol verändert. Die Messungen wurden an dem Mikroskop Axiovert S100 (Zeiss, Oberkochen), welches mit einem 20X Objektiv (Zeiss) einer CCD-Kamera SensiCam (PCO, Kelheim) und einem Monochromator Polychrome V (Till Photonics, Gräfelfing) ausgestattet ist, durchgeführt. Mit Hilfe geeigneter Filtersets (AHF Analysetechnik AG, Tübingen) konnte die Fluoreszenz von Fura-2 (Anregungswellenlänge bei 340, 360 bzw. 380 nm, Strahlenteiler bei 440 nm, Emission >510 nm) mit einer Belichtungszeit von 30 ms angeregt und detektiert werden. Eine Anregung der GFP-Fluoreszenz (480 nm, Strahlenteiler bei 495 nm, Emission >500 nm) diente zur Identifizierung von transfizierten Zellen, da die TRP cDNA zumeist in einem IRES-GFP-Vektor vorlag wurden nur grün fluoreszierende Zellen gemessen. Die TillVision Software (Till Photonics) wurde zur Aufzeichnung und

Auswertung der Messung verwendet. Hier erfolgte auch die Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz. Für die Messungen wurden Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen ausgesät und transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit 2 μ M Fura-2-AM im Medium für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Für Messungen von TRPV6 wurden die Zellen in Ca^{2+} -freiem Ca-Imaging-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.4) inkubiert. Zur Messung wurde das Gläschen 3-mal mit Ca-Imaging-Puffer gewaschen und in eine offene Messkammer eingelegt. Die Zellen wurden mit Ca-Imaging-Puffer bedeckt und je nach Protokoll wurden verschiedenen Substanzen, die in Ca-Imaging-Puffer verdünnt waren, appliziert. Die Endkonzentrationen der applizierten Substanzen zum jeweiligen Zeitpunkt sind in der Darstellung der Ergebnisse eingezeichnet. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Lediglich bei den Messungen der TRPM8-Konstrukte wurde die Messkammer, der Objektisch und die verwendeten Lösungen auf 37 °C temperiert, da der Temperatur-sensitive TRPM8-Kanal bei RT aktiviert ist, jedoch nicht bei 37 °C.

2.8 Patch-Clamp-Technik

Um Ströme über die Membran von Zellen zu messen wurde das Prinzip der Spannungsklemme im Ganzzell-Modus angewendet, welches im Folgenden als *Whole Cell Patch Clamp* bezeichnet wird (Hamill et al. 1981). Die Zusammensetzungen der verwendeten Bad- und Pipettenlösungen sind in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Patchpipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren (GB150T-8P; Science Products GmbH, Hofheim) mit Hilfe des PC-10 Ziehgerätes (Narishige, Tokyo, Japan) dünn ausgezogen. Nach dem Befüllen mit Pipettenlösung hatten die Pipetten einen Widerstand von 2-4 M Ω . Die Ströme wurden mit einem EPC-9 Verstärker (HEKA Electronics, Lambrecht) gemessen, gefiltert (2,9 kHz) und mit der Patchmaster Software (HEKA Electronics) aufgezeichnet. Die Digitalisierung erfolgte in Intervallen von 400 μ s bzw. 100 μ s, je nach Dauer der Rampe von 400 bzw. 50 ms. Nach Einbruch in die Zelle, sofern nicht anders beschrieben, wurde ein Haltepotential (V_H) von 0 mV angelegt und alle 2 s eine Spannungsrampe von -100 mV bis +100 mV durchlaufen. Ein Schema des Rampen-

protokolls ist in Abbildung 3.4 **F** gezeigt. Die gemessenen Ströme wurden auf die Zellkapazität, die ein Maß für die Zellgröße darstellt, normalisiert (pA/pF). Desweiteren wurde auf ein *Liquid Junction* Potential von 10 mV korrigiert. Zur Darstellung wurde der Strom bei -80 und +80 mV extrahiert und gegen die Zeit aufgetragen. Zur Berechnung der Stromamplituden nach Applikation eines Agonisten wurde der vor Applikation gemessene, als Basalstrom bezeichnete, Strom subtrahiert. Die Strom-Spannungs-Kennlinien (IV-Kurven) wurden zum jeweils angegebenen Zeitpunkt extrahiert. Für die Messungen von TRPC1, TRPC1/C4 und TRPC4 wurden HEK-293 oder NSC-34 Zellen verwendet, welche 48 h zuvor transfiziert wurden. Zur Aktivierung wurde die gemessene Zelle mit Agonisten wie Carbachol (CCh) oder Englerin A (EA) umspült. Dies wurde über eine Applikationspipette und mit Hilfe eines Druckapplikators (MPCU; Lorenz Messgerätebau, Katlenburg-Lindau) durchgeführt. Die Endkonzentration der applizierten Substanzen zum jeweiligen Zeitpunkt ist in der Darstellung der Ergebnisse eingezeichnet. Die Messungen von TRPM4-Kanälen wurden 24 h nach Transfektion durchgeführt. Die Pipettenlösung, die während der Messung in die Zelle eingespült wird, wurde mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 3 μM angesetzt, da TRPM4 durch eine hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wird. In der Badlösung wurde NaCl mit Na-Aspartat ersetzt, um dem Entstehen von Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Strömen während der Messung entgegenzuwirken. In Abschnitt 2.2.3 ist die Zusammensetzung der Puffer aufgeführt. Bei dem Messprotokoll für TRPM4-exprimierende HEK-293 Zellen betrug die Dauer einer Rampe 50 ms. NSC-34 Zellen wurden in einer Badlösung ohne Kalium gemessen, da in Anwesenheit von extrazellulärem Kalium EA-induzierte Kaliumströme auftraten. *Whole Cell Patch Clamp* Experimente an Ileum-Myozyten wurden von Dr. Volodymyr Tsvilovskyy nach der zuvor beschriebenen Methode durchgeführt (Tsvilovskyy et al. 2009). Ein Schema des hierbei verwendeten Rampenprotokolls ist in Abbildung 3.8 **D** dargestellt.

2.9 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) wurde an *Xenopus laevis* Oozyten im Labor von Prof. Xing-Zhen Chen (Universität von Alberta, Edmon-

ton, Kanada) durchgeführt. Die TEVC erfolgte 48 h nach Injektion von 25 ng der jeweiligen RNA. Als Kontrolle wurden die Oozyten mit H₂O injiziert. Zur Messung an einem TEVC-Setup wurden die Oozyten in eine Badlösung aus STD (siehe Abschnitt 2.2.3) eingetaucht. Die verwendeten Elektroden (Warner Instruments, Hamden, USA) wurden an einem Ziehgerät P-87 (Sutter Instruments, Novato, USA) gezogen. Zwei Elektroden wurden mit 3 M KCl gefüllt, wodurch sie einen Widerstand von 0.3-2 MΩ besaßen. Beide Elektroden wurden in die Oozyte eingestochen. Das V_H , welches während der Messung angelegt wurde betrug -50 mV und der Einwärtsstrom wurde gemessen. Die Ströme wurden mit einem Geneclamp 500B Verstärker, der mit einem Digidata 1322A AD/DA Umwandler (beide von Molecular Devices, Union City, USA) ausgestattet war, gemessen. Strom und Spannung wurden digital aufgezeichnet und durch einen 2 kHz Bessel-Filter gefiltert. Mithilfe der pClamp 9 Software (Axon Instruments, Union City, USA) wurde der Strom aufgezeichnet und analysiert. Die Ströme gegen die Zeit wurden mit der SigmaPlot 12 Software (Systat Software, San Jose, USA) dargestellt.

2.10 Biotinylierungsassay von Oozyten

Der Assay wurde im Labor von Prof. Xing-Zhen Chen (Universität von Alberta, Edmonton, Kanada) durchgeführt. Hierzu wurden 10-15 *Xenopus* Oozyten, die 48 h zuvor injiziert wurden, 3-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Oozyten für 30 min bei Raumtemperatur in einer 1 mg/ml Biotin-Lösung (EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in PBS geschüttelt. Um die Biotinylierung zu stoppen wurde 0,1 M NH₄Cl hinzugefügt und 3-mal mit PBS gewaschen. Die Oozyten wurden in 50 µl je Oozyte CellLytic M Lysepuffer (Sigma Aldrich), welchem Proteaseinhibitoren (Halt Protease Inhibitor Cocktail 100x, Thermo Fisher Scientific) zugesetzt worden waren, lysiert und homogenisiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 14000 g wurde mit dem Überstand (ohne die Fettschicht) weitergearbeitet. Ein Volumen von 400 µl Lysat wurde mit 50 µl Pierce Streptavidin Agarose (Thermo Fisher Scientific) über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Der Überstand wurde nach einer kurzen Zentrifugation bei ≤200 g abgenommen und verworfen. Die Streptavidin-*Beads* wurden mit NP40-Puffer (siehe

Abschnitt 2.2.2) inklusive Proteaseinhibitoren 3-mal gewaschen. Die biotinylierten Proteine wurden mit einer Mischung aus 45 μ l 5x SDS-Auftragspuffer (siehe Abschnitt 2.2.2) und 45 μ l Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren eluiert. Das Eluat wurde 5 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf SDS-PAGE-Gele aufgetragen.

2.11 Mikroskopie

Zum Mikroskopieren wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und transfiziert. Ein Ca^{2+} -aktivierter Chloridionen (Cl^-)-Kanal TMEM16a (Anoctamin-1) der an eGFP oder mRFP fusioniert ist, diente als Plasmamembranmarker. In einigen Experimenten wurde ein membranständiges Cherrypicker-Protein (Clontech, Mountain View, USA) als Oberflächenmarker verwendet. Die cDNA wurde, zusammen mit dem untersuchten Protein, 24-72 h zuvor co-transfiziert. Die untersuchten Proteine waren ebenfalls an eGFP oder mRFP fusioniert. Das TRPC1-Protein wurde C-terminal an die fluoreszierenden Proteine fusioniert, während das verwendete TRPC4 oder TRPC4-C1-Porenkonstrukt N-terminal fusioniert war. Zum Mikroskopieren wurden die Gläschen dreimal mit B1-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.4) gewaschen und in eine Messkammer eingelegt welche mit B1-Puffer gefüllt wurde. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden am Mikroskop Observer Z1 (Zeiss, Oberkochen) mit einem Plan-Apochromat 63X/1.40 Oil oder einem 10X Objektiv (Zeiss) aufgenommen. Das Mikroskop ist mit einer Lichtquelle HXP 120C (Pulch+Lorenz, March) sowie einer Axiocam Color CCD-Kamera (Zeiss) ausgestattet. Mit Hilfe geeigneter Filtersets der Firma AHF Analysetechnik AG, Tübingen für GFP (Anregung bei 470/40 nm, Strahlenteiler bei 495 nm, Emission >500 nm) oder RFP (Anregung bei 560/40 nm, Strahlenteiler bei 590 nm, Emission >590 nm) konnte die jeweilige Fluoreszenz angeregt und detektiert werden. Die Konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop LSM780 (Zeiss) welches ebenfalls mit einem Plan-Apochromat 63X/1.40 Oil Objektiv (Zeiss) in der Arbeitsgruppe von Prof. Jens Rettig (Homburg) gemacht. Hierbei wurden eGFP und mRFP mit Licht der Wellenlängen 488 nm bzw. 543 nm angeregt, welches von einem Argon bzw. HeNe-Laser erzeugt wurde. Die Aufnahme und Auswertung der Mikroskopaufnahmen erfolgte mit dem Programm ZEN oder

Axio Vision (beide Zeiss), mit welchem die Helligkeit und der Kontrast eingestellt wurde sowie die rote und grüne Fluoreszenz in der jeweiligen Farbe dargestellt wurde. Die Bilder wurden als .tiff exportiert und anschließend mit dem Programm ImageJ (NIH, Bethesda, USA) weiter ausgewertet. Hier erfolgte der Zuschchnitt des Bildes auf die gewünschte Region, das Übereinanderlagern der Fluoreszenzen, sowie die Erstellung der Fluoreszenzintensitätsprofile.

2.12 Analyse und Statistik

Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse, die durch Ca-Imaging oder *Whole Cell Patch Clamp* Experimente generiert wurden erfolgte mit der Software Igor Pro 6.31 (WaveMetrics, Lake Oswego, USA). Statistische Analysen wurden entweder mit Igor Pro oder Graph Pad Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Zur Darstellung der arithmetischen Mittelwerte $\pm SEM$ (*standard error of the mean*) und der statistischen Auswertung wurde Igor Pro, Graph Pad Prism oder OriginPro 2016 (OriginLabs, Northampton, USA) verwendet. Beim Vergleich von zwei Gruppen wurde ein Zweistichproben-*t*-Test für unabhängige Stichproben nach Student durchgeführt. Beim Vergleich von mehr als zwei Stichproben wurde eine *One-way* ANOVA (*analysis of variance*) Varianzanalyse angewandt, an die sich immer eine Bonferroni-Korrektur anschloss, um auf statistische Unterschiede zu prüfen. Bei den statistischen Tests gilt ein p-Wert von >0.05 als nicht signifikant (ns). Werte von $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) und $p \leq 0.001$ (***) sind signifikant. Die Abbildungen wurden mit CorelDRAW Graphics Suite X4 (Corel, Ottawa, Kanada) angefertigt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Teil 1: TRPC1-VL

3.1.1 Identifizierung des endogen exprimierten TRPC1-Proteins (TRPC1-VL) aus Maushirn

TRPC1 kann mittels Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern in Lysaten von Maushirn oder Ileum nachgewiesen werden. Ebenso kann TRPC1 mit synthetischen TRPC1 cDNA Konstrukten in verschiedenen Zelllinien, wie Cos-7 Zellen, exprimiert und ebenfalls nachgewiesen werden. Es zeigte sich aber, dass das TRPC1-Protein, welches in Maushirn vorkommt, eine größere Masse aufweist als das TRPC1-Protein, das durch Translation einer klonierten cDNA gebildet wird die mit dem ersten AUG-Codon der cDNA beginnt und einem Triplet, welches die Translation terminiert, endet (Abbildung 3.1 **A**). Letzteres Konstrukt (C1-S) enthält vor dem AUG-Triplett eine neun Aminosäuren lange Sequenz, die eine Bindungsstelle für Ribosomen darstellt und Kozak-Sequenz genannt wird (Kozak 1987). Es wurden weitere Konstrukte erstellt, die zusätzlich zum codierenden Bereich der TRPC1 cDNA die 5' UTR der cDNA enthalten (C1-VL), als auch eines an dessen 5' Ende der cDNA des nicht translatierten Bereichs ein artifizielles AUG-Codon eingebaut wurde (C1-art., Abbildung 3.1 **B**). Anschließend wurde eine Western Blot Analyse von heterolog in Cos-7 Zellen exprimierten TRPC1-Konstrukten neben Hirnmikrosomen und Ileum-Lysaten durchgeführt. Die Gewebelysate waren jeweils von Wildtyp (WT) oder TRPC1-defizienten Mäusen generiert worden. Hier-

bei ist zu erkennen, dass endogenes TRPC1 aus Hirn und Ileum die gleiche Mobilität in der SDS-PAGE zeigt wie die C1-VL-Variante welche in Cos-7 Zellen exprimiert worden war. Ein Massenunterschied von ca. 10 kDa im Vergleich zu der C1-S-Variante ist zu erkennen. Auch ist erkennbar, dass im Hirn oder Ileum keine mit C1-S vergleichbare Bande detektiert werden kann. In TRPC1-defizienten Gewebelysaten ist TRPC1 wie erwartet nicht detektierbar (Abbildung 3.1 A).

Der Western Blot zeigt außerdem, dass das TRPC1-Protein, welches vom C1-VL-Konstrukt gebildet wird, scheinbar die gleiche Masse aufweist wie das endogene TRPC1 aus Hirn und Ileum, während das Produkt, das vom C1-art.-Konstrukt gebildet wird, eine größere Masse aufweist. Die Daten implizieren, dass das endogen exprimierte TRPC1-Protein möglicherweise einen längeren N-Terminus aufweist und vermutlich ein Teil der cDNA, der bisher als nicht-translatierter Bereich bezeichnet wurde, *in vivo* translatiert wird. Massenunterschiede von Proteinen können aber auch auf post-translationalen Modifikationen beruhen wie beispielsweise der Glykosylierung von Aminosäureresten innerhalb des Proteins. Um einen Massenunterschied aufgrund eines unterschiedlichen Glykosylierungsmusters des TRPC1-Proteins auszuschließen, wurde ein Glykosylierungs-Assay mit Peptid N-Glykosidase F (PNGase F) durchgeführt. Durch Inkubation mit PNGase F können Glykosylierungsreste von Proteinen abgetrennt werden. Auf dem Western Blot konnte kein Massenunterschied des TRPC1-Proteins nach Inkubation mit PNGase F festgestellt werden (Abbildung 3.1 C). Der Versuch wurde in mit TRPC4 bzw. TRPC5 und TRPC1-VL co-transfizierten Cos-7 Zellen durchgeführt.

Um herauszufinden ob der Massenunterschied tatsächlich aufgrund einer N-terminalen Verlängerung des endogenen TRPC1 zu beobachten ist, wurden Hirnmikrosomen von Maus massenspektrometrisch untersucht. Um eine Anreicherung des TRPC1-Proteins zu erlangen, wurde zuvor eine Immunpräzipitation (IP) mit einem TRPC1-spezifischen Antikörper (AK) durchgeführt. Hierbei wurde von uns ein AK generiert, 4921, dessen Epitop im Bereich der 5' UTR der TRPC1 cDNA liegt, unter der Annahme, dass diese *in vivo* zumindest teilweise translatiert wird (Abbildung 3.1 D). Tatsächlich kann der AK 4921 TRPC1 präzipitieren und die in der Massenspektrometrie identifizierten Peptide liegen teilweise in dem Bereich, der zuvor als 5' UTR der

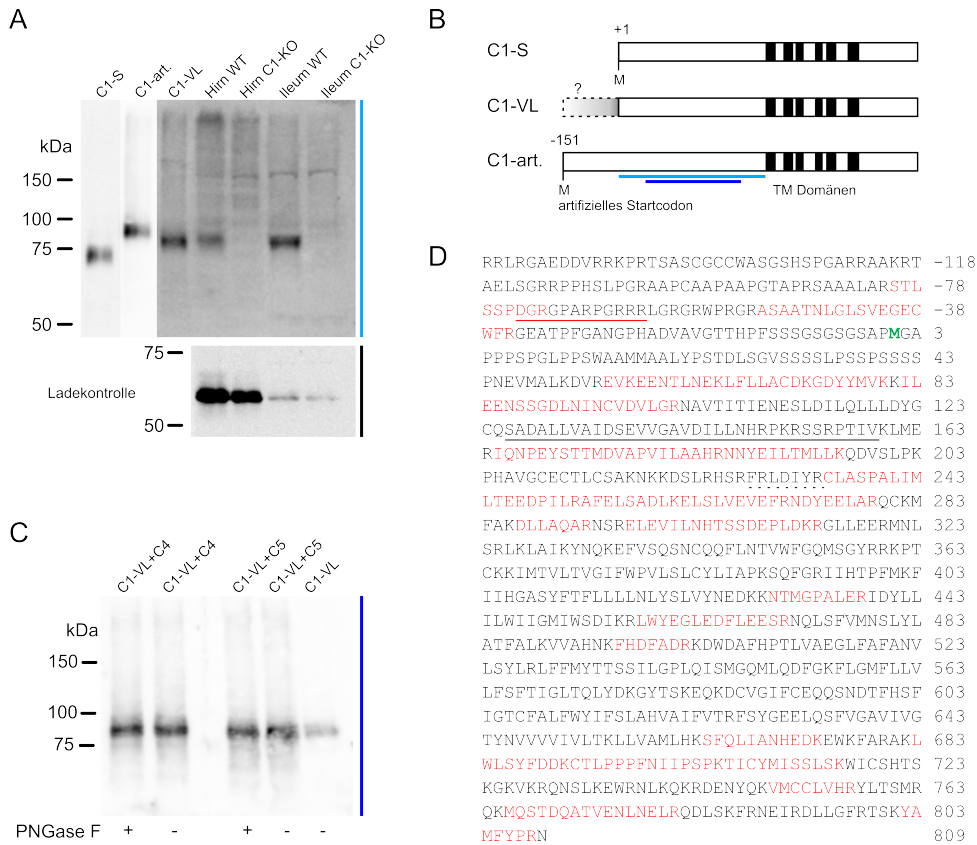


Abbildung 3.1: **Endogenes TRPC1 von Maus zeigt einen verlängerten N-Terminus.** **A**, Western Blot von verschiedenen TRPC1-Konstrukten neben TRPC1 aus Hirn und Ileum von Maus, inkubiert mit TRPC1-AK LQ9F2E4 (oben) und als Ladekontrolle mit einem AK gegen die $\beta 3$ Untereinheit des spannungs-sensitiven L-Typ Ca^{2+} -Kanals, AK 828 (unten). **B**, Schematische Darstellung der TRPC1-Konstrukte (C1-S, C1-VL und C1-art.), die in Cos-7 Zellen exprimiert wurden. Die Epitopbereiche der TRPC1-AK sind in hellblau (AK LQ9F2E4) und dunkelblau (AK 1F1) angedeutet. **C**, Glykosylierungs-Assay mit PNGase F in transfizierten Cos-7 Zellen. Der Western Blot wurde mit TRPC1-AK 1F1 inkubiert. **D**, TRPC1-VL-Proteinsequenz einschließlich der translatierten 5' UTR. Peptide, die nach einer Aufreinigung von Maushirn mittels Massenspektrometrie gefunden wurden sind in rot dargestellt. Die Sequenzabdeckung betrug 31,22%. Das ursprünglich angenommene Startmethionin ist grün markiert (Position +1). Rot unterstrichen ist das Epitop des TRPC1-AK 4921. Schwarz unterstrichen ist die Sequenz des Exon 3, welches in einer kürzeren Spleißvariante von TRPC1 nicht vorhanden ist. Gepunktet unterstrichen ist eine sieben Aminosäuren lange Sequenz aus Exon 5, die in einer weiteren Spleißvariante (epsilon) fehlt. Die in dieser Arbeit untersuchten TRPC1-Konstrukte enthalten die längstmögliche TRPC1-Sequenz.

TRPC1 cDNA beschrieben worden war. Demnach hat das endogen exprimierte TRPC1-Protein, das im Hirn der Maus exprimiert wird, eine N-terminale Verlängerung und demzufolge ist das die Translation initiiierende Triplet kein klassisches AUG-Codon. Um das Start-Triplett der TRPC1 cDNA zu identifizieren habe ich die als 5' UTR beschriebenen Sequenzen von TRPC1 cD-

NAs verschiedener Organismen verglichen. Dies geschah in der Annahme, dass TRPC1 auch in anderen Organismen nicht vom ersten in der cDNA enthaltenen AUG-Codon initiiert wird. Der Vergleich der translatierten 5' UTRs der TRPC1 mRNA ergibt, dass es stromaufwärts des ersten AUG in zwei Spezies Stoppcodons gibt, die im Leseraster liegen (Abbildung 3.2 **A**). Das eine Stoppcodon in der humanen Sequenz liegt ca. 122 Basentriplets stromaufwärts des ersten AUG-Codons. Zudem sind die translatierten 5' UTRs der verschiedenen Spezies hoch konserviert. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass der Initiations-Start der TRPC1 mRNA auch in anderen Spezies vor dem ersten AUG sein könnte.

Um das Startcodon zu identifizieren wurden zunächst AUG-ähnliche Codons in der 5' UTR gesucht, da es an diesen zu einer Translations-Initiation kommen kann (Ivanov et al. 2011). In der Literatur wurden beispielsweise ACG, welches normalerweise Threonin (T) codiert als auch CUG, welches Leucin (L) codiert, als Translations-Initiations-Codons beschrieben. Da die Translation jedoch auch an fünf weiteren Codons möglich ist, habe ich alle Codons in Betracht gezogen, die sich vom klassischen AUG-Codon um eine Base unterscheiden (Peabody 1989). Zunächst wurde ein Konstrukt erstellt, welches den kompletten, vormals als 5' UTR beschriebenen Bereich, als auch die ersten 180 Basenpaare (bp) nach dem ersten AUG-Triplett der TRPC1 cDNA an die cDNA des eGFP-Proteins fusioniert (C1-N-VL, Abbildung 3.2 **B**). Weiterhin wurde ein ähnliches Konstrukt erstellt ohne 5' UTR (C1-N-S). Mögliche Startcodons wurden mutiert, sodass die Triplets nicht mehr AUG-ähnlich sind, die codierte Aminosäure aber gleich bleibt. Dadurch kann eine Translations-Initiation an dem jeweiligen Codon der mRNA ausgeschlossen werden. In Abbildung 3.2 **A** sind die untersuchten durch AUG-ähnliche Codons codierten Aminosäuren in schwarz hervorgehoben. Mittels Mutagenese wurde in diesen cDNA-Konstrukten beispielsweise ACG (T) zu ACT (T) und CTG (L) zu TTA (L) mutiert (mut). In weiteren Konstrukten wurden diese Codons zu Stoppcodons (TAA) mutiert (Stopp). Um Massenunterschiede besser detektieren zu können, wurde das eben beschreibende verkürzte C1-N-VL-Konstrukt zur Mutagenese verwendet. Resultierende TRPC1-GFP-Fusionsproteine sind deutlich kürzer und mit einer Masse von ca. 48 kDa auf dem Western Blot detektierbar. Eine Übersicht der mutierten Konstrukte ist in Abbildung 3.2 **B** gegeben, mit

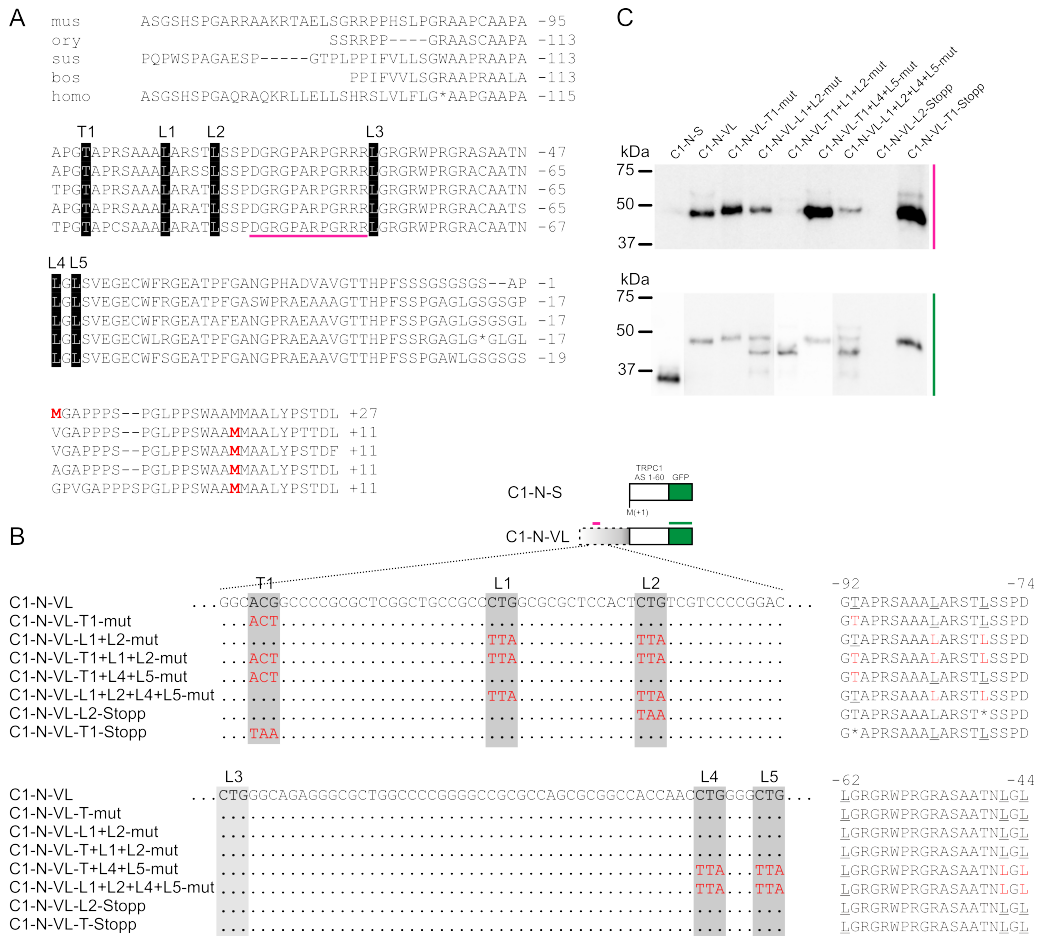


Abbildung 3.2: **Identifizierung des Translations-initiierenden Codons der TRPC1 cDNA.** **A**, Vergleich der translatierten 5' UTRs von TRPC1 von Maus (mus), Kaninchen (ory), Schwein (sus), Rind (bos) und Mensch (homo). Aminosäuren, die von AUG-ähnlichen Triplets codiert werden sind schwarz unterlegt. Das jeweilige erste Methionin ist rot markiert. Das Epitop des AK 4921 ist rosa unterstrichen. **B**, Schematische Übersicht über die C1-N-Konstrukte, die entweder eine Kozak-Sequenz vor dem ersten ATG-Triplett (C1-N-S) oder die 5' UTR vor dem ATG-Triplett (C1-N-VL) enthalten. Alle Konstrukte enthalten 180 bp, beginnend mit dem ersten ATG-Triplett der cDNA, fusioniert an eGFP. Das C1-N-VL-Konstrukt diente als Matritze für die in B gezeigten Mutanten. Ausschnitte der cDNA-Sequenz der analysierten Konstrukte (links) und resultierende AS-Sequenzen (rechts). Mutierte Codons oder Aminosäuren sind rot markiert. Aminosäuren, deren Basentriplets potenziell als Startcodons dienen könnten, sind schwarz unterstrichen. **C**, Western Blot der in B gezeigten Konstrukte nach Expression in Cos-7 Zellen, Inkubation mit einem TRPC1-spezifischen AK 4921 (oben), oder GFP-AK (unten).

der Bezeichnung der Variante links, der cDNA-Sequenz in der Mitte und der translatierten cDNA rechts. In der translatierten cDNA sind die Aminosäuren der möglichen, weiterhin ATG-ähnlichen Startcodons unterstrichen. Wenn eine Aminosäure zu einem Stoppcodon mutiert worden war, ist diese gekennzeichnet (*). Die C1-N-Konstrukte wurden in Cos-7 Zellen transfiziert und die Proteinlysate mittels Western Blot analysiert. Die C1-N-VL Konstrukte können entweder mit dem AK 4921, dessen Epitop sich im verlängerten N-Terminus von TRPC1 befindet, oder einem GFP-AK detektiert werden. Mit dem AK gegen GFP können alle Fusionsproteine detektiert werden, auch das C1-N-S (Abbildung 3.2, **C**). Die Auswertung des Western Blots, welcher mit dem Antikörper 4921 (Abbildung 3.2, **C**, oben) inkubiert wurde, ergibt Folgendes: Es wurden fünf Triplets mutiert, das am meisten stromauf gelegene Triplet codiert T sowie vier weitere Codons, die jeweils L codieren. Wird das CTG-Codon des zweiten Leucins (L2) zu einem Stoppcodon mutiert, erfolgt von diesem Konstrukt keine TRPC1-Proteinsynthese (Abbildung 3.2, **C**, Spur 8). Daraus kann geschlossen werden, dass das Initiations-Triplett auf der mRNA entweder CUG (L2) oder stromaufwärts davon gelegen ist. Werden die Codons für T1, L1 oder L2 einzeln mutiert, erfolgt die Translations-Initiation wahlweise von dem ACG (T1), CUG (L1) oder CUG (L2) auf der mRNA (Spur 3 + 4). Das Gelsystem kann jedoch die Größenunterschiede nicht auflösen wenn die Translation von den Triplets ACG (T) oder CUG (L1, L2) initiiert wird. Nur in einer Dreifach-Mutante in der die Codons von T1, L1 als auch L2 mutiert wurden (Spur 5), konnte ebenfalls kein Protein detektiert werden. Die Ergebnisse implizieren, dass das am meisten stromaufwärts liegende Initiationscodon das ACG-Codon ist, welches T codiert. Der Western Blot der mit dem GFP-AK inkubiert wurde (Abbildung 3.2, **C**, unten) zeigt ein ähnliches Muster. Proteinsynthese des relevanten Proteins (ca. 48 kDa) ist in den Spuren 5 und 8 ebenfalls nicht nachweisbar, aber es können durch den GFP-AK noch kürzere Proteine nachgewiesen werden, deren Identität jedoch unklar bleibt.

