

**Die physiologische Rolle
von TRPC6 und G_{q/11}-gekoppelten
Rezeptoren in der glatten
Gefäßmuskulatur**



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Ursula Storch

aus Fulda

Marburg/ Lahn 2008

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
16.01.2008 angenommen.

Erstgutachter:	Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein
Zweitgutachter:	Prof. Dr. T. Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung am 25.02.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Calciumregulation in glatten Muskelzellen.....	8
1.2 Calciumfreisetzung in glatten Muskelzellen.....	9
1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	10
1.3.1 Isoformen der G-Protein- α -Untereinheiten.....	11
1.3.2 Die Rolle von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Gefäß.....	12
1.4 TRP-Kanäle.....	15
1.4.1 Identifizierung und Charakterisierung der TRP-Superfamilie.....	15
1.4.2 Die Struktur der TRP-Kanäle.....	17
1.4.3 Funktionelle Eigenschaften der TRP-Kanäle.....	17
1.4.4 Die physiologische Funktion von TRP-Kanälen.....	18
1.4.5 Die Rolle der TRPC-Kanäle in der glatten Muskulatur.....	20
1.5 Myogener Gefäßtonus.....	23
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Materialien.....	27
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.2 Reagenzien und Enzyme.....	27
2.1.3 Agonisten und Pharmaka.....	28
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Zellkultur.....	29
2.2.2 Transfektionen.....	30
2.2.3 Isolation von glatten Muskelzellen aus Gehirn- und Nierenarterien.....	31
2.2.4 Fluorimetrische Calciummessungen und Manganquencher.....	33
2.2.5 Elektrophysiologie.....	35
2.2.6 Bestimmung der Inositolphosphatproduktion.....	39
2.2.7 Messung des myogenen Gefäßtonus.....	39
2.2.8 Statistik.....	40
3 Ergebnisse	42
3.1 Elektrophysiologische Analyse von TRPC-Strömen in glatten Muskelzellen von Gehirnarterien aus Wildtyp- und TRPC6-gendefizienten Mäusen.....	42
3.1.1 Charakterisierung der SAG-Aktivierung.....	42
3.1.2 Vergleich der Stromantworten von glatten Muskelzellen aus Wildtyp- und aus TRPC6-gendefizienten Mäusen.....	44
3.1.3 Messungen des Membranpotentials.....	49

3.2	Mechanosensitivität $G_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptoren.....	50
3.2.1	Calciumanstieg und Manganestrom durch osmotisch bedingte Membrandehnung.....	50
3.2.2	Osmotisch bedingte Membrandehnung aktiviert TRPC3-, 6- und 7-Kanäle	54
3.2.3	Direkte Membrandehnung induziert die Aktivierung von TRPC6.....	56
3.2.4	TRPC6-Kanäle sind nicht klassisch mechanosensitiv	57
3.2.5	Membrandehnung erhöht die Produktion von Inositolphosphaten.....	60
3.2.6	Membrandehnung aktiviert die Phospholipasen C und G-Proteine	61
3.2.7	Endogene Rezeptortyrosinkinasen sind nicht an der Aktivierung durch Membrandehnung beteiligt	63
3.2.8	$G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren sind involviert in die Mechanosensorik.....	64
3.2.9	Rolle der vasokonstriktorisches $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren in der Mechanosensorik.....	68
3.2.10	Überexpression von $AT_{1A}R$ in A7r5-Zellen führt zu Aktivierungen durch Membrandehnung.....	73
3.2.11	Ermittlung der für eine Mechanosensitivität erforderlichen AT_1 -Rezeptordichte.....	75
3.2.12	Membrandehnung aktiviert endogene AT_1R in glatten Muskelzellen aus renalen Widerstandsarterien.....	77
3.2.13	Losartan reduziert den myogenen Gefäßtonus	78
4	Diskussion.....	80
4.1	TRPC-defiziente Mausmodelle	80
4.2	Überexpression von TRPC3 in $TRPC6^{-/-}$ -Mäusen	81
4.3	Physiologische Relevanz der TRPC3-Überexpression.....	82
4.4	Heteromultimerisierungspotential	83
4.5	Myogener Gefäßtonus in Gehirnarterien von $TRPC6^{-/-}$ -Mäusen.....	84
4.6	Potentielle Mechanosensoren.....	85
4.6.1	Intrazelluläre Strukturen.....	85
4.6.2	Integrale Membranproteine.....	85
4.6.3	Mechanosensitive Ionenkanäle in glatten Muskelzellen	87
4.6.4	Enzyme	88
4.7	Vergleich verschiedener Stimuli zur Membrandehnung	88
4.8	Fehlende Mechanosensitivität des TRPC6.....	91
4.9	Agonistenunabhängige Aktivierungen von GPCRs	93
4.10	Folgen der Rezeptorkonformationsänderung durch Membrandehnung	95
4.10.1	β -Arrestinrekrutierung	95
4.10.2	Myogener Gefäßtonus	96
4.11	Rezeptordichte.....	98
5	Zusammenfassung	101
	Literaturverzeichnis	104
	Eigene Publikationen.....	122
	Erklärung	124

Danksagung..... 125

Abkürzungsverzeichnis

A7r5	glatte Muskelzelllinie aus der thorakalen Aorta der Ratte
ADP	Adenosindiphosphat
AT _{1A} R	Angiotensin II AT _{1A} -Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer
BSA	bovines Serumalbumin
C-	Carboxyl-
[Ca ²⁺] _i	freie zytosolische Calciumionenkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca _v	spannungsgesteuerter L-Typ Calciumkanal
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cmH ₂ O	cm Wassersäule
COS-7	Zelllinie aus dem Nierengewebe von Grünen Meerkatzen
DAG	Diacylglycerol
DPH	Diphenhydramin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“, grün fluoreszierendes Protein
ET _A R	Endothelin-A-Rezeptor
EYFP	„enhanced yellow fluorescent protein“, gelb fluoreszierendes Protein
F	Farad
FCS	fötales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GDP	Guanosindiphosphat
gp	aus dem Meerschweinchen
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	human

H ₁ R	Histamin-1-Rezeptor
HEK293	„human embrionic kidney cells“, Zelllinie aus humanen, embryonalen Nierenzellen
IP	Inositolphosphat
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRES	„internal ribosome entry site“
M	molar
m	aus der Maus
M ₅ R	muskarinischer M ₅ -Rezeptor
MLCK	„myosin light chain kinase“, Myosin-leichte-Ketten-Kinase
mmHg	mm Quecksilbersäule
mRNA	„messenger RNA“, Boten-RNA
N	Newton
N-	Amino-
Oligonukleotid	oligomeres Desoxyribonukleotid
Osm	Osmolarität
p	Plasmid-
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
pIRES2-EGFP	bicistronisches Vektorplasmid, das für EGFP kodiert
PLC	Phospholipase C
r	aus der Ratte
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	„receptor-operated channel“, rezeptorgesteuerter Kanal
S	Siemens
SERCA	„smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPase“
siRNA	„small interfering“ Ribonukleinsäure
SOC	„store-operated channel“, speichergesteuerter Kanal
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TRP	„transient receptor potential channel“
TRPC/M/V	„transient receptor potential canonical/melastatin/vanilloid channel“
V	Volt

1 Einleitung

Die glatte Muskulatur regelt die Organfunktion des Organismus, während die quergestreifte Skelettmuskulatur in erster Linie der Lokomotion dient. Insbesondere sind Hohlorgane wie Blutgefäße, Blase, Uterus, Lunge und der Gastrointestinaltrakt mit glatter Muskulatur ausgestattet, die dazu dient, den Tonus dieser Organe zu regulieren. Hierfür gibt es zwei Paradebeispiele: die Magen-Darm-Peristaltik sowie die Blutdruckregulation. Der Blutdruck wird sowohl durch das Herzzeitvolumen als auch durch den peripheren Gefäßwiderstand bestimmt. Der periphere Gefäßwiderstand wird durch die Arteriolen und die terminalen Arterien bestimmt und kann durch das Hagen-Poiseuille'sche Gesetz beschrieben werden. Der Gefäßwiderstand ist hierbei umgekehrt proportional zum Gesamtradius der parallel geschalteten Arteriolen in der vierten Potenz. Diese Gefäßradien werden durch den Kontraktionszustand der glatten Muskulatur in der Arterien- bzw. Arteriolenwand eingestellt.

Ein durch Fehlregulationen verstärkter Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskulatur führt zu einem erhöhten Gefäßtonus und somit zu einem Blutdruckanstieg, der pathophysiologische Konsequenzen haben kann wie Arteriosklerose, Angina pectoris und koronare Herzkrankheit. Diese kardiovaskulären Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in der westlichen Welt dar. Daher ist es wichtig, die Mechanismen zur Regulation der Gefäßkontraktilität zu verstehen, um neue therapeutische Ansätze zur Bekämpfung dieser Krankheiten zu finden.

1.1 Calciumregulation in glatten Muskelzellen

Freie zytosolische Calciumionen sind wichtige intrazelluläre Botenstoffe in glatten Muskelzellen und steuern deren Kontraktion. Die zytosolische Konzentration von freiem Calcium beträgt im Ruhezustand ca. 10 bis 100 nM. Im Vergleich dazu erreichen die Konzentrationen außerhalb der Zellen oder in den intrazellulären Calciumspeichern wie dem endo- bzw. sarkoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien 1,8 bis 2 mM. Der niedrige intrazelluläre Calciumspiegel wird durch plasmamembranäre Natrium-Calciumaustauscher oder unter Aufwand von Energie aufrechterhalten, sowohl über plasmamembranäre Calciumpumpen (Calcium-ATPasen), die Calcium in den Extrazellulärraum pumpen als auch über sarkoplasmatische Calciumpumpen (SERCA), die Calcium aus dem Zytosol in intrazelluläre Speicher transportieren sowie über cytoplasmatisch vorliegende calciumbindende Proteine.

Ein Anstieg der freien zytosolischen Calciumionenkonzentration im Bereich von 0,3 bis 1 μM ist ausreichend für eine glattmuskuläre Zellkontraktion. Dieser Calciumanstieg wird verursacht durch eine Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und durch einen Calciumeinstrom über die Zellmembran. In glatten Muskelzellen erfolgt der Calciumanstieg hauptsächlich über den Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle. Dieser Calciumanstieg schaltet die Kontraktionsmaschinerie an, indem die Calmodulin-Proteine von jeweils bis zu vier Calciumionen gebunden werden, die dann als Calcium-Calmodulin-Komplexe die Myosin-leichte-Ketten-Kinasen („myosin light chain kinase“) aktivieren, die die leichten Ketten am Myosinkopf phosphorylieren. Dadurch werden die Myosinköpfe aktiviert und interagieren mit den Aktinfilamenten, worauf es nach der Gleitfilament-Theorie zur Verkürzung der glatten Muskelzelle kommt.

1.2 Calciumfreisetzung in glatten Muskelzellen

Obwohl der Anteil der freigesetzten Calciumionen an dem Calciumanstieg gering ist, besitzt die Signalkaskade, die zur Freisetzung führt, eine Schlüsselfunktion für den Calciumeinstrom. Die Signalkaskade beginnt mit Rezeptoren in der Zellmembran, die die Phospholipase C (PLC) aktivieren (Abbildung 1.1). Dazu gehören Tyrosinkinase-rezeptoren, die die PLC-Isoform γ aktivieren, und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die die PLC-Isoform β aktivieren. Die aktivierte PLC spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die beiden intrazellulären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 bindet an IP_3 -Rezeptoren, die als ligandenoperierte Calciumkanäle fungieren, in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums und führt dort zur Calciumfreisetzung. Das freigesetzte DAG kann in der Zelle verschiedene Effektorsysteme anschalten. Einerseits stimuliert es bekannterweise die Proteinkinase C, andererseits kann es direkt unselektive Kationenkanäle in der Plasmamembran aktivieren, wie z.B. die „transient receptor potential canonical“(TRPC)-Kanäle. Diese Kanäle leiten Natrium- und Calciumionen, wobei die Calciumselektivität gering ist. Vor allem die Natriumpermeation führt in erster Linie zu einer Membrandepolarisation, die die Offenwahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Calciumkanäle (Ca_v) erhöht, so dass vermehrt Calcium einströmt und die Kontraktionsmaschinerie anschaltet. Die TRPC-Kanäle triggern somit die Ca_v -Kanäle (Gudermann et al., 2004).

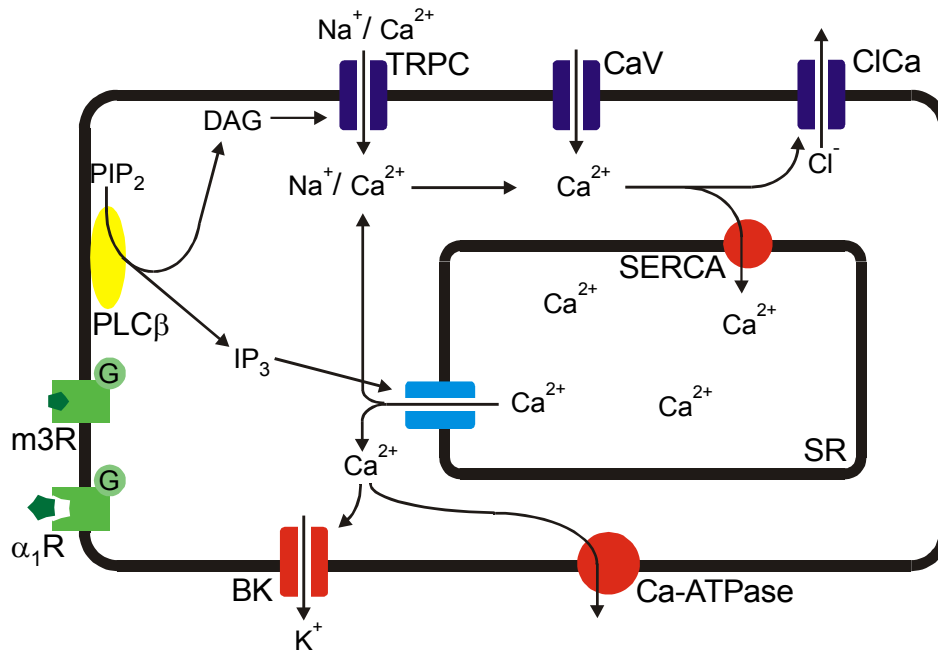


Abbildung 1.1: Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration in glatten Muskelzellen. G_{q/11}-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie muskarinische Acetylcholinrezeptoren (m3R) und α₁-Adrenozeptoren (α₁R) aktivieren die Phospholipase C-β (PLC β), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die beiden intrazellulären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und in Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren an der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), die als Calciumkanäle fungieren und eine Calciumfreisetzung aus dem SR bewirken. Der zweite intrazelluläre Botenstoff DAG kann direkt membranständige TRPC („transient receptor potential canonical“-)Kanäle aktivieren, so dass ein Natrium- und Calciumeinstrom ausgelöst wird, der eine Membrandepolarisation verursachen kann. Diese Membrandepolarisation erhöht die Offenwahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Calciumkanäle (Ca_vs), so dass ein massiver Calciumeinstrom stattfindet und somit die Kontraktionsmaschinerie der glatten Muskelzellen in Gang gesetzt wird. Weitere Kanäle wie die calciumaktivierbaren Chloridkanäle, spielen eine Rolle für die Stabilisierung der Membrandepolarisation. Außerdem werden durch den Calciumanstieg BK_{Ca}-Kanäle (calciumaktivierbare „Big“ Kalium-Kanäle) aktiviert, die zur Repolarisation der Zelle beitragen (Thorneloe und Nelson, 2005). Um die niedrige freie zytosolische Calciumkonzentration von ca. 100 nM wiederherzustellen, muss Calcium aus dem Zytosol herausgepumpt werden. Dies geschieht sowohl durch die plasmamembranären Natrium-Calciumaustauscher, als auch unter Energieverbrauch durch die „smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPasen“ (SERCA), die Calcium wieder in das SR zurückpumpen, und durch die plasmamembranären Calcium-ATPasen, die Calciumionen nach außen transportieren.