3.1.2 TRPC1 kann Komplexe mit anderen TRP-Kanälen bilden

Es war bislang bekannt, dass das N-terminal verkürzte TRPC1-Protein (TRPC1-S) nach heterologer Co-Expression mit den TRP-Proteinen TRPC3, TRPC4, TRPC5 und TRPV6 interagieren kann (Lintschinger et al. 2000; Storch, Forst, M. Philipp et al. 2012; Schindl et al. 2012). Ich habe die Frage untersucht ob das N-terminal verlängerte TRPC1 (TRPC1-VL) ebenfalls mit diesen Kanälen interagieren kann. Hierzu wurden TRPC3, TRPC4, TRPC5 oder TRPV6 zusammen mit TRPC1-VL heterolog in Cos-7 oder HEK-293 Zellen exprimiert. Anschließend wurden zwei Immunpräzipitationen (IPs), mit einem TRPC1-AK und einem AK gegen das co-exprimierte TRP-Protein, durchgeführt. Auf den Western Blots in Abbildung 3.3 sind die Zellysate (links), die entsprechenden IPs (mitte) und die IPs der mit TRPC1 co-exprimierten TRP-Proteine zu sehen (rechts). Da die betreffenden TRP-Proteine auf der rechten Spur in allen Western Blots detektierbar sind, sind die Co-IPs von TRPC3, TRPC4, TRPC5 und TRPV6 mit TRPC1-VL positiv. In Abbildung 3.3 A (unten) wurde eine Sekundärantikörper-Kontrolle mit anti-Kaninchen-AK durchgeführt, da die IP und der Western Blot beide mit AK aus Kaninchen durchgeführt wurde, mangels eines verfügbaren monoklonalen AK gegen TRPC3. In der Kontrolle wurden nur die schweren Ketten der Kaninchen-AK bei 50 kDa detektiert, aber keine Bande auf Höhe des TRPC3-Proteins. Die bekannten Interaktionen von TRPC1-S nach heterologer Expression konnten somit für TRPC1-VL ebenfalls nachgewiesen werden. Nach einer IP von Primärzellen aus Hippocampus und Septum von Maus mit einem TRPC4-AK konnte TRPC1-VL ebenfalls detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Funktionelle Untersuchungen von TRPC1-VL

Es war bislang bekannt, dass die Expression der kurzen Variante des TRPC1-Proteins (TRPC1-S) allein nicht zu messbaren Strömen über die Plasmamembran führt, deshalb war es nicht klar ob TRPC1 überhaupt einen Ionenkanal darstellt. Weiterhin war auch bekannt, dass TRPC1 Heteromultimere mit TRPC4 bilden kann und dabei die Eigenschaften des TRPC4-Stroms verändert (Strübing et al. 2001; Storch, Forst, M. Philipp et al. 2012). TRPC4 wiederum

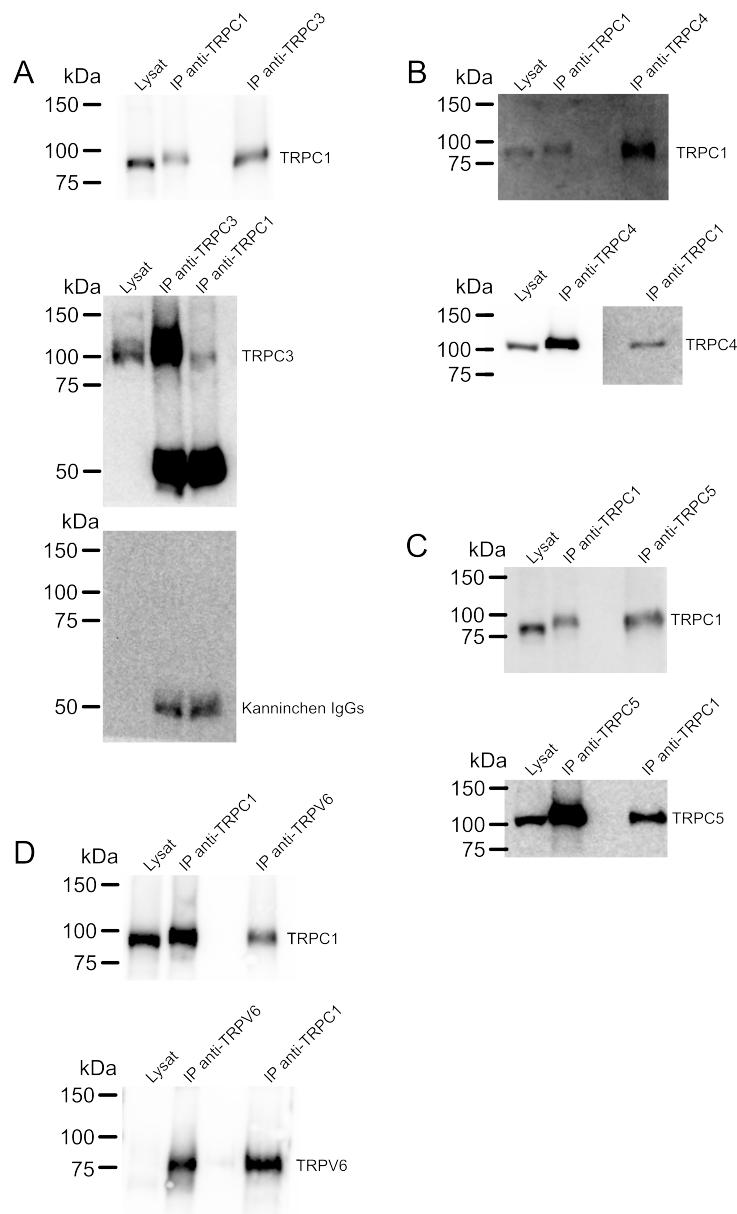


Abbildung 3.3: **TRPC1-VL bildet Multimere mit TRPC3, TRPC4, TRPC5 und TRPV6.** **A**, Co-IP von TRPC1-VL und TRPC3 aus Maus nach heterologer Co-Expression in Cos-7 Zellen. Für die IP wurden AK 1030 (TRPC1) und AK 45/47 (TRPC3) verwendet, detektiert wurde TRPC1 mit dem AK 1F1 und TRPC3 mit dem AK 45/47. Zur Kontrolle wurde der Blot mit dem Sekundärantikörper gegen Kaninchen-IgGs inkubiert (unten). **B**, Co-IP von TRPC1-VL und TRPC4 aus Maus nach heterologer Co-Expression in HEK-293 M₂R Zellen. Für die IP wurden AK 1030 (TRPC1) und AK 869 (TRPC4) verwendet, detektiert wurde TRPC1 mit dem AK 1F1 und TRPC4 mit dem AK PK2D2A2. **C**, Co-IP von TRPC1-VL und TRPC5 aus Maus nach heterologer Co-Expression in Cos-7 Zellen. Für die IP wurden AK 1030 (TRPC1) und AK 777 (TRPC5) verwendet, detektiert wurde TRPC1 mit dem AK 1F1 und TRPC5 mit dem AK 3B3A5. **D**, Co-IP von TRPC1-VL und TRPV6 aus Maus nach heterologer Co-Expression in Cos-7 Zellen. Für die IP wurden AK 1030 (TRPC1) und AK 429 (TRPV6) verwendet, detektiert wurde TRPC1 mit dem AK 1F1 und TRPV6 mit dem AK 429.

wird vollständig aktiviert über die gleichzeitige Stimulation von G_i und G_q -gekoppelten Rezeptoren, beispielsweise den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Typs M_2 (M_2R) und M_3 (M_3R) (Tsvilovskyy et al. 2009; H. Kim et al. 2012). Diese Rezeptoren können beide durch Carbachol aktiviert werden. M_3R nicht aber M_2R werden endogen in HEK-293 Zellen exprimiert (Zhu, Jiang et al. 1998; Atwood et al. 2011). Um die Funktion von TRPC1-VL versus TRPC1-S untersuchen zu können haben wir HEK-293 basierende Zellen verwendet, die stabil TRPC4 als auch den M_2R exprimieren (HEK-293 M_2R TRPC4). Die Stimulation des M_3R führt in HEK-293 Zellen auch zur Aktivierung des sogenannten speichervermittelten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) und kann in Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrations-Änderung (Ca-Imaging) Experimenten den TRPC4-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom maskieren. Aus diesem Grund empfiehlt sich ein Protokoll, das zunächst den SOCE aktiviert. Dies kann mittels Speicherentleerung durch den SERCA-Hemmer Thapsigargin (TG), sowie durch anschließende Ca^{2+} -Zugabe erfolgen. Daraufhin inaktiviert der SOCE durch die erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration. Durch Zugabe von Carbachol (CCh), einem Analogon von Acetylcholin, kann man dann den isolierten TRPC4-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom beobachten. Der Einfluss von TRPC1 auf den TRPC4-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom wurde mittels Ca-Imaging untersucht. Hierzu wurden HEK-293 M_2R TRPC4 Zellen mit der cDNA des leeren Vektors, TRPC1-VL oder TRPC1-S transfiziert. Die Messungen wurden in Ca-Imaging-Puffer ohne zugesetztes Ca^{2+} begonnen. Es folgte eine Applikation von TG und eine Ca^{2+} -Addition (Abbildung 3.4 **A** Peak 1 und 2). Nach Applikation von CCh konnte ein TRPC4-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom in Vektor transfizierten HEK-293 M_2R TRPC4 Zellen beobachtet werden. Wurden jedoch die TRPC1-Varianten (TRPC1-VL oder TRPC1-S) zusätzlich exprimiert, war dieser Ca^{2+} -Einstrom nicht mehr zu beobachten (Abbildung 3.4 **A**, Peak 3). Es kam zu einem abrupten Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wenn CCh appliziert wurde. In Abbildung 3.4 **B** sind die Flächen unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) für die drei Peaks dargestellt. Da bei Anwesenheit von TRPC1 kein TRPC4-vermittelter Ca-Einstrom mehr vorliegt, ist die AUC entsprechend kleiner. Nach statistischer Überprüfung mit Hilfe eines *t*-Tests sind die AUCs der TRPC1 transfizierten Zellen von Peak 3 signifikant kleiner als in Vektor transfizierten Kontrollzellen. Zwischen TRPC1-S

und TRPC1-VL konnte kein Unterschied festgestellt werden. In der Hoffnung, dass TRPC1-VL im Gegensatz zu TRPC1-S einen funktionsfähigen homomeren TRP-Kanal bilden kann, wurden die TRPC1-Varianten in HEK-293 M₂R Zellen überexprimiert. Hierbei zeigte keine der Varianten einen durch CCh induzierbaren Ca²⁺-Einstrom (Abbildung 3.4 **C**) auch konnte CCh in TRPC1-VL exprimierenden Zellen keinen mittels *Whole Cell Patch Clamp* messbaren Strom induzieren (Abbildung 3.4 **D**).

Ebenfalls wurden TRPC4/TRPC1 co-exprimierende Zellen mittels *Whole Cell Patch Clamp* analysiert. Mit dieser Methode kann ein CCh-induzierter Strom gemessen werden, der in den verwendeten Lösungen hauptsächlich durch Na⁺ getragen wird und mittels Ca-Imaging nicht detektiert werden kann (Abbildung 3.4 **E**). In Vektor transfizierten HEK-293 M₂R TRPC4 Zellen aktiviert CCh einen typischen TRPC4-Strom. In Abbildung 3.4 **E** ist links der Strom über die Zeit dargestellt und rechts die Strom-Spannungskennlinie (IV-Kurve) CCh-aktivierten Stroms. Wenn TRPC1-Varianten in den Zellen co-exprimiert wurden, änderten sich die Eigenschaften des Stroms. In Gegenwart von TRPC1-VL waren die Einwärtsströme bei -80 mV reduziert von $-14,84 \pm 4,3$ pA/pF auf $-2,14 \pm 0,6$ pA/pF. In TRPC4 und TRPC1-S co-exprimierenden Zellen betrugen die Einwärtsströme nur noch $-1,39 \pm 0,3$. Auch war der spannungsabhängige Magnesiumionen (Mg²⁺)-Block bei positiven Potentialen, welcher typisch für TRPC4 und TRPC5 Ströme ist (Schaefer et al. 2000), in der IV-Kurve von TRPC1 co-exprimierenden Zellen nicht mehr sichtbar (Abbildung 3.4 **E** rechts). Es konnten jedoch keinerlei Unterschiede festgestellt werden ob TRPC4 mit TRPC1-VL oder TRPC1-S co-exprimiert wurde. In 3.4 **F** ist ein Schema der Spannungsrampe gezeigt, welche bei den Messungen alle 2 s angelegt wurde. In 3.4 **G** sind die Amplituden des CCh-aktivierten Stroms bei ± 80 mV dargestellt. Zwischen Vektor transfizierten Zellen und TRPC1-VL transfizierten HEK-293 M₂R TRPC4 Zellen ist bei -80 mV ein signifikanter Unterschied erkennbar. Bei TRPC1-S transfizierten Zellen war ein statistischer Test aufgrund der zu niedrigen Stichprobenzahl nicht durchführbar. Die Tendenz ist jedoch vergleichbar mit TRPC1-VL transfizierten Zellen.

Wie in Abbildung 3.4 **A** zu erkennen ist, führt die Applikation von CCh auf TRPC4/TRPC1-VL oder -S exprimierenden HEK-293 M₂R Zellen nicht nur

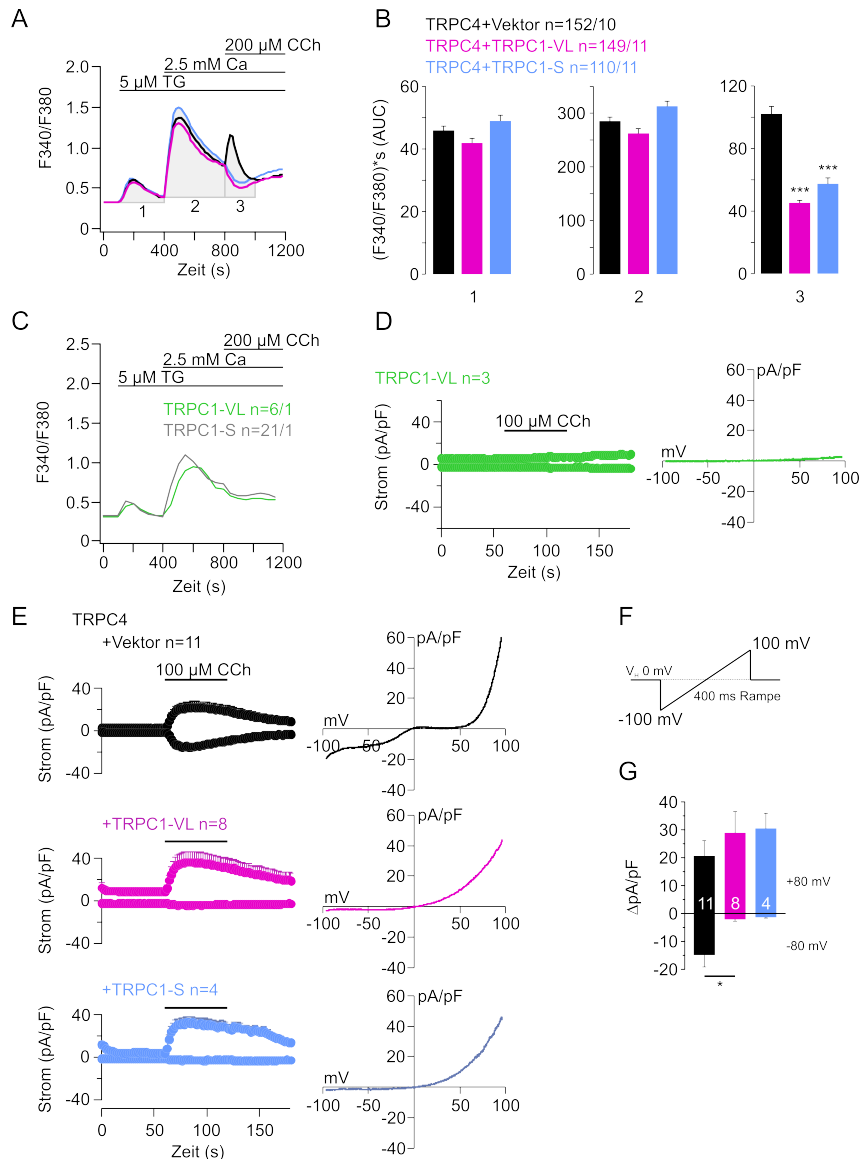


Abbildung 3.4: **TRPC1 hemmt den TRPC4-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom.** **A**, Ca-Imaging von HEK-293 M₂R TRPC4 Zellen, die mit Vektor (schwarz), TRPC1-VL (magenta) oder TRPC1-S (blau) transfiziert worden waren. Nach TG-Applikation ist die Speicherentleerung (Peak 1) zu beobachten, anschließend wird durch die Ca^{2+} -Zugabe der SOCE (Peak 2) sichtbar, darauf folgt der Carbachol (CCh)-induzierte Ca^{2+} -Einstrom durch TRPC4 (Peak 3). Die Flächen zur Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC) sind in grau eingezeichnet (n=Zellen/Experimente). **B**, AUC der drei Ca^{2+} -Peaks aus A; Ergebnisse des *t*-tests gegen Vektorkontrolle sind eingezeichnet. **C**, Ca-Imaging von HEK-293 M₂R Zellen, die transient mit TRPC1-VL (grün) oder -S (grau) transfiziert wurden und nach dem gleichen Protokoll wie die Zellen in A gemessen wurden. **D**, Ein- und Auswärtsströme TRPC1-VL exprimierender HEK-293 M₂R Zellen vor und nach Carbachol (CCh) Stimulation (± 80 mV, links), sowie IV-Kurve des CCh-induzierten Stroms (rechts). **E**, Ein- und Auswärtsströme von HEK-293 M₂R TRPC4 Zellen, die mit Vektor (schwarz), TRPC1-VL (magenta) oder TRPC1-S (blau) transfiziert worden waren (± 80 mV, links), sowie IV-Kurve des CCh-induzierten Stroms (rechts). **F**, Schematische Darstellung der Spannungsrampe des *Whole Cell Patch Clamp*-Protokolls, welches alle 2 s wiederholt wurde. **G**, Stromamplituden des CCh-induzierten Stroms bei ± 80 mV; Ergebnisse des *t*-tests sind eingezeichnet.

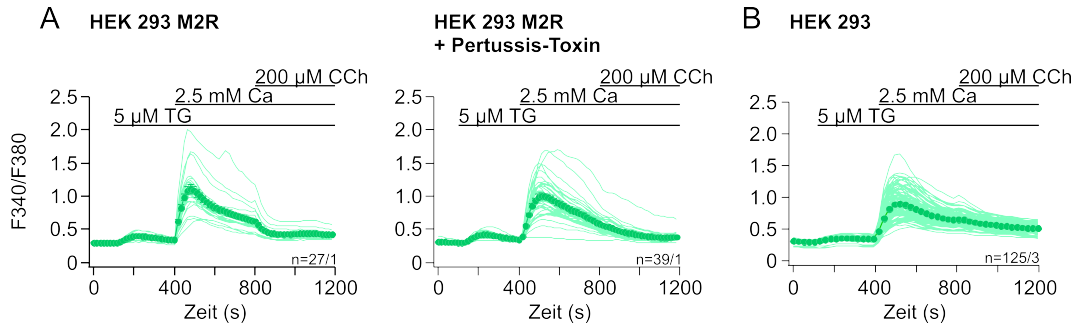


Abbildung 3.5: **Aktivierung von G_i -gekoppelten Rezeptoren führt zu einer Inhibition des speichervermittelten Ca^{2+} -Einstroms.** **A, B,** Ca-Imaging Experimente in untransfizierten HEK-293 Zelllinien nach Applikation von TG, Ca^{2+} und CCh (n =Zellen/Experimente). **A,** Das Protokoll wurde in HEK-293 M₂R Zellen (links) und in HEK-293 M₂R Zellen, die zuvor 24 h mit 200 ng/ml Pertussistoxin behandelt wurden (rechts), gemessen. **B,** Gleiches Protokoll wie in A mit HEK-293 Zellen, die keinen G_i -Protein gekoppelten M₂R exprimieren.

zu einer Hemmung des TRPC4-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms, sondern auch zu einer beschleunigten Inaktivierung des SOCE. Der M₂R aktiviert eine Signalkaskade an deren Anfang ein GDP/GTP-Austausch am heterotrimeren G_i -Protein steht und der gefolgt ist von einer Dissoziation der G-Protein Untereinheiten in $G_{\alpha i}$ und $G_{\beta\gamma}$, die dann die G_i -Kaskade aktivieren. Pertussis-Toxin hemmt die Interaktion der $G_{i,o}$ -Proteine mit dem Rezeptor und lässt somit Rückschlüsse auf involvierte G-Protein-gekoppelte Signalkaskaden zu (Wettchur und Offermanns 2005). In nicht-transfizierten HEK-293 M₂R Zellen löst eine CCh-Stimulation nach Speicherentleerung und anschließendem SOCE ebenso einen abrupten Abfall der Ca^{2+} -Konzentration aus. Durch 24-stündige Vorbehandlung mit Pertussis-Toxin kann dieses Phänomen aufgehoben werden (Abbildung 3.5 A). In HEK-293 Zellen, die keinen G_i -Protein-gekoppelten Rezeptor exprimieren, sondern nur den endogenen G_q -gekoppelten M₃R exprimieren, löst CCh keinen Abfall der Ca^{2+} -Konzentration aus (Abbildung 3.5 B). Offensichtlich scheint der durch CCh induzierte abrupte Abfall der Ca^{2+} -Konzentration durch die Aktivierung der G_i -Kaskade durch den M₂R zu erfolgen.

3.1.4 Subzelluläre Lokalisation von TRPC1-VL

Es war bereits bekannt, dass TRPC1-S nach Überexpression kaum oder nur in geringem Maße in die Plasmamembran von HEK-293 Zellen gelangt. Meh-

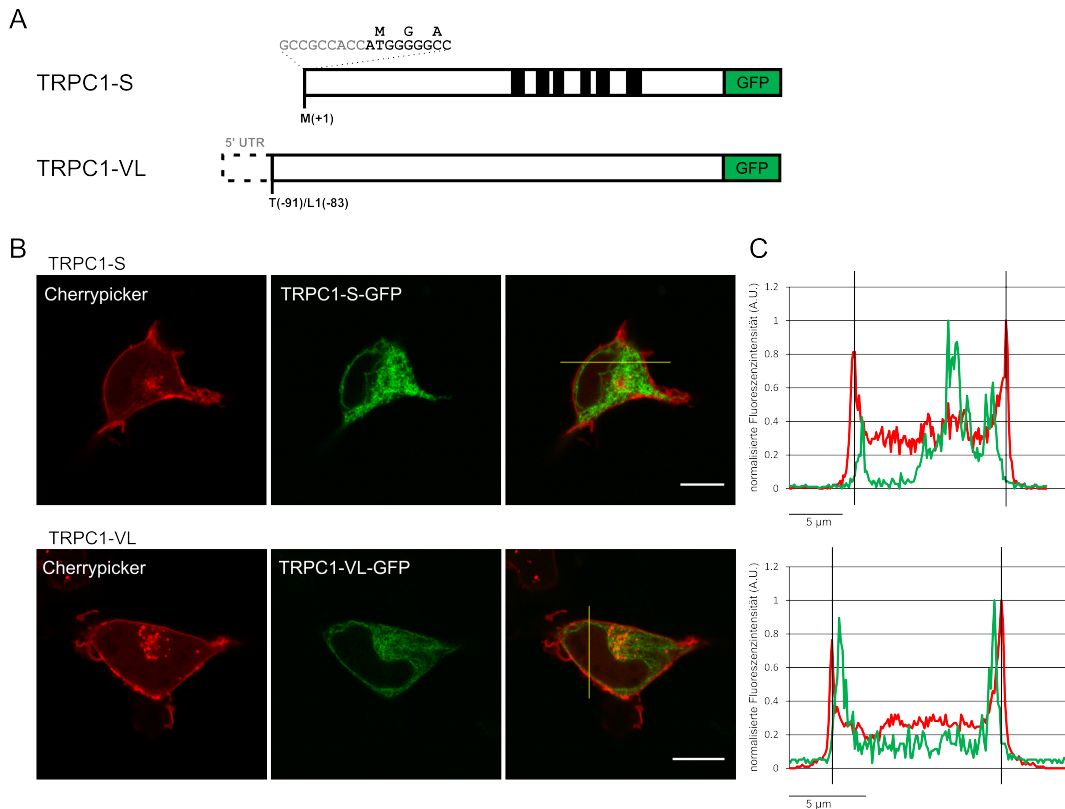


Abbildung 3.6: **TRPC1-VL als auch TRPC1-S sind nicht in der Plasmamembran nachweisbar.** **A**, Schematische Darstellung der TRPC1-GFP-Fusionskonstrukte. TRPC1-S beginnt, durch eine Kozak-Sequenz vor dem ersten ATG-Triplett, mit dem ersten Methionin (M) und TRPC1-VL enthält stattdessen die gesamte 5' UTR und ermöglicht die Translation des verlängerten N-Terminus. **B**, Co-Transfektion von TRPC1-S bzw. -VL mit Cherrypicker in HEK-293 Zellen. Gezeigt sind jeweils rote (links), grüne (Mitte) und überlagerte Fluoreszenz (rechts); Maßstab 10 μm . **C**, Profil-Plot der normalisierten Fluoreszenzintensitäten von grüner und roter Fluoreszenz entlang der gelben Linie aus den überlagerten Aufnahmen.

rere Arbeiten haben aber gezeigt, dass die Co-Expression von TRPC1-S mit anderen TRP-Kanälen wie beispielsweise TRPC4, TRPC5 oder TRPV4 dazu führt, dass TRPC1-S vermehrt in die Plasmamembran gelangt (T. Hofmann, Schaefer et al. 2002; Alfonso et al. 2008; Ma et al. 2010). Um der Frage nach zu gehen, ob der verlängerte N-Terminus die Lokalisation von TRPC1 beeinflusst, wurden konfokale Bilder aufgenommen. Hierfür wurden TRPC1-VL oder TRPC1-S an eGFP fusioniert und in HEK-293 Zellen exprimiert (Abbildung 3.6 **A**). Als Kontrolle wurde ein rot fluoreszierender Plasmamembranmarker, Cherrypicker, co-transfiziert.

Die Konfokalaufnahmen in Abbildung 3.6 **B** zeigen HEK-293 Zellen nach Co-Transfektion mit GFP-markiertem TRPC1-S bzw. TRPC1-VL und Cher-

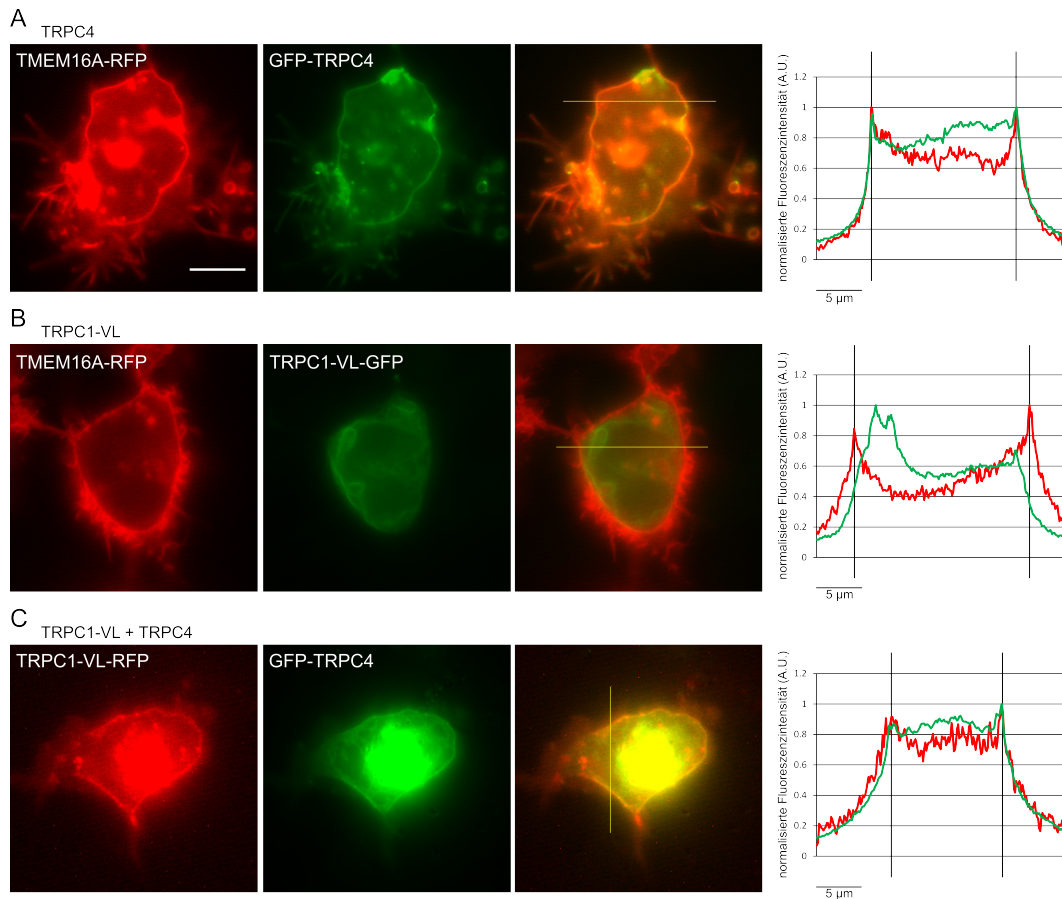


Abbildung 3.7: **TRPC1-VL ist nach Co-Expression mit TRPC4 in der Plasmamembran nachweisbar.** Fluoreszenzaufnahmen von Cos-7 Zellen, die co-transfiziert wurden mit einem Membranmarker TMEM16a-mRFP und eGFP-TRPC4 (**A**), mit TMEM16a-mRFP und TRPC1-VL-eGFP (**B**) und TRPC1-VL-mRFP und eGFP-TRPC4 (**C**). Maßstab 10 μm ; Rechts sind die jeweiligen Profil-Plots gezeigt.

rypicker. Es wurde ein Fluoreszenzintensitäts-Profil entlang der gelben Linie im überlagerten Bild gemacht (Abbildung 3.6 **C**). Die roten und grünen Fluoreszenzen wurden jeweils auf die Maximalintensität normalisiert und gegen die Länge des Querschnitts aufgetragen. Wie zu erkennen ist überlappen die Maxima der grünen und roten Fluoreszenzen in beiden Fällen nicht, d. h. TRPC1-S als auch TRPC1-VL sind nicht in der Plasmamembran detektierbar.

Für weitere Lokalisationsexperimente wurden Cos-7 Zellen verwendet. Hierbei wurde ein Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanal, TMEM16a (Anoctamin-1), C-terminal an mRFP fusioniert und als Plasmamembranmarker mit den eGFP-markierten TRP-Konstrukten co-transfiziert. TRPC4, welches N-terminal an eGFP fusioniert war, co-lokalisiert wie erwartet mit TMEM16a, und kann somit in

der Plasmamembran nachgewiesen werden (Abbildung 3.7 **A**). Dagegen ist TRPC1-VL auch in den Cos-7 Zellen nicht in der Plasmamembran nachweisbar (Abbildung 3.7 **B**). TRPC1-VL ist in der Plasmamembran von Cos-7 Zellen nachweisbar wenn diese auch mit TRPC4 transfiziert worden waren (Abbildung 3.7 **C**). Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen, dass TRPC1-VL nur dann in die Plasmamembran gelangt wenn TRPC4 ebenfalls vorhanden ist.

3.1.5 Funktion von TRPC1-VL *in vivo*

Da eine Funktion von TRPC1-VL bisher nur in Co-Expression mit TRPC4 messbar ist, wurde als nächstes ein Gewebe untersucht, welches TRPC1-VL und TRPC4 exprimiert. Glatte Muskelzellen des Ileums exprimieren TRPC1-VL, welches in TRPC1-defizienten Mäusen abwesend ist (Abbildung 3.8 **A**). Dagegen ist TRPC1-VL in Zellen von TRPC4-defizienten Mäusen weiterhin detektierbar. Auch sind in Wildtyp (WT) Ileum-Myozyten beide TRPC4-Isoformen, TRPC4 α und eine kürzere Variante, TRPC4 β , exprimiert. Beide Spleißvarianten sind im Ileum von TRPC4-defizienten Mäusen nicht mehr nachweisbar. Der Kationenstrom, der durch muskarinerge Stimulation in den Ileum-Myozyten aktiviert wird (mI_{CAT}) wurde mittels *Whole Cell Patch Clamp* gemessen. Hierbei war zu beobachten, dass der Einwärtsstrom in TRPC1-defizienten Ileum-Myozyten doppelt so groß ist wie in WT Zellen. Auch zeigt die IV-Kurve einen ausgeprägteren Mg^{2+} -Block (Schaefer et al. 2000), wenn TRPC1 nicht vorliegt (Abbildung 3.8 **B**, **C**). Das Ergebnis des vergrößerten mI_{CAT} in TRPC1-defizienten Myozyten im Vergleich zum WT reflektiert die Ergebnisse der Experimente von TRPC4 bzw. TRPC4/TRPC1 nach heterologer Expression in HEK-293 M2R Zellen (Abbildung 3.4 **E**). Die Anwesenheit von TRPC1 moduliert vor allem den Ca^{2+} -Einstrom des TRPC4-Kanals. Beim Vergleich der IV-Kurven von TRPC4 exprimierenden HEK-293 M₂R Zellen mit den TRPC1-defizienten Ileum-Myozyten sind unterschiedliche Verläufe, vor allem bei negativen Potentialen, zu erkennen (vergleiche Abbildung 3.4 **E** oben rechts mit 3.8 **B**). Dies ist dadurch zu erklären, dass in den Experimenten mit Ileum-Myozyten eine inverse Rampe (von +80 nach -120 mV) angelegt wurde. In einem weiteren Versuch wurden Zellen verwendet, die sowohl einen G_i-gekoppelten Opioidrezeptor als auch TRPC4 stabil exprimieren (HEK-293 μ -OR TRPC4). Diese Zellen wurden mit CCh und einem μ -OR Agonisten,

[D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-Enkephalin (DAMGO), stimuliert und das gleiche in Abbildung 3.8 **D** dargestellte Rampenprotokoll wurde angewendet. Wie in Abbildung 3.8 **E** zu sehen ist, ähnelt die IV-Kurve der HEK-293 μ -OR TRPC4 Zellen der Form der IV-Kurve, wie sie in Ileum-Myozyten beobachtet wurde. Dies spricht dafür, dass zuvor beobachtete Unterschiede der IV-Kurven das Resultat der verschiedenen Rampenprotokolle ist. Die Experimente belegen, dass die Modulation der TRPC4-Ströme durch TRPC1 auch *in vivo* zu beobachten ist.

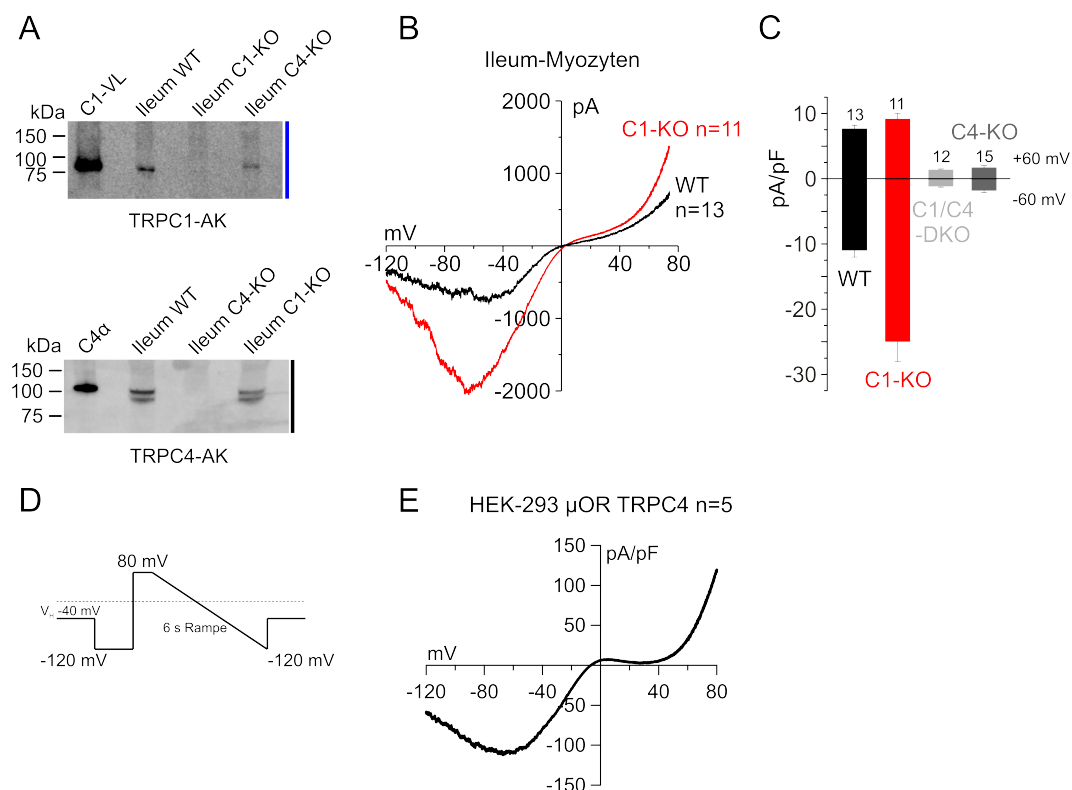


Abbildung 3.8: Physiologische Rolle von endogen exprimiertem TRPC1 und TRPC4 in glatten Muskelzellen des Ileums. **A**, Western Blots von Lysaten von TRPC1-VL (C1-VL) oder TRPC4 α (C4 α) exprimierenden Cos-7 Zellen sowie von Ileum-Myozyten, die von WT, TRPC1- (C1-KO) als auch TRPC4-defizienten (C4-KO) Mäusen isoliert wurden. Die Blots wurden mit TRPC1-AK 1F1 (oben) und mit TRPC4-AK PK2D2A2 (unten) inkubiert. **B**, IV-Kurven des CCh-aktivierten Stroms in Ileum-Myozyten von WT (schwarz) und C1-KO Mäusen (rot). **C**, Stromamplituden bei ± 60 mV in WT-, C1-KO-, C4-KO- und C1/C4 Doppel-KO Zellen des Ileums. **D**, Rampenprotokoll welches für die Messungen in B und E alle 30 s durchlaufen wurde. **E**, IV-Kurve von HEK-293 μ -OR TRPC4 Zellen nach Stimulation mit CCh und dem μ -OR-Agonisten [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-Enkephalin (DAMGO). Für die Messung wurde, analog zu den Ileum-Messungen, ein inverses Rampenprotokoll (D) verwendet.

3.2 Teil 2: Einfluss von Punktmutationen auf die TRP-Kanalfunktion

3.2.1 TRPC1

In einigen TRP-Kanälen können Mutationen in TRP-spezifischen Aminosäure-Motiven, die über mehrere TRP-Familien konserviert sind, zu ähnlichen Effekten führen. Beispielsweise ist die Verbindung zwischen der TM-Domäne S4 und S5 (S4-S5 Linker) zu nennen. Hier sind eine Reihe von Mutationen beschrieben worden, die eine konstitutive Öffnung des betreffenden Kanals zur Folge haben und mit Krankheiten assoziiert sind (L. Hofmann, Wang, Zheng et al. 2017). Eine Mutation der Aminosäure Glycin (G) zu Serin (S) an Position 573 innerhalb des TRPV3-Proteins führt zu einer konstitutiven Aktivität des Kanals. In Mäusen führt diese Mutation zu Alopezie (Asakawa et al. 2006; Xiao et al. 2008). Das G ist in vielen TRP-Proteinen konserviert (Abbildung 3.9). Wie von unserer Arbeitsgruppe gezeigt worden ist, führt der Austausch des konservierten Glycins zu Serin (S) oder Cystein (C) auch in TRPC4 und TRPC5 zu konstitutiv aktiven Kanälen (Beck et al. 2013). Nun galt es herauszufinden, ob diese Ergebnisse auch auf TRPC1-VL übertragbar sind. In vorhergegangenen Experimenten wurde die Mutation in die Sequenz von TRPC1-S eingefügt und mittels *Whole Cell Patch Clamp* untersucht (Daten nicht gezeigt). Die Mutation hatte keinen Effekt auf die TRPC1-Aktivität. Die G540S-Mutation in TRPC1-VL wurde mittels Ca-Imaging untersucht (Abbildung 3.10 B). Die Zellen zeigten ein vergleichbares Ca^{2+} -Profil wie Kontrollzellen oder TRPC1-VL exprimierenden Zellen. Im Gegensatz zu TRPC4 oder TRPC5 führt die Substitution des G450S in TRPC1-VL nicht zu einer konstitutiv offenen Kanalkonformation.

Es sind noch weitere Aminosäuren in TRP-Proteinen bekannt deren Austausch gegen eine andere Aminosäure zu konstitutiver Kanalaktivität, vermehrter Plasmamembran-Lokalisation oder zu einem vollständigen Verlust der Kanalaktivität führen können (persönliche Mitteilung von Prof. Veit Flockerzi, Dr. Wang Zheng). Beispielsweise im TRPP3-Protein wurde gezeigt, dass ein Austausch eines konservierten Tryptophans (W) innerhalb des Bereichs, der N-terminal vor der ersten TM-Domäne gelegen ist (prä S1-Helix), zur Hem-

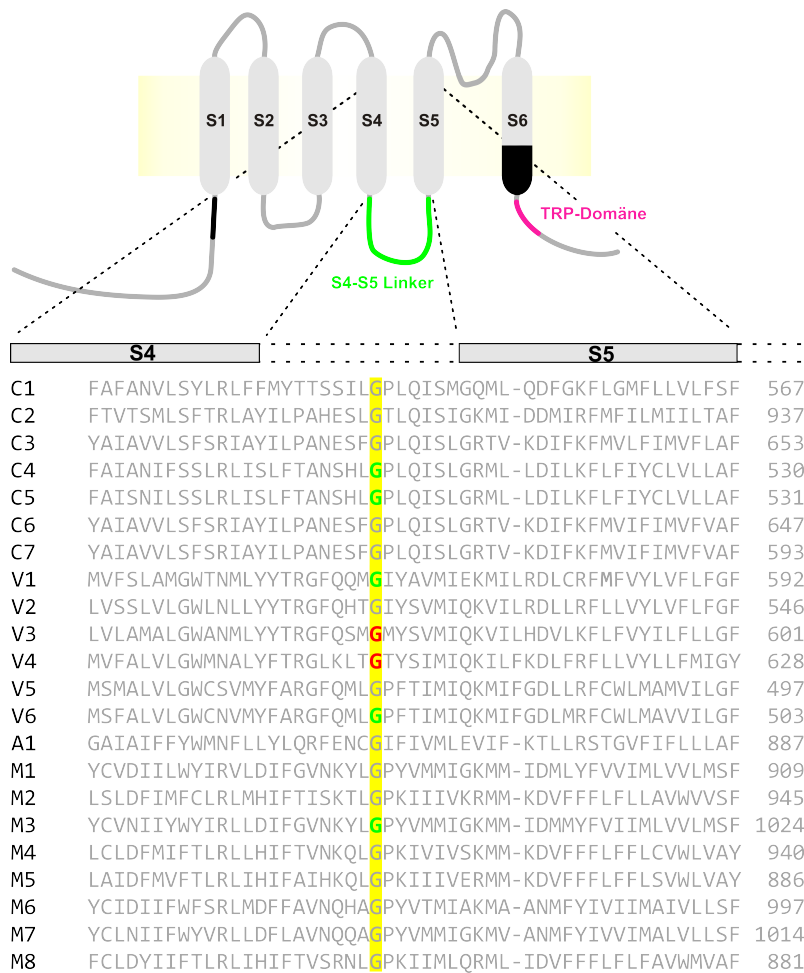


Abbildung 3.9: **Alignment des S4-S5 Linkers von murinen TRP-Proteinen.** Ein Glycin (G) ist in allen gezeigten TRP-Proteinen konserviert (gelb). Eine Mutation des G in TRPV3 wurde mit dem Olmsted-Syndrom und in TRPV4 mit Spondylometaphysärer Dysplasie vom Typ Koslowski assoziiert (rot). Mutationen in TRPC4, TRPC5, TRPV1, TRPV6 und TRPM3 führen zu konstitutiv aktiven Kanälen (grün). Modifiziert nach (L. Hofmann, Wang, Zheng et al. 2017).

mung der Kanalaktivität führt (Zheng et al. 2017, eingereichtes Manuskript). Durch die Mutation kann eine π -Kationen-Bindung des Tryptophan (W) mit einem Lysin (K) der TRP-Domäne nicht mehr ausgebildet werden, welche essentiell für die Kanalfunktion ist. Ebenso kann ein Austausch des K in der TRP-Domäne zu Alanin (A) im TRPP3 ebenfalls die Kanalaktivität hemmen. Weitere Mutationen, beispielsweise im Bereich der sechsten TM-Domäne (S6) können zu einer erhöhten basalen Leitfähigkeit des betreffenden TRP-Kanals führen (Zheng, Hu et al. 2017). Um den Effekt von Mutationen auf TRPC1 zu untersuchen wurden die im Schema in Abbildung 3.10 A eingezeichneten Mutationen in die TRPC1-VL-Sequenz der Maus eingebracht.

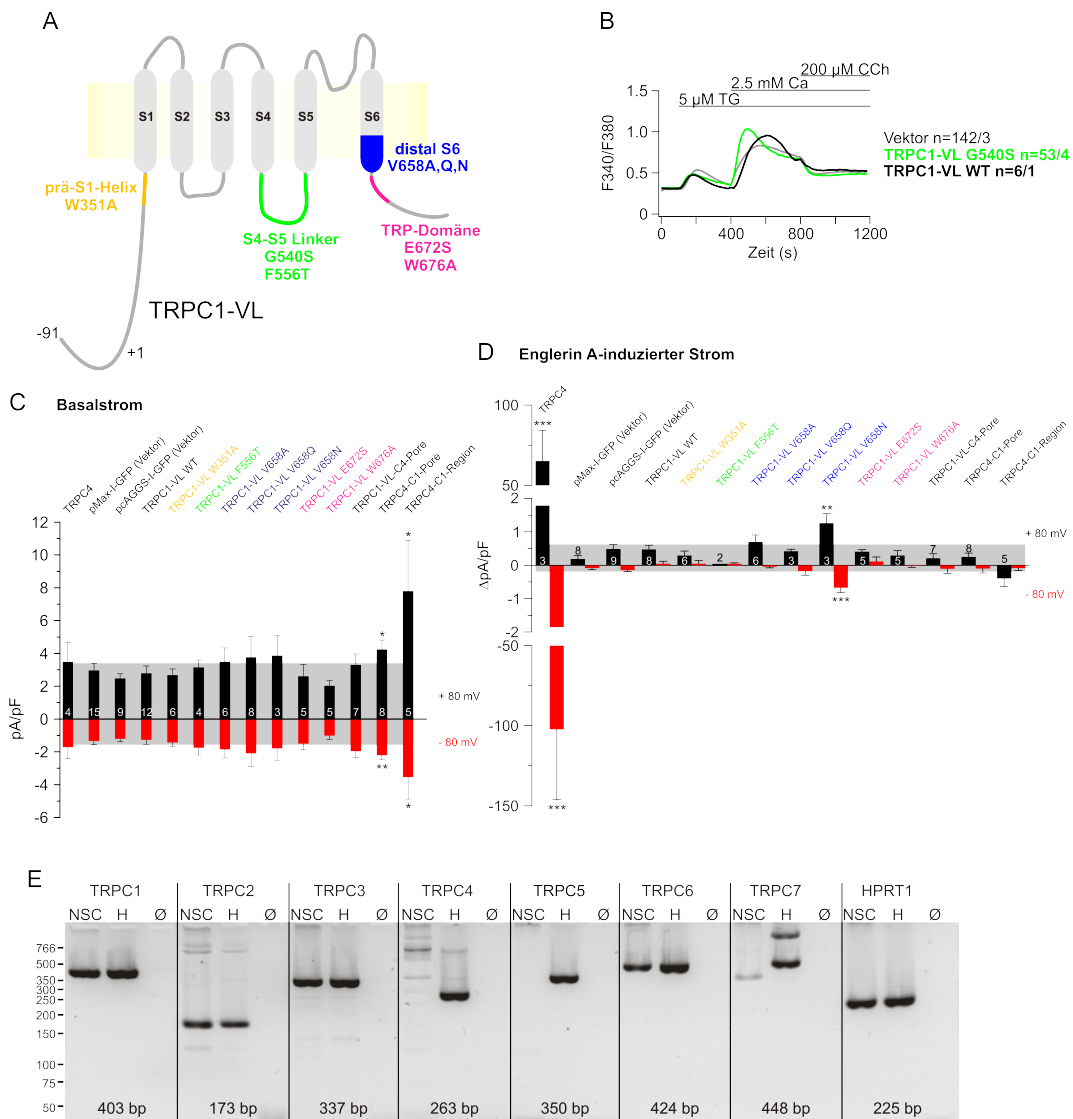


Abbildung 3.10: **Charakterisierung verschiedener TRPC1-VL-Mutanten.** **A**, Schematische Darstellung des TRPC1-VL-Proteins der Maus, in welches verschiedene Mutationen eingebracht wurden. **B**, Ca-Imaging Experimente von HEK-293 M₂R Zellen die mit Vektorkontrolle (grau), TRPC1-VL (schwarz) oder TRPC1-VL G540S (grün) transfiziert worden waren; n=Zellen/Experimente. **C**, **D**, *Whole Cell Patch Clamp* Experimente in transfizierten NSC-34 Zellen. Stromamplituden bei ± 80 mV (rot bzw. schwarz) des Basalstroms (**C**) sowie des Stroms, der sich nach Applikation von 1 μ M EA entwickelt (**D**). Für Experimente in TRPC4 exprimierenden Zellen wurde eine EA Konzentration von 10 nM verwendet. Die Ergebnisse der *t*-tests zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede gegenüber Vektor sind eingezeichnet. **E**, RT-PCR von NSC-34 Zellen (NSC) bzw. Hirn von Maus (H); Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) dient als Positivkontrolle.

Die TRPC1-VL-Mutanten wurden in einer neuronalen Zelllinie, NSC-34, gemessen, die auch endogen TRPC1 bildet. Dies hat den Vorteil, dass endogene Faktoren, die zur Plasmamembran-Lokalisierung oder TRPC1-Aktivierung benötigt werden, vorhanden sein könnten. In NSC-34 Zellen wurde ein potenter Agonist Englerin A (EA) verwendet, dieser ist in der Lage in nanomolarer Konzentration TRPC4- als auch TRPC5-Kanäle zu aktivieren (Akbulut et al. 2015). Da TRPC1 ca. 33,7 % identische Aminosäuren mit TRPC4 aufweist, wurde ausprobiert ob EA auch TRPC1 aktivieren kann. In diesem Fall wurde eine Applikation von einer relativ hohen Konzentration EA ($1 \mu\text{M}$) gewählt. In TRPC4 exprimierenden NSC-34 Zellen reichte die Applikation von 10 nM EA aus um einen TRPC4-Strom von $-102,4 \pm 43,8 \text{ pA/pF}$ bei -80 mV zu induzieren und diente hierbei als Positivkontrolle. In Abbildung 3.10 **C**, **D** sind die gemessenen Ströme zusammengefasst, wobei in **C** die Basalströme und in **D** die EA-induzierten Ströme bei $\pm 80 \text{ mV}$ (mit *SEM*) dargestellt sind (schwarz bzw. rot). Die TRPC1-VL-Mutanten wurden je nach der Region in welcher die Mutation war, nach dem Farbschema in **A** gekennzeichnet. Wie in den Abbildungen zu sehen ist, kann in den Mutanten im Vergleich zu nicht modifiziertem TRPC1-VL oder Leervektor transfizierten Zellen kein erhöhter Basalstrom gemessen werden. Auch nach Applikation von EA konnte in den TRPC1-VL-Mutanten kein zusätzlicher Strom induziert werden. Lediglich in der V658N-Mutante scheint EA einen minimalen Effekt zu haben, das Ergebnis ist jedoch aufgrund der zu niedrigen Stichprobenzahl nicht repräsentativ. Die Aminosäure V658 entspricht der Aminosäure I679 in der TRPV1-Sequenz der Ratte, die im Bereich des so genannten *lower gate* innerhalb der TRPV1-Pore liegt (M. Liao et al. 2013). Teilweise führte die Applikation von EA zu einer Abnahme des Basalstroms, was durch eine negative bzw. positive Stromamplitude bei $+80$ bzw. -80 mV gekennzeichnet ist (Abbildung 3.10 **D**). Eine von Stefanie Buchholz durchgeführte Transkript Analyse von NSC-34 Zellen zeigt, dass TRPC1-, C2-, C3- und C6-Transkripte endogen in NSC-34 Zellen vorhanden sind, nicht aber Transkripte von TRPC4 oder C5 (Abbildung 3.10 **E**). Die Ergebnisse zeigen, dass keine der getesteten Mutationen zu konstitutiv aktiven TRPC1-Kanälen führt. Durch die Applikation von EA lassen sich ebenfalls keine Ströme induzieren.

Wie bereits gezeigt wurde, lässt sich weder das TRPC1-S- noch das TRPC1-

VL-Konstrukt nach Überexpression in der Plasmamembran von HEK-293 oder Cos-7 Zellen nachweisen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass TRPC1 in Gegenwart von TRPC4 in der Plasmamembran nachweisbar ist und auch TRPC4-Ströme moduliert. Dies wirft die Frage auf ob TRPC1 bzw. die TRPC1-Pore alleine überhaupt eine eigene Leitfähigkeit besitzt oder nur eine akzessorische Untereinheit eines Kanalkomplexes darstellt. Um diese Frage zu klären wurde

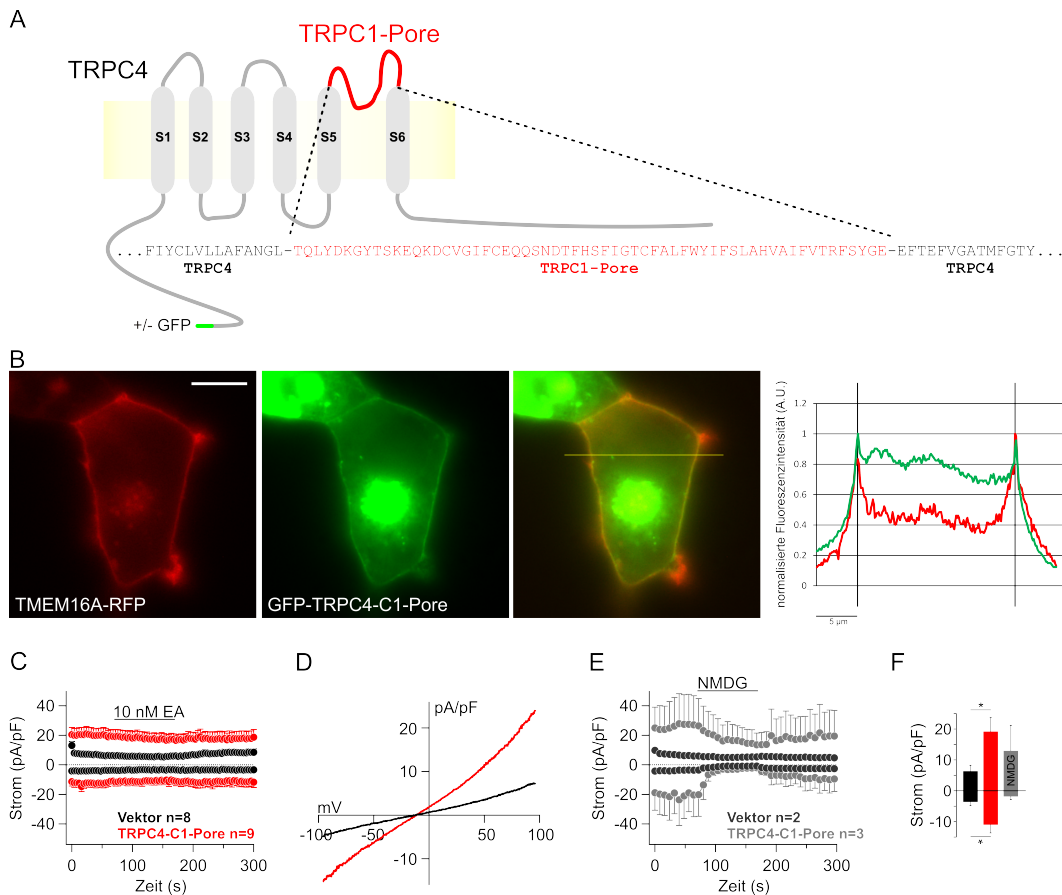


Abbildung 3.11: Die TRPC1-Pore weist eine Leitfähigkeit für Kationen auf.

A, Ein chimäres Konstrukt bestehend aus TRPC4 und der Pore von TRPC1 wurde kloniert. **B**, Co-Expression von TMEM16a-mRFP (links) mit eGFP-TRPC4-C1-Pore (Mitte) in Cos-7 Zellen sowie überlagertes Bild und Profil-Plot (rechts). Maßstab 10 μm . **C**, *Whole Cell Patch Clamp* Experimente in transfizierten HEK-293 M₂R Zellen. Das chimäre Konstrukt (rot) induziert einen gegenüber Vektor (schwarz) erhöhten Basalstrom, dieser wird jedoch durch Englerin A (EA) nicht beeinflusst. Gezeigt ist der Strom bei ± 80 mV. **D**, IV-Kurven vor EA-Applikation. **E**, Ein- und Auswärtsströme von HEK-293 M₂R Zellen, die mit TRPC4-C1-Porenkonstrukt (rot) oder Vektor (schwarz) transfiziert wurden. Appliziert wurde NMDG-Badlösung, in welcher Na^+ durch NMDG ersetzt worden war. **F** Stromamplituden bei ± 80 mV in Vektor transfizierten Kontrollzellen (schwarz) und mit TRPC4-C1-Porenkonstrukt transfizierten Zellen (rot) vor Applikation von EA sowie nach NMDG-Applikation in TRPC4-C1-Porenkonstrukt transfizierten Zellen (grau).

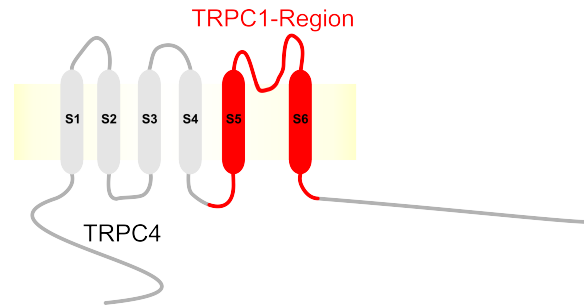


Abbildung 3.12: **Schematische Darstellung des chimären Konstrukts TRPC4-C1-Region.** Die in TRPC4 eingebrachte Sequenz von TRPC1 reicht von L539 bis L694 und umfasst S4-S5 Linker, TM-Domäne S5, Pore, TM-Domäne S6 sowie die TRP-Domäne.

der Bereich der Porenregion des TRPC4, zwischen der fünften und sechsten TM-Domäne, gegen die Sequenz des TRPC1 ausgetauscht (Abbildung 3.11 **A**). Zunächst wurde getestet ob das Konstrukt TRPC4-C1-Pore nach Überexpression in der Plasmamembran von Cos-7 Zellen nachweisbar ist, was der Fall war (Abbildung 3.11 **B**). Funktionelle Daten zeigen, dass das TRPC4-C1-Porenkonstrukt nach Expression sowohl in NSC-34 Zellen (Abbildung 3.10 **C**, **D**) als auch in HEK-293 M₂R Zellen einen konstitutiv erhöhten Basalstrom zeigen, dieser aber nicht durch EA beeinflusst wird (Abbildung 3.11 **C**, **D**). Der durch TRPC4-C1-Pore erhöhte Basalstrom wird hauptsächlich durch das Kation Na⁺ getragen, da ein Austausch von Na⁺ gegen das impermeable Ion N-Methyl-D-glucamin (NMDG) zu einem Rückgang des erhöhten Basalstroms auf die Größe von Kontrollzellen führt (Abbildung 3.11 **E**). Ein weiteres chimäres Konstrukt aus TRPC4, welches eine TRPC1-Sequenz vom S4-S5 Linker bis zur TRP-Domäne enthält, TRPC4-C1-Region, wurde ebenfalls in NSC-34 Zellen untersucht. Hier konnte ebenfalls ein basal erhöhter Kationenstrom gemessen werden, der - wie im Falle des TRPC4-C1-Porenkonstrukts - nicht sensitiv gegenüber EA war (Abbildung 3.12 und 3.10 **C** TRPC4-C1-Region).

Insgesamt wurde durch die Messungen gezeigt, dass die meisten Mutationen, die in TRPC1 getestet wurden, nicht dazu führen, dass TRPC1 konstitutiv aktiv wird oder einen durch EA induzierbaren Strom aufweist. Tatsächlich weist die Pore aber eine Leitfähigkeit auf, die man jedoch nur im chimären Konstrukt, TRPC4-C1-Pore, zeigen kann weil das chimäre Protein auch in die Plasmamembran gelangt. Zusätzlich konnte ich zeigen, dass nach Überexpression von TRPC4 mit TRPC1 heteromultimere Kanäle gebildet werden,

die andere Charakteristika aufweisen als die homomeren Kanäle, die nach Expression der einzelnen Komponenten gebildet werden, ähnlich wie dies zuvor beschrieben worden war (Storch, Forst, M. Philipp et al. 2012). *In vivo* gibt es dazu ein Korrelat: TRPC4 als auch TRPC1 werden in Ileum-Zellen der Maus exprimiert, dort spiegelt die Funktion des TRPC1-Proteins die Daten, die aus Überexpressions-Experimenten erhalten wurden, wider. Unter dem Gesichtspunkt, dass nach Co-Expression von TRPC4 auch TRPC1 in der Plasmamembran nachweisbar ist und zusätzlich den Strom moduliert, ist es wahrscheinlich, dass TRPC1 eine porenformende Untereinheit in einem heteromeren TRPC4/TRPC1-Komplex darstellt.