1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) werden codiert von einer der größten Genfamilien mit mehr als tausend Genen (Bockaert und Pin, 1999). Die gemeinsamen Strukturmerkmale der GPCRs sind sieben Transmembrandomänen mit extrazellulärem N- und intrazellulärem C-Terminus. Ihre natürlichen Agonisten sind strukturell sehr unterschiedliche Substanzen wie Aminosäuren, biogene Amine, Lipide, Nukleotide,

Peptidhormone und viele mehr (Civelli, 2005; Vassilatis et al., 2003). Mit Hilfe von GPCRs sind Sinneszellen in der Lage, extrazelluläre Stimuli zu perzipieren, so dass Licht-, Geruchs- und Geschmacksreize transduziert, transformiert und prozessiert werden können. Alle GPCRs haben die Fähigkeit, heterotrimere Guanosintriphosphat (GTP)-hydrolysierende Proteine, sprich G-Proteine, an ihrer intrazellulären Seite zu binden. Diese Proteine bestehen die aus einer α -Untereinheit, die GTP bindet und hydrolysiert und aus einem Komplex aus je einer β - und γ -Untereinheit (Hamm, 1998; Wettschureck und Offermanns, 2005).

In Abwesenheit eines Agonisten befindet sich der G-Protein-gekoppelte Rezeptor im nicht-aktiven Konformationszustand, bei dem der heterotrimere G-Proteinkomplex mit Guanosindiphosphat (GDP) an der intrazellulären Seite des Rezeptors gebunden ist. Nach Bindung eines Agonisten katalysiert der Rezeptor den Austausch von GDP durch GTP an der α -Untereinheit im heterotrimeren G-Proteinkomplex, der anschließend in die G-Protein- α -GTP- und in die G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert oder sich nur umgruppiert (Bunemann et al., 2003). Diese beiden Untereinheiten können jeweils unabhängig verschiedene intrazelluläre Effektorsysteme aktivieren.

Der aktive und der nicht-aktive Konformationszustand der Rezeptoren liegen in einem thermodynamischen Gleichgewichtszustand vor, d.h. dass agonistenungebundene Rezeptoren G-Proteine aktivieren können. Diese G-Proteinaktivierung in Abwesenheit eines Agonisten wird als basale Rezeptoraktivität bezeichnet. Nur inverse Agonisten haben das Potential, die basale Rezeptoraktivität vollständig zu unterdrücken. Antagonisten beeinflussen diese Basalaktivität nicht, sondern können nur durch die Verdrängung von Agonisten Rezeptoraktivierungen verhindern.

1.3.1 Isoformen der G-Protein- α -Untereinheiten

Von den heterotrimeren G-Proteinen sind verschiedene Isoformen bekannt. Die ubiquitär vorkommenden α -Untereinheiten werden in vier Familien eingeteilt: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$.

1. Durch Aktivierung der G-Protein- α_s -Untereinheit wird die Adenylylzyklase aktiviert und dadurch wird die Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) gesteigert. Der intrazelluläre cAMP-Anstieg bewirkt eine Aktivierung von cAMP-abhängigen Proteinkinasen, z.B. vom Typ A (PKAs). Die PKAs phosphorylieren Serine oder Threonine von weiteren Effektorproteinen. In der glatten Muskulatur wird G_s -abhängig die Myosin-leichte-Ketten-Kinase phosphoryliert, wodurch die Sensitivität der Kontraktionsmaschinerie für Calcium verringert wird, was in einer Muskelzellrelaxation mündet.

2. Eine Aktivierung der $G_{i/o}$ -Proteine führt im Gegensatz dazu zur Inhibierung der Adenylzyklase und dadurch zu einer Muskelzellkontraktion. $G_{i/o}$ -Proteine sind sensitiv gegenüber Pertussistoxin, einem von *Bordetella pertussis* produzierten Toxin mit einer Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosyltransferase-Aktivität (Locht und Antoine, 1995). Die Übertragung einer ADP-Ribosegruppe auf ein C-terminales Cystein der α_i -Untereinheit bewirkt, dass sich die G-Protein- α_i -Untereinheit nicht mehr an den Rezeptor binden kann. Somit ist der Rezeptor vom G-Protein entkoppelt.
3. Die dritte ubiquitär vorkommende Familie beinhaltet die $G_{q/11}$ -Proteine. Diese Proteine aktivieren über ihre α -Untereinheit die PLC- β . Dabei werden wie in Kapitel 1.2 genauer beschrieben, aus PIP_2 die intrazellulären Botenstoffe IP_3 und DAG gebildet, die eine calciumabhängige Muskelzellkontraktion bewirken.
4. Die vierte Familie der $G_{12/13}$ -Proteine aktiviert die GTPase RhoA, die zur Ras-Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine gehört. Zu den Effektoren der RhoA gehören die Rho-abhängigen Proteinkinasen, bestehend aus Rho-Kinase und Proteinkinase N, die beide bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts eine Rolle spielen (Leung et al., 1995). Die Rho-Kinase phosphoryliert eine regulatorische Untereinheit der Myosin-Phosphatase, woraus eine Aktin-Myosin-Interaktion und damit eine Muskelzellkontraktion resultiert. Daneben wirkt die Rho-Kinase über Phosphorylierung der leichten Kette auf das Myosin selbst, was wiederum zu einer verstärkten Aktin-Myosin-Interaktion führt, so dass es zu einer calciumunabhängigen verspäteten und lang anhaltenden Konstriktion der glatten Muskulatur kommt (Hersch et al., 2004).

1.3.2 Die Rolle von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Gefäß

Im Gefäßsystem können GPCRs sowohl vasokonstriktorisch als auch vasodilatatorisch wirken (Wettschureck und Offermanns, 2005). Hierbei unterscheidet man zwischen einer direkten Vasokonstriktion und einer direkten und indirekten Vasodilatation. In Abbildung 1.2 ist die Beteiligung der GPCRs an der Regulation des Gefäßtonus schematisch dargestellt.

Die direkte Vasokonstriktion erfolgt meistens über $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren wie Angiotensin II AT_1 (AT_1)-, Endothelin-1 (ET_A)-, Histamin (H_1)-, Vasopressin (V_{1A})-, Serotonin ($5-HT_{2A}$)-Rezeptoren und α_1 -Adrenozeptoren in glatten Muskelzellen über ihre endogenen Agonisten (Eguchi et al., 1996; Gohla et al., 2000; Guimaraes und Moura, 2001; Maguire und Davenport, 2005; Yu et al., 1996). So bewirkten folgende Agonisten eine Vasokonstriktion (Davenport, 2002): das in der glatten Muskulatur gebildete Oktapeptid Angiotensin II, das vom Endothel abgegebene Endothelin-1, das

aus Mastzellen sekretierte Histamin, das aus dem Hypophysenhinterlappen inkretierte Vasopressin, das aus Blutplättchen freigesetzte Serotonin und das aus sympathischen Nervenfasern ausgeschüttete Noradrenalin. Eine Vielzahl von weiteren endogenen Substanzen wie Eicosanoide, Nukleotide und Nukleoside können ebenfalls als Agonisten für GPCRs in glatten Gefäßmuskelzellen vasokonstriktorisch wirken (Fleming et al., 1996).

In vitro können die meisten $G_{q/11}$ -gekoppelten, vasokonstriktorisch wirkenden Rezeptoren auch $G_{12/13}$ -Proteine binden und aktivieren. Hierzu zählen die ET_A -, AT_1 -, V_1 -, Thrombin (PAR1)- und Thromboxan (A_2)-Rezeptoren (Gohla et al., 2000; Hersch et al., 2004; Majumdar et al., 1999; Offermanns et al., 1996; Offermanns et al., 1994). Während die $G_{q/11}$ -Proteinaktivierung eine kurze und transiente Vasokonstriktion vermittelt, führt die Aktivierung der $G_{12/13}$ -Proteine zu einer langsamen und tonischen Vasokonstriktion (Hersch et al., 2004). Zurzeit ist es noch nicht klar, welchen Anteil jeweils die $G_{q/11}$ -calciumvermittelten als auch die calciumunabhängigen $G_{12/13}$ -RhoA-vermittelten Signaltransduktionen am Gefäßtonus haben.

$G_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren, die die Adenylylzyklase inhibieren, haben ebenfalls einen direkten vasokonstriktorischen Effekt auf die glatte Gefäßmuskulatur über eine Enthemmung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase, die die Kontraktionsmaschinerie direkt anschaltet. Studien an Rattenschwanzarterien zeigten, dass Pertussistoxin die noradrenalininduzierte Gefäßkonstriktion inhibieren konnte (Petitcolin et al., 2001; Spitzbarth-Regrigny et al., 2000). Die $G_{i/o}$ -induzierte Vasokonstriktion wird unter anderem durch die α_{2A} -, α_{2B} -, α_{2C} -, 5-HT $_{1B}$ - und ET_B -Rezeptoren in den Gefäßmuskelzellen vermittelt.

Die direkte Vasodilatation erfolgt in erster Linie über G_s -gekoppelte Rezeptoren in den glatten Gefäßmuskelzellen. Diese Rezeptoren aktivieren die Adenylylzyklase und verursachen somit einen Anstieg der cAMP-Konzentration. Dadurch wird die Myosin-leichte-Ketten-Kinase gehemmt und kann die Kontraktionsmaschinerie nicht anschalten, so dass schließlich Gefäßdilatationen erfolgen, die unter anderem durch folgende Rezeptoren vermittelt werden: 5-HT $_{7}$ -, H_2 -, Dopamin (D_1)-, V_2 -Rezeptoren und β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren. Vasopressin, das in erster Linie als starker Vasokonstriktor an $G_{q/11}$ -gekoppelten V_1 -Rezeptoren bekannt ist, kann demzufolge über G_s -gekoppelte V_2 -Rezeptoren vasodilatatorisch wirken (Beech, 2005).

Während die GPCRs in der Gefäßmuskelwand für die direkte Vasokonstriktion und -dilatation verantwortlich sind, bewirken die endothelialen GPCRs eine indirekte Vasodilatation. Das Endothel besitzt die Fähigkeit, drei vasodilatatorisch wirkende Substanzen zu produzieren, nämlich Stickstoffmonoxid (NO), „Endothelium-derived hyperpolarising factor“ (EDHF) und Prostacyclin (PGI_2) (Triggle et al., 2003). Diese drei

Substanzen werden vom Endothel freigesetzt entweder aufgrund von Blutfluss bedingten Scherkräften an der Endothelzellwand oder durch Agonistenstimulationen über die folgenden GPCRs: α_{2A} -, β_2 -, β_3 -, H_1 -, ET_B -, V_1 - und V_2 -Rezeptoren. Stimulationen mit einem Agonisten können im Blutgefäß sowohl vasodilatatorisch als auch vasokonstriktorisch wirken (Davenport, 2002), wie z.B. Endothelin-1, das sowohl ET_B -Rezeptoren im Endothel als auch ET_A -Rezeptoren in der glatten Muskulatur aktivieren kann.

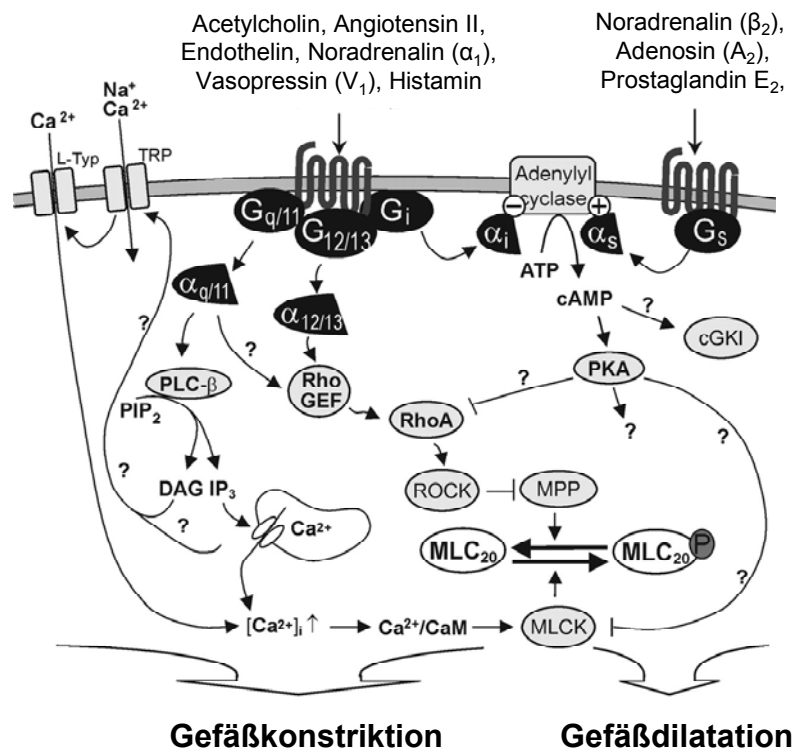


Abbildung 1.2: Regulation des Gefäßtonus durch heterotrimere G-Proteine in glatten Gefäßmuskeln (nach Wettchureck und Offermanns, 2005). G_{q/11}-gekoppelte Rezeptoren erhöhen PLC-abhängig die intrazelluläre Calciumkonzentration, was zu einer Ca²⁺/Calmodulin (CaM)-abhängigen Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) und zur Phosphorylierung der leichten Kette am Myosinkopf (MLC₂₀) führt, wodurch die Kontraktionsmaschinerie angeschaltet wird und zu einer Gefäßkonstriktion führt. Die Familie der G_{12/13}-gekoppelten Rezeptoren vermittelt eine RhoA-Aktivierung, die eine calciumabhängige, langsame Konstriktion der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt. Die Aktivierung der G_s-gekoppelten Rezeptoren induziert eine cAMP-vermittelte Gefäßdilatation durch Hemmung der MLCK. G_i-gekoppelte Rezeptoren verursachen vermutlich durch die Enthemmung der MLCK eine Gefäßkonstriktion. Weitere Abkürzungen: cGKI: cGMP-abhängige Proteinkinase I, DAG: Diacylglycerol, IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphate, L-Typ: spannungsgesteuerter L-Typ Calciumkanal, MPP: Myosinphosphatase, PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PKA: cAMP-abhängige Kinase, PLC β : Phospholipase C- β , RhoGEF: Rho-spezifischer Guaninnukleotid-Austauschfaktor, ROCK: Rho-Kinase, TRP: „Transient receptor potential“-Kanal

Abschließend muss bemerkt werden, dass Fehlfunktionen von GPCRs viele Krankheiten auslösen, was sich in der Tatsache widerspiegelt, dass die Hälfte aller derzeit erhältlichen Arzneistoffe die Funktion von GPCRs beeinflusst. Paradebeispiele hierfür sind die inversen AT_1 -Rezeptoragonisten, die α_1 -Rezeptorantagonisten und die β -Rezeptorantagonisten, die als Antihypertensiva eingesetzt werden. Andere Antihypertensiva verhindern eine Rezeptoraktivierung, indem sie die Agonistenbildung spezifisch inhibieren, wie die sehr häufig verordneten „angiotensin II converting enzyme“ (ACE)-Hemmer.