Nun war von Interesse, wie sich ein inverses Konstrukt, TRPC1-VL-C4-Pore, verhält und ob es sich ähnlich wie TRPC4 aktivieren lässt (Abbildung 3.13 A). Im Ca-Imaging konnte jedoch kein CCh-induzierter Ca^{2+} -Einstrom detektiert werden (Abbildung 3.13 B). Auch wurde das TRPC1-VL-C4-Porenkonstrukt in NSC-34 Zellen mittels *Whole Cell Patch Clamp* untersucht und es konnte keine durch EA induzierte Zunahme des Stroms beobachtet werden (Abbildung 3.10 C TRPC1-VL-C4-Pore). Auch wurden Messungen durchgeführt in denen TRPC1-VL-C4-Pore neben TRPC4 in HEK-293 M_2R Zellen exprimiert wurde. Hierbei konnte ein dominant negativer Effekt des TRPC1-VL-C4-Porenkonstrukts gemessen werden, denn die Zellen zeigten keinen CCh-induzierten Strom (Dr. Andreas Beck, Daten nicht gezeigt).

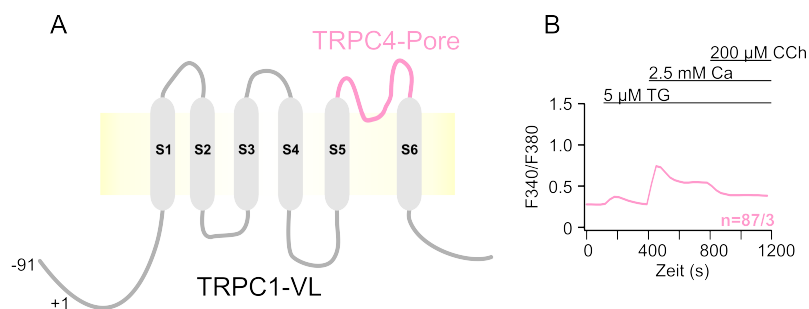


Abbildung 3.13: Untersuchung eines chimären Porenkonstrukts TRPC1-VL-C4-Pore mittels Ca-Imaging. A, Schematische Darstellung des Porenkonstrukts, welches aus TRPC1-VL und der TRPC4-Pore (N535 bis H590) besteht. B, Das TRPC1-VL-C4-Porenkonstrukt wurde in HEK-293 M_2R Zellen exprimiert und mittels Ca-Imaging untersucht. Nach Speicherentleerung mit Thapsigargin (TG) und anschließender Aktivierung des SOCE ist durch Carbachol (CCh)-Applikation kein zusätzlicher Ca^{2+} -Einstrom nachweisbar (n=Zellen/Experimente).

3.2.2 TRPV6

Eine Mutation eines konservierten Glycins (G) im S4-S5 Linker des TRPV3-Proteins führt zu konstitutiver Kanalaktivität (Xiao et al. 2008). Ob die analoge Mutation in TRPV6 den gleichen Effekt hat, wurde getestet. Das korrespondierende G516 der humanen TRPV6-Sequenz wurde zu Serin (S) und Cystein (C) mutiert. Weiterhin ist bekannt, dass ebenfalls in TRPC4 als auch TRPC5 eine entsprechende Mutation des Glycins (G503S bzw. G504S) zu konstitutiv offenen Kanälen führt. Der S4-S5 Linker scheint mit einer Aminosäure des C-Terminus zu interagieren, so dass die Einführung einer zweiten Mutation, S623A, den Effekt der ersten Mutation kompensieren kann (Beck et al. 2013). Es wurde deshalb ebenfalls in TRPV6 die Mutation einer analogen Aminosäure eingeführt (T621A).

TRPV6 formt einen Kanal, der konstitutiv aktiv und selektiv permeabel für Ca^{2+} ist. Im Ca-Imaging sind TRPV6-Kanäle durch ein Ca^{2+} -Additions-Protokoll messbar. Die Zellen wurden zunächst in Ca^{2+} -freier Lösung gemessen und anschließend wurde 2,5 mM Ca^{2+} hinzugegeben. Die TRPV6 exprimierenden Zellen reagieren mit einem raschen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, verbunden mit einer anschließenden Ca^{2+} -abhängigen Inaktivierung und dem Erreichen eines Gleichgewichtswertes, dem sog. Plateau, der bei nicht modifiziertem TRPV6 einen Wert von $0,87 \pm 0,03$ F340/F380 erreicht. Kontrollzellen, die mit Leervektor transfiziert wurden, reagierten auf die Ca^{2+} -Zugabe nur mit einem geringen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und erreichten ein Plateau mit einem signifikant niedrigerem Wert von $0,46 \pm 0,01$ (Abbildung 3.14 **A**, **B**). Wenn im TRPV6-Protein G516 durch S oder C ersetzt wurde, waren die basalen Fluoreszenzwerte vor der Ca^{2+} -Addition mit $1,29 \pm 0,08$ signifikant gegenüber $0,71 \pm 0,02$ der TRPV6 exprimierenden Zellen erhöht. Nach Zugabe von Ca^{2+} konnte die Ca^{2+} -Konzentration in den G516S exprimierenden Zellen noch weiter gesteigert werden ($1,35 \pm 0,08$) (Abbildung 3.14 **C**, **E**). Wenn zusätzlich zu G516S noch T621 zu A mutiert war, konnte der Effekt teilweise aufgehoben werden, das basale Ca^{2+} -Level vor Addition betrug dann nur noch $0,73 \pm 0,06$ F340/F380, was keinen signifikanten Unterschied zu den TRPV6 WT transfizierten Zellen mehr darstellt (Abbildung 3.14 **D**). Auch eine benachbarte Mutation in der TRP-Domäne (D620V) zeigt einen vergleichbaren Phänotyp wie die G516S/C-

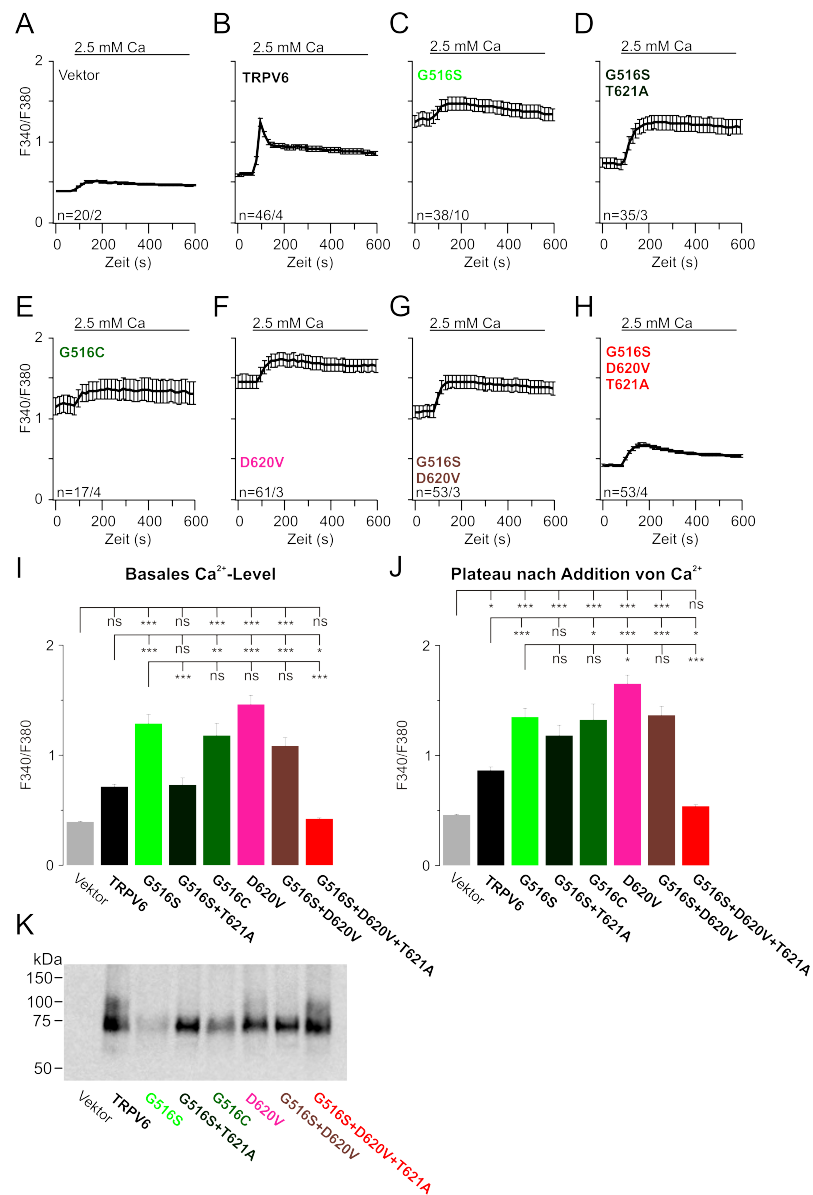


Abbildung 3.14: Funktionelle Charakterisierung von TRPV6-Mutanten mit Mutationen im S4-S5 Linker und der TRP-Domäne. **A-H**, Ca-Imaging Experimente von transfizierten HEK-293 Zellen (n=Zellen/Experimente). **I**, Zusammenfassung der Mittelwerte $\pm$ SEM des basalen Ca^{2+} -Levels vor Ca^{2+} -Addition (0-100 s). Die Ergebnisse der *One-way* ANOVA Varianzanalyse sind dargestellt. **J** Mittelwerte des Ca^{2+} -Levels in der Plateauphase zwischen 500-600 s mit statistischer Auswertung wie in **I**. **K**, Western Blot von transfizierten Cos-7 Zellen nach Inkubation mit TRPV6-AK 429. Modifiziert nach (L. Hofmann, Wang, Beck et al. 2017).

Mutanten (Abbildung 3.14 **F**). Eine Doppelmutation G516S + D620V hat jedoch keine weitere Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vor oder nach Ca^{2+} -Addition zur Folge (Abbildung 3.14 **G**). Eine Dreifachmutante verhält sich wie Vektor transfizierte Kontrollzellen (Abbildung 3.14 **H, I, J**). Eine Western Blot Analyse zeigte, dass alle Mutanten heterolog in Cos-7 Zellen exprimiert werden (Abbildung 3.14 **K**). Die Ergebnisse zeigen, dass der konservierte Glycinrest G516 innerhalb des S4-S5 Linkers von TRPV6 ähnlich wie in TRPC4- bzw. TRPC5-Proteinen die Steuerung des Öffnens und des Schließens (*gating*) dieser Ionenkanäle beeinflusst. Die Mutation führt dazu, dass der Kanal konstitutiv offen ist und auch in Gegenwart hoher zytosolischer Ca^{2+} -Konzentration nicht mehr inaktiviert. Der S4-S5 Linker scheint in Kontakt zu treten mit einer C-terminalen Sequenz, die zwischen der TM-Domäne S6 und dem sogenannten TRP-Motiv lokalisiert ist. Eine Mutation in diesem Bereich, T621A, kann den Effekt der G516S Mutation weitgehend aufheben.

Weitere Mutationen in einem TRP-Vertreter, TRPP3, konnten eine Wechselwirkung zwischen Aminosäuren der prä S1-Helix und der TRP-Domäne aufdecken, welche möglicherweise durch eine π -Kationen-Bindung zustande kommt und essentiell für die Kanalfunktion ist (Zheng et al. 2017, eingereichtes Manuskript). Eine π -Kationen-Bindung stellt eine nicht kovalente Bindung zwischen π -Elektronen einer aromatischen Aminosäure, wie beispielsweise Tryptophan, mit kationischen Aminosäuren, wie z.B. Arginin oder Lysin, dar (Gallivan und Dougherty 1999). Als beteiligte Aminosäuren wurden ein konserviertes Tryptophan (W) aus der prä S1-Helix und ein Lysin (K) der TRP-Domäne identifiziert. Es stellt sich die Frage, ob eine Interaktion dieser Domänen auch in anderen TRP-Kanälen eine Rolle spielt und welchen Einfluss die Mutation der korrespondierenden Aminosäuren auf die Kanalfunktion von TRPV6 hat. In Abbildung 3.15 **A, B** ist eine Übersicht über die Lokalisation der Domänen im TRPV6-Protein (**A**) sowie ein Alignment der TRPV6-Sequenzen gezeigt (**B**). Das W in der prä S1-Helix ist in allen Vertretern der TRPV-Familie und in TRPV6 von verschiedenen Spezies konserviert. In der TRP-Domäne ist ebenfalls ein hoch-konserviertes W zu finden, während die positive Aminosäure, die in TRPP3 an einer putativen π -Kationen-Bindung beteiligt ist, in TRPV6 nicht vorhanden ist. Da anhand der TRPV1-Struktur möglicherweise ein K425 aus der prä S1-Helix an intra- oder intermolekularen

Bindungen beteiligt sein könnte, wurde das korrespondierende, in TRPV6 konservierte, K360 der prä S1-Helix in TRPV6 ebenfalls mutiert (M. Liao et al. 2013). Die Mutationen K360A, W361A sowie W633A wurden in die humane Sequenz von TRPV6 eingebracht (Abbildung 3.15 **B**).

Der TRPV6-Kanal wurde nach Überexpression in Oozyten mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) gemessen. Hierbei wurde der Strom durch Ca^{2+} -Zugabe in die Badlösung induziert. Die Zugabe von Ca^{2+} bewirkt einen Ca^{2+} -Einstrom durch konstitutiv aktive TRPV6-Kanäle, dieses Ca^{2+} aktiviert einen Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanal in den Oozyten. Der Cl^- -Strom ist durch eine initiale Stromspitze zu erkennen und mischt sich im folgenden Verlauf mit dem TRPV6-Strom. Das Plateau, welches anschließend erreicht wird, wird als TRPV6-vermittelter Strom angesehen und zur Berechnung der Stromamplitude verwendet (Abbildung 3.15 **C**, **D**). Hier wurde auch die Amplitude der K360A-Mutante gezeigt, welche ebenfalls untersucht wurde. Die W-Mutanten zeigten einen um das 20- bis 30-fache erhöhten Strom in den Oozyten, während die K360A-Mutante keinen Effekt auf die TRPV6-Kanalaktivität hat. Um auszuschließen, dass die Zunahme des gemessenen Stroms in den Mutanten auf eine gesteigerte Plasmamembran-Lokalisation zurückzuführen ist, wurde ein Biotinylierungsassay durchgeführt. In Abbildung 3.15 **E** ist zu sehen, dass die Intensität der Proteinbanden im Lysat (links) und in der biotinylierten Fraktion (rechts) zwischen WT und Mutanten ähnlich ist. Die Mutanten W361A und W633A wurden ebenfalls in HEK-293 Zellen überexprimiert und charakterisiert. Hierfür wurden Ca-Imaging Experimente 24 h nach Transfektion mit den TRPV6-Konstrukten durchgeführt. Es wurde ein Ca^{2+} -Additionsprotokoll gemessen (Abbildung 3.16 **A**). Die absoluten Werte von F340/F380 vor (basal) und nach Applikation von Ca^{2+} (Plateau) sind in Abbildung 3.16 **B** dargestellt. Die Mutanten wiesen beide erhöhte basale Ca^{2+} -Konzentrationen auf, welche sich nach Addition von 2 mM Ca^{2+} nochmals signifikant gegenüber TRPV6 exprimierenden Zellen steigerten. Ein Western Blot von transfizierten HEK-293 Zellen zeigt, dass die TRPV6 W633A-Mutante sehr schlecht exprimiert wird (Abbildung 3.16 **C**). Es wurden von TRPV6 transfizierten Zellen 10 μl Lysat und von den Mutanten jeweils 25 μl aufgetragen. Dennoch war die Expression von TRPV6 W633A gering. Scheinbar ist das TRPV6 W633A Konstrukt für die HEK-293 Zellen toxisch. Um die erhöhte Sterberate der Zel-

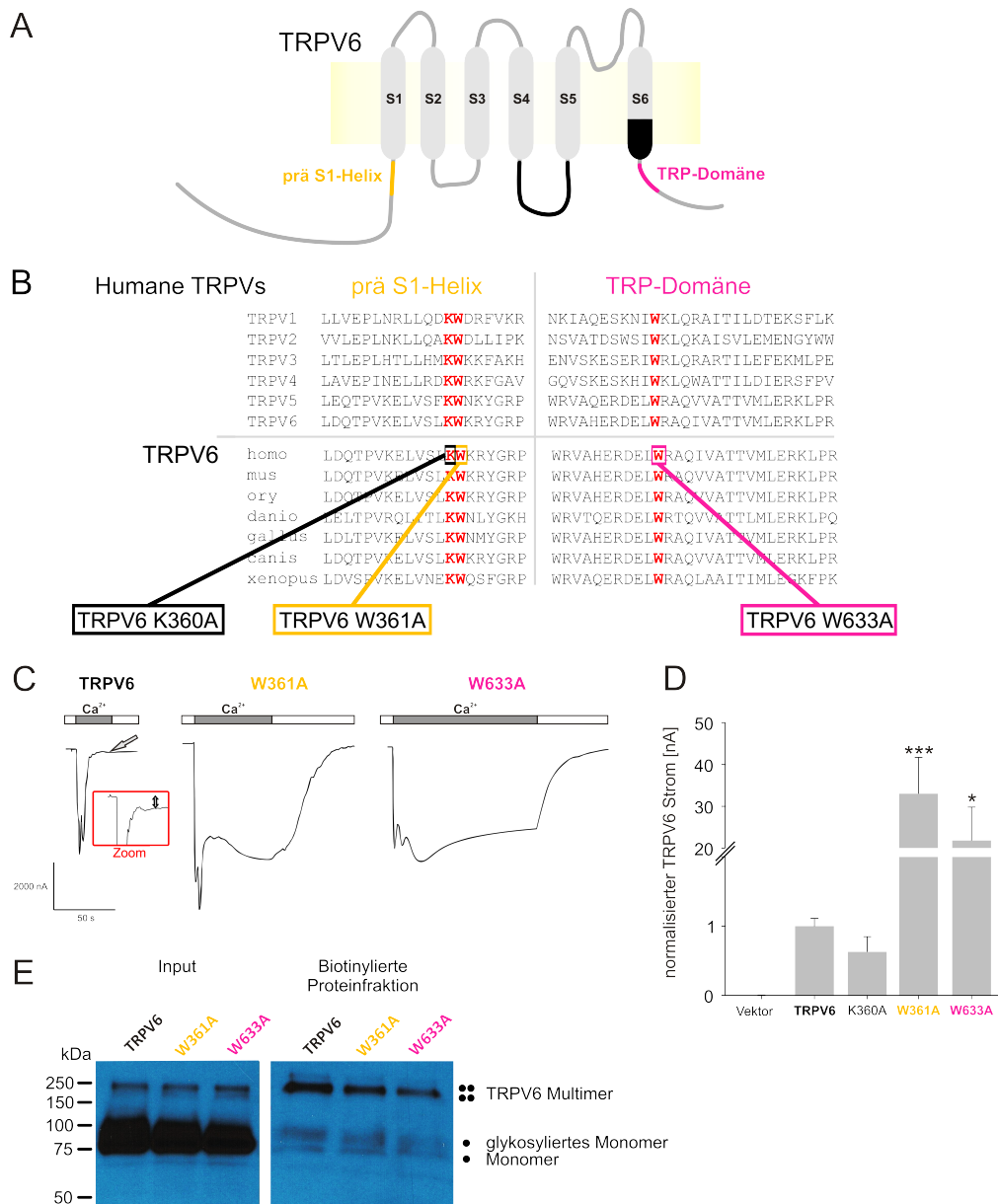


Abbildung 3.15: **Charakterisierung von TRPV6-Mutanten in *Xenopus* Oozyten.** **A**, Lokalisation der prä S1-Helix und der TRP-Domäne innerhalb des TRPV6-Proteins. **B**, Alignment der prä S1-Helix und der TRP-Domäne von TRPV-Vertretern (oben) und von TRPV6-Sequenzen aus verschiedenen Spezies (unten). Die in der humanen Sequenz mutierten Aminosäuren sind hervorgehoben. **C**, Vergleich der Stromverläufe von TRPV6 und der W-Mutanten 24 h nach Injektion von 25 ng RNA in *Xenopus laevis* Oozyten. Der initiale Peak direkt nach Ca^{2+} -Zugabe ist einem endogen exprimierten Ca^{2+} -aktivierten Cl-Kanal zuzuordnen, die nachfolgende Plateauphase wird durch TRPV6 bestimmt. **D**, Normalisierte Amplituden aus C zum Zeitpunkt unmittelbar vor dem Wechsel zu Ca^{2+} -freier Badlösung; Ergebnisse des *t*-tests gegen TRPV6 sind eingezeichnet. **E**, Western Blot Analyse von TRPV6 und TRPV6-Mutanten. Sowohl TRPV6 als auch die Mutanten wurden in Oozyten exprimiert (links). Durch ein Biotinylierungsexperiment kann gezeigt werden, dass vergleichbare Proteinmengen zur Plasmamembran transferiert werden (rechts).

len zu visualisieren wurden Bilder am Fluoreszenzmikroskop 16 und 48 h nach Transfektion aufgenommen (3.16 **D**). Die transfizierten Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz, da die TRPV6 cDNA und die cDNA von GFP über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) verknüpft ist, die eine bizistronische Translation von TRP-Protein und GFP ermöglicht. Während in den TRPV6 transfizierten Zellen die Anzahl grüner Zellen zunahm, war bei der W633A-Mutante ein Rückgang grüner Zellen zu beobachten. Schon nach 16 h war die Zelldichte geringer und die überlebenden Zellen exprimierten das GFP nur sehr schwach. Nach 48 h war ein deutlicher Rückgang der Zelldichte, sowie ein Klumpen der überlebenden Zellen in der Durchlichtaufnahme zu sehen. Es ist zu vermuten, dass nur schwach grüne Zellen überleben, die vermutlich den mutierten TRPV6-Kanal ebenfalls nur schwach exprimieren. Der in Abbildung 3.16 **C** gezeigte Western Blot bestätigt dieses Ergebnis. Es ist davon auszugehen, dass die konservierten W-Reste eine wichtige Rolle für die TRPV6-Kanalfunktion haben, da beide Mutationen, W361A als auch W633A, zu einer gesteigerten konstitutiven Aktivität führen.

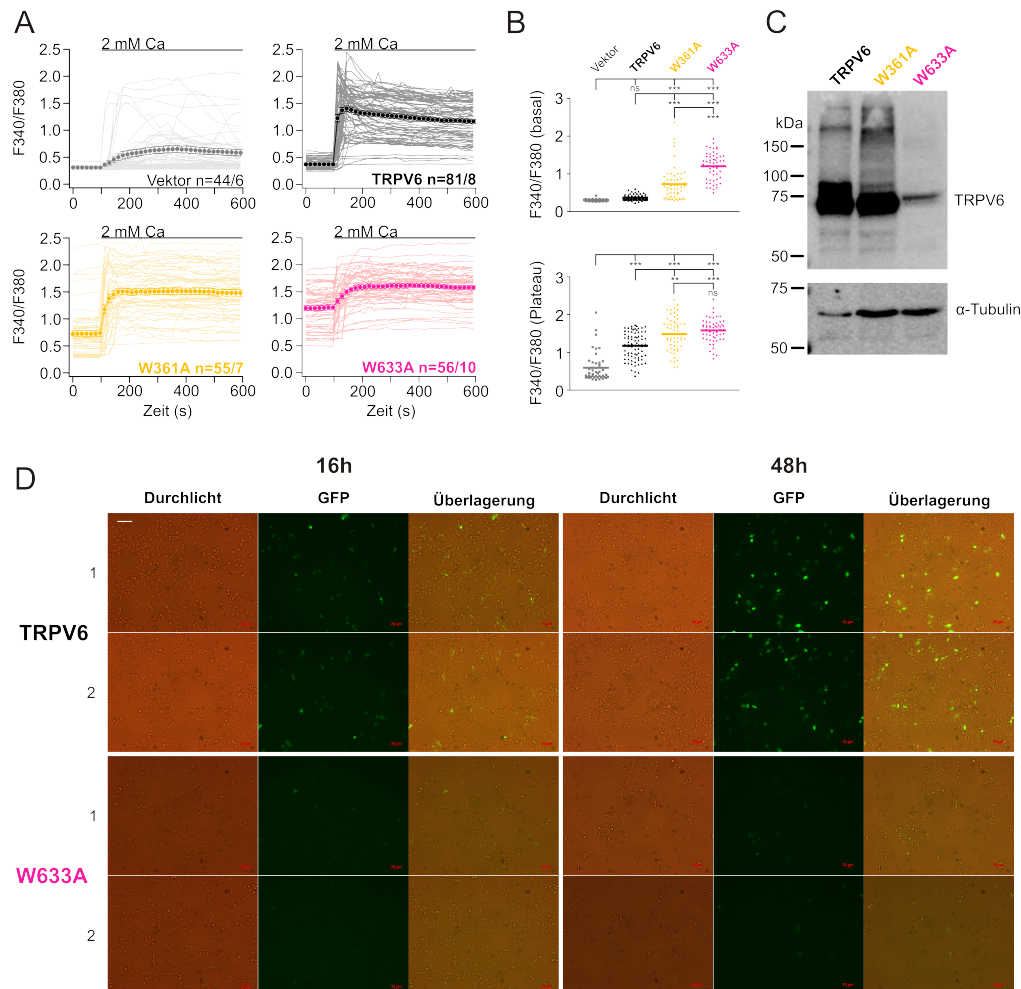


Abbildung 3.16: **Charakterisierung von TRPV6-Mutanten W361A und W633A in HEK-293 Zellen.** **A**, Ca-Imaging Experimente in transfizierten HEK-293 Zellen 16-19 h nach Transfektion mit Leer-Vektor (grau), TRPV6 WT (schwarz), W361A (gelb) oder W633A (pink); n=Zellen/Experimente. **B**, Werte aus A vor (oben) und nach Ca^{2+} -Addition (unten). Die Basalwerte der Zellen stellen den Mittelwert des Zeitraums 0-100 s dar, die Plateauphase wurde aus den Werten des Zeitraums 500-600 s kalkuliert; Ergebnisse der *One-way* ANOVA Varianzanalyse sind eingezeichnet. **C**, Western Blot von transfizierten HEK-293 Zelllysaten, der mit TRPV6-AK 429 (oben) und als Ladekontrolle mit α -Tubulin-AK (unten) inkubiert wurde. **D**, Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von TRPV6 als auch TRPV6 W633A transfizierten HEK-293 Zellen nach 16 h (links) und 48 h (rechts). Maßstab 100 μ m.

3.2.3 TRPM8

In Kapitel 3.2.2 wurden konservierte Tryptophan-Reste in TRP-Proteinen beschrieben, die in der so genannten prä S1-Helix lokalisiert sind und einen erheblichen Einfluss auf die Funktion der TRP-Kanäle TRPP3 und TRPV6 haben. Die prä S1-Helix des TRPM8-Proteins enthält ebenfalls an der korrespondierenden Position einen Tryptophan-Rest (W682). Dieser könnte in Wechselwirkung treten mit einer positiv geladenen Aminosäure Arginin (R), das in der TRP-Domäne gelegen ist (R998). Zusätzlich zu dieser Interaktion erscheint auch eine Wechselwirkung über π -Elektronen zwischen zwei aromatischen Aminosäuren (π - π -Bindung) möglich. In der prä S1-Helix ist zusätzlich zu dem W682 auch ein konserviertes Phenylalanin (F), F668A, gelegen welches ebenso mit dem in der TRP-Domäne vorhandenen W994 interagieren könnte. Das W994 ist, genau wie in TRPV6, eine Aminosäure der so genannten TRP-*box*, die einen hoch konservierten Bereich innerhalb der TRP-Domäne darstellt. Der Einfluss dieser vier Aminosäuren wurde in TRPM8-Mutanten untersucht, in denen die Aminosäuren jeweils gegen A getauscht wurden. TRPM8 lässt sich mit Menthol aktivieren und kann, da der Kanal für Ca^{2+} und Na^{+} permeabel ist, mittels Ca-Imaging funktionell charakterisiert werden. TRPM8 kann auch durch niedrige Umgebungstemperatur (unter 22-28 °C) aktiviert werden, aus diesem Grund wurden alle Experimente bei 37 °C durchgeführt. Zunächst wurden Mutationen in die cDNA von TRPM8 der Ratte eingeführt (Dr. Wang Zheng). Die Mutanten wurden in HEK-293 Zellen exprimiert, wie auf dem Western Blot in Abbildung 3.17 **B** gezeigt ist. In Abbildung 3.17 **C** ist ein Alignment von TRPM-Sequenzen sowie von TRPM8-Sequenzen verschiedener Spezies gezeigt. Die Ca-Imaging Messungen wurden in Ca^{2+} -freiem Puffer begonnen, dann folgte eine Ca^{2+} -Addition, welche zu einem minimalen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt (Abbildung 3.17 **D**). Die anschließende Menthol-Zugabe aktiviert einen TRPM8-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in den TRPM8 transfizierten Zellen, welcher in den Mutanten nicht zu beobachten ist. Die in TRPM8 eingeführten Mutationen führen weitgehend zu einem Verlust der Aktivierbarkeit des TRPM8-Kanals durch Menthol. Als Menthol-Bindestellen wurden Aminosäuren innerhalb der TRP-Domäne, Y1005 und L1009, und der TM-Domäne S2, Y745, identifiziert (Bandell et al. 2006). Da die von mir eingeführten Mutationen nur teilweise in Sequenz-

abschnitten liegen an die Menthol bindet, kann es sein, dass die Mutationen beispielsweise die Faltung des Proteins beeinflussen und somit die Menthol-Bindung verhindern. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die Mutation direkt die Bindung des N-Terminus an die TRP-Domäne beeinträchtigt mit der Folge, dass die Aktivierung des Kanals nicht mehr möglich ist.

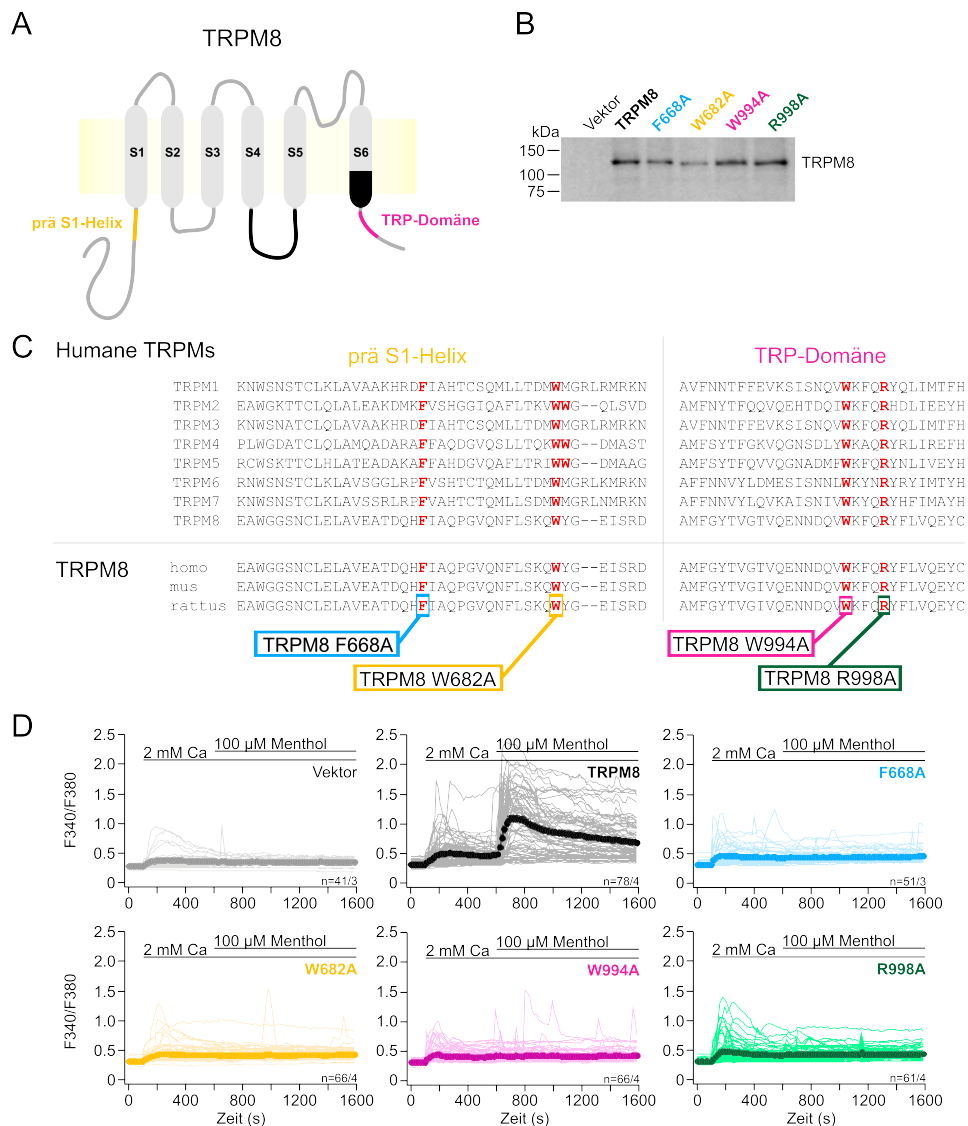


Abbildung 3.17: Charakterisierung von TRPM8-Mutanten in HEK-293 Zellen. **A**, Schematische Darstellung des TRPM8-Proteins. **B**, Western Blot von transfizierten HEK-293 Zellen, inkubiert mit TRPM8-AK 797. **C**, Alignment der prä S1-Helix und TRP-Domäne der TRPM-Proteine als auch von TRPM8-Proteinen aus verschiedenen Spezies. Die eingeführten Mutationen sind gekennzeichnet. **D**, Ca-Imaging Experimente mit transient transfizierten HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden mit TRPM8 oder mit den TRPM8 Mutanten F668A, W682A, W994A und R998A transfiziert und mit einer Vektor-Kontrolle verglichen. Die Zellen wurden erst mit Ca^{2+} und anschließend mit Menthol stimuliert. Um eine Aktivierung von TRPM8 bei RT zu verhindern wurden die Experimente bei 37 °C durchgeführt (n=Zellen/Experimente).

3.2.4 TRPM4

In der Sequenz von TRPM4, einem weiteren Vertreter der TRPM-Familie, sind in der prä S1-Helix zwei aufeinanderfolgende, konservierte Tryptophane, W680 und W681, zu finden. In der TRP-Domäne ist ebenfalls ein durch alle TRP-Subfamilien konserviertes Tryptophan, W1054, vorhanden auf das vier Aminosäuren stromabwärts ein positiv geladenes Arginin (R), R1058, folgt (Abbildung 3.18 **A**, **B**). Analog zu den Versuchen in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 wurde untersucht ob die genannten Aminosäuren einen Einfluss auf die Funktion des TRPM4-Proteins zeigen. Die Mutationen der jeweiligen Aminosäure zu A wurde in die TRPM4-Sequenz der Maus eingebracht (Abbildung 3.18 **B**). Aufgrund der zwei aufeinanderfolgenden Tryptophane wurde auch eine Doppelmutante, W680A+W681A, kloniert. Zur funktionellen Charakterisierung wurde der Strom in den transfizierten HEK-293 Zellen mittels *Whole Cell Patch Clamp* gemessen. Da TRPM4 ein Ca^{2+} -aktivierter Kationenkanal ist, wurde dieser mit $3 \mu\text{M}$ intrazellulärem Ca^{2+} (in der Patchpipette) aktiviert. Da die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auch die Aktivierung von Cl^- -Kanälen in den Zellen begünstigt, wurde das normalerweise in der Badlösung enthaltene NaCl mit Na-Aspartat ersetzt. Die ersten 3 min des gemessenen TRPM4-Stroms wurden aufgezeichnet und mit den TRPM4-Mutanten verglichen (Abbildung 3.18 **C**). In Abbildung 3.18 **E** sind die Amplituden des Ca^{2+} -aktivierten TRPM4-Stroms gezeigt. Abbildung 3.18 **F** zeigt den Minimalstrom, der nach dem Abklingen des TRPM4-vermittelten Stroms gemessen wurde und zur Amplitudenberechnung von dem Ca^{2+} -aktivierten Strom als Basalstrom abgezogen wurde. In den TRPM4 exprimierenden Zellen betrug der mittlere Ca^{2+} -aktivierte Strom bei -80 mV $-11 \pm 2,5 \text{ pA/pF}$ und inaktivierte nach ca. 15 s. Nach 50 s wurde ein Minimalstrom von $-2,6 \pm 0,37 \text{ pA/pF}$ gemessen, der vergleichbar mit dem Strom war, der unmittelbar nach Einbruch gemessen wurde. In den Mutanten W680A und W681A war die Amplitude des TRPM4-Stroms bei +80 mV jeweils um das ca. 6-fache gegenüber nicht modifiziertem TRPM4 erniedrigt, bei -80 mV war ebenfalls eine signifikante Reduktion zu beobachten. In der Doppelmutante W680A+W681A konnte, wie in Vektor transfizierten Zellen, keine Zunahme des Stroms detektiert werden. In der TRPM4 W1054A-Mutante wurde ein Ca^{2+} -aktivierter Strom bei -80 mV von $-625,2 \pm 284,5 \text{ pA/pF}$ gemessen, welcher lediglich auf

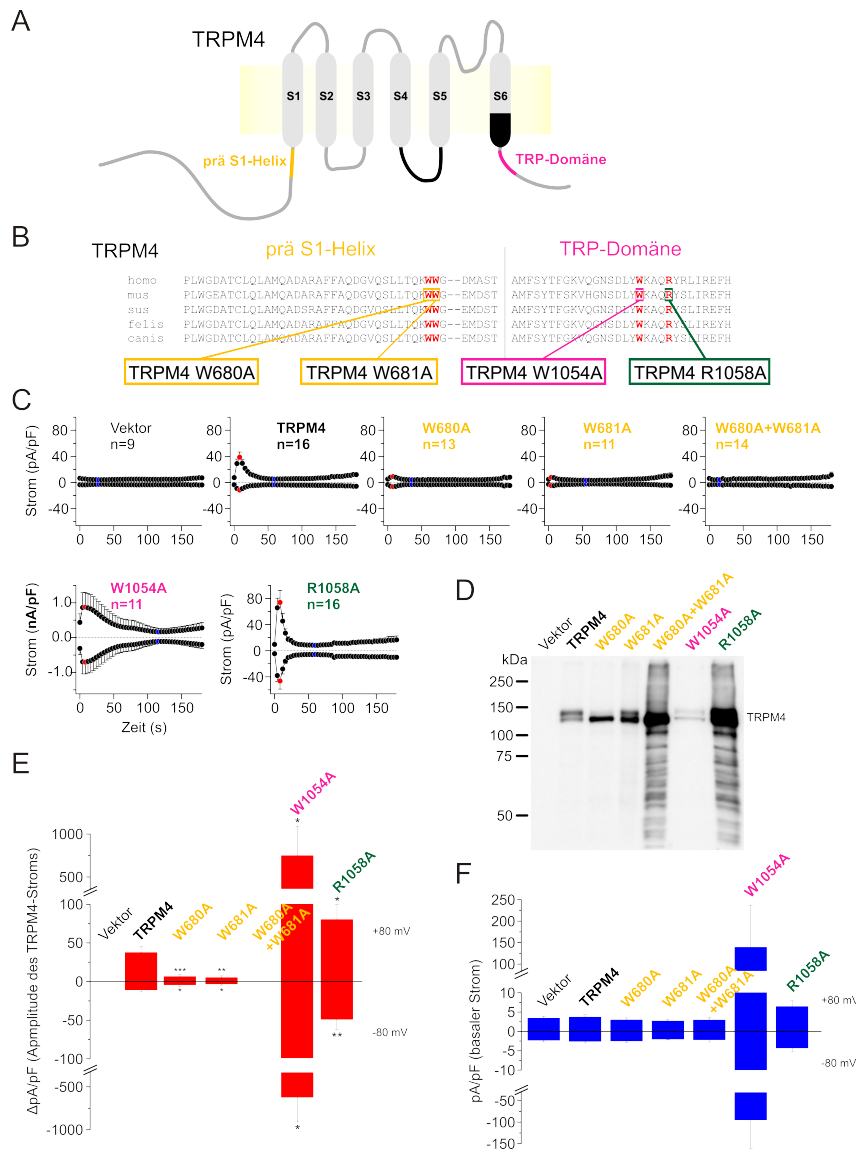


Abbildung 3.18: **Funktionelle Charakterisierung der TRPM4-Mutanten.** **A**, Schematische Darstellung des TRPM4-Proteins. **B**, Alignment der prä S1-Helix und TRP-Domäne der TRPM-Proteine als auch von TRPM4-Proteinen aus verschiedenen Spezies. Die eingeführten Mutationen sind gekennzeichnet. **C**, Ein- und Auswärtsströme der transfizierten HEK-293 Zellen (±80 mV). Die Zeitpunkte der Berechnung der Stromamplitude in E und des Basalstroms in F sind in rot bzw. blau gekennzeichnet. **D**, Western Blot von transfizierten HEK-293 Zelllysaten, inkubiert mit dem TRPM4-AK 578. **E**, Amplituden des Ca^{2+} -induzierten Stroms bei ±80 mV (der Minimalstrom zum blau markierten Zeitpunkt wurde abgezogen). Bei Vektor und W680A+W681A transfizierten Zellen war kein TRPM4-Strom messbar. **F**, basaler Minimalstrom bei ±80 mV, welcher zum in C blau markierten Zeitpunkt gemessen wurde.

-95,1 $\pm$ 65,9 pA/pF zurück ging. Hierbei ist zu beachten, dass der Strom der W1054A-Mutante in der Darstellung in Abbildung 3.18 C in nA/pF angegeben ist. In den W1054A-Mutante exprimierenden Zellen blieb der Strom auch nach 120 s immer noch auf einem ca. 30-fach höheren Level verglichen mit Zellen die nicht modifiziertes TRPM4 exprimieren, jedoch waren die absoluten Werte dieses „Minimalstroms“ in den einzelnen Zellen sehr unterschiedlich und somit nicht signifikant verschieden von TRPM4 WT (Abbildung 3.18 F). Die TRPM4 R1058A-Mutante zeigte einen im Vergleich zu TRPM4 erhöhten Strom, der jedoch ebenfalls nach ca. 15 s wieder inaktiviert und auf ein mit TRPM4 WT vergleichbaren Minimalstrom zurück ging. In Anwesenheit von 100 nM Ca²⁺ in der Patchpipette konnte in den Konstrukten kein TRPM4-Strom aktiviert werden (Daten nicht gezeigt). Auf dem Western Blot ist zu erkennen, dass TRPM4 und alle TRPM4-Mutanten exprimiert werden (Abbildung 3.18 D). Das TRPM4 W1054A-Protein war 48 h nach Transfektion nur sehr schwach exprimiert. Auf der SDS-PAGE wurde deshalb die 3-fache Menge an Zelllysate aufgetragen. Vermutlich ist das TRPM4 W1054A-Konstrukt für die HEK-293 Zellen toxisch, da nach 48 h keine grünen Zellen mehr vorhanden waren. Aus diesen Gründen wurden alle TRPM4-Messungen 24 h nach Transfektion durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass wie in TRPM8, Mutationen der Tryptophane innerhalb der prä S1-Helix einen Funktionsverlust des TRPM4-Kanals bewirken. Da bei TRPM4 zwei aufeinander folgende Tryptophane vorhanden sind, konnte ich zeigen, dass eine Mutation von einem der beiden Reste die Kanalfunktion signifikant reduziert, während die Mutation beider Tryptophane die Kanalaktivität vollständig inhibiert. Die Mutationen W1054A bzw. R1058A in der TRP-Domäne von TRPM4 führen zu erhöhter Kanalaktivität. Hierbei verhält sich die Mutation W1054A ähnlich wie die Mutation des korrespondierenden Tryptophans innerhalb der TRP-Domäne von TRPV6, W633A.

3.2.5 TRPC4

In der TRPC4-Sequenz sind in der prä S1-Helix und der TRP-Domäne ebenfalls konservierte, aromatische Aminosäuren zu finden, welche in Abbildung 3.19 A, B hervorgehoben sind. Vier Aminosäuren nach dem konservierten W in der TRP-Domäne ist ein R vorhanden, das in der gesamten TRPC-Familie

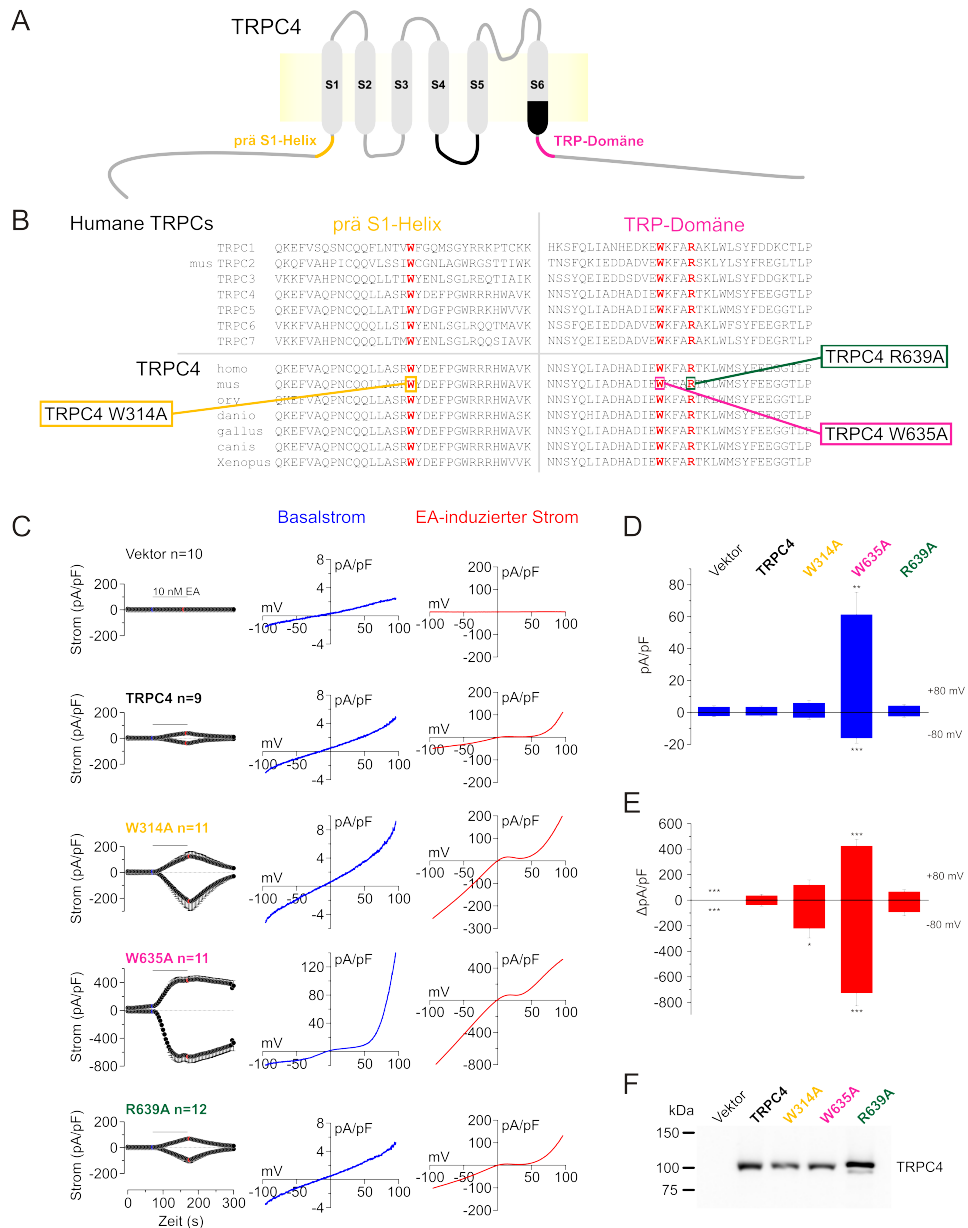


Abbildung 3.19: Funktionelle Charakterisierung von TRPC4-Mutanten mittels *Whole Cell Patch Clamp*. **A**, Schematische Darstellung des TRPC4-Proteins. **B**, Alignment der prä S1-Helix und TRP-Domäne der TRPC-Proteine als auch von TRPC4-Proteinen aus verschiedenen Spezies. Die eingeführten Mutationen sind gekennzeichnet. **C**, *Whole Cell Patch Clamp* Experimente von transfizierten HEK-293 Zellen. Gezeigt ist der Strom bei ± 80 mV über die Zeit (links) und die IV-Kurven des Basalstroms (Mitte) und des durch Englerin A (EA) induzierten Stroms (rechts). **D**, Amplituden des Basalstroms (bei ± 80 mV) vor Applikation von EA. **E** Amplituden des durch EA induzierten Stroms. *One-way* ANOVA Varianzanalyse zur Prüfung statistisch signifikanter Unterschiede gegenüber TRPC4. **F**, Western Blot von transfizierten HEK-293 Zellen, inkubiert mit dem TRPC4-AK PK2D2A2.

und in TRPC4 verschiedener Spezies konserviert ist. Die Mutationen wurden in die TRPC4-Sequenz von Maus eingebracht. Zunächst wurden HEK-293 Zellen mit Leervektor, TRPC4 und TRPC4-Mutanten transfiziert und mittels *Whole Cell Patch Clamp* charakterisiert. Um TRPC4 zu aktivieren wurde 10 nM Englerin A (EA) appliziert (Abbildung 3.19 C). In den TRPC4-exprimierenden Zellen wurde durch EA ein typischer TRPC4-Kationenstrom bei -80 mV mit $-37,87 \pm 8,847$ pA/pF induziert. Vor der Applikation betrug der Basalstrom $-2,06 \pm 0,33$ pA/pF. In TRPC4 W314A exprimierenden Zellen konnte EA einen signifikant größeren Strom von $-222,2 \pm 74,04$ pA/pF bei -80 mV induzieren. Der Basalstrom vor EA-Zugabe war jedoch vergleichbar mit dem TRPC4 WT-Konstrukt. Die TRPC4 W635A exprimierenden Zellen zeigten schon vor Applikation von EA einen basal erhöhten Strom bei -80 mV von $-16,2 \pm 3,05$ pA/pF, welcher die charakteristische TRPC4-IV-Kurve besitzt. Der Strom bei -80 mV ließ sich durch Zugabe von EA um $-727,6 \pm 100,2$ pA/pF erhöhen und inaktivierte nach Wegnahme von EA kaum. Dagegen konnte für die R639A-Mutante kein Unterschied zu nicht modifiziertem TRPC4 gemessen werden (Abbildung 3.19 C - E). Eine Western Blot Analyse von HEK-293 Lysaten zeigt, dass alle Mutanten in den Zellen exprimiert werden (Abbildung 3.19 F).

Die beiden Tryptophan-Mutanten, W314A und W635A, wurden ebenso hinsichtlich des Ca^{2+} -Einstroms untersucht. Hierzu wurden HEK-293 μ -OR Zellen mit TRPC4 oder TRPC4-Mutanten transfiziert und mittels Ca-Imaging gemessen. In Abbildung 3.20 A sind die Verläufe der intrazellulären Ca^{2+} -Level anhand der Fluoreszenz-Werte gezeigt. Es wurde eine Speicherentleerung mit Thapsigargin (TG) in Abwesenheit von Ca^{2+} herbeigeführt, anschließend erfolgte eine Addition von Ca^{2+} (Peak 1) und danach die G-Protein-Aktivierung des μ -OR sowie des endogen vorhandenen M_3R durch die Applikation von [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-Enkephalin (DAMGO) und Carbachol (CCh). Die Peak-Amplituden sowie die Flächen unter der Kurve (AUC) wurden für Peak 1 und 2 berechnet (Abbildung 3.19 B). Es ist zu erkennen, dass bei der W635A-Mutante eine signifikante Erhöhung der AUC des Peak 1 und 2 gegenüber TRPC4 WT oder der W314A-Mutante vorliegt. Der durch G-Protein-Aktivierung ausgelöste TRPC4-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom (Peak 2) ist bei der W314A- und der W635A-Mutante signifikant größer als bei nicht modi-

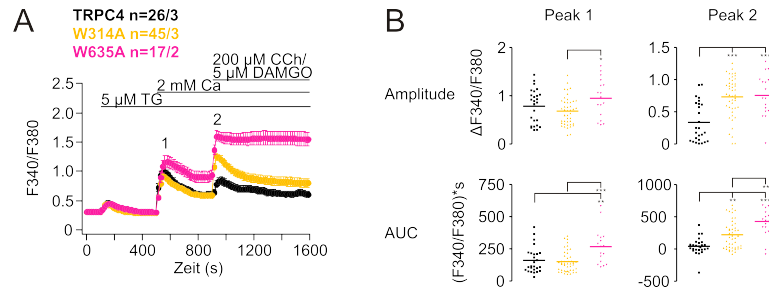


Abbildung 3.20: **Funktionelle Charakterisierung der TRPC4-Mutanten mittels Ca-Imaging.** **A**, Ergebnisse der Ca-Imaging Experimente von HEK-293 μ -OR Zellen 48 h nach Transfektion mit den Konstrukten TRPC4 WT (schwarz), TRPC4 W314A (gelb) und TRPC4 W635A (magenta); n=Zellen/Experimente. **B**, Auswertung der Peaks nach Ca^{2+} -Zugabe (1) und nach CCh/DAMGO-Zugabe (2) in Form von Peak-Amplitude (oben) und der AUC (unten). One-way ANOVA Varianzanalyse zur Prüfung statistisch signifikanter Unterschiede.

fiziertem TRPC4. Hier ist zu beobachten, dass die Ca^{2+} -Konzentration in den W635A-Mutante exprimierenden Zellen, im Gegensatz zu den TRPC4 WT oder W314A-Mutante exprimierenden Zellen, nach CCh-Applikation nicht abnimmt. Die Ca-Imaging-Daten bestätigen den mittels *Whole Cell Patch Clamp* gemessenen konstitutiv aktiven Phänotyp der TRPC4 W635A-Mutante und geben möglicherweise einen Hinweis darauf, dass der Kanal durch die W635A-Mutation nicht mehr inaktivieren kann.

Ein weiteres konserviertes Motiv in TRP-Kanälen befindet sich distal in der TM-Domäne S6 und besteht aus hydrophoben Aminosäuren (Abbildung 3.21 **A**). Charakteristisch ist die Aminosäure-Abfolge LIAM und diese ist in vielen Vertretern der TRP-Familie konserviert (Abbildung 3.21 **B**). Die bisher publizierten hoch auflösenden Strukturen von TRP-Kanälen bestätigen, dass die Aminosäuren dieses Bereichs an der unteren Verengung der Pore (*lower gate*) liegen und somit eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des geschlossenen Zustands spielen könnten (M. Liao et al. 2013; Paulsen et al. 2015; Zubcevic et al. 2016; Saotome et al. 2016; Shen et al. 2016; Jin et al. 2017). Die Arbeitshypothese war, dass ein Austausch der beteiligten Aminosäure gegen eine hydrophile oder sterisch größere Aminosäure den Porendurchmesser möglicherweise erweitern und somit zu einer erhöhten basalen Leitfähigkeit des TRP-Kanals führen kann. Eine Mutation des Isoleucin (I)617 zu Asparagin (N) in TRPC4 β führt zu einem erhöhten Basalstrom in *Xenopus* Oozyten (Zheng, Hu et al. 2017). Die Mutation I617N wurde in die TRPC4 α -Sequenz von Maus eingebracht. Nach Transfektion in HEK-293 Zellen wurde TRPC4 I617N ex-

primiert, wie auf dem Western Blot zu erkennen ist (Abbildung 3.21 **C**). Die TRPC4 I617N exprimierenden Zellen wurden mittels *Whole Cell Patch Clamp* gemessen und zeigen ebenfalls einen im Vergleich zu TRPC4 WT exprimierenden Zellen erhöhten Basalstrom, der sich durch Applikation von EA noch zusätzlich steigern lässt. Die Stromamplitude des EA-aktivierten Stroms ist im Vergleich zu nicht modifiziertem TRPC4 wesentlich größer (Abbildung 3.21 **D - F**). Die IV-Kurve des EA induzierten Stroms der I617N-Mutante zeigt, dass der spannungsabhängige Mg^{2+} -Block weniger ausgeprägt ist als bei TRPC4 WT exprimierenden Zellen und somit die IV-Kurve annähernd linear wird (Abbildung 3.21 **F**). Die Ergebnisse zeigen, dass ein Austausch von I617N auch in TRPC4 α eine erhöhte basale Leitfähigkeit zur Folge hat. Dies unterstützt die Interpretation der Strukturdaten aus denen bereits geschlossen wurde, dass I617 innerhalb der *lower gate* der ionenleitenden Pore lokalisiert ist. Der in der Mutante gemessene erhöhte Basalstrom stellt einen nicht selektiven Kationenstrom dar, der keine TRPC4-charakteristische IV-Kurve zeigt sondern eine annähernd lineare IV-Kurve aufweist.

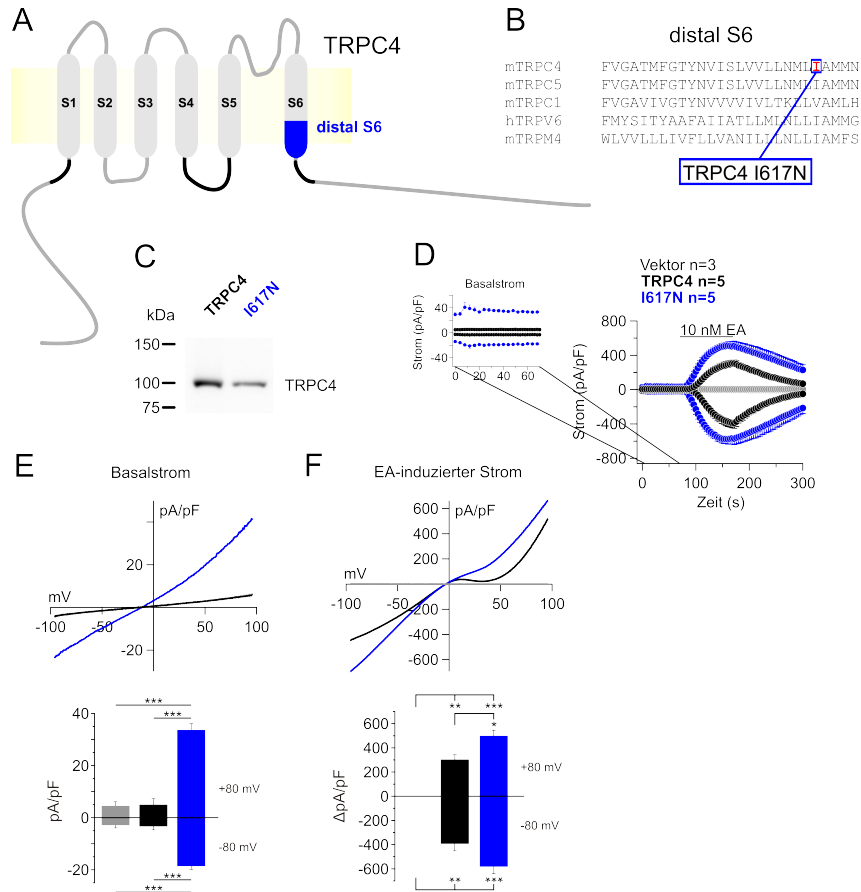


Abbildung 3.21: **Funktionelle Untersuchung einer TRPC4-Mutation in der TM-Domäne S6.** **A**, Schematische Darstellung des TRPC4-Proteins, die Aminosäure I617 ist im distalen Teil von S6 lokalisiert (blau) **B**, Alignment von murinen (m) oder humanen (h) TRP-Sequenzen des distalen Bereichs von S6. **C**, Western Blot von transfizierten HEK-293 Zellen, inkubiert mit dem TRPC4-AK PK2D2A2. **D**, Ein- und Auswärtsströme bei ± 80 mV von Leer-Vektor (grau), TRPC4 (schwarz) und TRPC4 I617N (blau) exprimierenden HEK-293 Zellen vor und nach Applikation von Englerin A (EA) 24 h nach Transfektion. **E**, IV-Kurven (oben) und Amplituden des Basalstroms bei ± 80 mV (unten) vor Applikation von EA. One-way ANOVA Varianzanalyse zur Prüfung statistisch signifikanter Unterschiede. **F**, IV-Kurven (oben) und Amplituden (unten) des durch EA induzierten Stroms. One-way ANOVA Varianzanalyse zur Prüfung statistisch signifikanter Unterschiede.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Diskussion Teil 1: TRPC1-VL

4.1.1 Identifizierung des nicht-AUG-Startcodons

Vor einiger Zeit wurde publiziert, dass die Translation des humanen TRPV6-Proteins nicht an einem klassischen AUG-Triplett initiiert wird, sondern an einem 120 Basenpaare (bp) stromaufwärts gelegenen ACG-Triplett. Somit wird ein Teil der vormals als 5' nicht translatierte Region (5' UTR) beschriebenen Sequenz translatiert, mit der Folge, dass das humane TRPV6-Protein am N-terminus um 40 Aminosäuren länger ist als zuvor angenommen (Fecher-Trost et al. 2013). Es stellte sich die Frage, ob auch das TRPC1-Protein einen verlängerten N-Terminus besitzt, da heterolog exprimiertes TRPC1 in einer Vielzahl von Experimenten eine höhere Mobilität in der SDS-PAGE zeigt als endogenes TRPC1 aus Maushirn. Somit weist endogen exprimiertes TRPC1 eine größere Masse auf als das rekombinant exprimierte Protein, das von einer cDNA translatiert wird, die die 5' UTR vor dem ersten ATG-Triplett nicht enthält (Abbildung 3.1 **A, B**). Allerdings sind im Hirn von Mäusen verschiedene Spleißvarianten von TRPC1 nachweisbar. So gibt es Transkripte die das Exon 3 nicht enthalten oder eine so genannte „Epsilon“-Variante, die in Osteoklastenvorläuferzellen identifiziert wurde und der sieben Aminosäuren innerhalb des Exon 5 fehlen (Zhu, Chu et al. 1995; Ong et al. 2013). Um eine veränderte Größe aufgrund einer Spleißvariante auszuschließen, wurde ein TRPC1-Konstrukt kloniert, das sowohl Exon 3 als auch die sieben Aminosäuren in Exon 5 ent-

hält. Dennoch weist das heterolog exprimierte TRPC1-Protein immer noch eine geringere Masse auf als das endogen exprimierte TRPC1. Eine verlangsamte Mobilität in der SDS-PAGE kann auch aufgrund von unterschiedlichen Glykosylierungsmustern zustande kommen, deshalb wurden Glykosylierungsreste durch Inkubation mit PNGase F abgetrennt (Abbildung 3.1 C). Da die Masse von TRPC1 nach der PNGase F-Behandlung unverändert blieb, kam die Frage auf, ob der Translationsstart möglicherweise stromaufwärts des bislang als Initiations-Stelle angenommenen ATG-Tripletts der TRPC1 cDNA liegt. Durch massenspektrometrische Analyse von Hirnmikrosomen der Maus, aus denen TRPC1 mit Hilfe des Antikörpers angereichert worden war, der sich gegen ein potenzielles Epitop der translatierten „5' UTR“ richtete, konnten Peptide, die durch Translation des vormals als 5' UTR bezeichneten Bereichs von TRPC1-VL identifiziert werden (Abbildung 3.1 D). Dieser Fund bestätigt, dass die Translation des endogen gebildeten TRPC1-Proteins an einem stromaufwärts gelegenen, nicht-AUG-Codon der mRNA initiiert. Die 5' UTR von TRPC1 wurde auf potenzielle Startcodons untersucht. Prinzipiell kommen alle Codons, die vom klassischen AUG-Codon um eine Base abweichen für eine nicht-AUG-Translations-Initiation in Frage (Ivanov et al. 2011). Jedoch spielen einige Codons eine eher untergeordnete Rolle und auch ist der Sequenzkontext von hoher Bedeutung. Der Algorithmus preTIS¹ identifiziert Codons, die in einem guten Kontext in der 5' UTR von humanen cDNA-Sequenzen liegen und gibt die Wahrscheinlichkeiten einer Translations-Initiation c mit einem Wert von 0 bis 1 an (Reuter et al. 2016). Hierbei ist ein Wert $\geq 0,9$ als sehr hohe Initiations-Wahrscheinlichkeit, $0,8 \leq c < 0,9$ als hoch und $0,7 \leq c < 0,8$ als moderat eingestuft. Nach Eingabe der humanen TRPC1-Sequenz (NM_001251845.1) wurden in der 5' UTR mehrere potenzielle nicht-ATG-Startcodons gefunden. Mit einem Wahrscheinlichkeitswert von 0,96 erreicht ein CTG-Codon, welches Leucin (L) codiert (L1 in Abbildung 3.2) den höchsten Wert, ein weiteres CTG-Codon (codiert L2) liegt bei 0,89 und ein ACG-Codon, das Threonin (T) codiert, erreicht den Wert 0,72. Weitere Codons stromabwärts in der 5' UTR liegen ebenfalls in einem guten Kontext und erreichen teilweise Werte von bis zu 0,9. Dies war eine weitere Bestätigung, dass eine nicht-AUG-Translations-Initiation vor dem ersten AUG-Codon der mRNA sehr wahrscheinlich ist.