Neben den allgemein bekannten GPCRs existiert noch eine Vielzahl weiterer kürzlich charakterisierter GPCRs, die durch stark vasokonstriktorisch wirkende Substanzen wie Apelin, Motilin, Neuromedin U, Sphingosin-1-Phosphat und Urotensin-II oder durch vasodilatatorisch wirkende Substanzen wie Ghrelin und Nociceptin aktiviert werden können (Maguire und Davenport, 2005). Außerdem gibt es im kardiovaskulären System noch GPCRs, deren spezifische endogene Agonisten bisher nicht identifiziert wurden. Diese als „orphan receptors“ (Civelli et al., 2006) bezeichneten Rezeptoren und ihre endogenen Agonisten könnten in Zukunft als weitere Zielstrukturen für die Entwicklung neuer gefäßaktiver Arzneistoffe dienen.

1.4 TRP-Kanäle

Die Identifizierung der molekularen Korrelate des Calciumeinstroms begann in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts mit spannungsabhängigen Calciumkanälen (Ca_v) und den ligandengesteuerten Kationenkanälen. Letztere sind auch bekannt als ionotrope Rezeptoren wie z.B. die NMDA-Typ-Glutamat-, die $5-HT_3$ - und die P_{2X} -purinergen Rezeptoren. Erst ab Mitte der neunziger Jahre wurde die molekulare Identität der calciumpermeablen Kationenkanäle entdeckt, die nach Aktivierung von GPCRs oder Rezeptortyrosinkinasen einen Calciumeinstrom bewirken.

1.4.1 Identifizierung und Charakterisierung der TRP-Superfamilie

Die Identifizierung dieser Kationenkanäle gelang erst durch die molekulare Charakterisierung der *Drosophila melanogaster* „transient receptor potential“ (trp)-Mutante (Cosens und Manning, 1969). Diese Mutante fiel phänotypisch durch ein verändertes Elektroretinogramm auf. Im Gegensatz zu nicht mutierten Fruchtfliegen führt ein kontinuierlich andauernder Lichtreiz zu einem transient verlaufenden statt einem persistierenden Rezeptorpotential im Elektroretinogramm, was mit dem Fehlen eines anhaltenden Calciumeinstroms in den Lichtsinneszellen korreliert werden konnte. Diese Mutanten waren infolgedessen blind. Die genetische Charakterisierung dieser trp-Mutante führte zur Identifizierung des TRP-Gens, das eine porenbildende Unter-

einheit eines nicht selektiven calciumpermeablen Kationenkanals in der Zellmembran der Lichtsinneszellen codiert. Diese Kanäle zeichnen sich besonders durch ihre PLC-abhängige Aktivierbarkeit aus und können nicht nur homotetramere Kanäle, sondern auch heterotetramere Kanäle mit weiteren porenbildenden, trp-ähnlichen Untereinheiten (TRPL und TRP γ) bilden (Montell, 2001).

Mittels Sequenzhomologievergleiche wurden weitere TRP-Gene in anderen Spezies identifiziert. Bei der Klasse der Säugetiere umfasst die TRP-Genfamilie mittlerweile 28 Mitglieder, die sich in sechs Unterfamilien einteilen lassen. Die Unterfamilie der klassischen TRP-Kanäle (TRPC, „classic“ oder „canonical“ TRP) umfasst sieben TRP-Gene, die der Vanilloid-Rezeptor-ähnlichen TRP-Kanäle (TRPV, „vanilloid“ TRP) sechs Gene, die der Melastatin-ähnlichen TRP-Kanäle (TRPM, „melastatin“ TRP) acht Gene und die der ANKTM1-Kanäle (TRPA, „ankyrin-repeat“ TRP) nur ein Gen (Montell et al., 2002b). Die Unterfamilie der polycystischen Nierenerkrankungsproteine (PKD, TRPP; „polycystic kidney disease proteins“) umfasst drei TRP-Gene und die der Mucolipine (TRPML) ebenfalls drei Gene (Clapham et al., 2001a; Nilius et al., 2007; Pedersen et al., 2005; Venkatachalam und Montell, 2007) (Abbildung 1.3).

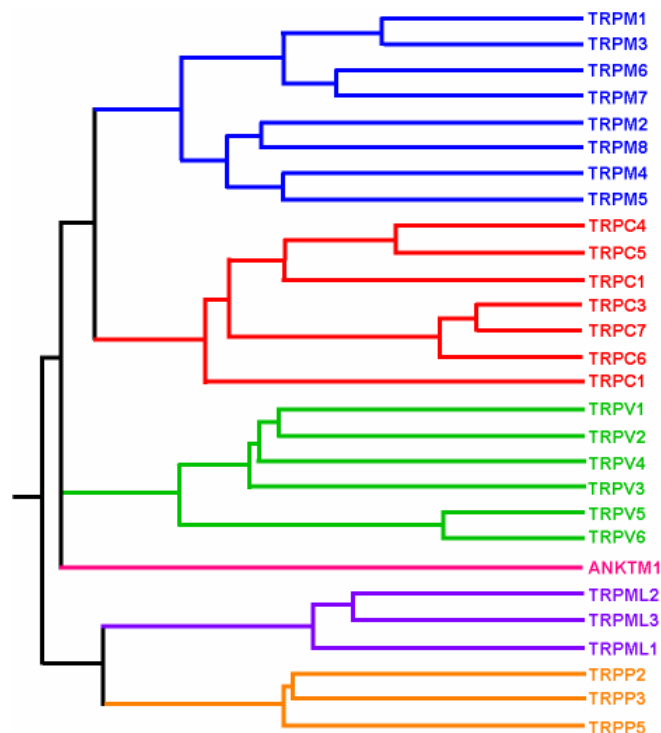


Abbildung 1.3: Phylogenetischer Stammbaum der Säuger-TRP-Familien (nach Montell et al., 2002).

Die phylogenetische Analyse der konservierten Regionen der TRP-Superfamilie ist dargestellt. Die TRP-Superfamilie umfasst die drei großen Genfamilien der TRPM (melastatin)-, der TRPC (classical)- und der TRPV (vanilloid receptor)-Kanäle. Dazu kommen die Genfamilien der ANKTM1-Kanäle (auch als TRPA bezeichnet), der Mucolipine (TRPML) und der polycystischen Nierenerkrankungsproteine (TRPP). Insgesamt umfasst die TRP-Superfamilie bei Säugetieren somit sechs Genfamilien mit 28 Mitgliedern.

1.4.2 Die Struktur der TRP-Kanäle

Die Analyse der Primärstruktur von TRP-Kanälen zeigt als strukturelle Gemeinsamkeit aller TRP-Kanäle einen Aufbau aus jeweils sechs Transmembrandomänen mit einer Porenregion zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne und intrazellulärem N- und C-Terminus. Diese Primärstruktur befindet sich in Analogie zu bekannten Ionenkanälen wie den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen und den durch Hyperpolarisation und/oder cyclische Nukleotide gesteuerten Kanälen (CNG, „cyclic nucleotide gated channels“; HCN, „hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channels“). Die kompletten Sequenzhomologien zwischen einzelnen TRP-Mitgliedern können in einigen Fällen bei nur 20% liegen. Dennoch besitzen sie gemeinsame, regional konservierte Aminosäuresequenzen mit deutlich höheren Sequenzhomologien. Innerhalb der zytoplasmatischen N-Termini von Proteinen der TRPA-, TRPC- und TRPV-Unterfamilien liegen z.B. sich wiederholende Ankyrinbindungssequenzen. Die Proteine der TRPC- und TRPM-Unterfamilie weisen außerdem auffällige prolinreiche Aminosäuresequenzen direkt hinter der fünften Transmembrandomäne auf (Clapham et al., 2001b). Ein weiteres besonderes Merkmal der TRP-Proteine ist die C-terminal direkt hinter der sechsten Transmembrandomäne liegende TRP-Domäne mit einer Länge von 25 Aminosäuren, die die hoch konservierte Aminosäuresequenz EWKFAR (im Einbuchstabencode) beinhaltet, die sogenannte TRP-Box, deren Funktion allerdings bisher noch nicht entschlüsselt ist. Erst kürzlich konnte eine Funktion der TRP-Domäne anhand des TRPM8-Kanals als eine PIP₂-Interaktionsstelle beschrieben werden (Rohacs et al., 2005). Die hoch konservierten TRP-Domänen sind nur in den Unterfamilien der TRPC- und TRPM-Kanäle zu finden (Clapham et al., 2005; Clapham et al., 2003; Montell et al., 2002a).

Neben den erwähnten Sequenzhomologien besitzen die TRP-Proteine das Heteromultimerisierungspotential als weiteres gemeinsames Merkmal (Hellwig et al., 2005; Hofmann et al., 2002; Schaefer, 2005; Strübing et al., 2003). Höchstwahrscheinlich bilden vier TRP-Proteine einen funktionellen Kanal.

1.4.3 Funktionelle Eigenschaften der TRP-Kanäle

Die TRP-Kanäle sind sowohl für monovalente als auch für divalente Kationen permeabel. Sie sind somit nicht-selektiv mit einem Permeabilitätsquotienten von $P_{Ca}/P_{Na} \leq 10$. Ausnahmen bilden TRPM4- und TRPM5-Kanäle, die ausschließlich für monovalente Kationen und TRPV5- und TRPV6-Kanäle, die nur für divalente Calciumionen durchlässig sind mit einem Permeabilitätsquotienten von $P_{Ca}/P_{Na} > 100$. Die TRP-Kanäle zeigen im Gegensatz zu spannungsabhängigen Calcium- und Natriumkanälen keine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit (Clapham et al., 2001b).

Bei TRPM4- und TRPM5-Kanälen konnte jedoch durch Spannungsänderungen ein modulierender Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle beschrieben werden (Hofmann et al., 2003; Nilius et al., 2003). Ebenfalls konnte eine schwache Spannungsabhängigkeit bei den TRPC3/6/7-Kanälen und bei den TRPC4/5-Kanälen in unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden.

1.4.4 Die physiologische Funktion von TRP-Kanälen

Die physiologische Rolle der TRPC-Kanäle ist zurzeit noch umstritten. Ursprünglich wurde postuliert, dass die TRPC-Kanäle einen Calciumeinstrom nach Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher bewirken, der die Funktion hat, diese Calciumspeicher wiederaufzufüllen (Putney, 1977; Putney und McKay, 1999). Die Wiederauffüllfunktion gilt heute als spekulativ, da schon einfache rechnerische Überlegungen offenbaren, dass der Calciumeinstrom über TRPC-Kanäle hierfür nicht ausreichend groß ist. Mittlerweile hat der Natriumeinstrom für die Funktion der TRPC-Kanäle an Bedeutung gewonnen, da er groß genug ist, um eine Membrandepolarisation hervorzurufen. Durch diese Membrandepolarisation triggern die TRPC-Kanäle wahrscheinlich spannungsabhängige Calciumkanäle in erregbaren Zellen. Zudem kann die physiologische Rolle erst dann geklärt werden, wenn der genaue Aktivierungsmechanismus der TRPC-Kanäle bekannt ist. Zurzeit werden zwei generelle Aktivierungsmechanismen für die TRPC-Kanäle kontrovers diskutiert. Zum einen wird der sogenannte rezeptorgesteuerte Aktivierungsmechanismus über „receptor-operated channels“ (ROCs) erwogen. Er beginnt mit der Stimulation von $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen, wodurch PLC β oder PLC γ aktiviert werden, die jeweils PIP_2 in die beiden Botenstoffe IP_3 und DAG spalten. DAG kann dabei direkt - ohne Proteinkinase C-Beteiligung - die Mitglieder der TRPC3/6/7-Kanalunterfamilie aktivieren (Hofmann et al., 1999). Zum anderen wird der oft beschriebene speichergesteuerte Aktivierungsmechanismus über „store-operated channels“ (SOCs) in Erwägung gezogen. Dieser beginnt mit der Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher wie dem endo- bzw. sarkoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien, und aktiviert dann die TRPC-Kanäle auf einem noch nicht geklärten Weg. Bis heute werden drei verschiedene Wege für die Aktivierung von speichergesteuerten Kanälen (SOCs) diskutiert. So beruht ein Weg auf der Freisetzung eines noch nicht identifizierten Botenstoffs namens „calcium influx factor“ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, der entweder direkt SOCs aktivieren kann oder indirekt zur Aktivierung von calciumunabhängigen Phospholipasen A_2 ($iPLA_2$) führt, die Lysophospholipide freisetzen, welche anschließend SOCs aktivieren (Smani et al., 2004). Der zweite Weg führt über eine Konformationsänderung der Freisetzungskanäle wie z. B. die

intrazellulären ionotropen IP₃-Rezeptoren im Skelettmuskel. Diese Konformationsänderung bewirkt wiederum eine Konformationsänderung des SOC in seine aktive Kanalkonfiguration. Dieser Weg setzt also eine direkte Protein-Protein-Kopplung zwischen SOC und IP₃-Rezeptor voraus (Berridge, 1997; Irvine, 1992). Der dritte Weg beruht auf der Vorstellung, dass die SOCs direkt unterhalb der Plasmamembran in sehr kleinen zytoplasmatischen Vesikeln vorliegen. Eine Calciumfreisetzung führt hierbei zu einer Verschmelzung dieser Vesikel mit der Plasmamembran, wodurch SOCs in die Plasmamembran eingebaut werden, die dann speichergesteuert fungieren (Patterson et al., 1999; Yao et al., 1999). Erste Indizien für diesen dritten Weg konnten bei TRPC5- und TRPC6-Kanälen gefunden werden (Bezzarides et al., 2004; Cayouette et al., 2004). Ob sie stichhaltig genug sind, wird sich in Zukunft zeigen. Des Weiteren sind die klassischen Protokolle zur Speicherentleerung generell kritisch zu betrachten, da bei den intrazellulären Calciumkonzentrationsmessungen keinerlei Informationen über das Membranpotential vorhanden sind (Nilius, 2004).