¹<http://service.bioinformatik.uni-saarland.de/pretis/>

In weiteren Experimenten wurden eGFP-Fusionskonstrukte erstellt, die eine Translations-Initiation an der endogenen Initiations-Stelle ermöglichen, da die 5' UTR der TRPC1 cDNA vorhanden ist. Die Konstrukte enthalten auch 180 bp der an das erste ATG anschließenden Sequenz (C1-N-VL, Abbildung 3.2 B). Auf Basis dieses Konstrukts wurden alle potenziellen ATG-ähnlichen Codons mutiert und alle resultierenden Konstrukte auf Western Blots unter Verwendung eines GFP-AK detektiert. Weiterhin wurden die Western Blots ebenfalls mit einem TRPC1-spezifischen AK, 4921, inkubiert, dessen Epitop im vormaligen als 5' UTR beschriebenen Bereich der TRPC1 cDNA liegt (Abbildung 3.2 C). Die Experimente ergeben, dass die Translation von einem ACG-Codon erfolgen kann, somit wäre das endogen im Maushirn gebildete TRPC1-Protein 91 Aminosäuren länger als bisher angenommen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass ebenfalls zwei CTG-Tripletts, die 8 Basentripletts bzw. 13 Basentripletts stromabwärts liegen, Translations-initiierende Codons darstellen, da minimale Massenunterschiede mittels Western Blot nicht aufgelöst werden können. In den massenspektrometrischen Untersuchungen wurden jedoch Peptide identifiziert, die Sequenzen enthalten, die stromaufwärts des zweiten CTG-Codons liegen, was dafür spricht, dass die Translation entweder am ACG-Codon oder dem nächsten stromabwärts gelegenen CTG-Codon beginnt. Das bedeutet, dass das murine TRPC1-Protein, wie es im Maushirn gebildet wird, eine relative Masse von ca. 102000 (900 Aminosäuren) oder ca. 101000 (892 Aminosäuren) aufweist, und damit 91 bzw. 83 Aminosäuren länger als die in den Datenbanken annotierte Version des TRPC1-Proteins (809 Aminosäuren, hier TRPC1-S) ist. TRPC1 wird ebenfalls in Osteoklasten der Maus gebildet und es wurde bereits publiziert, dass diese Zellen höchst wahrscheinlich das erste CTG-Triplett der TRPC1 cDNA als Translations-Start nutzen, so dass ein TRPC1-Protein mit einer relativen Masse von ca. 101000 (892 Aminosäuren) entsteht (Ong et al. 2013).

4.1.2 Funktion von TRPC1-VL

TRPC1 wurde *in vitro* sowie *in vivo* als Untereinheit von heteromultimeren Kanalkomplexen beschrieben. Es wurde mittels Co-Immunpräzipitations-Experimenten in heterologen Expressionsexperimenten gezeigt, dass TRPC1-S, an TRP-Proteine aus verschiedenen TRP-Subfamilien bindet. In dieser Arbeit

wurde die Interaktion von dem N-terminal verlängerten TRPC1-VL, das dem endogen exprimiertem TRPC1 entspricht, mit TRPC3, TRPC4, TRPC5 und TRPV6 nach heterologer Expression gezeigt (Abbildung 3.3). Dies bedeutet, dass TRPC1-VL, genauso wie TRPC1-S, mit den genannten TRP-Kanälen interagieren kann. Die Bindung von TRPC1 beeinflusst die Eigenschaften heteromultimerer Kanalkomplexe. Unter anderem wird TRPC1 in heteromultimeren Kanalkomplexen mit TRPC4 oder TRPC5 eine Verminderung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit zugeschrieben (Storch, Forst, M. Philipp et al. 2012). In HEK-293 Zellen wurde eine Abnahme des TRPV6-vermittelten Stroms durch TRPC1 gezeigt, die durch die Interaktion der N-terminalen Ankyrin-like Domäne von TRPC1 mit TRPV6 und einer einhergehenden Internalisierung von TRPV6 erklärt wurde (Schindl et al. 2012). Allerdings konnte ich mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC)-Messungen an TRPV6 exprimierenden Oozyten bzw. TRPC1-VL und TRPV6 co-exprimierenden Oozyten jedoch keinen Unterschied zeigen (Daten nicht gezeigt). Um mögliche Unterschiede von TRPC1-VL gegenüber TRPC1-S zu identifizieren, wurden stabil TRPC4 cDNA exprimierende Zellen mit beiden TRPC1-Konstrukten transfiziert und anschließend funktionell untersucht (Abbildung 3.4). Es wurde ein Ca-Imaging-Protokoll verwendet, welches für Messungen des TRPC4-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms optimiert wurde. Die Applikation von TG hemmt die Ca^{2+} -Pumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums SERCA. Somit ist die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das endoplasmatische Retikulum (ER) gehemmt, dies führt zu einer Entleerung von Ca^{2+} aus dem ER in das Zytoplasma durch sog. Leckströme. Dies ist durch eine Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Levels im Ca-Imaging durch einen Peak sichtbar. Das Ca^{2+} wird durch plasmamembranständige Pumpen und Ionenaustauscher wieder aus dem Zytoplasma entfernt, weshalb die Ca^{2+} -Konzentration rasch wieder an das ursprüngliche Level angeglichen wird. TG ist über die gesamte Dauer der Messung anwesend, weil die Speicherentleerung aufrecht erhalten werden soll. Durch die leeren Speicher wird die STIM/Orai-Interaktion begünstigt und es kommt zu einer Annäherung des ER-ständigen STIM (stromal interaction molecule) an die plasmamembranständigen, Ca^{2+} -selektiven Orai-Kanäle und dadurch zu einer Aktivierung dieser. Nach Zugabe von Ca^{2+} in die Badlösung wird der speichervermittelter Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) durch die Orai-Kanäle sicht-

bar. Wenn die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration ein gewisses Level erreicht hat, inaktivieren die Orai-Kanäle und die Ca^{2+} -Konzentration nimmt wieder ab, bzw. erreicht eine Gleichgewichtskonzentration. Wenn dieses Level erreicht ist, kann ein TRPC4-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom sichtbar gemacht werden, welcher sonst durch den SOCE maskiert wäre. Für TRPC4-Kanäle ist *in vitro* (Schaefer et al. 2000; H. Kim et al. 2012) und *in vivo* (Tsvilovskyy et al. 2009) gezeigt worden, dass simultane G_i - und G_q -Rezeptor Stimulation eine optimale Aktivierung herbeiführt. Carbachol (CCh), als Analogon zu Acetylcholin, wirkt als Aktivator an den muskarinischen Rezeptoren M_2R und M_3R . In den verwendeten HEK-293 Zelllinien ist der M_2R stabil überexprimiert, während der M_3R endogen vorkommt. In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Co-Expression von TRPC4 und TRPC1 zu einer Hemmung des CCh-induzierten Ca^{2+} -Einstroms in HEK-293 M_2R Zellen führt, dies jedoch beide Konstrukte, TRPC1-S und TRPC1-VL, in gleichem Maße bewirken (Abbildung 3.4). In meinen Experimenten konnte ich keinen Unterschied zwischen dem TRPC1-S, das die meisten früheren Publikationen untersucht hatten, und dem endogen in Maushirn vorkommenden TRPC1-VL nachweisen. TRPC1-S und TRPC1-VL sind in HEK-293 als auch in Cos-7 Zellen nicht in der Plasmamembran nachweisbar (Abbildung 3.6 und 3.7). Auch die Einführung verschiedener Mutationen in TRPC1-S oder -VL beeinflusst nicht die Funktion von TRPC1 (Abbildung 3.10). Es bleibt festzustellen, dass weder TRPC1-S noch TRPC1-VL Effekte zeigen, aus denen sich schließen lässt, dass TRPC1-Proteine alleine einen Ionenkanal bilden. Ein naheliegender Grund könnte darin zu sehen sein, dass beide TRPC1-Varianten nicht in der Plasmamembran überexprimierender Zellen zu detektieren sind. Aus diesem Grund wurde ein chimäres Kanalprotein erstellt, das innerhalb der TRPC4-Sequenz die TRPC1-Pore enthält. Dieses chimäre Protein ist in der Plasmamembran nachweisbar und zeigt erhöhte Leitfähigkeit für Kationen (Abbildung 3.11). Dieser basal erhöhte Strom kommt durch Austausch von Na^+ gegen NMDG zum Erliegen, d.h. Kationen, die durch die TRPC1-Pore permeieren können, sind in diesem Fall Na^+ . Ein weiteres chimäres Konstrukt bestehend aus TRPC4, in das ein längerer Bereich des TRPC1-Proteins kloniert wurde, der sowohl TM-Domäne S5, die putative Porenregion, TM-Domäne S6 als auch die TRP-Domäne enthält, zeigt ebenfalls basal erhöhte Leitfähigkeit nach Expression

in NSC-34 Zellen (Abbildung 3.10). Da es in TRPC1 und TRPC4 exprimierenden Zellen zu einer Plasmamembran-Lokalisierung von TRPC1 kommt und die Stromeigenschaften, vor allem die IV-Kurve, verändert sind, ist davon auszugehen, dass TRPC1 als porenformende Untereinheit in tetrameren Kanal-komplexen aus TRPC4 und TRPC1 vorkommt (Abbildung 3.7 und 3.4). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es keinen Unterschied zwischen TRPC1-S und TRPC1-VL in heteromultimeren Kanal-komplexen mit TRPC4 gibt. Es stellt sich die Frage ob es ein physiologisches Korrelat gibt, d. h. Zellen, die beispielsweise TRPC4 und TRPC1 exprimieren und in denen durch TRPC1 modulierte TRPC4-Ströme nachweisbar sind. In glatten Muskelzellen des Darms wird durch muskarinerge Stimulation ein Kationenstrom (mI_{CAT}) hervorgerufen, der durch Lanthanionen (La^{3+}) verstärkt werden kann, ein typisches Merkmal von TRPC4- oder TRPC5-Kanälen (Zholos und Bolton 1997; T. Hofmann, Schaefer et al. 2000). In einer weiteren Arbeit wurden die für den mI_{CAT} verantwortlichen Kanäle, TRPC4- und in geringem Maße TRPC6, zugeordnet (Tsvilovskyy et al. 2009). Die Ergebnisse meiner Arbeit in Kooperation mit Volodymyr Tsvilovskyy zeigen, dass die Interaktion von TRPC4 mit TRPC1 in den Ileum-Zellen *in vivo* eine Rolle spielt und dass der mI_{CAT} nicht wie zuvor angenommen, allein durch TRPC4 und TRPC6 getragen wird, sondern auch von TRPC1 moduliert wird. Die in dieser Arbeit untersuchten glatten Muskelzellen des Ileums zeigen einen CCh-aktivierten TRPC4/TRPC1 Strom, dessen Einwärts-Komponente nach Deletion von TRPC1 um das zweifache erhöht ist (Abbildung 3.8). Dies spiegelt die Ergebnisse der Experimente nach heterologer Expression in HEK-293 Zellen wider. Interessanterweise wurde in TRPC1-defizienten Mausmodellen bis jetzt nicht über einen Phänotyp im Darm berichtet. Vielmehr scheint es als diene TRPC1 dazu, die TRPC4 Ströme im Ileum zu modulieren und den Ca^{2+} -Einstrom zu regulieren. Denkbar wäre, dass der Organismus je nach Bedarf die TRPC1-Expression steuert, sodass in den Zellen eine größere Diversität des auftretenden mI_{CAT} möglich ist. Bezüglich der Funktion von TRPC1 in Zellen, denen die typischen TRPC1-Interaktionspartner TRPC4 und TRPC5 fehlen, ist wenig bekannt. Solche Zellen sind die von mir verwendeten NSC-34 Zellen (Abbildung 3.10) aber auch primäre, aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten (Ergebnisse von Stefanie Buchholz & Veit Flockerzi). Entsprechend meiner Daten müsste TRPC1

in diesen Zellen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sein. Ob TRPC1 dort tatsächlich als „Leckkanal“ fungiert ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4.2 Diskussion Teil 2: Einfluss von Punktmutationen auf die TRP-Kanalfunktion

Mutationen haben in der Erforschung der Funktion der TRP-Proteine wichtige Erkenntnisse geliefert. Der *Drosophila* TRP-Kanal wurde in einer mutierten Fliege entdeckt, die ein gegenüber WT verändertes Elektoretinogramm nach Lichtreiz zeigt. Die Ursache ist ein Defekt im TRP-Gen dieser Mutante (Hardie und Minke 1992). Auch in Säugern wurden Mutationen in TRP-Genen mit Krankheiten assoziiert. Mutationen im TRPML1-Gen können zu Mukopolidose Typ IV führen, Mutationen in TRPM6, TRPC6, TRPV3 und TRPV4 wurden als ursächlich für die Entstehung von Hypomagnesiämie, Glomerulosklerose, Olmsted-Syndrom und Brachyolmia beschrieben (Sun et al. 2000; Schlingmann et al. 2002; Winn et al. 2005; Asakawa et al. 2006; Rock et al. 2008). Bereits im Jahr 2000 wurden Sequenzbereiche bzw. Aminosäure-Motive beschrieben, die in vielen TRP-Proteinen konserviert sind (Philipp et al. 2000; Flockerzi 2007). Durch gezielte Mutationen solcher Aminosäuren wurden bereits im einzigen TRP-Protein der Hefe, YVC1, Mutanten erhalten, die Veränderungen im Aktivierungsmechanismus aufweisen (Su et al. 2007). Weiterhin ist bekannt, dass der S4-S5 Linker in TRP-Proteinen als Hotspot für Punktmutationen dient, die zumeist eine konstitutive Öffnung des TRP-Kanals bewirken (L. Hofmann, Wang, Zheng et al. 2017). Durch die Publikationen von hoch auflösenden Kanalstrukturen konnten weitere Sequenzbereiche identifiziert werden, die potenziell Einfluss auf die Kanalfunktion haben. Beispielsweise hatte die Veröffentlichung der Struktur eines spannungsabhängigen Kaliumkanals, des Shaker-Kanals K_V1.2, hierbei eine große Bedeutung für die TRP-Forschung (Chen et al. 2010). Shaker-Kanäle verfügen ebenfalls über sechs TM-Domänen und weisen im Bereich der TM-Domänen inklusive der Pore erkennbare Ähnlichkeit mit TRP-Kanälen auf, vor allem im Bereich der Verbindung zwischen der TM-Domänen S4 und S5 (S4-S5 Linker), der TM-Domäne S6 und der nach der S6 gelegenen TRP-Domäne. Durch die Übertragung der Strukturdaten auf verwandte Kanäle (*homology modeling*) konnte beispielsweise auf Basis der K_V1.2-Struktur (PDB-ID: 3LUT) in TRPC4 eine Aminosäure im S6-TRP-Domäne Linker, S623, identifiziert werden, die sich in nächster Nähe eines konservierten Glycins befindet (Beck et al. 2013). Die TRPC4 G503S/C-

Mutation führt zu einer konstitutiven Kanalaktivität welche durch gezielte Mutation der möglicherweise interagierenden Aminosäure, S623A, teilweise aufgehoben werden kann. In den hoch auflösenden Strukturen von TRPV1 und TRPA1 wurde ebenfalls eine räumliche Nähe des S4-S5 Linkers und der TRP-Domäne beobachtet (M. Liao et al. 2013; Paulsen et al. 2015). In den gleichen Arbeiten wurde ebenfalls gezeigt, dass zusätzlich ein Bereich, der sich vor der ersten TM-Domäne S1 (prä S1-Helix) befindet, wiederum in Kontakt mit dem S4-S5 Linker treten kann. Hoch auflösende Strukturen von weiteren TRP-Kanälen bestätigten die räumliche Nähe dieser Domänen (Zubcevic et al. 2016; Saotome et al. 2016; Shen et al. 2016; Jin et al. 2017). Es konnte in TRPV4, mittels *homology modeling* auf Basis der TRPV1-Struktur, eine Bindung zwischen einer Aminosäure des S4-S5 Linkers mit einem konservierten Tryptophan der TRP-Domäne identifiziert werden (Teng et al. 2015). Hierbei führen die einzelnen Mutationen der beteiligten Aminosäuren jeweils zu gesteigerter oder konstitutiver Aktivität des TRPV4-Kanals. Die prä S1-Helix beinhaltet ebenfalls konservierte Aminosäuren, die man TRP-Subfamilien übergreifend findet (Flockerzi 2007). Im TRPP3-Protein wurden in diesem Bereich Deletionsmutanten erzeugt, die einen erheblichen Einfluss auf die Kanalaktivität haben (Zheng et al. 2017, eingereichtes Manuskript). Verantwortlich für diesen Effekt ist ein konserviertes Tryptophan (W), W81, in der prä S1-Helix des TRPP3-Proteins welches, möglicherweise über eine Wechselwirkung seiner π -Elektronen, mit positiv geladenen Aminosäuren der TRP-Domäne interagieren kann. Aus diesem Grund wurde ein besonderer Fokus auf konservierte Aminosäuren gelegt. In dieser Arbeit wurden Mutationen im Bereich der prä S1-Helix, des S4-S5 Linkers, dem Bereich distal S6 und der TRP-Domäne untersucht. Im Detail wurden Mutationen in TRPC1, TRPC4, TRPM4, TRPM8 und TRPV6 untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

4.2.1 Analyse von TRPC1-Mutationen

Ein Kationenstrom oder Ca^{2+} -Einstrom, der durch homomere TRPC1-Kanäle vermittelt wird, konnte durch die in der vorliegenden Arbeit gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Auch die heterologe Expression des N-terminal verlängerten TRPC1-Proteins (TRPC1-VL) führte nicht zu einer messbaren Kanalaktivität. Durch die Stimulation von G-Protein gekoppelten

Tabelle 4.1: Übersicht über TRP-Mutationen und die Effekte auf die Kanalfunktion

TRP-Kanal	Region	Mutation	Methode	Effekt
TRPC1	prä S1-Helix S4-S5 Linker	W351A	Patch Clamp	kein Unterschied zu WT oder Vektor
		G540S	Ca-Imaging	kein Unterschied zu WT oder Vektor
	distal S6*	F556T	Patch Clamp	kein Unterschied zu WT oder Vektor
		V658A	Patch Clamp	kein Unterschied zu WT oder Vektor
		V658Q	Patch Clamp	kein Unterschied zu WT oder Vektor
		V658N	Patch Clamp	möglicherweise Zunahme des Stroms durch Zugabe von 1 μ M EA
TRPC4	TRP-Domäne	E672S	Patch Clamp	kein Unterschied zu WT oder Vektor
		W676A	Patch Clamp	kein Unterschied zu WT oder Vektor
	prä S1-Helix	W314A	Patch Clamp	gesteigerte Aktivität nach Aktivierung mit EA
			Ca-Imaging	gesteigerte Aktivität nach Aktivierung mit CCh/DAMGO
	distal S6*	I617N	Patch Clamp	gesteigerte basale Leitfähigkeit, gesteigerte Aktivität/Leitfähigkeit nach Aktivierung mit EA
			Patch Clamp	gesteigerte basale Aktivität, extrem gesteigerte Aktivität nach Aktivierung mit EA, fehlende Inaktivierung
TRPM4	TRP-Domäne	W635A	Patch Clamp	extrem gesteigerte Aktivität nach Aktivierung mit CCh/DAMGO, fehlende Inaktivierung
			Ca-Imaging	kein Unterschied zu WT
	prä S1-Helix	R639A	Patch Clamp	verminderte Aktivität nach Aktivierung durch 3 μ M intrazelluläres Ca^{2+}
		W680A	Patch Clamp	verminderte Aktivität nach Aktivierung durch 3 μ M intrazelluläres Ca^{2+}
	TRP-Domäne	W681A	Patch Clamp	keine Aktivität nach Aktivierung durch 3 μ M intrazelluläres Ca^{2+}
		W680A+W681A	Patch Clamp	extrem gesteigerte Aktivität nach Aktivierung durch 3 μ M intrazelluläres Ca^{2+} , fehlende Inaktivierung
TRPM8	TRP-Domäne	W1054A	Patch Clamp	gesteigerte Aktivität nach Aktivierung durch 3 μ M intrazelluläres Ca^{2+}
			Patch Clamp	keine Funktion (Menthol)
	prä S1-Helix	R1058A	Patch Clamp	keine Funktion (Menthol)
		F668A	Ca-Imaging	keine Funktion (Menthol)
	TRP-Domäne	W682A	Ca-Imaging	keine Funktion (Menthol)
		W994A	Ca-Imaging	keine Funktion (Menthol)
TRPV6	prä S1-Helix	R998A	Ca-Imaging	gesteigerte basale Aktivität
		W361A	Ca-Imaging	extrem gesteigerte basale Aktivität
	S4-S5 Linker	TEVC		extrem gesteigerte basale Aktivität
		G516S	Ca-Imaging	extrem gesteigerte basale Aktivität
	S6-TRP-Domänen Linker	G516C	Ca-Imaging	extrem gesteigerte basale Aktivität
		D620V	Ca-Imaging	extrem gesteigerte basale Aktivität
	TRP-Domäne	W633A	Ca-Imaging	extrem gesteigerte basale Aktivität
			TEVC	extrem gesteigerte basale Aktivität
			Fluoreszenzmikroskopie	toxisch für Zellen (16-48 h post Transfektion)

* „distal S6“ entspricht dem so genannten „lower gate“ der vorhandenen TRP-Strukturen

Rezeptoren in HEK-293 M₂R Zellen mittels Carbachol (CCh) ließ sich TRPC1-VL, ebenso wie TRPC1-S, nicht aktivieren (Abbildung 3.4 **C**, **D**). Dies ist in Übereinstimmung mit vorhergegangenen Arbeiten, in denen TRPC1-S keine Leitfähigkeit aufwies (Strübing et al. 2001; Alexander Dietrich et al. 2007; Varga-Szabo et al. 2008; Storch, Forst, M. Philipp et al. 2012; Ong et al. 2013). Auf der Suche nach einem TRPC1-Aktivator wurden bekannte TRP-Kanal-Aktivatoren oder Agonisten an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren getestet. Beispielsweise wurden 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG), Allylisothiocyanat (AITC), Adenosintriphosphat (ATP), Histamin oder Thrombin im Rahmen von Ca-Imaging-Messungen appliziert, konnten aber in TRPC1-VL exprimierenden Zellen kein Ca²⁺-Einstrom induzieren (Daten nicht gezeigt). Wie bereits dargestellt wurde, gibt es im S4-S5 Linker ein konserviertes Glycin (Abbildung 3.9), das zu Serin oder Cystein mutiert, in TRPV1, TRPV3, TRPC4, TRPC5 und auch TRPV6 zu konstitutiv offenen Kanälen führt (Boukalova et al. 2010; Xiao et al. 2008; Beck et al. 2013; L. Hofmann, Wang, Beck et al. 2017). Einführung dieser Mutation in TRPC1-VL führt nicht zu einer messbaren Kanalaktivität (Abbildung 3.10 **B**). Die TRPC1-S-Variante, in der ebenfalls das Glycin zu Serin mutiert wurde, konnte auch nach Co-Expression mit TRPC4 keine konstitutiv aktiven Kanäle in der Plasmamembran bilden. Hier wurde lediglich der typische TRPC4/TRPC1-Strom nach CCh-Stimulation gemessen (Daten nicht gezeigt). Denkbar wäre auch, dass nach heterologer Expression in HEK-293 Zellen endogene Faktoren zur Translokation von TRPC1 in die Plasmamembran generell fehlen, sodass eine Plasmamembran-Lokalisierung nicht stattfinden kann. Deshalb wurde TRPC1-VL ebenfalls in einer neuronalen, endogen TRPC1 exprimierenden Zelllinie, NSC-34, exprimiert. Allerdings konnte auch in diesem Zellsystem keine Kanalaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 3.10). Zusätzlich wurden eine Reihe weiterer Mutationen in TRPC1-VL eingeführt, die entweder in der prä S1-Helix, dem S4-S5 Linker, distal S6 oder im Bereich der TRP-Domäne liegen (Abbildung 3.10). Diese Mutationen bewirken in anderen TRP-Kanälen eine teilweise konstitutive Aktivität oder erhöhen die Kanalaktivierung nach Bindung eines Agonisten. Die Mutationen hatten alle keinen Effekt auf die TRPC1-Kanalfunktion (Abbildung 3.10 **C**, **D**).

Mithilfe eines chimären Konstruktes, in dem in TRPC4 die Porenregion

gegen die putative TRPC1-Porensequenz ausgetauscht wurde, konnte ich das chimäre Protein in der Plasmamembran nachweisen (Abbildung 3.11 **B**). Unter der Annahme, dass sich das chimäre TRP-Protein ebenfalls zu funktionsfähigen Tetrameren zusammenlagert und die Porenregion somit hauptsächlich aus TRPC1-Sequenz besteht, wurden *Whole Cell Patch Clamp* Experimente durchgeführt (Abbildung 3.11 **C** und 3.10). Hier konnte der TRPC1-Porenregion eine intrinsische Kationenleitfähigkeit nachgewiesen werden, da die basale Leitfähigkeit gegenüber Vektor transfizierten Zellen erhöht war. Der chimäre Kanal zeigt keine typischen TRPC4-Charakteristika, so konnte er nicht durch EA aktiviert werden. Ebenfalls konnte eine G-Protein-Stimulation mit CCh oder die Applikation von La^{3+} keine Zunahme des Stroms bewirken (Daten nicht gezeigt). Der gemessene Basalstrom des TRPC4-C1-Porenkonstrukts hat eine annähernd lineare IV-Kurve, was auf eine nicht-selektive Leitfähigkeit hindeutet (Abbildung 3.11 **D**).

4.2.2 Analyse von TRPC4-, TRPM4-, TRPM8- und TRPV6-Mutationen

TRPC4 lässt sich über G-Protein vermittelte Stimulation aktivieren oder auch über den Agonisten Englerin A (EA). Ich habe in die Sequenz des TRPC4 drei Mutationen eingebracht, W314A, das in der prä S1-Helix liegt, sowie W635A und R639A, die beide im Bereich der TRP-Domäne liegen. Die Konstrukte wurden exprimiert und mit EA stimuliert (Abbildung 3.19). Die Mutanten wurden mittels *Whole Cell Patch Clamp* charakterisiert. Die W314A-Mutante (prä S1-Helix) zeigte nach EA-Aktivierung einen im Vergleich zu TRPC4 vergrößerten Kationeneinstrom, war aber vor EA-Applikation nicht konstitutiv aktiv. Die W635A-Mutante (TRP-Domäne) zeigte unmittelbar nach Einbruch in die Zelle einen konstitutiven TRPC4-Strom, der sich nach Applikation von EA weiter steigern ließ. Auch mittels Ca-Imaging zeigte die W314A-Mutante in der prä S1-Helix einen gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom nach G-Protein-Stimulation im Vergleich zu nicht modifiziertem TRPC4, was die Ergebnisse des *Whole Cell Patch Clamp* widerspiegelt. Hierbei war in den TRPC4 W635A exprimierenden HEK-293 μ -OR Zellen eine Erhöhung des SOCE (Peak 1) zu beobachten, was durch eine basal erhöhte Aktivität des TRPC4-Kanals be-

dingt sein könnte. Desweiteren ist der durch G-Protein-Aktivierung ausgelöste TRPC4-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom (Peak 2) ebenfalls signifikant größer als bei nicht modifiziertem TRPC4. Die W635A-Mutation hat scheinbar eine fehlende Inaktivierung des TRPC4-Kanals zur Folge, da das Ca^{2+} -Level über die gesamte Dauer der Messung konstant bleibt, während es in TRPC4 WT oder W314A exprimierenden Zellen auf ein Gleichgewichts-Level zurück geht (Abbildung 3.20). Die R639A-Mutante wurde mittels *Whole Cell Patch Clamp* charakterisiert, es konnte kein Unterschied zu TRPC4 WT gemessen werden (Abbildung 3.19).

Eine konstitutive Aktivität äußert sich in Form eines dauerhaft vorliegenden geöffneten Zustands des Ionenkanals, wie es beispielsweise bei der TRPC4 G503S-Mutante der Fall ist. Hier kommt es zu einem massiven Kationen-Einstrom, welcher ab einem gewissen Zeitpunkt toxisch für die Zelle ist und diese abstirbt. Messungen an TRPC4 G503S exprimierenden Zellen konnten somit nur bis zu maximal 24 h nach Transfektion durchgeführt werden. Auch konnte in diesen Kanälen keine zusätzliche Aktivierung durch G-Protein-Stimulation oder La^{3+} ausgelöst werden, da die Kanäle in ihrem maximal geöffneten Zustand vorlagen (Beck et al. 2013). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der Strom der TRPC4 W635A-Mutante schon vor Applikation eines Agonisten eine typische TRPC4-IV-Kurve zeigt, somit konstitutiv aktiv ist, sich jedoch zusätzlich noch weiter aktivieren lässt. Dies bedeutet möglicherweise, dass die W635A-Mutation eine Inaktivierung des geöffneten Kanals erschweren könnte.

Die Aminosäuresequenz am C-terminalen Ende der sechsten TM-Domäne (distal S6) beinhaltet ein konserviertes Motiv, LIAM, dessen Aminosäure-Seitenketten an der Bildung der untersten Verengung der Pore, dem sog. *lower gate*, beteiligt sind (M. Liao et al. 2013). Die Verengung hat eine zentrale Bedeutung im TRP-Kanal, da es den Durchtritt von Kationen im geschlossenen Zustand verhindert. So wurde spekuliert, dass sich der Porendurchmesser durch eine Hydratisierung beispielsweise weitet und somit in einem basal geöffneten Zustand vorliegt (Aryal et al. 2015; Zheng, Hu et al. 2017). Mittels *Whole Cell Patch Clamp* konnte der erwartete Phänotyp in einer TRPC4 I617N-Mutante, die in diesem Motiv verändert ist, beobachtet werden (Abbildung 3.21). Die IV-Kurve des Basalstroms von TRPC4 I617N ist annähernd linear, was auf eine nicht-selektive Leitfähigkeit hindeutet. Des-

halb kann man im Vergleich zu der W635A- oder G503S-Mutante nicht von einer konstitutiven Aktivität sprechen sondern vielmehr von einer Veränderung der Permeabilitätseigenschaften der Pore. Durch EA-Applikation wurde TRPC4 I617N zusätzlich aktiviert, es konnte eine gegenüber TRPC4 WT veränderte IV-Kurve beobachtet werden, die vor allem durch den weniger stark ausgeprägten Mg^{2+} -Block, linearer ist (Schaefer et al. 2000).