1.4.4.1 Die molekulare Identität der SOCs

Neben den oben beschriebenen TRPC-Kanälen als potentielle molekulare Korrelate für den SOC werden weitere Kanäle diskutiert. In T-Lymphozyten ist ein speichergesteuerter, hoch calciumselektiver Kanal charakterisiert worden, der einen als „calcium release-activated current“ (I_{CRAC}) bezeichneten Strom hervorruft (Hoth und Penner, 1992). Seine molekulare Identität ist bis heute nicht eindeutig geklärt (Nilius et al., 2007). Ob und welche TRPC-Proteine daran beteiligt sind, ist ebenfalls noch unklar (Clapham, 2003). Kürzlich wurden zwei Proteine identifiziert, die vermutlich am SOC-Einstrom beteiligt sind: „stromal interaction molecule“ (STIM-1), das als Calciumsensor im endoplasmatischen Retikulum fungieren könnte (Roos et al., 2005; Spassova et al., 2006b; Zhang et al., 2005) und Orai, das eventuell eine Untereinheit des CRAC-Kanals darstellt (Feske et al., 2006; Soboloff et al., 2006; Vig et al., 2006). Es bleibt abzuwarten, ob TRPC-Kanäle hierbei ebenfalls eine Rolle spielen. Erste Indizien für eine Beteiligung von TRPC-Kanälen an SOCs können die beobachteten Interaktionen zwischen TRPC1 und STIM-1 sein (Huang et al., 2006; Liu et al., 2007; Lopez et al., 2006). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisher weder der Aktivierungsmechanismus der TRPC-Kanäle noch ihre physiologische Rolle hinreichend aufgeklärt werden konnten.

1.4.5 Die Rolle der TRPC-Kanäle in der glatten Muskulatur

Wie bereits beschrieben, spielen die mit den *Drosophila*-TRPs am nächsten verwandten Kanäle der TRPC-Unterfamilie, die basierend auf ihrer Aminosäuresequenz-Homologie in vier Untergruppen unterteilt werden, nämlich TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5 (Clapham et al., 2001b; Harteneck et al., 2000; Montell, 2001), wahrscheinlich für die Aktivierung der spannungsgesteuerten Calciumkanäle in der glatten Muskulatur eine wichtige Rolle (Dietrich et al., 2005a). Außerdem konnte bei den Kanälen TRPC1, -3, -4, -5 und -6 eine Beteiligung an kontraktile und proliferativen Vorgängen in der Gefäßmuskulatur festgestellt werden (Beech, 2005), die bedeutend sein könnte für kardiovaskuläre Erkrankungen.

TRPC1-Proteine werden ubiquitär exprimiert (Zhu, 1995) und konnten in der glatten Gefäßmuskulatur auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (Yip et al., 2004). Das TRPC1-Gen war das erste klonierte TRP-Gen der Säugetiere (Wes et al., 1995; Zhu, 1995). Die proliferative Funktion der TRPC1-Proteine konnte mittels Antisense-Oligonukleotiden in kultivierten glatten Muskelzellen aus Pulmonalarterien verifiziert werden (Sweeney et al., 2002). Zudem konnte mittels eines blockierenden Antikörpers gegen TRPC1-Proteine, der an die äußere Porenregion bindet, an Arterien aus dem Rattenschwanz eine Beteiligung von TRPC1-Proteinen an der Endothelin induzierten Gefäßkonstriktion beobachtet werden (Bergdahl et al., 2003). Darüber hinaus führte eine Überexpression von TRPC1-Proteinen in Pulmonalarterien nach Speicherentleerung zu einer Gefäßkonstriktion (Kunichika et al., 2004). Somit könnte das TRPC1-Protein ein Kandidat für den SOC in glatten Gefäßmuskelzellen sein (Sweeney et al., 2002; Xu und Beech, 2001). Jedoch konnte in der glatten Gefäßmuskulatur von TRPC1-gendefizienten Mäusen keine Beteiligung des TRPC1 am SOC-Einstrom beobachtet werden (Dietrich et al., 2007). Leider ist bis heute nicht ausreichend geklärt, ob TRPC1-Proteine funktionelle homomere Kanäle bilden können und in welcher Stöchiometrie sie mit anderen TRPC-Proteinen heteromultimerisieren. Gut charakterisierte Einblicke in das Heteromultimerisierungspotential von TRPC1-Proteinen finden sich in drei Arbeiten (Hofmann et al., 2002; Strübing et al., 2001; Strübing et al., 2003).

Für die TRPC4- und TRPC5-Kanäle, die außer in der glatten Gefäßmuskulatur (Beech et al., 2004) vor allem im Gehirn exprimiert werden (Venkatachalam und Montell, 2007), sind sowohl rezeptorgesteuerte bzw. PLC-abhängige (Schaefer et al., 2000) als auch speichergesteuerte Aktivierungsmechanismen beschrieben. Letztere konnten mittels siRNA gegen TRPC4-mRNA in kultivierten glatten Muskelzellen aus Pulmonalarterien bestätigt werden (Zhang et al., 2004). Auch Antisense-DNA-Studien an mesangialen Zellen bestätigten eine Beteiligung des TRPC4 am SOC-Einstrom

(Wang et al., 2004). Darüber hinaus spielen TRPC4-Proteine eine wichtige Rolle in der Endothel-vermittelten indirekten Vasodilatation, was an TRPC4-gendefizienten Mäusen beobachtet werden konnte (Freichel et al., 2001).

Ebenfalls können heterolog exprimierte TRPC5-Kanäle speichergesteuert aktiviert werden (Beech, 2005; Zeng et al., 2004). Außerdem konnte mittels eines TRPC5-Antikörpers in glatten Muskelzellen aus Arteriolen in der *Pia mater* von Ratten der SOC-Einstrom unterdrückt werden (Xu et al., 2006a). Dieser Kationenstrom wies sogar ähnliche Strom-Spannungs-Charakteristika auf wie der Kationenstrom bei heterologer Expression von TRPC1/5-Kanalkomplexen (Xu et al., 2006b).

Zwei weitere in der glatten Gefäßmuskulatur exprimierte TRPC-Kanäle stellen die TRPC3- und TRPC6-Kanäle dar, die eine Sequenzhomologie von 74% aufweisen und untereinander heterotetramere Kanäle bilden können (Hofmann et al., 2002). Der Aktivierungsmechanismus von TRPC6 ist wahrscheinlich rezeptorgesteuert und PLC-abhängig, ohne Beteiligung von Proteinkinase C (Boulay et al., 1997; Hofmann et al., 1999; Ma et al., 2000; Venkatachalam et al., 2001; Zhang und Saffen, 2001), während der des TRPC3 sowohl als rezeptor- (Hurst et al., 1998; Patterson et al., 2005) als auch als speichergesteuert (Kiselyov et al., 1998; Tang et al., 2001; Zhang et al., 2001; Zhu et al., 1996) diskutiert wird. Möglicherweise beeinflusst der zelluläre Expressionslevel von TRPC3-Proteinen die Art der Aktivierung (Putney, 2004). TRPC3-Proteine werden außer in der glatten Gefäßmuskulatur vorwiegend im Gehirn exprimiert (Zhu et al., 1996). Das TRPC3-Gen war das zweite klonierte Gen aus der TRPC-Unterfamilie (Zhu et al., 1996). Außerdem besitzen TRPC3-Kanäle eine starke konstitutive Kanalaktivität (Zitt et al., 1997), die sich in einer geringeren Glykosylierung begründet (Dietrich et al., 2003). Die Rolle von TRPC3 in Blutgefäßen ist bisher rudimentär untersucht, scheint aber grundlegend zu sein, denn in Pulmonalarterien von Patienten mit einer idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie konnten erhöhte TRPC3-Expressionslevel diagnostiziert werden (Yu et al., 2004). Außerdem konnte in Cerebralarterien mittels Antisense-Oligonukleotiden gegen TRPC3-mRNA eine Uridin-5'-triphosphat induzierte Membrandepolarisation mit anschließender Vasokonstriktion unterdrückt werden (Reading et al., 2005). Allerdings hatte diese Unterdrückung jedoch keinen Einfluss auf die myogene Gefäßkonstriktion.

Während ursprünglich der TRPC6 aus dem Gehirn von Mäusen kloniert wurde (Boulay et al., 1997), ist sein humanes Homologon aus der Plazenta gewonnen (Hofmann et al., 1999). TRPC6-Proteine werden außer in der glatten Gefäßmuskulatur auch im Gehirn, in der Lunge und in der Niere exprimiert. Obwohl TRPC6-Kanäle als direkt DAG-sensitive Kanäle allgemein akzeptiert sind, ist eine mögliche DAG-Bindungsstelle bisher noch nicht identifiziert worden. Außer DAG kann offenbar auch

der Arachidonsäuremetabolit 20-Hydroxyeicosatetraensäure TRPC6-Kanäle aktivieren (Basora et al., 2003). Zudem konnten die zurzeit noch als spezifische TRPC5-Aktivatoren geltenden Lysophosphatidylcholine (Flemming et al., 2006) ebenfalls TRPC6-Kanäle aktivieren (unveröffentlichtes Ergebnis). TRPC6-Proteine spielen vermutlich ebenso wie die TRPC3-Kanäle eine wichtige Rolle in der glatten Gefäßmuskulatur, denn Untersuchungen mit Hilfe von TRPC6-Antisense-Oligonukleotiden ergaben, dass TRPC6-Kanäle die α_1 -Adrenozeptor-aktivierten, unselektiven Kationenströme vermitteln (Inoue et al., 2001). Außerdem wurden TRPC6-Kanäle in der glatten A7r5-Muskelzelllinie aus thorakaler Rattenaorta als rezeptorgesteuerte Kationenkanäle identifiziert, die über den Vasopressin (V_1)-Rezeptor aktivierbar waren (Jung et al., 2002). Darüber hinaus besitzen die TRPC6-Kanäle eine essentielle Funktion für die myogene Gefäßkonstriktion, denn eine Unterdrückung der TRPC6-Expression in isolierten Gehirnarterien mittels Antisense-Oligonukleotiden verminderte die myogene Vasokonstriktion stark (Welsh et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Charakterisierung von TRPC6-gendefizienten Mäusen - entgegen aller Erwartungen - keine verminderte myogene Vasokonstriktion, sondern eine verstärkte Kontraktionskraft von Aortenringen und ein erhöhter systemischer Blutdruck (Dietrich et al., 2005b). Sogar das Einsetzen des myogenen Gefäßtonus war zu niedrigeren intravaskulären Drücken hin verschoben. Dennoch untermauern diese Befunde die distinktive Funktion der TRPC6-Kanäle in der glatten Gefäßmuskulatur. Des weiteren konnten ebenfalls - wie bei TRPC3 - Überexpressionen von TRPC6-Proteinen bei Patienten mit einer idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie festgestellt werden (Yu et al., 2004). Diese Überexpressionen führten zu einer gesteigerten Zellproliferation und einer damit verbundenen Erhöhung des Gefäßtonus (Yu et al., 2003). Zudem konnten TRPC6-Überexpressionen in Pulmonalarterien von Ratten bestimmt werden, die eine pulmonale Hypertonie durch chronische Hypoxie hatten (Lin et al., 2004). In diesen Zellen wurde sogar ein erhöhter OAG-induzierter Kationeneinstrom beobachtet, der eventuell ein Indiz für eine Beteiligung von TRPC6-Kanälen ist. Außerdem spielt der TRPC6 eine entscheidende Rolle für die durch Hypoxie ausgelöste, akute pulmonale Vasokonstriktion, was in glatten Muskelzellen aus Pulmonalarterien von TRPC6^{-/-}-Mäusen gezeigt werden konnte (Weissmann et al., 2006).

Das nahe verwandte TRPC7-Gen aus der DAG-sensitiven TRPC3/6/7-Kanalunterfamilie konnte ebenso wie das TRPC6-Gen als erstes aus dem Gehirn von Mäusen kloniert werden (Okada et al., 1999). TRPC7-Kanäle sind hauptsächlich rezeptorgesteuert aktivierbar, was z.B. in Keratinozyten gezeigt werden konnte (Beck et al., 2006). Es gibt jedoch auch Hinweise auf einen speichergesteuerten Aktivierungs-

mechanismus (Lievremont et al., 2004). Kürzlich wurde der TRPC7 in einer B-Lymphozyten-Zelllinie als DAG-sensitiver Kationenkanal identifiziert, dessen Aktivierung IP₃-Rezeptor-abhängig war (Vazquez et al., 2006), was auf einen Zusammenhang zwischen speicher- und rezeptorgesteuerter Aktivierung hindeutet. Auch die Unterdrückung der DAG-induzierten TRPC7-Ströme durch Thapsigargin, einem Inhibitor der „smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPasen“ (SERCA), könnte darauf hinweisen (Lemonnier et al., 2006). Im Gegensatz zu TRPC6-Kanälen weisen die TRPC7-Kanäle eine ähnliche konstitutive Kanalaktivität auf wie TRPC3-Kanäle (Okada et al., 1999). TRPC7-Proteine werden hauptsächlich in der Lunge, im Herzen und im Auge exprimiert (Okada et al., 1999). Allerdings werden TRPC7-Kanäle, im Gegensatz zu TRPC3 und -6, vermutlich nicht in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert, was auf mRNA- und Proteinebene in humanen Aorten und Gehirnarterien (Yip et al., 2004) nachgewiesen werden konnte. Außerdem zeigten die meisten Arbeiten keine TRPC7-Expression in A7r5-Zellen aus thorakaler Rattenaorta (Jung et al., 2002; Moneer et al., 2005; Soboloff et al., 2005) mit Ausnahme von einer kürzlich erschienenen Arbeit (Maruyama et al., 2006). Im Gegensatz zu glatten Muskelzellen konnte jedoch in Endothelzellen eine TRPC7-Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Yip et al., 2004), so dass eine kardiovaskuläre Funktion postuliert werden kann. Die genaue physiologische Rolle der TRPC7-Kanäle ist jedoch noch weitgehend unklar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beschriebenen TRPC-Kanäle eine wichtige Rolle in der Kontraktion und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen spielen, die bei Fehlregulation unerwünschte kardiovaskuläre Folgen haben könnten. Möglicherweise stellen daher diese Kanäle im kardiovaskulären System neue Zielstrukturen für Arzneimittel dar.

1.5 Myogener Gefäßtonus

Der Bayliss-Effekt ist eine nach dem britischen Physiologen William Maddock Bayliss (*1860, †1924) benannte Konstriktionsreaktion von Blutgefäßen (Bayliss, 1902). Es handelt sich hierbei um eine lokale Regulation des Blutkreislaufes - eine Autoregulation - die zur Konstanthaltung der Durchblutung eines Organs bzw. Gewebes dient. Ändert sich durch eine Blutdruckerhöhung die Wanddehnung einer kleinen Arterie oder Arteriole, so wird dies von einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen beantwortet. Dadurch verringert sich der Gefäßradius und der Strömungswiderstand in diesem Blutgefäßabschnitt steigt (Hagen-Poiseuillesches Gesetz), so dass im nachfolgenden kapillären Gefäßbett der Blutfluß und der kapilläre Filtrationsdruck konstant bleiben. Bei einem Nachlassen des intravasalen Drucks geht die Gefäßmuskulatur wieder auf ihren ursprünglichen „basalen“ Gefäßtonus zurück. Auf diese Weise kann

auch bei stark schwankendem Blutdruck - beim Menschen im Bereich zwischen ca. 120 und 200 mmHg - eine konstante Durchblutung von Organen und Geweben aufrechterhalten werden. Somit schützt der Bayliss-Effekt das nachfolgende Kapillarbett vor einer Schädigung, die durch eine zu große Blutmenge im Kapillarbett zustande käme. Diese Art der Kreislaufregulation arbeitet völlig unabhängig von einer vegetativen Innervation der Blutgefäße. Das bedeutet, dass auch bei einer Durchtrennung der das Gefäß versorgenden Nerven der Bayliss-Effekt erhalten bleibt. Bei einer Gabe von Papaverin, einem Spasmolytikum, kann der Effekt über eine Lähmung der glatten Gefäßmuskelzellen aufgehoben werden. Der Bayliss-Effekt ist zum Beispiel in den kleinen Arterien und Arteriolen der Nieren, des Herzen, des Magen-Darm-Trakts und des Gehirns nachweisbar, jedoch nicht in kleinen Arterien und Arteriolen der Haut oder der Lungen (Johnson, 1989). Der Bayliss-Effekt ist vor allem in Gehirnarterien gut charakterisiert worden, denn folgende Vorteile sprechen für die dortige Untersuchung des Gefäßtonus:

- Die Autoregulation ist im Gehirn sehr gut entwickelt.
- Die Arteriolen sind besonders im Gehirn ziemlich kurz, so dass die Gehirnarterien einen ungewöhnlich hohen Anteil am Gefäßwiderstand von 40 bis 50% besitzen.
- Die Gehirnarterien lassen sich besonders leicht vom umliegenden Gewebe befreien, da sie in der *Pia mater*, einem lockeren Bindegewebe, verlaufen.

Es ist bekannt, dass die Konstriktion der Gefäßmuskulatur durch calcium- und calmodulinabhängige Phosphorylierung der regulierenden leichten Myosinkette vermittelt wird. Die distalen Schritte in der Signalkaskade der myogenen Gefäßkonstriktion sind bereits gut untersucht worden. Hingegen sind die proximalen Schritte und die Sensorik noch immer unklar.

Alle für den myogenen Gefäßtonus erforderlichen Komponenten sind offenbar in glatten Muskelzellen der Gefäßwand und nicht im Endothel lokalisiert, da der Gefäßtonus durch eine Zerstörung des Endothels nicht beeinflusst wird (Bevan und Laher, 1991). Als Mechanosensoren wurden bereits verschiedene Membranproteine und Enzyme in Betracht gezogen, wie die Phospholipasen A₂ (Ko und McCulloch, 2000), die Phospholipasen C (Jarajapu und Knot, 2002; Narayanan et al., 1994; Osol et al., 1993), die Tyrosinkinase (Oishi et al., 1998) und die Integrine (Martinez-Lemus et al., 2005; Waitkus-Edwards et al., 2002), da deren Aktivitäten durch Membrandehnung oder Zellschwellung gesteigert werden konnten.

Andere Kandidaten für Mechanosensoren stellten die Membrandehnungs- bzw. mechanisch aktivierbaren Kanäle dar (Kalapesi et al., 2005), die in isolierten glatten Muskelzellen gefunden wurden (Davis et al., 1992; Ohya et al., 1998; Setoguchi et al.,

1997; Wu und Davis, 2001). Allerdings wurde bisher ihre molekulare Struktur noch nicht ausreichend aufgeklärt. Außerdem ist noch nicht bekannt, ob diese Kanäle direkte Sensoren für Membrandehnung sind oder ob ihre Aktivierung eher einen distalen Schritt in der Signalkaskade darstellt. Während der letzten 10 Jahre konnte gezeigt werden, dass sehr unterschiedliche Ionenkanäle an der Regulation des myogenen Gefäßtonus beteiligt sind (Jackson, 2000), wie zum Beispiel die zellschwellungsaktivierten Chloridkanäle (Greenwood und Large, 1998; Yamazaki et al., 1998) und die zellschwellungsaktivierten Kationenkanäle (Welsh et al., 2000).

In den letzten fünf Jahren wurden zwei Kationenkanäle identifiziert, die eine Schlüsselrolle für die Ausbildung des myogenen Gefäßtonus spielen. So führte eine Unterdrückung der Expression von TRPC6- und TRPM4-Kanälen mittels Antisense-Oligonukleotiden zu einer Reduktion der myogenen Gefäßkonstriktion (Earley et al., 2004; Welsh et al., 2002). Darüber hinaus konnte für den TRPC6 indirekt eine Beteiligung an der myogenen Gefäßkonstriktion gezeigt werden, da der myogene Gefäßtonus von TRPC6-gendefizienten Mäusen bei niedrigeren intravaskulären Drücken einsetzte (Dietrich et al., 2005b), was sich wahrscheinlich in einer TRPC3-Überexpression begründete. Unter physiologischen Bedingungen könnten sowohl TRPC6- als auch TRPM4-Kanalaktivierungen zu einer Membrandepolarisation führen und dadurch die spannungsgesteuerten L-Typ Ca_v -Kanäle triggern. Die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit dieser Ca_v -Kanäle könnte somit den für die Muskelzellkontraktion notwendigen Calciumeinstrom bewirken.

Diese spannungsgesteuerten L-Typ Ca_v -Kanäle stellen sicherlich die wichtigsten Kanäle für den Calciumeinstrom in Gefäßmuskelzellen dar (Hughes, 1995). So konnte sich der myogene Gefäßtonus in Gefäßen von Mäusen, bei denen das L-Typ Ca_v -Gen in glatten Muskelzellen ausgeschaltet war, nicht mehr entwickeln (Moosmang et al., 2003). Außerdem beeinflussten sowohl L-Typ Ca_v -spezifische Inhibitoren als auch Aktivatoren den myogenen Gefäßtonus (Wesselman et al., 1996). Somit stellen Ca_v -Kanäle offenbar die wichtigsten Transduktionselemente im distalen Schritt der Signalkaskade dar. Spannungsgesteuerte T-Typ Calciumkanäle (Hughes, 1995; VanBavel et al., 1998) und intrazelluläre ryanodinsensitive Calciumkanäle (Tanaka et al., 1994; Watanabe et al., 1993) sind möglicherweise ebenfalls als Transduktionselemente von Bedeutung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den letzten 15 Jahren viele unterschiedliche Proteine, Enzyme und Ionenkanäle als Mechanosensoren oder –transduktionselemente in Betracht gezogen wurden. Dabei ist es bisher noch nicht gelungen, die tatsächlichen Mechanosensoren zu identifizieren.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der physiologischen Rolle der TRPC6-Kanäle in der Gefäßmuskulatur. Folgende Aufgaben wurden gestellt:

1. Die elektrophysiologische Charakterisierung von isolierten glatten Muskelzellen aus Gehirnarterien von TRPC6-gendefizienten Mäusen.
2. Die Identifizierung des Mechanosensors in der Signaltransduktionskaskade der myogenen Gefäßkonstriktion.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Substanz	Hersteller
BAPTA (1,2-Bis(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma
CaCl ₂	Sigma
CsCl	Sigma
Cäsiummethansulfonat	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
EDTA (Ethyldiamintetraacetat, Dinatriumsalz)	Sigma
GdCl ₃	Sigma
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure)	Sigma
KCl	Sigma
LiCl	Sigma
MgCl ₂	Sigma
MnCl ₂	Sigma
NaCl	Roth
Na ₃ GTP (Guanosine 5'-triphosphat Natriumsalz)	Calbiochem
NMDG-Cl (N-Methyl-D-Glucamin Chlorid)	Sigma

2.1.2 Reagenzien und Enzyme

Substanz	Hersteller
BSA („bovine serum albumin“, Rinderserumalbumin)	Sigma
Collagen-I-Lösung 10%	Sigma
Collagenase H	Sigma
Collagenase F	Sigma

Substanz	Hersteller
DTE (Dithioerythritol)	Sigma
Fugene6® (Transfektionsreagenz)	Roche
Fura-2-AM (Fura-2-acetoxymethylester)	Fluka
nAB (neutralisierender Antikörper gegen Angiotensin II)	Cortex Biochem
Papain	Worthington
Polylysin	Sigma

2.1.3 Agonisten und Pharmaka

Substanz	Hersteller
AG1478	Calbiochem
Angiotensin II	Sigma
Atropin	Sigma
Candesartan	AstraZeneca
Carbachol	Sigma
DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonsäure)	Sigma
Darusentan	Knoll
Endothelin-1	Sigma
GDP- β -S (Guanosin 5'-[β -thio]diphosphat Trilithiumsalz)	Calbiochem
Genistein	Sigma
Histamin	Sigma
IP ₃ (D-myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat)	Sigma
Losartan	Merck
Nicardipin	Sigma
Nifluminsäure	Sigma
Nimodipin	Sigma
NPPB (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoesäure)	Sigma
OAG (1-Oleoyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycerol)	Calbiochem
PP2	Calbiochem

Substanz	Hersteller
PTX (Pertussistoxin)	Sigma
SAG (1-Stearoyl-2-arachidonyl- <i>sn</i> -glycerol)	Calbiochem
U73122	Sigma
U73343	Sigma
Vasopressin (Arg ⁸ -Vasopressin)	Sigma

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden als heterologe Expressionssysteme drei verschiedene Zelllinien verwendet: die HEK293-Zelllinie - eine Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen („human embryonic kidney“) -, die COS-7-Zelllinie - eine Zelllinie aus dem Nierengewebe der Grünen Meerkatze *Cercopithecus aethiops* - und die A7r5-Zelllinie - eine glatte Muskelzelllinie aus der embryonalen thorakalen Aorta von einer Ratte.

Die HEK293-Zellen wurden mit dem Nährmedium, das als Earl's minimal essentielles Medium bekannt ist (EMEM Earle, PAA laboratories, Linz, Österreich) in 250 ml-Kulturflaschen (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) kultiviert. Zu diesem Nährmedium wurde 10% fetales Kälberserum (FCS, Gibco Invitrogen cell culture, USA), 100 U ml⁻¹ Penicillin und 100 µg ml⁻¹ Streptomycin (PAA laboratories, Linz, Österreich) zugesetzt. Die adhärenenten Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 bis 90% mit einer 0,02% EDTA-haltigen 0,05%igen Trypsinlösung (PAA laboratories Linz, Österreich) vom Flaschenboden abgelöst und in den Verdünnungen 1:10 und 1:20 auf zwei weitere 250 ml-Flaschen verteilt. Die Kultivierung der Zellen fand in einem Inkubationsschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% statt. Transfektionen wurden in 33 mm-Kulturschälchen (Nunc Brand Products, Nalge Nunc International, Dänemark) mit zwei Tage zuvor ausgesäten 300.000 HEK293-Zellen durchgeführt.

Die Kultivierung der COS-7-Zelllinie erfolgte in ähnlicher Weise wie bei den HEK293-Zellen. Als Kulturmedium diente hier Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM, mit 10 mM Glucose, PAA laboratories, Linz, Österreich) mit Zusätzen von FCS, Penicillin und Streptomycin in den oben genannten Konzentrationen. Ebenso wie bei HEK293-Zellen wurden zur Weiterkultivierung Zellsuspensions-Verdünnungen von 1:10 und 1:20 hergestellt. Allerdings unterschied sich hier die Transfektion: nur

100.000 COS-7-Zellen pro Loch wurden in einer 12-Loch-Schale (Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) ausgesät und schon 24 Stunden später entsprechend transfiziert.

Die A7r5-Zelllinie wurde ebenso wie die COS-7-Zelllinie mit FCS-, Penicillin- und Streptomycin-haltigem DMEM kultiviert. Zur Weiterkultivierung eigneten sich 1:2 und 1:5 Zellsuspensions-Verdünnungen. Die Inkubationstemperatur betrug wie üblich 37°C, die CO₂-Konzentration lag allerdings bei 7%. Für Patch-Clamp-Experimente wurden jeweils 300.000 A7r5-Zellen in 33 mm-Kulturschälchen überführt, 24 Stunden später dort transfiziert und wieder 24 Stunden später gemessen.

Für die elektrophysiologischen und fluorimetrischen Untersuchungen wurden die transfizierten und nicht transfizierten Zellen HEK293- oder A7r5-Zellen in den 33 mm-Kulturschälchen mittels der EDTA-haltigen Trypsinlösung vom Boden abgelöst und durch An- und Absaugen über eine blaue Pipettenspitze vereinzelt. Je nach Transfektionsrate und Zelldichte wurde diese Zellsuspension auf drei bis zehn vorbereitete 33 mm-Kulturschälchen verteilt. Nach dem Umsetzen konnten die HEK293-Zellen frühestens eine Stunde und die A7r5-Zellen frühestens zehn Stunden später untersucht werden.

2.2.2 Transfektionen

Die Transfektionen der HEK293-, A7r5- und COS-7-Zellen erfolgten mit dem Transfektionsmittel Fugene6[®] (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland), eine Suspension aus liposomal vorliegenden polykationischen Lipiden. Hierzu wurde die jeweilige Menge des pcDNA-Konstruktes (in µg) mit serumfreiem Kulturmedium gemischt und mit der dreifachen Menge des Transfektionsreagenzes (in µl) nach Vorschrift des Herstellers versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Gemisch aus pcDNA, Fugene6[®] und serumfreiem Medium auf die Zellen gegeben.