TRPM4 ist ein Kationenkanal der nicht durchlässig ist für Ca^{2+} , jedoch intrazellulär durch Ca^{2+} aktiviert wird. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Mutationen mittels *Whole Cell Patch Clamp* überprüft. Es wurden die Mutationen W680A und W681A in der prä S1-Helix als auch eine Doppelmutante, W680A+W681A, untersucht. Desweiteren wurden Mutationen im Bereich der TRP-Domäne, W1054 und R1058, analysiert (Abbildung 3.18). Es zeigt sich, dass in den beiden prä S1-Helix-Mutanten sowohl Einwärts- als auch Auswärtsströme signifikant reduziert sind, während in der Doppelmutante gar kein Strom messbar ist. Die W1054A-Mutante der TRP-Domäne zeigt einen um das ca. 10-fache erhöhten Strom bei ± 80 mV, welcher nur langsam inaktiviert. Vermutlich ist das TRPM4 W1054A-Konstrukt für die HEK-293 Zellen toxisch. Dies kann man vermuten, da man im Western Blot nur geringe Mengen an TRPM4 W1054A-Protein nachweisen kann und bereits 48 h nach Transfektion keine transfizierten Zellen mehr gefunden werden. Eine durch die Mutation hervorgerufene konstitutive Aktivität des Kanals und die damit verbundene massive Depolarisierung der Zellen könnte einen Stressfaktor darstellen und die Zellen würden vermehrt absterben. Ebenfalls die R1058A-Mutation führte zu signifikant erhöhten Strömen im Vergleich zu TRPM4. Im Hinblick auf Kinetik und Inaktivierung sehen diese Ströme dem TRPM4 WT-Strom jedoch sehr ähnlich.

Der TRPM8-Kanal ist permeabel für Kationen und kann deshalb auch mittels Ca-Imaging charakterisiert werden. Um eine Aktivierung bei Raumtemperatur zu unterbinden wurde TRPM8 bei 37 °C gemessen und mit Menthol aktiviert. Es wurden zwei Mutationen in die prä S1-Helix, F668 und W682A, sowie zwei Mutationen in die TRP-Domäne, W994A und R998A, inseriert (Abbildung 3.17). Menthol induziert in TRPM8 transfizierten HEK-293 Zellen normalerweise einen instantanen Ca^{2+} -Anstieg. Im Gegensatz dazu konnte in den untersuchten Mutanten von TRPM8 kein Menthol-induzierter Anstieg der

zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beobachtet werden. Parallel wurden TEVC-Messungen an *Xenopus* Oozyten von Dr. Wang Zheng durchgeführt, die das Ausbleiben des Menthol-induzierten Stroms sowie des spannungs-aktivierten Stroms, in W682A- und R998A-Mutanten bestätigen. Zusammengefasst bedeutet das, dass alle untersuchten Mutationen zum völligen Verlust der Aktivierbarkeit durch Menthol führen. Dieser Effekt könnte jedoch auch darauf zurückzuführen sein, dass die TRPM8-Kanäle nicht mehr in die Plasmamembran gelangen. In *Xenopus* Oozyten wurde, zumindest für TRPM8 W682A und R998A, eine mit TRPM8 WT vergleichbare Oberflächenexpression nachgewiesen (Zheng et al. 2017, eingereichtes Manuskript).

TRPV6 kann durch Absenken der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Medium aktiviert werden. Durch Zugabe von Ca^{2+} ins Medium können TRPV6 exprimierende Zellen dann instantan große Mengen an Ca^{2+} aufnehmen. Der TRPV6-Kanal wird durch intrazelluläres Ca^{2+} wiederum gehemmt. TRPV6 ist unter physiologischen Bedingungen ein Ca^{2+} -selektiver Kanal, der nur permeabel für Na^+ ist, wenn in Gegenwart von Chelatoren keine freien zweiwertigen Ionen im Medium vorhanden sind. In *Xenopus* Oozyten exprimiert, führt der Einstrom von Ca^{2+} zur Aktivierung eines Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Kanals der endogen in Oozyten vorkommt und relativ schnell inaktiviert. Eine sich anschließende Plateau-Phase kann dann der Aktivität von TRPV6 zugeordnet werden (Peng et al. 1999). Ich habe TRPV6 sowohl mittels TEVC in Oozyten als auch mittels Ca-Imaging in HEK-293 Zellen analysiert (Abbildungen 3.14, 3.15 und 3.16). In die TRPV6-Sequenz wurden Mutationen in die prä S1-Helix, W361A, in den S4-S5 Linker, G516S und G516C, in den S6-TRP-Domäne Linker, D620V, als auch im Bereich der TRP-Domäne, W633A, eingeführt. Die Mutation innerhalb der prä S1-Helix führt zu einem erhöhten TRPV6-Strom in Oozyten (Abbildung 3.15) und zu einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vor und nach Ca^{2+} -Zugabe (Abbildung 3.16). Die Mutationen im S4-S5 Linker, G516S und G516C haben sehr ähnliche Effekte, hier ist die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration erhöht und nach Ca^{2+} -Applikation steigt die Ca^{2+} -Konzentration erneut an. Die TRPV6 G516S- oder G516C-Kanäle zeigen keine schnelle Inaktivierung wie man es bei TRPV6 WT-Kanälen beobachten kann (Abbildung 3.14). Die Struktur des S4-S5 Linkers ist in der Kristallstruktur von TRPV6 nicht aufgelöst. Um dennoch eine mög-

liche Erklärung anhand der Kanalkonformation zu finden wurde eine putative helikale Konformation des S4-S5 Linkers angenommen (L. Hofmann, Wang, Beck et al. 2017). Dieses Modell zeigt, dass es durch eine Mutation des G516 zu S oder C zur Ausbildung von polaren Wechselwirkungen mit Aminosäuren aus dem S6-TRP-Domäne Linker oder der TRP-Domäne kommen könnte. Wenn zusätzlich T621 aus dem S6-TRP-Domäne-Linker zu A mutiert wurde, kann der erhöhten konstitutiven Öffnung des Kanals teilweise entgegengewirkt werden. Dies lässt sich aufgrund der fehlenden Interaktion von A621 mit Aminosäuren des S4-S5 Linkers möglicherweise erklären. Die Interaktion des S4-S5 Linkers mit dem S6-TRP-Domäne Linker scheint wichtig zu sein für eine konstitutive Öffnung, da auch in TRPC4 G503S eine Mutation einer Aminosäure des S6-TRP-Domäne Linkers, S623A zu einer partiellen Aufhebung der konstitutiven Aktivität von TRPC4 G503S führt (Beck et al. 2013). Im TRPV6-Protein befindet sich benachbart zu T621 eine geladene Aminosäure, D620. Eine D620V-Mutation führt ebenfalls zu gesteigert konstitutiv offenen TRPV6-Kanälen, ebenso wie eine Mutation innerhalb des TRP-Motivs, W633A (Abbildungen 3.14, 3.15 und 3.16). Die untersuchten Mutationen führen dazu, dass die mutierten TRPV6-Kanäle vermutlich nicht inaktivieren. Man kann vermuten, dass Mutationen in TRPV6, die zu gesteigert konstitutiv offenen und nicht-inaktivierenden Kanälen führen, potenziell toxisch sein müssten. Dies wurde anhand der TRPV6 W633A-Mutante gezeigt: Tatsächlich sterben HEK-293 Zellen, die solch einen veränderten TRPV6-Kanal exprimieren, innerhalb kurzer Zeit ab (Abbildung 3.16).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass konservierte aromatische Aminosäuren in der prä S1-Helix erhebliche Auswirkung auf die Aktivität der entsprechenden Kanäle haben, die Art und Weise der Auswirkung aber ganz unterschiedlich ausfällt: So wirken sich die getesteten prä S1-Helix Tryptophan-Mutationen in TRPM4 und TRPM8 negativ auf die Kanal-Aktivität aus. Analoge Mutationen in TRPP3 führen ebenfalls zum Verlust der Aktivierbarkeit dieser Kanäle (Zheng et al. 2017, eingereichtes Manuskript). Im Gegensatz dazu wird der TRPV6-Kanal durch die Mutation in der prä S1-Helix gesteigert konstitutiv aktiv, während TRPC4 W314A-Kanäle eine erhöhte Aktivität lediglich nach Stimulation durch EA zeigen. Auch Mutationen im S4-S5 Linker führen zu divergierenden Resultaten. Ein Glycin ist im S4-S5 Linker aller Ver-

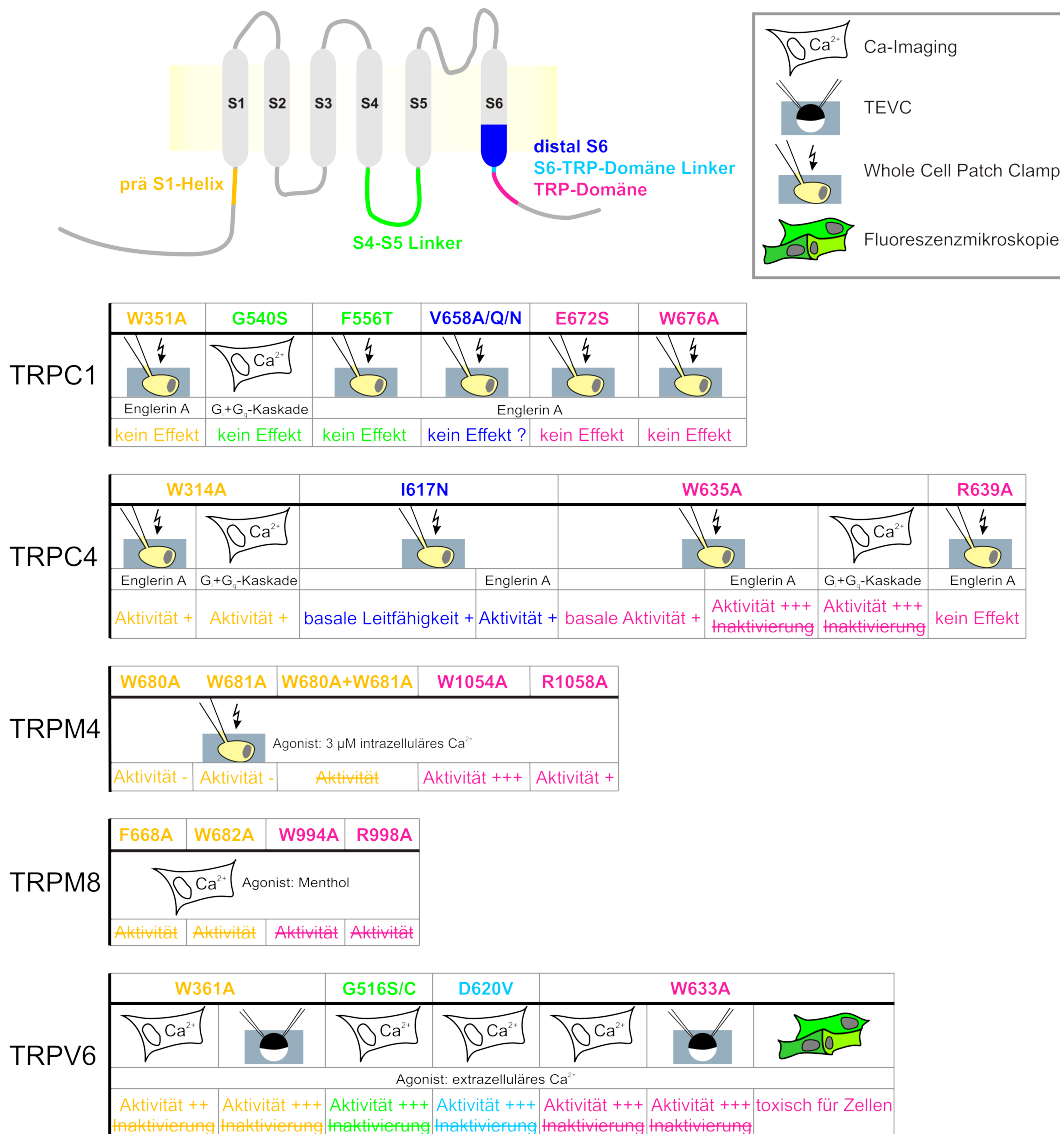


Abbildung 4.1: Übersicht über die in dieser Arbeit eingefügten Mutationen und deren Effekt auf die jeweilige TRP-Kanalfunktion. Die Mutationen sind analog zu den Motiven im TRP-Protein-Schema (oben) farblich unterschieden. Die verwendeten Methoden sind anhand von Piktogrammen gezeigt (Legende oben rechts). Im Schema sind die Effekte der Mutationen in keinen messbaren Effekt (kein Effekt), einen nicht eindeutigen Effekt (keinen Effekt ?), eine Zunahme der Aktivität (+, ++, +++) oder eine verminderte Aktivität (-) im Vergleich zum nicht modifiziertem TRP-Protein unterschieden. Falls keine Aktivität oder keine Inaktivierung nach Mutation auftritt, wurde das Wort durchgestrichen.

treter der TRP C-, V-, A- und M-Subfamilie, sowie in YVC1 von Hefe und ebenfalls in TRP und TRP-like von *Drosophila* konserviert. Wird dieses Glycin mutiert entstehen konstitutiv offene TRPC4-, TRPC5-, TRPV3-, TRPV6- und TRPM3-Kanäle (Beck et al. 2013; Xiao et al. 2008; L. Hofmann, Wang, Beck et al. 2017; L. Hofmann, Wang, Zheng et al. 2017). Wird die entsprechende Aminosäure in TRPM8 mutiert führt dies zu inaktiven und auch nicht durch Menthol stimulierbaren Kanälen (Daten nicht gezeigt). Ebenso führt die Mutation in TRPC1 nicht zu konstitutiv aktiven Kanälen. Da TRPC1 ohne akzessorische TRP-Untereinheit nicht in die Membran gelangt ist dieses Ergebnis zunächst zu erwarten. Aber auch in Gegenwart von TRPC4 zeigt die TRPC1-S G540S-Mutante im S4-S5 Linker keinen Unterschied im Vergleich zu unverändertem TRPC1 (Daten nicht gezeigt). Im Fall des TRPC4-Proteins wurden eine Reihe verschiedener Mutanten im S4-S5 Linker erzeugt, G503 wurde zu Serin, Cystein, Methionin und Alanin mutiert (Beck et al. 2013). Alle Mutationen führen zu konstitutiver Kanalaktivität des TRPC4 Proteins. Vermutlich ist dieser Glycinrest innerhalb des S4-S5 Linkers invariant aufgrund seiner kurzen Seitenkette, die die Kanal-Inaktivierung ermöglicht. Mutationen im Bereich der TM-Domäne S6 bzw. dem TRP-Motiv haben in den meisten untersuchten Proteinen konstitutive Aktivität der entsprechenden Kanäle zur Folge. In TRPV6 führen gleich zwei Mutationen, innerhalb des S6-TRP-Domäne Linkers als auch in der TRP-Domäne zu konstitutiver Aktivität. In der Struktur des TRPV6-Kanals scheint es, als liegen die Tryptophane aus prä S1-Helix und TRP-Domäne in nächster Nähe (Abbildung 4.2). Hier könnte eine π - π -Wechselwirkung beider Aminosäuren möglicherweise stattfinden. Wenn eine der beiden zu A mutiert ist, ist eine Wechselwirkung nicht mehr vorhanden und der Kanal lässt sich möglicherweise nicht mehr regulieren, bzw. inaktivieren. Dies führt dann zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom, der nach einer gewissen Zeit toxisch ist. Eine vergleichbare Interaktion des N- und C-Terminus über Aminosäuren der prä S1-Helix und TRP-Domäne wurde für TRPP3, TRPP2, TRPM8, TRPV1 und TRPC4 nachgewiesen (Zheng et al. 2017, eingereichtes Manuskript). Ein Tryptophan-Rest ist in fast allen TRP-Vertretern in einem hoch konservierten Bereich der TRP-Domäne, genannt TRP-*box*, vorhanden, was eine wichtige Funktion der Aminosäure in den Kanälen suggeriert. Für TRPV4 konnte in einem Modell, das anhand der TRPV1-Struktur gemacht

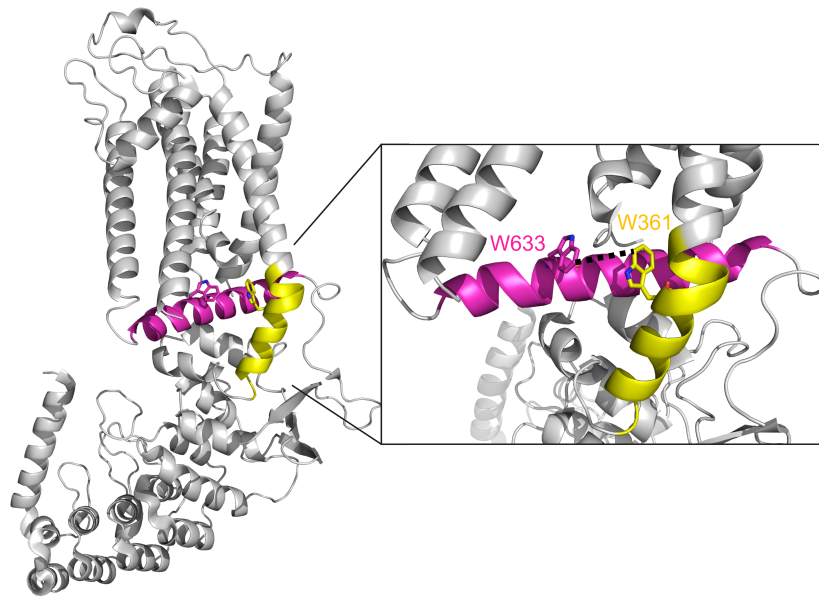


Abbildung 4.2: **Kristallstruktur von TRPV6 von Ratte (5IWK).** Gezeigt ist ein Bändermodell einer TRPV6-Untereinheit (PDB-ID: 5IWK; hervorgehoben sind die prä S1-Helix (gelb) und die TRP-Domäne (magenta); die Tryptophanreste der beiden Domänen, W361 und W633, sind dargestellt und ihr Abstand zueinander beträgt entlang der schwarz gestrichelten Linie 6,21 Angström.

wurde, gezeigt werden, dass das Tryptophan eine Bindung mit einem Leucin (L) im S4-S5 Linker eingeht, um den geschlossenen Zustand zu stabilisieren (Teng et al. 2015). Nach heterologer Expression zeigten die W733-Mutanten eine konstitutive Aktivität, die auf einer fehlenden Inaktivierung beruhte. Eine Mutation des L, L596P, resultierte ebenfalls in einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit des TRPV4-Kanals. Interessanterweise wurde die Mutation L596P, ähnlich wie eine Mutation des konservierten Glycins im S4-S5 Linker von TRPV4, zuvor mit der Krankheit Spondylometaphysärer Dysplasie vom Typ Koslowski in Verbindung gebracht (Dai et al. 2010). Eine Mutation des korrespondierenden Tryptophan der TRP-Domäne in TRPV3 resultiert nach Überexpression in HEK-293 Zellen ebenfalls in einen konstitutiv aktiven Kanal und ist, auch hier neben der Mutation des konservierten Glycins im S4-S5 Linker, als eine der zugrunde liegenden Mutationen bei der Hautkrankheit Olmsted-Syndrom identifiziert worden (Lin et al. 2012). Möglicherweise hat das Tryptophan der TRP-Domäne eine essentielle Funktion und Mutationen haben durch die dadurch ausgelöste, ungebremste Kanalfunktion eine letale Wirkung auf die Zellen, weshalb keine weiteren genetischen Erkrankungen von Lebewesen mit Mutationen dieser Aminosäure in Verbindung gebracht wer-

den können (Teng et al. 2015). In der kürzlich veröffentlichten Struktur von NOMPC, einem TRP-Kanal der in Amphibien und Fischen vorkommt, wird dem entsprechenden Tryptophan in der TRP-Domäne ebenfalls eine zentrale Rolle für die Kanalfunktion zugeschrieben, da eine entsprechende W1572A-Mutation auch hier zu einer gesteigerten basalen Aktivität des NOMPC und einer fehlenden Regulierung durch mechanische Reize führt (Jin et al. 2017). In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass Mutationen des konservierten Tryptophans der TRP-Domäne drastische Auswirkungen auf die Kanalfunktion von TRPC4, TRPM4 und TRPV6 haben. Hierbei kommt es zu einer konstitutiven Aktivität des gebildeten TRP-Kanals und impliziert 1) eine Beteiligung des Tryptophans an der Aufrechterhaltung des geschlossenen Zustands und 2) eine mögliche inter- oder intramolekulare Wechselwirkung mit Aminosäureresten der prä S1-Helix.

4.2.3 Ausblick

Ich habe in meiner Arbeit nachgewiesen, dass die Translations-Initiation des im Maushirn exprimierten TRPC1 von einem nicht-AUG-Codon aus erfolgt, das stromaufwärts des ersten AUG-Codons der TRPC1 mRNA liegt, mit der Konsequenz, dass das TRPC1-Protein eine deutlich höhere Masse aufweist als bisher angenommen. Allerdings konnten keine funktionellen Unterschiede herausgearbeitet werden, die sich aufgrund des verlängerten N-Terminus ergeben. Im Weiteren konnte ich zeigen, dass TRPC1 nach Überexpression in verschiedenen Zellsystemen nicht in die Plasmamembran gelangt. Insofern ist es nicht verwunderlich, dass Mutationen, die in anderen TRP-Kanälen zur konstitutiven Aktivität führen, in TRPC1 keinen Effekt zeigen. TRPC1 kann beispielsweise mit TRPC3, TRPC4 und TRPC5 Multimere bilden und die Gegenwart von TRPC1 verändert dabei die Kanaleigenschaften des Multimers. Beispielsweise weisen TRPC1/TRPC4-Multimere verringerte Ca^{2+} -Einströme auf, im Vergleich zu den TRPC4-Homotetrameren. Ich konnte zeigen, dass die Effekte, die in Überexpressionssystemen gezeigt werden konnten, tatsächlich *in vivo* auftreten. In Myozyten des Ileums sind TRPC4 und TRPC1 exprimiert und in TRPC1-defizienten Zellen können deutlich erhöhte Kationenströme im Vergleich zu Wildtyp Zellen gemessen werden. TRPC1 moduliert als Untereinheit von TRPC4- und TRPC5-Kanälen *in vivo* die ionenleitenden

Eigenschaften dieser heteromeren Kanäle. Die Versuche zeigen aber nicht ob homomere TRPC1-Kanäle eine endogene Leitfähigkeit für Ionen aufweisen - in diesem Sinne stellt sich die Frage ob homomere TRPC1-Komplexe überhaupt als Ionenkanäle fungieren. Ich habe die Frage versucht zu lösen indem ich Chimären aus TRPC4, die die TRPC1-Pore enthalten, exprimiert habe. Die Chimären gelangen in die Plasmamembran und zeigen konstitutive Kationenströme. Insofern ist zu vermuten, dass TRPC1 homomere Ionenkanäle mit einer Leitfähigkeit für Kationen möglicherweise in der Membran des endoplasmatischen Retikulums bilden kann.

Analysiert man die RNA-Faltung der TRPC1 mRNA mit Hilfe eines Programms RNAfold² so ergibt sich, dass im 5' Bereich der RNA, genauer im Bereich des Translations-Starts, sogenannte inverse Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) gefunden werden, die dazu führen könnten, dass die TRPC1-Translation unterdrückt wird. Durch Auffaltung dieser Strukturen und nachfolgender Translation könnte den Zellen dann sehr schnell TRPC1 mRNA zur Verfügung stehen und das daraufhin synthetisierte TRPC1 könnte somit unmittelbar zur Regulation von weiteren in der Zelle vorhandenen Ionenkanälen beitragen. Zusätzlich ist bekannt, dass die Translation an nicht-AUG-Codons wie beispielsweise CUG ohne die kanonische tRNA_i^{Met} ablaufen kann (Starck et al. 2012). Dies kann ebenfalls auf eine unabhängige und möglicherweise auch in Stress-Situationen schnell verfügbare Translation von TRPC1 hindeuten.

Auch hierbei würde, legt man meine Ergebnisse und publizierte Daten zugrunde (Strübing et al. 2001; Storch, Forst, M. Philipp et al. 2012; Belkacemi et al. 2017), TRPC1 die Funktion heteromerer TRPC1-enthaltender TRP-Kanäle in der Plasmamembran negativ modulieren und damit zur weiteren Kontrolle des Ca²⁺-Einstroms in die Zelle beitragen.

²<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>

Kapitel 5

Literaturverzeichnis

5.1 Quellenverzeichnis

- Akbulut, Y., H. J. Gaunt, K. Muraki, M. J. Ludlow, M. S. Amer, A. Bruns, N. S. Vasudev, L. Radtke, M. Willot, S. Hahn, T. Seitz, S. Ziegler, M. Christmann, D. J. Beech und H. Waldmann (2015). “(-)-Englerin A is a potent and selective activator of TRPC4 and TRPC5 calcium channels”. In: *Angewandte Chemie* 54.12, S. 3787–91. DOI: 10.1002/anie.201411511.
- Alfonso, S., O. Benito, S. Alicia, Z. Angelica, G. Patricia, K. Diana und L. Vaca (2008). “Regulation of the cellular localization and function of human transient receptor potential channel 1 by other members of the TRPC family”. In: *Cell Calcium* 43.4, S. 375–87. DOI: 10.1016/j.ceca.2007.07.004.
- Aryal, P., M. S. Sansom und S. J. Tucker (2015). “Hydrophobic gating in ion channels”. In: *J Mol Biol* 427.1, S. 121–30. DOI: 10.1016/j.jmb.2014.07.030.
- Asakawa, M., T. Yoshioka, T. Matsutani, I. Hikita, M. Suzuki, I. Oshima, K. Tsukahara, A. Arimura, T. Horikawa, T. Hirasawa und T. Sakata (2006). “Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents”. In: *J Invest Dermatol* 126.12, S. 2664–72. DOI: 10.1038/sj.jid.5700468.
- Atwood, B. K., J. Lopez, J. Wager-Miller, K. Mackie und A. Straiker (2011). “Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis”. In: *BMC Genomics* 12, S. 14. DOI: 10.1186/1471-2164-12-14.

- Bandell, M., A. E. Dubin, M. J. Petrus, A. Orth, J. Mathur, S. W. Hwang und A. Patapoutian (2006). "High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol". In: *Nat Neurosci* 9.4, S. 493–500. DOI: 10.1038/nn1665.
- Becerra, S. P., J. A. Rose, M. Hardy, B. M. Baroudy und C. W. Anderson (1985). "Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 82.23, S. 7919–23.
- Beck, A., T. Speicher, C. Stoerger, T. Sell, V. Dettmer, S. A. Jusoh, A. Abdulmughni, A. Cavalie, S. E. Philipp, M. X. Zhu, V. Helms, U. Wissenbach und V. Flockerzi (2013). "Conserved Gating Elements in TRPC4 and TRPC5 Channels". In: *The Journal of biological chemistry*. DOI: 10.1074/jbc.M113.478305.
- Belkacemi, T., A. Niermann, L. Hofmann, U. Wissenbach, L. Birnbaumer, P. Leidinger, C. Backes, E. Meese, A. Keller, X. Bai, A. Scheller, F. Kirchhoff, S. E. Philipp, P. Weissgerber, V. Flockerzi und A. Beck (2017). "TRPC1- and TRPC3-dependent Ca^{2+} signaling in mouse cortical astrocytes affects injury-evoked astrogliosis in vivo". In: *Glia* 65.9, S. 1535–1549. DOI: 10.1002/glia.23180.
- Berbey, C., N. Weiss, C. Legrand und B. Allard (2009). "Transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) operates as a sarcoplasmic reticulum calcium leak channel in skeletal muscle". In: *The Journal of biological chemistry* 284.52, S. 36387–94. DOI: 10.1074/jbc.M109.073221.
- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov und P. E. Bourne (2000). "The Protein Data Bank". In: *Nucleic Acids Res* 28.1, S. 235–42.
- Bimboim, HC und J2 Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". In: *Nucleic acids research* 7.6, S. 1513–1523.
- Boukalova, S., L. Marsakova, J. Teisinger und V. Vlachova (2010). "Conserved residues within the putative S4-S5 region serve distinct functions among thermosensitive vanilloid transient receptor potential (TRPV) channels". In: *J Biol Chem* 285.53, S. 41455–62. DOI: 10.1074/jbc.M110.145466.

- Broker-Lai, J., A. Kollwe, B. Schindeldecker, J. Pohle, V. Nguyen Chi, I. Mathar, R. Guzman, Y. Schwarz, A. Lai, P. Weissgerber, H. Schwegler, A. Dietrich, M. Both, R. Sprengel, A. Draguhn, G. Kohr, B. Fakler, V. Flockerzi, D. Bruns und M. Freichel (2017). “Heteromeric channels formed by TRPC1, TRPC4 and TRPC5 define hippocampal synaptic transmission and working memory”. In: *EMBO J.* DOI: 10.15252/embj.201696369.
- Cashman, N. R., H. D. Durham, J. K. Blusztajn, K. Oda, T. Tabira, I. T. Shaw, S. Dahrouge und J. P. Antel (1992). “Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons”. In: *Dev Dyn* 194.3, S. 209–21. DOI: 10.1002/aja.1001940306.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine und D. Julius (1997). “The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway”. In: *Nature* 389.6653, S. 816–24. DOI: 10.1038/39807.
- Chen, X., Q. Wang, F. Ni und J. Ma (2010). “Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement”. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107.25, S. 11352–7. DOI: 10.1073/pnas.1000142107.
- Cheng, K. T., X. Liu, H. L. Ong, W. Swaim und I. S. Ambudkar (2011). “Local Ca^{2+} entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca^{2+} signals required for specific cell functions”. In: *PLoS Biol* 9.3, e1001025. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001025.
- Chung, C. T., S. L. Niemela und R. H. Miller (1989). “One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution”. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86.7, S. 2172–5.
- Corey, D. P., J. Garcia-Anoveros, J. R. Holt, K. Y. Kwan, S. Y. Lin, M. A. Vollrath, A. Amalfitano, E. L. Cheung, B. H. Derfler, A. Duggan, G. S. Geleoc, P. A. Gray, M. P. Hoffman, H. L. Rehm, D. Tamasauskas und D. S. Zhang (2004). “TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells”. In: *Nature* 432.7018, S. 723–30. DOI: 10.1038/nature03066.
- Cosens, D. J. und A. Manning (1969). “Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant”. In: *Nature* 224.5216, S. 285–7.
- Crick, F. H. (1966). “Codon–anticodon pairing: the wobble hypothesis”. In: *J Mol Biol* 19.2, S. 548–55.