Die eingesetzten pcDNA-Mengen betragen bei HEK293-Zellen in der Regel 2 µg Kanal-pcDNA, 0,5 µg Rezeptor-pDNA und 0,1 µg pEGFP („enhanced green fluorescent protein“) oder 0,2 µg pEYFP („enhanced yellow fluorescent protein“). Die Kotransfektionen mit pEGFP und pEYFP, die für fluoreszierende Proteine kodieren, dienten der Identifizierung von transfizierten Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Abwandlungen eines fluoreszierenden Proteins aus der Qualle *Aequorea victoria*. Die fluorimetrischen Calciummessungen zur Bestimmung der Korrelation zwischen Rezeptordichte und intrazellulärer Calciumkonzentration wurden mit HEK293-Zellen durchgeführt, die direkt auf den Glasplättchen (Deckgläser 24 mm, Menzel-Glaser, Braunschweig, Deutsch-

land) mit unterschiedlichen Rezeptor-pcDNA-Mengen (0, 0,05, 0,1, 0,5, 1 und 2 μg) transfiziert waren. Als pcDNA-Konstrukt diente hier ein humaner, mit Venus (Venus ist ein stabiles EYFP)-fusionierter Angiotensin II AT₁-Rezeptor (hAT₁R-Venus). Die pcDNA-Gesamtmenge betrug jeweils 2 μg , d.h. die transfizierten Rezeptormengen wurden jeweils mit 2, 1,95, 1,9, 1,5, 1 und 0 μg pcDNA3.1-Leervektorplasmid ergänzt. Hingegen wurden die A7r5-Zellen mit dem bicistronischen Vektor pIRES2-EGFP (Clontech, Palo Alto, USA), in den ein Angiotensin II AT₁-Rezeptor aus der Maus inkloniert war transfiziert (2 μg mAT_{1A}R-IRES-EGFP), da die Transfektionseffizienz unter einem Promille war. Bei COS-7-Zellen wurde 1 μg Rezeptor-pcDNA zur Bestimmung der Inositolphosphatproduktion eingesetzt.

Folgende Kanalprotein-kodierende pcDNA-Konstrukte wurden verwendet: humaner TRPC6 (hTRPC6), humaner TRPC3 (hTRPC3) und TRPC7 aus der Maus (mTRPC7). Bei allen Einzelkanalmessungen wurde das hTRPC6-Konstrukt (hTRPC6-IRES-EGFP) verwendet. Die pcDNA-Konstrukte, die für die G_{q/11}-Protein-gekoppelten Rezeptoren kodieren waren: Histamin-H₁-Rezeptor aus dem Meerschweinchen (gpH₁R), muskarinischer M₅-Rezeptor aus der Ratte (rM₅R), humaner Endothelin-A-Rezeptor (hET_AR-myc), Vasopressin-V_{1A}-Rezeptor aus der Ratte (rV_{1A}R), Angiotensin II-AT₁-Rezeptor aus der Maus und aus dem Menschen (mAT_{1A}R, mAT_{1A}R-IRES-EGFP und hAT₁R-Venus).

2.2.3 Isolation von glatten Muskelzellen aus Gehirn- und Nierenarterien

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen der TRPC6-gendefizienten Mäuse wurden isolierte glatte Muskelzellen aus Gehirnarterien herangezogen. Zur Isolation glatter Muskelzellen wurde eine Maus mit Isofluran betäubt und durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Nach Entnahme des Gehirns wurde dieses sofort in eiskalte, Hydrogencarbonat gepufferte, physiologische Salzlösung überführt. Diese Lösung hatte folgende Zusammensetzung: (in mM) 119 NaCl, 24 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 1,6 CaCl₂, 0,026 EDTA und 11 Glukose, mit einem pH-Wert von 7,6, der mit NaOH eingestellt wurde. Beim Begasen mit Carbogen (eine Mischung aus 95% O₂ und 5% CO₂) stellte sich der pH-Wert dieser Salzlösung auf 7,4 ein.

Folgende Gehirnarterien wurden in chronologischer Reihenfolge unter dem Stereomikroskop (SZ-4045-CTV, Olympus, Hamburg, Deutschland) bei ca. zehnfacher Vergrößerung präpariert: Basilararterie (*A. basilaris*), mittlere Hirnschlagader (*A. cerebri media*), hintere Hirnschlagader (*A. cerebri posterior*) und obere Kleinhirnschlagader (*A. cerebelli anterior/superior*). Die freipräparierten Arterienstücke wurden sofort in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, welches mit 500 μl eiskalter, calciumfreier, 1% albuminhaltiger (A-6003, fettsäurefrei, Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Isolierlösung gefüllt war. Die Isolierlösung hatte folgende Zusammensetzung: (in mM) 55 NaCl, 80 Natriumglutamat, 5,6 KCl, 2 MgCl₂, 10 Glukose und 10 HEPES, mit einem pH-Wert von 7,3, der mit NaOH eingestellt wurde.

Der enzymatische Verdau der isolierten Gefäßabschnitte erfolgte in zwei Schritten mit zwei unterschiedlichen Enzymlösungen. Die erste Enzymlösung hatte die gleiche Zusammensetzung wie die oben beschriebene albuminhaltige Isolierlösung, enthielt jedoch zusätzlich 0,6 mg ml⁻¹ Papain (Worthington, Freehold, NJ, USA) und 1,0 mg ml⁻¹ Dithioerythritol (DTE, D-9680, Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Die erste Enzymlösung wurde zur Aktivierung des Papains für zehn Minuten im Wasserbad bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde vorsichtig die Isolierlösung von den Arterienstücken entfernt und sofort durch 500 µl der Papain-DTE-Lösung ersetzt. Eine Inkubation von 22 Minuten bei 37°C im Wasserbad war von Nöten.

Nach Entfernen dieser ersten Enzymlösung wurden die bereits leicht angedauten Arterienstücke mit 500 µl einer zweiten Enzymlösung überschichtet, die 0,6 mg ml⁻¹ Collagenase H, 1,0 mg ml⁻¹ Collagenase F (C-8051 und C-7926, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und 1 µM CaCl₂ enthielt. Der zweite enzymatische Verdau erfolgte ebenfalls im Wasserbad bei 37°C für 6,5 Minuten. Nach zwei Waschschrinen mit jeweils 500 µl eiskalter, albuminhaltiger Isolierlösung und anschließender Zentrifugation bei 2000 Umdrehungen pro Minute für jeweils 60 Sekunden wurde der klare Überstand bis auf einen Rest von ca. 50 µl abgenommen. Diese 50 µl wurden durch mehrmaliges An- und Absaugen mit einer gelben, abgeschnittenen und feuerpolierten gelben Pipettenspitze, die einen Öffnungsdurchmesser von ca. 100 µm hatte, resuspendiert. Durch diesen Vorgang wurden die glatten Gefäßmuskelzellen trituriert. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf Eis gelagert und konnte innerhalb von sechs Stunden für die elektrophysiologischen Untersuchungen verwendet werden. Vor der einzelnen elektrophysiologischen Messung wurden jeweils 5 bis 10 µl dieser Zellsuspension direkt in die mit Badlösung gefüllte Messkammer gegeben. Nach 10 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur (23°C) hefteten sich die glatten Gefäßmuskelzellen am Boden des 33 mm-Kulturschälchens an und konnten anschließend untersucht werden.

Um Calciummessungen an kultivierten glatten Muskelzellen aus Nierenarteriolen durchzuführen, wurde eine enzymfreie Isolationsmethode herangezogen - die sogenannte Siebmethode (Endlich et al., 2000). Dazu wurden 10 bis 15 ca. 10 Tage alte Mäuse mit einer Isofluran-Narkose betäubt und anschließend dekapitiert, um die Nieren herauszupräparieren. Die Nieren wurden in einem 50 ml-Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) gesammelt, das 50 ml vorgewärmtes (37°C) Isolierungsmedium enthielt. Das Isolierungsmedium hatte folgende Zusammensetzung: DMEM (glukose- und glutamatrai) und Hams F-12-Medium im Verhältnis 1:1 (fertige

Mischung von PAA laboratories, Linz, Österreich) mit einem Zusatz von 100 U ml^{-1} Penicillin und $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ Streptomycin (PAA laboratories, Linz, Österreich). Anschließend wurde unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank ein Turm aus drei Edelstahlsieben (10 cm Durchmesser, Retsch, Haan, Deutschland) mit unterschiedlicher Maschenweite in absteigender Reihenfolge aufgebaut: $450 \text{ } \mu\text{m}$, $200 \text{ } \mu\text{m}$ und $100 \text{ } \mu\text{m}$. Die einzelnen Siebe wurden zunächst mit 30 ml Beschichtungsmedium (Isolierungsmedium und FCS im Verhältnis 1:1) benetzt. Danach wurden die vom Nierenmark befreiten Nieren auf das obere Sieb gegeben und mit dem gummierten Kolben einer 50 ml-Perfusorspritze (Braun, Melsungen, Deutschland) vollständig zerrieben. Anschließend wurde mit 50 ml Isolierungsmedium der Siebturm gespült und das $100 \text{ } \mu\text{m}$ -Sieb mit insgesamt 100 ml Isolierungsmedium gewaschen. Die Waschlösung wurde in zwei 50 ml-Reagenzgefäßen aufgefangen. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen pro Minute wurde der Zellrückstand in Wachstumsmedium (Isolierungsmedium mit Zusätzen von $5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ Transferrin, 5 ng ml^{-1} Natriumselenit, $0,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ Insulin, 2 mM L-Glutamin und 100 nM Hydrocortison, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) aufgenommen und auf sechs bis zwölf Collagen-I (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) beschichteten 24 mm-Glasplättchen verteilt. Nach drei Tagen in Kultur bei 37°C und 7% CO_2 waren bereits die ersten glatten Muskelzellkolonien zu sehen. Die fluorimetrischen Calciummessungen wurden nach vier bis sechs Kultivierungstagen durchgeführt.

2.2.4 Fluorimetrische Calciummessungen und Manganquencher

Bei den fluorimetrischen Calciummessungen an hAT₁R-Venus exprimierenden HEK293-Zellen und an den kurz kultivierten glatten Muskelzellen aus Nierenarteriolen wurden 100 einzelne HEK293-Zellen bzw. 15 bis 30 einzelne glatte Muskelzellen direkt auf den 24 mm-Glasplättchen gemessen. Bei allen weiteren fluorimetrischen Calciummessungen an HEK293-Zellen erfolgte ca. drei bis 20 Stunden vor der eigentlichen Messung ein Umsetzen der transient transfizierten bzw. nicht-transfizierten Zellen auf fünf bis sechs Glasplättchen.

Unmittelbar vor den anstehenden Messungen wurden die HEK293- bzw. die glatten Muskelzellen aus Nierenarteriolen für ca. 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und einer CO_2 -Konzentration von 5% mit $5 \text{ } \mu\text{M}$ Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2-AM, Fluka, Taufkirchen, Deutschland) in HEPES-gepufferter, 1‰ albuminhaltiger Salzlösung folgender Zusammensetzung inkubiert: (in mM) 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 5 Glukose, 10 HEPES (mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt). Unter Raumtemperaturbedingungen wurden die Zellen in einer speziell angefertigten Messkammer (Eigenbau) kontinuierlich superfundiert. Hierzu wurde eine Badlösung folgender

Zusammensetzung verwendet: (in mM) 110 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 Glukose, 10 HEPES, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und mit Mannitol auf 300 mOsm kg⁻¹ ergänzt. Die hypoosmolare Lösung besaß die gleiche Salzkonzentration, jedoch keinen Zusatz von Mannitol, so dass sich Osmolaritäten von 249 bis 253 mOsm kg⁻¹ ergaben. Die Agonistenstimulationen wurden entweder mit 100 µM Histamin bzw. mit 100 µM Carbachol oder mit 100 nM Angiotensin II für 60 Sekunden durchgeführt.

Bei den untersuchten HEK293-Zellen wurden sowohl oszillierende als auch solche Zellen ausgeschlossen, die zu Beginn des Experiments eine freie intrazelluläre Calciumionenkonzentration von mehr als 99 nM aufwiesen. Zur Messung der intrazellulären Calciumkonzentrationen diente ein inverses Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX 70 mit einem Uapo/340 40x/1.35 Ölimmersionsobjektiv oder einem UPlan Apo20x/0,80 Ölimmersionsobjektiv), das mit einem Monochromator (Polychrome II, TILL-Photonics, Martinsried, Deutschland) ausgestattet war. Die Fluoreszenzen von Fura-2 und von EYFP wurden mit einer 12-bit CCD-Kamera (Imago, TILL-Photonics, Martinsried, Deutschland) aufgenommen bei Anregungswellenlängen von 340, 360, 380 und 500 nm. Fura-2 wurde bei 500 nm nicht angeregt und die Beteiligung von EYFP an der Fluoreszenz bei 340 bis 380 nm war vernachlässigbar gering. Die intrazellulären Calciumkonzentrationen $[Ca^{2+}]_i$ wurden nach folgender Formel berechnet:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times F380_{min} / F380_{max} \text{ (Grynkiewicz et al., 1985)}$$

wobei R („ratio“) für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten $F(340 \text{ nm})/F(380 \text{ nm})$ bei der zu bestimmenden Calciumkonzentration steht. R_{min} und R_{max} stellen die Extrembedingungen dar, die mit calciumfreier Lösung und bei Calciumsättigung ermittelt wurden. $F380_{min}$ und $F380_{max}$ stehen für die absoluten Fluoreszenzintensitäten bei 380 nm unter den beiden Extrembedingungen. Die Dissoziationskonstante K_d von Fura-2 für Calciumionen beträgt 264 nM bei Raumtemperatur (22°C).

Um den Calciumeinstrom von der Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Calciumspeichern zu unterscheiden, wurden gleichzeitig Calciummessungen und sogenannte Manganquench-Experimente mit Manganionen-haltiger Badlösung durchgeführt. In der Regel erfolgten diese Messungen innerhalb von 48 bis 61 Stunden nach Abschluss der Transfektionen. Dabei wurde die Fura-2-Gesamtfluoreszenz am isosbestischen Punkt von 360 nm detektiert, da sie an diesem Punkt unabhängig von der Calciumkonzentration ist. Manganionen (Mn^{2+}) werden von fast allen calciumpermeablen Kanälen geleitet und bilden mit Fura-2 einen nicht-fluoreszierenden Komplex. Die Auslöschung („quenching“) der Fura-2-Fluoreszenz durch Mn^{2+} ist somit ein Maß für den Einstrom von divalenten Kationen aus dem Extrazellulärraum. Bei den Manganquench-Experimenten mit transfizierten und nicht-transfizierten HEK293-Zellen

wurden 90 Sekunden nach Messbeginn 200 μM MnCl_2 kontinuierlich superfundiert. Dabei wurde die Anfangsfluoreszenz jeder einzelnen Zelle vor Beginn der Superfusion mit Mn^{2+} auf 100% normiert. Die Manganquenchrage in Prozent pro Sekunde ($\% \text{ s}^{-1}$) als Maß für den Einstrom von divalenten Kationen lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Manganquenchrage} = \frac{St_v - St_s}{St_v} * (-100) \quad \text{in } \% \text{ s}^{-1}$$

St_v: die Steigung pro Sekunde des Fluoreszenzverlaufs bei 360 nm vor Applikation eines Stimulus in Anwesenheit von Manganionen.

St_s: die initiale Steigung pro Sekunde des Fluoreszenzverlaufs unter der Stimulation mit hypoosmolarer Lösung oder mit einem Agonisten.

Die Ermittlung der Steigung erfolgte entweder über eine Zweipunktbestimmung oder über eine Ausgleichsgerade. Zellen mit einer basalen Manganquenchrage (bestimmt in Anwesenheit von Mn^{2+} , aber vor der Applikation eines Stimulus) von $\geq 0,20\% \text{ s}^{-1}$ wurden grundsätzlich ausgeschlossen.

2.2.5 Elektrophysiologie

2.2.5.1 Ganzzelleableitungen

Patch-Clamp-Messungen in der konventionellen Ganzzellkonfiguration wurden an HEK293-, an A7r5- und an frisch isolierten glatten Muskelzellen aus Gehirnarterien mit einem inversen Mikroskop (Olympus IX 70, Hamburg, Deutschland) bei Raumtemperatur (23°C) durchgeführt. Die Messungen der transfizierten HEK293- und A7r5-Zellen wurden jeweils 48 Stunden nach Abschluss der Transfektionen durchgeführt. Die Zellen wurden während der Messungen in einer Durchflussskammer (Eigenbau) kontinuierlich mit folgender Badlösung (B2) superfundiert: (in mM): 110 NaCl, 5 CsCl, 2 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 Glukose, 10 HEPES, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und mit Mannitol auf eine Osmolarität von 300 mOsm kg^{-1} ergänzt. Die hypoosmolare Lösung wies die gleichen Salzkonzentrationen auf, jedoch ohne den Zusatz von Mannitol, so dass sich daraus Osmolaritäten von 249 bis 253 mOsm kg^{-1} ergaben. Die Osmolaritäten der Bad- und Pipettenlösungen wurden jeweils mit dem Dampfdruck-Osmometer Vapro 5520 (Wescor Inc., Logan, USA) bestimmt. Die Stimulationen der HEK293-Zellen in der Ganzzellkonfiguration erfolgten entweder durch Applikation eines Agonisten (100 μM Histamin, 100 μM Carbachol, 100 nM Angiotensin II, 100 nM Endothelin-1, 1 μM Vasopressin) oder durch Applikation des membranpermeablen DAG-Analogons 1-Oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (OAG, 100 μM , Calbiochem) in der

Badlösung B2. Da OAG zur Mizellenbildung neigt, enthielt die OAG-haltige Badlösung zusätzlich 1‰ fettsäurefreies Albumin.

Die isolierten glatten Muskelzellen aus Gehirnarterien wurden ebenso wie die HEK293-Zellen mit B2 superfundiert. Zusätzliche Experimente wurden hierbei durchgeführt mit einer natriumfreien Badlösung, deren Natriumionenkonzentration äquimolar durch N-Methyl-D-Glucamin (NMDG⁺) ersetzt wurde. Um eventuell vorhandene spannungsabhängige Calciumkanal-Ströme in den isolierten glatten Muskelzellen auszuschließen, wurde bei einigen Experimenten der Calciumkanalblocker Nimodipin (10 µM, Sigma) der Standardbadlösung B2 zugesetzt. Eine Beteiligung von Chloridströmen an den Ganzzellströmen wurde mit Hilfe von drei verschiedenen Chloridkanalblockern, 5-Nitro-2-(3-phenyl-propylamino)-benzoesäure (NPPB, Sigma), Nifluminsäure (Sigma) und 4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonsäure (DIDS, Sigma) im Einzelnen analysiert. Zur Überprüfung einer möglichen Beteiligung von speichergesteuerten, calciumpermeablen Kationenkanälen am Gesamtstrom wurde Gadoliniumchlorid (GdCl₃, 5 µM, Sigma) der Standardbadlösung B2 zugesetzt.

A7r5-Zellen wurden zu Beginn der Messungen ebenfalls mit B2 superfundiert. Nach dem Erreichen der Ganzzellkonfiguration wurden der Badlösung jedoch zusätzlich 10 µM Nicardipin (Sigma), ein Inhibitor von spannungsgesteuerten Calciumkanälen, und 50 µM NPPB zugesetzt. Um die TRPC-Ströme bei A7r5-Zellen etwas zu vergrößern, wurde die extrazelluläre Calciumionenkonzentration auf 200 µM reduziert.

Die Stromantworten der konventionellen Ganzzelleableitungen wurden mit einem EPC10 Verstärker (HEKA, Lambrecht, Deutschland) aufgenommen und digitalisiert. Die Messungen selbst wurden mit dem Messprogramm Pulse (Pulse v8.63, HEKA Electronics, Dr. Schulz GmbH, Lambrecht, Deutschland) erhoben. Der Vorverstärker war auf einem Mikromanipulator (LN min/combi, Luigs & Neumann, Ratingen Deutschland) befestigt.

Die Patchpipetten wurden aus Borosilikatglas (GB 150TF-8F, Science Products, Hofheim, Deutschland) mit einem automatischen Pipettenziehgerät (DMZ-Universal-Puller, Zeitz Instrumente, München, Deutschland) mittels drei Ziehvorgängen hergestellt und feuerpoliert und besaßen nach dem Befüllen mit der Pipettenlösung Widerstände von 3,5 bis 4,0 MΩ für HEK293-Zellen und 5,5 bis 8,0 MΩ für A7r5- und isolierte glatte Muskelzellen. Um die Pipettenkapazität zu verringern wurden bei allen Ganzzelleableitungen die Pipettenspitzen mit dem Polymer R-6101 (Dow Chemicals, La Jolla, USA) beschichtet. Als Standardpipettenlösung wurde folgende Lösung verwendet: (in mM) 120 CsCl, 9,4 NaCl, 1 MgCl₂, 0,2 Na₃GTP, gepuffert auf 100 nM freies Ca²⁺ mit 10 BAPTA, 10 HEPES, mit CsOH auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und mit einer Osmolarität von 298 bis 301 mOsm kg⁻¹.

Für die Messungen der isolierten glatten Gefäßmuskelzellen wurde außerdem eine zweite Pipettenlösung gleicher Zusammensetzung benutzt, die zusätzlich 50 μM des potenten, nicht-membranpermeablen DAG-Analogons 1-Stearyl-Arachidonoyl-*sn*-Glycerol (SAG, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) enthielt. Die SAG-haltige Pipettenlösung enthielt 0,5% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) und wurde jeweils kurz vor Befüllen der Patchpipette für mindestens sieben Minuten ins Ultraschallbad gegeben, um eine Mizellenbildung und ein daraus resultierendes Verstopfen der Patchpipette zu verhindern. Außerdem wurden bei isolierten glatten Gefäßmuskelzellen zusätzlich IP_3 -Infusionen mit 100 μM D-myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) in der SAG-freien Pipettenlösung durchgeführt, um speichergesteuerte Kationeneinströme zu untersuchen. Einige IP_3 -Infusionen wurden mit einer chloridarmen Pipettenlösung durchgeführt, wobei CsCl äquimolar durch Cäsiummethansulfonat ersetzt war. Diese Pipettenlösung diente dazu, Chloridströme über ihr Umkehrpotential zu erkennen. Die Änderungen der Stromdichten während der IP_3 -Infusionen bei ± 60 mV wurden berechnet als Quotienten der mittleren Stromdichten aus der ersten bis fünften Sekunde und aus der 120. bis 125. Sekunde nach dem Aufreißen der Zellmembran.

Die Serienwiderstände in der Ganzzellkonfiguration betragen 5 bis 20 M Ω und wurden zu 70% über den dafür vorgesehen Schaltkreis des Verstärkers kompensiert. Das Liquid Junction-Potential betrug +4,0 mV und die Offsetkorrektur wurde vom Pulse-Programm automatisch durchgeführt. Die Membrankapazität wurde vom EPC10 automatisch bestimmt, ebenso fand die Membrankapazitätskompensation automatisch statt. Das Haltepotential betrug jeweils -60 mV. Um Strom-Spannungsbeziehungen zu erhalten, die als Kennlinien für bestimmte Kanäle dienen können, wurden trianguläre Spannungsrampen von -100 bis $+60$ mV mit einer Frequenz von 1 Hz mit einer Rampengeschwindigkeit von $0,4 \text{ V s}^{-1}$ appliziert. Die Daten wurden nach Filterung mit 1,67 kHz mit einer Frequenz von 5 kHz aufgenommen.

An isolierten glatten Gefäßmuskelzellen aus Gehirnarterien wurden zusätzlich Membranpotentialmessungen durchgeführt. Hierfür diente eine Stromklemme bei 0 pA in der Ganzzellkonfiguration. Diese Daten wurden mit einer Frequenz von 200 Hz über einen Zeitraum von mindestens zehn Minuten aufgenommen. Um möglichst physiologische Bedingungen während der Stromklemme-Messungen zu erreichen, wurde folgende Pipettenlösung benutzt (in mM): 80 KCl, 50 Kaliumglutamat, 2 MgCl_2 , 2 MgATP, 10 HEPES, mit 10 BAPTA auf 100 nM freies Ca^{2+} gepuffert und mit KOH auf pH 7,2 eingestellt. Die Badlösung hatte folgende Zusammensetzung (in mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 Glukose, 10 HEPES, eingestellt mit NaOH auf pH 7,4. Das Liquid-Junction-Potential zwischen den beiden Lösungen betrug +8,0 mV.

Es wurden nur Messungen in die Auswertung miteinbezogen, die für mindestens fünf Minuten ein stabiles Membranpotential zeigten und ein Membranpotential von ≤ -20 mV mit einer glockenförmigen Häufigkeitsverteilung aufwiesen.

Als direkte mechanische Stimulationen an HEK293-Zellen in der Ganzzellkonfiguration dienten zwei verschiedene Stimuli. Als erstes wurde ein positiver Überdruck über die Patchpipette in Höhe von 5 bis 10 cmH₂O unter Kontrolle eines Wassermanometers appliziert (als Druck bedingte Membrandehnung bezeichnet). Höhere Drücke führten hierbei zum Aufreißen der Zellmembran und zum Verlust der Messkonfiguration. Als zweite mechanische Stimulation diente die vertikale Verschiebung der Patchpipette um 8 bis 10 μ m nach oben (als Zug bedingte Membrandehnung bezeichnet). Bei der Zug bedingten Membrandehnung mussten Polylysin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)-beschichtete Kulturschälchen verwendet werden, da nur ausreichend adhärente Zellen der Verschiebung der Patchpipette standhielten. Während der Druck oder Zug bedingten Membrandehnungen konnten keine Veränderungen des Serienwiderstands beobachtet werden.

2.2.5.2 Einzelkanalableitungen in der inside-out-Konfiguration

Einzelkanalableitungen wurden an HEK293-Zellen durchgeführt, die 72 Stunden zuvor mit 2 μ g hTRPC6-IRES-EGFP transfiziert worden waren und die ca. drei bis zehn Stunden vor den Messungen auf Polylysin-beschichtete Kulturschälchen umgesetzt wurden. Die Einzelkanalmessungen der isolierten Membranflecken in der inside-out-Konfiguration, bei der die Innenseite der Membran der Badlösung zugewendet ist, fanden jeweils bei Raumtemperatur (23°C) statt. Identische Bad- und Pipettenlösungen mit folgender Zusammensetzung wurden verwendet (in mM): 130 Cäsium-methansulfonat, 102 CsCl, 1 MgCl₂, 9,949 CaCl₂, 10 BAPTA (100 nM freies Ca²⁺) und 10 HEPES (mit CsOH auf pH 7,2 eingestellt), was in einer Osmolarität von 294 mOsm kg⁻¹ resultierte. Die Badlösung enthielt zusätzlich 50 μ M NPPB, um eventuell auftretende Chloridströme zu unterdrücken. Die Patchpipetten aus Borosilikatglas wurden mit R-6101 beschichtet und hatten Widerstände von 8 bis 10 M Ω . Die Daten der Einzelkanalableitungen wurden mit einem sehr rauscharmen EPC9-Verstärker (HEKA, Lambrecht, Deutschland) aufgenommen. Die Messungen selbst wurden mit dem Messprogramm Pulse (Pulse v8.63, HEKA Electronics, Dr.Schulz GmbH, Lambrecht, Deutschland) erhoben bei einem Haltepotential von -60 mV und mit einer Frequenz von 20 kHz nach einer Filterung mit 6,67 kHz. Die mechanische Stimulation erfolgte mittels eines negativen Drucks von 10 oder 70 cmH₂O, der unter Kontrolle eines Wassermanometers über die Patchpipette auf das isolierte Membranstück appliziert wurde. Diese Stimulation wird in der vorliegenden Arbeit als Sog bedingte Membrandehnung bezeichnet. Am Ende jeder Messung

wurden zur Ermittlung der maximalen TRPC6-Kanalaktivitäten jeweils 10 μM SAG über die Badlösung appliziert. Die Auswertung der konsekutiven Kanalaktivitäten („NPo“, das Produkt aus der Anzahl der Kanäle und der Offenwahrscheinlichkeit) in 1 s-Schritten wurde mit Hilfe der Software PC DAC 1.1.5 (Marburg University Software-Team) durchgeführt.