- Cui, M., P. Honore, C. Zhong, D. Gauvin, J. Mikusa, G. Hernandez, P. Chandran, A. Gomtsyan, B. Brown, E. K. Bayburt, K. Marsh, B. Bianchi, H. McDonald, W. Niforatos, T. R. Neelands, R. B. Moreland, M. W. Decker, C. H. Lee, J. P. Sullivan und C. R. Faltynek (2006). "TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists". In: *J Neurosci* 26.37, S. 9385–93. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1246-06.2006.
- Dai, J., O. H. Kim, T. J. Cho, M. Schmidt-Rimpler, H. Tonoki, K. Takikawa, N. Haga, K. Miyoshi, H. Kitoh, W. J. Yoo, I. H. Choi, H. R. Song, D. K. Jin, H. T. Kim, H. Kamasaki, P. Bianchi, G. Grigelioniene, S. Nampoothiri, M. Minagawa, S. I. Miyagawa, T. Fukao, C. Marcelis, M. C. Jansweijer, R. C. Hennekam, F. Bedeschi, A. Mustonen, Q. Jiang, H. Ohashi, T. Furuichi, S. Unger, B. Zabel, E. Lausch, A. Superti-Furga, G. Nishimura und S. Ikegawa (2010). "Novel and recurrent TRPV4 mutations and their association with distinct phenotypes within the TRPV4 dysplasia family". In: *J Med Genet* 47.10, S. 704–9. DOI: 10.1136/jmg.2009.075358.
- Dietrich, A., M. Fahlbusch und T. Gudermann (2014). "Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator?" In: *Cells* 3.4, S. 939–62. DOI: 10.3390/cells3040939.
- Dietrich, Alexander, Hermann Kalwa, Ursula Storch, Michael Mederos y Schnitzler, Birgit Salanova, Olaf Pinkenburg, Galyna Dubrovskaya, Kirill Essin, Maik Gollasch und Lutz Birnbaumer (2007). "Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1". In: *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 455.3, S. 465–477.
- Dong, X. P., X. Cheng, E. Mills, M. Delling, F. Wang, T. Kurz und H. Xu (2008). "The type IV mucopolidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel". In: *Nature* 455.7215, S. 992–6. DOI: 10.1038/nature07311.
- Du, J., X. Ma, B. Shen, Y. Huang, L. Birnbaumer und X. Yao (2014). "TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel". In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. DOI: 10.1096/fj.14-251652.
- Duncan, L. M., J. Deeds, J. Hunter, J. Shao, L. M. Holmgren, E. A. Woolf, R. I. Tepper und A. W. Shyjan (1998). "Down-regulation of the novel gene

- melastatin correlates with potential for melanoma metastasis". In: *Cancer Res* 58.7, S. 1515–20.
- Fecher-Trost, C., U. Wissenbach, A. Beck, P. Schalkowsky, C. Stoerger, J. Doerr, A. Dembek, M. Simon-Thomas, A. Weber, P. Wollenberg, T. Ruppert, R. Middendorff, H. H. Maurer und V. Flockerzi (2013). "The in vivo TRPV6 protein starts at a non-AUG triplet decoded as methionine upstream the canonical initiation at AUG". In: *The Journal of biological chemistry*. DOI: 10.1074/jbc.M113.469726.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold und M. Danielsen (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84.21, S. 7413–7.
- Flockerzi, V. (2007). "An introduction on TRP channels". In: *Handbook of experimental pharmacology* 179, S. 1–19. DOI: 10.1007/978-3-540-34891-7_1.
- Freichel, M., S. H. Suh, A. Pfeifer, U. Schweig, C. Trost, P. Weissgerber, M. Biel, S. Philipp, D. Freise, G. Droogmans, F. Hofmann, V. Flockerzi und B. Nilius (2001). "Lack of an endothelial store-operated Ca^{2+} current impairs agonist-dependent vasorelaxation in $\text{TRP4}^{-/-}$ mice". In: *Nat Cell Biol* 3.2, S. 121–7. DOI: 10.1038/35055019.
- Gallivan, J. P. und D. A. Dougherty (1999). "Cation-pi interactions in structural biology". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96.17, S. 9459–64.
- Gavva, N. R., J. J. Treanor, A. Garami, L. Fang, S. Surapaneni, A. Akrami, F. Alvarez, A. Bak, M. Darling, A. Gore, G. R. Jang, J. P. Kesslak, L. Ni, M. H. Norman, G. Palluconi, M. J. Rose, M. Salfi, E. Tan, A. A. Romanovsky, C. Banfield und G. Davar (2008). "Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans". In: *Pain* 136.1-2, S. 202–10. DOI: 10.1016/j.pain.2008.01.024.
- Gross, S. A., G. A. Guzman, U. Wissenbach, S. E. Philipp, M. X. Zhu, D. Bruns und A. Cavalie (2009). "TRPC5 is a Ca^{2+} -activated channel functionally coupled to Ca^{2+} -selective ion channels". In: *J Biol Chem* 284.49, S. 34423–32. DOI: 10.1074/jbc.M109.018192.

- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann und F. J. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". In: *Pflügers Arch* 391.2, S. 85–100.
- Hann, S. R., M. W. King, D. L. Bentley, C. W. Anderson und R. N. Eisenman (1988). "A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas". In: *Cell* 52.2, S. 185–95.
- Hardie, R. C. und B. Minke (1992). "The trp gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in Drosophila photoreceptors". In: *Neuron* 8.4, S. 643–51.
- Hofmann, L., H. Wang, A. Beck, U. Wissenbach und V. Flockerzi (2017). "A conserved gating element in TRPV6 channels". In: *Cell Calcium* 63, S. 24–28. DOI: 10.1016/j.ceca.2016.10.003.
- Hofmann, L., H. Wang, W. Zheng, S. E. Philipp, P. Hidalgo, A. Cavalié, X. Z. Chen, A. Beck und V. Flockerzi (2017). "The S4—S5 linker - gearbox of TRP channel gating". In: *Cell Calcium, in Druck*. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.04.002.
- Hofmann, Thomas, Alexander G Obukhov, Michael Schaefer, Christian Harteneck, Thomas Gudermann und Günter Schultz (1999). "Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol". In: *Nature* 397.6716, S. 259–263.
- Hofmann, Thomas, Michael Schaefer, Günter Schultz und Thomas Gudermann (2000). "Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry". In: *Journal of molecular medicine* 78.1, S. 14–25.
- (2002). "Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.11, S. 7461–7466.
- Ingolia, N. T., L. F. Lareau und J. S. Weissman (2011). "Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes". In: *Cell* 147.4, S. 789–802. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.002.

- Islam, Md. Shahidul (2011). *Transient Receptor Potential Channels*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Dordrecht Heidelberg London New York: Springer Science+Business Media.
- Ivanov, I. P., A. E. Firth, A. M. Michel, J. F. Atkins und P. V. Baranov (2011). “Identification of evolutionarily conserved non-AUG-initiated N-terminal extensions in human coding sequences”. In: *Nucleic acids research* 39.10, S. 4220–34. DOI: 10.1093/nar/gkr007.
- Jin, P., D. Bulkley, Y. Guo, W. Zhang, Z. Guo, W. Huynh, S. Wu, S. Meltzer, T. Cheng, L. Y. Jan, Y. N. Jan und Y. Cheng (2017). “Electron cryo-microscopy structure of the mechanotransduction channel NOMPC”. In: *Nature* 547.7661, S. 118–122. DOI: 10.1038/nature22981.
- Kim, H., J. Kim, J. P. Jeon, J. Myeong, J. Wie, C. Hong, H. J. Kim, J. H. Jeon und I. So (2012). “The roles of G proteins in the activation of TRPC4 and TRPC5 transient receptor potential channels”. In: *Channels (Austin)* 6.5, S. 333–43. DOI: 10.4161/chan.21198.
- Kim, M. S., W. Zeng, J. P. Yuan, D. M. Shin, P. F. Worley und S. Muallem (2009). “Native Store-operated Ca^{2+} Influx Requires the Channel Function of Orai1 and TRPC1”. In: *Journal of Biological Chemistry* 284.15, S. 9733–9741. DOI: 10.1074/jbc.M808097200.
- Kim, S., H. Nie, V. Nesin, U. Tran, P. Outeda, C. X. Bai, J. Keeling, D. Maskey, T. Watnick, O. Wessely und L. Tsiokas (2016). “The polycystin complex mediates Wnt/ Ca^{2+} signalling”. In: *Nat Cell Biol* 18.7, S. 752–764. DOI: 10.1038/ncb3363.
- Kozak, M. (1981). “Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes”. In: *Nucleic Acids Res* 9.20, S. 5233–52.
- (1987). “At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells”. In: *J Mol Biol* 196.4, S. 947–50.
- Liao, Maofu, Erhu Cao, David Julius und Yifan Cheng (2013). “Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy”. In: *Nature* 504.7478, S. 107–112. DOI: 10.1038/nature12822.
- Liao, Y., C. Erxleben, J. Abramowitz, V. Flockerzi, M. X. Zhu, D. L. Armstrong und L. Birnbaumer (2008). “Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC mo-

- del for SOCE/ I_{crac} channels". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105.8, S. 2895–900. DOI: 10.1073/pnas.0712288105.
- Lin, Z., Q. Chen, M. Lee, X. Cao, J. Zhang, D. Ma, L. Chen, X. Hu, H. Wang, X. Wang, P. Zhang, X. Liu, L. Guan, Y. Tang, H. Yang, P. Tu, D. Bu, X. Zhu, K. Wang, R. Li und Y. Yang (2012). "Exome sequencing reveals mutations in TRPV3 as a cause of Olmsted syndrome". In: *Am J Hum Genet* 90.3, S. 558–64. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.02.006.
- Lintschinger, B., M. Balzer-Geldsetzer, T. Baskaran, W. F. Graier, C. Rominin, M. X. Zhu und K. Groschner (2000). "Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca^{2+} -sensitive cation channels". In: *The Journal of biological chemistry* 275.36, S. 27799–805. DOI: 10.1074/jbc.M002705200.
- M. Scharltl M. Gessler, A. von Eckardstein (2009). *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. Elsevir GmbH, Muenchen.
- Ma, X., J. Cao, J. Luo, B. Nilius, Y. Huang, I. S. Ambudkar und X. Yao (2010). "Depletion of intracellular Ca^{2+} stores stimulates the translocation of vanilloid transient receptor potential 4-c1 heteromeric channels to the plasma membrane". In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30.11, S. 2249–55. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.212084.
- Malarkannan, S., T. Horng, P. P. Shih, S. Schwab und N. Shastri (1999). "Presentation of out-of-frame peptide/MHC class I complexes by a novel translation initiation mechanism". In: *Immunity* 10.6, S. 681–90.
- McKemy, D. D., W. M. Neuhauser und D. Julius (2002). "Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation". In: *Nature* 416.6876, S. 52–8. DOI: 10.1038/nature719.
- Miesenbock, G. (2012). "Synapto-pHluorins: genetically encoded reporters of synaptic transmission". In: *Cold Spring Harb Protoc* 2012.2, S. 213–7. DOI: 10.1101/pdb.ip067827.
- Minke, B. (1977). "Drosophila mutant with a transducer defect". In: *Biophys Struct Mech* 3.1, S. 59–64.
- (1982). "Light-induced reduction in excitation efficiency in the trp mutant of Drosophila". In: *J Gen Physiol* 79.3, S. 361–85.
- Minke, B., C. Wu und W. L. Pak (1975). "Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in Drosophila mutant". In: *Nature* 258.5530, S. 84–7.

- Mochizuki, T., G. Wu, T. Hayashi, S. L. Xenophontos, B. Veldhuisen, J. J. Saris, D. M. Reynolds, Y. Cai, P. A. Gabow, A. Pierides, W. J. Kimberling, M. H. Breuning, C. C. Deltas, D. J. Peters und S. Somlo (1996). "PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein". In: *Science* 272.5266, S. 1339–42.
- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels". In: *Sci STKE* 2005.272, re3. DOI: 10.1126/stke.2722005re3.
- Montell, C., K. Jones, E. Hafen und G. Rubin (1985). "Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation". In: *Science* 230.4729, S. 1040–3.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction". In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, S. 263–73.
- Okada, T., R. Inoue, K. Yamazaki, A. Maeda, T. Kurosaki, T. Yamakuni, I. Tanaka, S. Shimizu, K. Ikenaka, K. Imoto und Y. Mori (1999). "Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca^{2+} -permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor". In: *J Biol Chem* 274.39, S. 27359–70.
- Ong, E. C., V. Nesin, C. L. Long, C. X. Bai, J. L. Guz, I. P. Ivanov, J. Abramowitz, L. Birnbaumer, M. B. Humphrey und L. Tsiokas (2013). "A TRPC1-dependent pathway regulates osteoclast formation and function". In: *The Journal of biological chemistry*. DOI: 10.1074/jbc.M113.459826.
- Paulsen, C. E., J. P. Armache, Y. Gao, Y. Cheng und D. Julius (2015). "Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms". In: *Nature* 525.7570, S. 552. DOI: 10.1038/nature14871.
- Peabody, D. S. (1987). "Translation initiation at an ACG triplet in mammalian cells". In: *J Biol Chem* 262.24, S. 11847–51.
- (1989). "Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells". In: *The Journal of biological chemistry* 264.9, S. 5031–5.
- Peier, A. M., A. Moqrich, A. C. Hergarden, A. J. Reeve, D. A. Andersson, G. M. Story, T. J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan und A. Patapoutian (2002). "A TRP channel that senses cold stimuli and menthol". In: *Cell* 108.5, S. 705–15.

- Peng, J. B., X. Z. Chen, U. V. Berger, P. M. Vassilev, H. Tsukaguchi, E. M. Brown und M. A. Hediger (1999). "Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption". In: *J Biol Chem* 274.32, S. 22739–46.
- Perez, C. A., L. Huang, M. Rong, J. A. Kozak, A. K. Preuss, H. Zhang, M. Max und R. F. Margolskee (2002). "A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells". In: *Nat Neurosci* 5.11, S. 1169–76. DOI: 10.1038/nn952.
- Philipp, S., A. Cavalie, M. Freichel, U. Wissenbach, S. Zimmer, C. Trost, A. Marquart, M. Murakami und V. Flockerzi (1996). "A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL". In: *EMBO J* 15.22, S. 6166–71.
- Philipp, S, U Wissenbach und V Flockerzi (2000). "Molecular biology of calcium channels". In: *Calcium signaling CRC Press, New York*, S. 321–342.
- Prats, H., M. Kaghad, A. C. Prats, M. Klagsbrun, J. M. Lelias, P. Liauzun, P. Chalon, J. P. Tauber, F. Amalric, J. A. Smith und et al. (1989). "High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86.6, S. 1836–40.
- Reuter, K., A. Biehl, L. Koch und V. Helms (2016). "PreTIS: A Tool to Predict Non-canonical 5' UTR Translational Initiation Sites in Human and Mouse". In: *PLoS Comput Biol* 12.10, e1005170. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005170.
- Rock, M. J., J. Prenen, V. A. Funari, T. L. Funari, B. Merriman, S. F. Nelson, R. S. Lachman, W. R. Wilcox, S. Reyno, R. Quadrelli, A. Vaglio, G. Owsianik, A. Janssens, T. Voets, S. Ikegawa, T. Nagai, D. L. Rimoin, B. Nilius und D. H. Cohn (2008). "Gain-of-function mutations in TRPV4 cause autosomal dominant brachyolmia". In: *Nat Genet* 40.8, S. 999–1003. DOI: 10.1038/ng.166.
- Saiki, Randall K, David H Gelfand, Susanne Stoffel, Stephen J Scharf, Russell Higuchi, Glenn T Horn, Kary B Mullis und Henry A Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". In: *Science* 239.4839, S. 487–491.

- Saotome, K., A. K. Singh, M. V. Yelshanskaya und A. I. Sobolevsky (2016). "Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6". In: *Nature* 534.7608, S. 506–11. DOI: 10.1038/nature17975.
- Schaefer, Michael, Timothy D Plant, Alexander G Obukhov, Thomas Hofmann, Thomas Gudermann und Günter Schultz (2000). "Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5". In: *Journal of Biological Chemistry* 275.23, S. 17517–17526.
- Schindl, R., R. Fritsch, I. Jardin, I. Frischauf, H. Kahr, M. Muik, M. C. Riedl, K. Groschner und C. Romanin (2012). "Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca^{2+} influx". In: *The Journal of biological chemistry* 287.42, S. 35612–20. DOI: 10.1074/jbc.M112.400952.
- Schlingmann, K. P., S. Weber, M. Peters, L. Niemann Nejsum, H. Vitzthum, K. Klingel, M. Kratz, E. Haddad, E. Ristoff, D. Dinour, M. Syrrou, S. Nielsen, M. Sassen, S. Waldegger, H. W. Seyberth und M. Konrad (2002). "Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family". In: *Nat Genet* 31.2, S. 166–70. DOI: 10.1038/ng889.
- Schwab, S. R., K. C. Li, C. Kang und N. Shastri (2003). "Constitutive display of cryptic translation products by MHC class I molecules". In: *Science* 301.5638, S. 1367–71. DOI: 10.1126/science.1085650.
- Shen, P. S., X. Yang, P. G. DeCaen, X. Liu, D. Bulkley, D. E. Clapham und E. Cao (2016). "The Structure of the Polycystic Kidney Disease Channel PKD2 in Lipid Nanodiscs". In: *Cell* 167.3, 763–773 e11. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.048.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid". In: *Anal Biochem* 150.1, S. 76–85.
- Starck, S. R., V. Jiang, M. Pavon-Eternod, S. Prasad, B. McCarthy, T. Pan und N. Shastri (2012). "Leucine-tRNA initiates at CUG start codons for protein synthesis and presentation by MHC class I". In: *Science* 336.6089, S. 1719–23. DOI: 10.1126/science.1220270.

- Storch, U., A. L. Forst, F. Pardatscher, S. Erdogmus, M. Philipp, M. Gregoritz, Y. Schnitzler M. Mederos und T. Gudermann (2017). “Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol”. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 114.1, E37–E46. DOI: 10.1073/pnas.1612263114.
- Storch, U., A. L. Forst, M. Philipp, T. Gudermann und M. Mederos y Schnitzler (2012). “Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes”. In: *The Journal of biological chemistry* 287.5, S. 3530–40. DOI: 10.1074/jbc.M111.283218.
- Story, G. M., A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan und A. Patapoutian (2003). “ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures”. In: *Cell* 112.6, S. 819–29.
- Strotmann, R., C. Harteneck, K. Nunnenmacher, G. Schultz und T. D. Plant (2000). “OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity”. In: *Nat Cell Biol* 2.10, S. 695–702. DOI: 10.1038/35036318.
- Strübing, C., G. Krapivinsky, L. Krapivinsky und D. E. Clapham (2001). “TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain”. In: *Neuron* 29.3, S. 645–55.
- (2003). “Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain”. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.40, S. 39014–39019.
- Su, Z., X. Zhou, W. J. Haynes, S. H. Loukin, A. Anishkin, Y. Saimi und C. Kung (2007). “Yeast gain-of-function mutations reveal structure-function relationships conserved among different subfamilies of transient receptor potential channels”. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104.49, S. 19607–12. DOI: 10.1073/pnas.0708584104.
- Sun, M., E. Goldin, S. Stahl, J. L. Falardeau, J. C. Kennedy, Jr. Acierno J. S., C. Bove, C. R. Kaneski, J. Nagle, M. C. Bromley, M. Colman, R. Schiffmann und S. A. Slaugenhaupt (2000). “Mucopolidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel”. In: *Hum Mol Genet* 9.17, S. 2471–8.

- Tarentino, A. L., C. M. Gomez und Jr. Plummer T. H. (1985). "Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F". In: *Biochemistry* 24.17, S. 4665–71.
- Teng, J., S. H. Loukin, A. Anishkin und C. Kung (2015). "L596-W733 bond between the start of the S4-S5 linker and the TRP box stabilizes the closed state of TRPV4 channel". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 112.11, S. 3386–91. DOI: 10.1073/pnas.1502366112.
- Tsavaler, L., M. H. Shapero, S. Morkowski und R. Laus (2001). "Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins". In: *Cancer Res* 61.9, S. 3760–9.
- Tsvilovskyy, Volodymyr V, Alexander V Zholos, Thomas Aberle, Stephan E Philipp, Alexander Dietrich, Michael X Zhu, Lutz Birnbaumer, Marc Freichel und Veit Flockerzi (2009). "Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo". In: *Gastroenterology* 137.4, S. 1415–1424. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.06.046.
- Varga-Szabo, David, Kalwant S Authi, Attila Braun, Markus Bender, Archana Ambily, Sheila R Hassock, Thomas Gudermann, Alexander Dietrich und Bernhard Nieswandt (2008). "Store-operated Ca^{2+} entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1". In: *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 457.2, S. 377–387.
- Venkatachalam, K. und C. Montell (2007). "TRP channels". In: *Annu Rev Biochem* 76, S. 387–417. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- Voet, Donald, Judith G. Voet und Charlotte W. Pratt (2010). *Lehrbuch der Biochemie*. Bd. 2. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH.
- Voets, T., G. Droogmans, U. Wissenbach, A. Janssens, V. Flockerzi und B. Nilius (2004). "The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels". In: *Nature* 430.7001, S. 748–54. DOI: 10.1038/nature02732.
- Weissgerber, P., U. Kriebs, V. Tsvilovskyy, J. Olausson, O. Kretz, C. Stoerger, R. Vennekens, U. Wissenbach, R. Middendorff, V. Flockerzi und M. Freichel (2011). "Male fertility depends on Ca^{2+} absorption by TRPV6 in epididymal epithelia". In: *Sci Signal* 4.171, ra27. DOI: 10.1126/scisignal.2001791.

- Wes, P. D., J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten und C. Montell (1995). "TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel". In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92.21, S. 9652–6.
- Wettschureck, N. und S. Offermanns (2005). "Mammalian G proteins and their cell type specific functions". In: *Physiol Rev* 85.4, S. 1159–204. DOI: 10.1152/physrev.00003.2005.
- Winn, M. P., P. J. Conlon, K. L. Lynn, M. K. Farrington, T. Creazzo, A. F. Hawkins, N. Daskalakis, S. Y. Kwan, S. Ebersviller, J. L. Burchette, M. A. Pericak-Vance, D. N. Howell, J. M. Vance und P. B. Rosenberg (2005). "A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis". In: *Science* 308.5729, S. 1801–4. DOI: 10.1126/science.1106215.
- Wissenbach, U., M. Boddling, M. Freichel und V. Flockerzi (2000). "Trp12, a novel Trp related protein from kidney". In: *FEBS Lett* 485.2-3, S. 127–34. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)02212-2.
- Xiao, R., J. Tian, J. Tang und M. X. Zhu (2008). "The TRPV3 mutation associated with the hairless phenotype in rodents is constitutively active". In: *Cell Calcium* 43.4, S. 334–43. DOI: 10.1016/j.ceca.2007.06.004.
- Zhang, Y., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, K. L. Mueller, B. Cook, D. Wu, C. S. Zuker und N. J. Ryba (2003). "Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways". In: *Cell* 112.3, S. 293–301.
- Zheng, W., R. Cai, L. Hofmann, V. Nesin, Q. Hu, X. Liu, S. Hussein, T. Kong, J. Li, J. Tang, V. Flockerzi, L. Tsiokas und X. Z. Chen (2017). "Direct preS1-TRP domain binding in TRP channels mediates gating and functional regulation by PIP2". In:
- Zheng, W., R. Hu, R. Cai, L. Hofmann, Q. Hu, M. Fatehi, W. Long, T. Kong, J. Tang, P. Light, V. Flockerzi, Y. Cao und X. Z. Chen (2017). "Identification and characterization of hydrophobic pore gates in TRP channels". In: *FASEB journal, in Druck*.
- Zheng, W., J. Yang, E. Beauchamp, R. Cai, S. Hussein, L. Hofmann, Q. Li, V. Flockerzi, L. G. Berthiaume, J. Tang und X. Z. Chen (2016). "Regulation of TRPP3 Channel Function by N-terminal Domain Palmitoylation and

- Phosphorylation". In: *J Biol Chem* 291.49, S. 25678–25691. DOI: 10.1074/jbc.M116.756544.
- Zholos, Alexander V und Thomas B Bolton (1997). "Muscarinic receptor subtypes controlling the cationic current in guineapig ileal smooth muscle". In: *British journal of pharmacology* 122.5, S. 885–893.
- Zhu, X., P. B. Chu, M. Peyton und L. Birnbaumer (1995). "Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene". In: *FEBS Lett* 373.3, S. 193–8. DOI: 10.1016/0014-5793(95)01038-G.
- Zhu, X., M. Jiang und L. Birnbaumer (1998). "Receptor-activated Ca^{2+} influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca^{2+} entry". In: *J Biol Chem* 273.1, S. 133–42.
- Zitt, Christof, Andrea Zobel, Alexander G Obukhov, Christian Harteneck, Frank Kalkbrenner, Andreas Lückhoff und Günter Schultz (1996). "Cloning and functional expression of a human Ca^{2+} -permeable cation channel activated by calcium store depletion". In: *Neuron* 16.6, S. 1189–1196.
- Zubcevic, L., Jr. Herzik M. A., B. C. Chung, Z. Liu, G. C. Lander und S. Y. Lee (2016). "Cryo-electron microscopy structure of the TRPV2 ion channel". In: *Nat Struct Mol Biol* 23.2, S. 180–186. DOI: 10.1038/nsmb.3159.

5.2 Eigene Veröffentlichungen

- Belkacemi, T., A. Niermann, L. Hofmann, U. Wissenbach, L. Birnbaumer, P. Leidinger, C. Backes, E. Meese, A. Keller, X. Bai, A. Scheller, F. Kirchhoff, S. E. Philipp, P. Weissgerber, V. Flockerzi und A. Beck (2017). “TRPC1- and TRPC3-dependent Ca^{2+} signaling in mouse cortical astrocytes affects injury-evoked astrogliosis in vivo”. In: *Glia* 65.9, S. 1535–1549. DOI: 10.1002/glia.23180.
- Hofmann, L., H. Wang, A. Beck, U. Wissenbach und V. Flockerzi (2017). “A conserved gating element in TRPV6 channels”. In: *Cell Calcium* 63, S. 24–28. DOI: 10.1016/j.ceca.2016.10.003.
- Hofmann, L., H. Wang, W. Zheng, S. E. Philipp, P. Hidalgo, A. Cavalié, X. Z. Chen, A. Beck und V. Flockerzi (2017). “The S4—S5 linker - gearbox of TRP channel gating”. In: *Cell Calcium, in Druck*. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.04.002.
- Zheng, W., R. Hu, R. Cai, L. Hofmann, Q. Hu, M. Fatehi, W. Long, T. Kong, J. Tang, P. Light, V. Flockerzi, Y. Cao und X. Z. Chen (2017). “Identification and characterization of hydrophobic pore gates in TRP channels”. In: *FASEB journal, in Druck*.
- Zheng, W., J. Yang, E. Beauchamp, R. Cai, S. Hussein, L. Hofmann, Q. Li, V. Flockerzi, L. G. Berthiaume, J. Tang und X. Z. Chen (2016). “Regulation of TRPP3 Channel Function by N-terminal Domain Palmitoylation and Phosphorylation”. In: *J Biol Chem* 291.49, S. 25678–25691. DOI: 10.1074/jbc.M116.756544.

5.3 Eingereichte Manuskripte

- Zheng, W., R. Cai, L. Hofmann, V. Nesin, Q. Hu, X. Liu, S. Hussein, T. Kong, J. Li, J. Tang, V. Flockerzi, L. Tsiokas und X. Z. Chen (2017). “Direct preS1-TRP domain binding in TRP channels mediates gating and functional regulation by PIP2”. In:

Abbildungsverzeichnis

1.1	TRP-Kanäle aus Mammalia	2
2.1	Sequenzausschnitt der chimären Konstrukte TRPC1-VL-C4-Pore, TRPC4-C1-Pore und TRPC4-C1-Region	31
3.1	Endogenes TRPC1 von Maus zeigt einen verlängerten N-Terminus	51
3.2	Identifizierung des Translations-initiierenden Codons der TRPC1 cDNA	53
3.3	TRPC1-VL bildet Multimere mit TRPC3, TRPC4, TRPC5 und TRPV6	56
3.4	TRPC1 hemmt den TRPC4-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom	59
3.5	Aktivierung von G_i -gekoppelten Rezeptoren führt zu einer In- hibition des speichervermittelten Ca^{2+} -Einstroms	60
3.6	TRPC1-VL als auch TRPC1-S sind nicht in der Plasmamem- bran nachweisbar	61
3.7	TRPC1-VL ist nach Co-Expression mit TRPC4 in der Plas- mamembran nachweisbar	62
3.8	Physiologische Rolle von endogen exprimiertem TRPC1 und TRPC4 in glatten Muskelzellen des Ileums	64
3.9	Alignment des S4-S5 Linkers von murinen TRP-Proteinen . . .	66
3.10	Charakterisierung verschiedener TRPC1-VL-Mutanten	67
3.11	Die TRPC1-Pore weist eine Leitfähigkeit für Kationen auf . . .	69
3.12	Schematische Darstellung des chimären Konstrukts TRPC4-C1- Region	70
3.13	Untersuchung eines chimären Porenkonstrukts TRPC1-VL-C4- Pore mittels Ca-Imaging	71

3.14 Funktionelle Charakterisierung von TRPV6-Mutanten mit Mutationen im S4-S5 Linker und der TRP-Domäne	73
3.15 Charakterisierung von TRPV6-Mutanten in <i>Xenopus</i> Oozyten .	76
3.16 Charakterisierung von TRPV6-Mutanten W361A und W633A in HEK-293 Zellen	78
3.17 Charakterisierung von TRPM8-Mutanten in HEK-293 Zellen . .	81
3.18 Funktionelle Charakterisierung der TRPM4-Mutanten	83
3.19 Funktionelle Charakterisierung von TRPC4-Mutanten mittels <i>Whole Cell Patch Clamp</i>	85
3.20 Funktionelle Charakterisierung der TRPC4-Mutanten mittels Ca-Imaging	87
3.21 Funktionelle Untersuchung einer TRPC4-Mutation in der TM-Domäne S6	89
4.1 Übersicht über die in dieser Arbeit eingefügten Mutationen und deren Effekt auf die jeweilige TRP-Kanalfunktion	107
4.2 Kristallstruktur von TRPV6 von Ratte (5IWK)	109

Tabellenverzeichnis

2.1	Vektoren	23
2.2	Primer	24
2.3	Temperaturprofil der PCR	27
2.4	Reaktionsansatz der PCR	28
2.5	Restriktionsansatz	28
2.6	Plasmidliste	33
2.7	Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele	39
2.8	Deglykosylierungsansatz	42
4.1	Übersicht über TRP-Mutationen und die Effekte auf die Kanal- funktion	100

Danksagung

Mein Dank gilt besonders Veit Flockerzi für die Betreuung, die Möglichkeit eine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen sowie die Aufnahme in das Graduiertenkolleg IRTG 1830. Dies hat, mit dem Kanadaaufenthalt, den vielen Workshops und internationalen Meetings meine fachliche als auch persönliche Entwicklung sehr stark vorangetrieben. Danke sagen möchte ich vor allem Ulrich Wissenbach, der mich fachlich und menschlich über die gesamte Zeit begleitet hat und mir sehr viele wertvolle Tipps mit auf den Weg gegeben hat. Danke, für das korrigieren der Arbeit. Andreas Beck danke ich besonders, dass er sich immer viel Zeit genommen hat um mir diverse Techniken beizubringen und jederzeit ein offenes Ohr hatte. Herzlichen Dank geht an Karin Wolske, für die Unterstützung in allen Lebenslagen und dass du mir gezeigt hast wie der Hase im Labor läuft. Ich danke ebenfalls Heidi Löhr, Sandra Plant, Christine Wesely, Stefanie Buchholz, Martin Simon-Thomas, Ute Soltek und Claudia Ecker für fachlich-technischen Rat und Tat über die gesamte Zeit. Für das tolle Arbeitsklima Danke ich ALLEN Mitarbeitern der Pharmakologie und besonders Lorenz, Sandra, Mona, Barbara, Thabet, Ahsan, Alex, Anouar, Teqiyya, Mahnaz, Manuel, sowie den ehemaligen Kollegen Christof, Janka, Pascal und Nouma. Herzlichen Dank an Gabi Amoroso, die sich im Rahmen des IRTG 1830 immer für mich stark gemacht hat. Special thanks to my co-supervisor Dr. Chen und Dr. Wang Zheng for the warm welcome in Canada and the exciting collaboration projects. Ich Danke meinen Eltern und meiner Familie, ohne deren konstante Unterstützung ich nicht soweit gekommen wäre. Danke an meine Freunde, die mir soviel Kraft geben und das Leben lebenswert machen. Bedanken möchte ich mich vor allem bei meinem Fabian, dass ich mich immer auf ihn verlassen kann und für die Hilfe mit dem LaTeX.