2.2.6 Bestimmung der Inositolphosphatproduktion

Um die Produktion von Inositolphosphaten (IP) zu messen, wurden je 100.000 COS-7-Zellen pro Loch in drei 12-Loch-Schalen ausgesät und 24 Stunden später mit jeweils 0,1 μg pEGFP und 1 μg gpH₁R- oder rM₅R-pcDNA kotransfiziert. Nach 30 Stunden wurden die transfizierten COS-7-Zellen markiert mit jeweils 1 μCi myo-[2-³H] Inositol (16 Ci/mmol, Amersham Biosciences Limited, Buckinghamshire, Großbritannien) pro Loch. Nach einer Markierungszeit von 18 Stunden wurden die Zellen zunächst mit 1 ml 10 mM LiCl-haltigem DMEM gewaschen und fünf Minuten lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml Badlösungen verschiedener Osmolaritäten appliziert. Die isoosmolare Badlösung B3 war folgendermaßen zusammengesetzt: (in mM) 125 NaCl, 10 LiCl, 1,5 MgCl₂, 0,1 CaCl₂, 10 Glukose, 10 HEPES (pH 7,4 mit NaOH). Es resultierten Osmolaritäten von 295 bis 303 mOsm kg⁻¹. Die hypoosmolaren Lösungen besaßen die gleichen Ionenkonzentrationen wie die Badlösung B3, jedoch wiesen sie niedrigere NaCl-Konzentrationen auf von 100, 75, 50 und 25 mM, was in Osmolaritäten von 250, 200, 150 und 100 mOsm kg⁻¹ mit einer Toleranz von ± 4 mOsm kg⁻¹ resultierte. Zur Durchführung von Agonistenstimulationen wurden die beiden Agonisten Histamin oder Carbachol (jeweils 100 μM) der isoosmolaren Badlösung B3 zugefügt. Bei Experimenten mit dem inversen Muskarinrezeptor-Agonisten Atropin wurde die maximale Hemmkonzentration von 1 μM 10 Minuten vor der hypoosmolaren Stimulation appliziert. Die hypoosmolare Stimulation erfolgte unter 1 μM Atropin für jeweils 30 Minuten bei 37°C. Für das Beenden der Stimulationen wurden pro Loch 300 μl 0,24 N NaOH-Lösung zugesetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Neutralisation der alkalischen Lösung mit Hilfe von 120 μl 0,2 M Ameisensäure. Anschließend wurde die IP-Fraktion über Anionenaustauscher-Chromatographie isoliert (Berridge et al., 1983) und in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (LS 6000 IC, Beckman Instruments, Fullerton, USA) gemessen. Die jeweiligen IP-Fraktionen wurden mittels Sechsfach-Messungen bestimmt.

2.2.7 Messung des myogenen Gefäßtonus

Die Messungen des myogenen Gefäßtonus wurden an isolierten Gehirnarterienabschnitten von männlichen Sprague-Dawley Ratten (80 bis 300 g) durchgeführt. Die

Ratten wurden zunächst mit Isofluran anästhesiert und anschließend enthauptet. Das herauspräparierte Gehirn wurde sofort in eiskalte, mit Carbogen begaste, physiologische Salzlösung (B4) mit folgender Zusammensetzung überführt: (in mM) 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 KH_2PO_4 , 24 NaHCO_3 , 1,2 Mg_2SO_4 , 11,1 Glukose, 1,6 CaCl_2 und durch kontinuierliches Begasen mit Carbogen auf pH 7,4 gebracht. Anschließend wurden zwei Arten von Gehirnarterien herauspräpariert und vom Bindegewebe befreit: zum einen die hinteren Hirnschlagadern (*A. cerebri posterior*) und zum anderen die oberen Kleinhirnschlagadern (*A. cerebelli anterior*). Die gesäuberten Gehirnarterienabschnitte hatten eine Länge von ungefähr 1 mm und einen Durchmesser von 140 bis 290 μm . Diese Gehirnarterienabschnitte wurden mit beiden Enden auf jeweils zwei speziell ausgezogenen, luftblasenfrei mit B4 gefüllten Borosilikat-Kapillaren befestigt, die zuvor in einer 2 ml-Messkammer (Living System Instrumentation, Burlington, Vermont) eingebaut wurden. Die isolierten Gefäßabschnitte wurden kontinuierlich mit der Carbogen-begasten Badlösung B4 superfundiert, mit einer Superfusionsrate von 3,6 ml pro Minute und einer Temperatur von 35°C. Die Messungen erfolgten mit einem inversen Mikroskop (Nikon Diaphot mit einem Planfluor 10x/0,3 Objektiv), das mit einer CCD-Kamera (Panasonic WV-BL1200) ausgestattet war. Während der Messungen wurde der Außendurchmesser der Gefäßabschnitte mit einer Frequenz von 1 Hz unter Verwendung der VasoTrack Software (TSE, Bad Homburg, Deutschland) aufgenommen. Ein konstanter intravaskulärer Druck von 60 mmHg ohne Durchfluss wurde mit Hilfe eines elektronischen Druck-Servosystems (Living Systems Instrumentation, Burlington, Vermont) erzeugt. Um eine maximale Gefäßkonstriktion hervorzurufen, wurde zu Beginn der Messungen für eine Minute eine Hoch-Kalium-Lösung appliziert, die 63,7 mM NaCl und 60 mM KCl enthielt und ansonsten die gleiche Salzzusammensetzung und Osmolarität wie B4 aufwies. Mittels einer nominell calciumfreien Lösung, die die gleiche Zusammensetzung hatte wie B4 ohne den Zusatz von CaCl_2 , wurde die maximale Gefäßdilataion ausgelöst.

2.2.8 Statistik

Die experimentell gewonnenen Daten wurden, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwerte und deren Standardfehler (S.E.M., „standard error of the mean“) dargestellt. Als Signifikanztest diente der gepaarte oder ungepaarte Student's *t*-Test zwischen zwei Datensätzen. Die Signifikanzen wurden bei einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$ akzeptiert und werden in der vorliegenden Arbeit mit * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) und *** ($P < 0,001$) dargestellt. Um mehrere Datensätze miteinander zu vergleichen, wurde bei den Calcium- und Manganquenchmessungen die einfaktorielle Varianzanalyse

(ANOVA, „one-way analysis of variance“) mit dem Mittelwertvergleich nach Scheffé angewendet.

3 Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Analyse von TRPC-Strömen in glatten Muskelzellen von Gehirnarterien aus Wildtyp- und TRPC6-gendefizienten Mäusen

Die Arbeitsgruppe von Mark T. Nelson hatte im Jahr 2002 gezeigt, dass TRPC6-Kanäle in der Gefäßmuskulatur eine wichtige Rolle für den myogenen Gefäßtonus spielen. Um die physiologische Rolle der TRPC6-Kanäle in der Gefäßmuskulatur genauer zu beleuchten, wurde die Funktion des TRPC6 in isolierten glatten Muskelzellen aus Wildtypmäusen und aus von Alexander Dietrich entwickelten TRPC6-gendefizienten (TRPC6^{-/-}) Mauslinien verglichen (Dietrich et al., 2005). Dazu wurden elektrophysiologische Ganzzelleableitungen von frisch isolierten glatten Muskelzellen aus Gehirnarterien durchgeführt (Abbildung 3.1). Die Gehirnarterien sind relativ leicht vom Gehirn abzulösen und leicht vom Bindegewebe zu befreien.

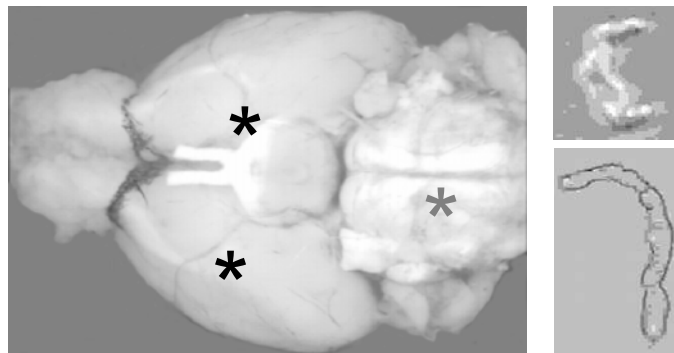


Abbildung 3.1: Isolierte glatte Muskelzellen aus Gehirnarterien von Mäusen. Die Unterseite eines Mausgehirns ist dargestellt. Die Sterne markieren die präparierten Gehirnarterien (schwarz: *A. cerebelli media* und grau: *A. basilaris*). Das Bild rechts oben zeigt eine typische, isolierte glatte Muskelzelle. Das Bild rechts unten zeigt eine Kette von zusammenhängenden, isolierten glatten Muskelzellen.

3.1.1 Charakterisierung der SAG-Aktivierung

Um die DAG-sensitiven, endogenen TRPC3-, 6- und 7-Kanäle in glatten Muskelzellen zu aktivieren, wurde das nicht-membranpermeable DAG-Analogen 1-Stearyl-2-arachidonyl-*sn*-glycerol (SAG) verwendet. SAG wurde hierbei gezielt über die Pipettenlösung in die einzelnen Zellen infundiert. Dieser neue methodische Ansatz der SAG-Infusionen wurde zuvor systematisch an hTRPC6 oder mTRPC7 exprimierenden HEK293-Zellen untersucht. Dazu wurden Infusionen mit verschiedenen SAG-

Konzentrationen (1, 10, 20, 50 und 100 μM , $n \geq 6$ für jede Konzentration) durchgeführt. SAG in einer Konzentration von 100 μM führte bei allen gemessenen Zellen zu Stromerhöhungen mit charakteristischen TRPC6- bzw. TRPC7-Strom-Spannungsbeziehungen mit einem sogenannten doppelt-rektifizierenden Verlauf und einem Umkehrpotential bei 0 mV. 83% der Zellen, die mit 100 μM SAG infundiert wurden, zeigten eine instantane Aktivierung, d.h. direkt nach dem Aufreißen der Zellmembran wurde der maximale Strom gemessen (Abbildung 3.2A).

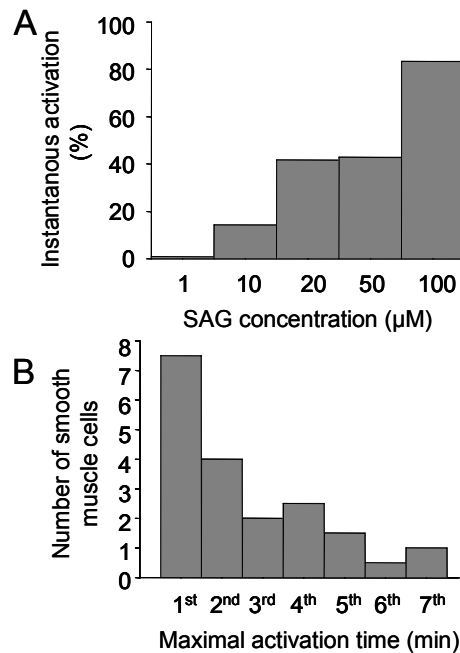


Abbildung 3.2: Charakterisierung der SAG-Aktivierung. A, Zusammenfassung der Ganzzelleableitungen von hTRPC6 oder mTRPC7 exprimierenden HEK293-Zellen mit 1, 10, 20, 50 und 100 μM SAG in der Pipettenlösung ($n \geq 6$ für jede Konzentration). B, Zusammenfassung von Ganzzelleableitungen isolierter glatter Muskelzellen mit 50 μM SAG in der Pipettenlösung.

Mit 50 μM oder 20 μM infundiertem SAG zeigten 43% bzw. 42% der Zellen instantane Aktivierungen nach Aufreißen der Zellmembran. 10 μM SAG führte nur bei 17% der Zellen zu instantanen Aktivierungen. Den kleinsten Anteil der instantanen Aktivierungen von 1% ergaben Infusionen mit 1 μM SAG. Instantane Aktivierungen haben den Nachteil, dass ihr Maximum häufig nicht genau bestimmt werden kann aufgrund einer fehlenden Aktivierungskinetik. Um sicherzugehen, dass es bei jeder Messung zu einer Aktivierung kommen kann, wurde die Konzentration von 50 μM SAG, bei der weniger als jede zweite Zelle instantan reagiert, an glatten Muskelzellen ausprobiert. In frisch isolierten Gefäßmuskelzellen aus Wildtypmäusen führten Infusionen mit 50 μM SAG bei 39% der gemessenen Zellen zu maximalen Strömen innerhalb der ersten Minute nach Aufreißen der Zellmembran. Die restlichen Zellen zeigten innerhalb von 7 min maximale Stromantworten (Abbildung 3.2B). Demnach

waren die 50 μ M SAG-Infusionen geeignet, um SAG-induzierbare Ströme in glatten Muskelzellen zu untersuchen.

3.1.2 Vergleich der Stromantworten von glatten Muskelzellen aus Wildtyp- und aus TRPC6-gendefizienten Mäusen

Als erstes wurden die Membrankapazitäten der Einzelzellen ermittelt, um auszuschließen, dass Unterschiede der Stromantworten auf unterschiedliche Zellgrößen der Wildtyp- und TRPC6^{-/-}-Zellen zurückzuführen sind. Die Membrankapazitäten, die anhand von automatischer Kapazitätskompensation bestimmt wurden, sind ein Maß für die Zelloberfläche und somit für die Größe der Zelle. Ganzzelleableitungen von Wildtyp- und TRPC6^{-/-}-Zellen ergaben keine Unterschiede der Membrankapazitäten ($6,6 \pm 0,3$ pF bei 37 Zellen von 8 Wildtypmäusen und $6,6 \pm 0,3$ pF bei 33 Zellen von sechs TRPC6^{-/-}-Mäusen), was zeigt, dass ein Ausschalten des TRPC6-Gens keinen Einfluss auf die Zellgröße hat.

Als nächstes wurden Ganzzellströme über die Zeit und die dazugehörigen Strom-Spannungsbeziehungen beider Muskelzelltypen mit und ohne SAG-Infusionen verglichen. In Abbildung 3.3A bis 3.3D sind exemplarische Stromdichtenzeitverläufe von glatten Muskelzellen aus Wildtyp- und TRPC6^{-/-}-Mäusen dargestellt. Interessanterweise wurden in Abwesenheit von SAG bei Zellen aus TRPC6^{-/-}-Mäusen signifikant höhere Stromdichten in Auswärts- ($P < 0,05$) und Einwärtsrichtung ($P < 0,05$) beobachtet (Abbildung 3.3G), was auf eine höhere Kanalaktivität der TRPC6-gendefizienten Zellen hinweist. Durch Infusionen mit 50 μ M SAG ließen sich erstaunlicherweise sowohl in glatten Muskelzellen aus Wildtyp- als auch in denen aus TRPC6^{-/-}-Mäusen TRPC-Kanäle aktivieren, was sich in Stromdichtenerhöhungen in Einwärts- und Auswärtsrichtung äußerte. Die SAG-induzierten Stromantworten zeigten die für diese glatten Muskelzellen charakteristischen Strom-Spannungsbeziehungen mit einer schwachen Auswärtsrektifizierung und mit einem Umkehrpotential bei 0 mV (Abbildung 3.3E und 3.3F). Eine qualitative Veränderung der Strom-Spannungsbeziehungen bei glatten Muskelzellen aus TRPC6^{-/-}-Mäusen war nicht vorhanden. Durch die SAG-Infusionen vergrößerten sich sogar die Stromantworten bei TRPC6^{-/-}-Zellen. Diese wiesen signifikant höhere Stromdichten bei +60 mV auf ($P < 0,001$). Damit waren sie fast zweifach höher als bei Wildtypzellen. Auch die Stromdichten bei -60 mV waren signifikant höher ($P < 0,05$). Das könnte darauf hindeuten, dass glatte Muskelzellen von TRPC6^{-/-}-Mäusen mehr DAG-aktivierbare Kanäle besitzen oder dass diese Kanäle eine höhere Offenwahrscheinlichkeit haben als in Wildtypzellen.

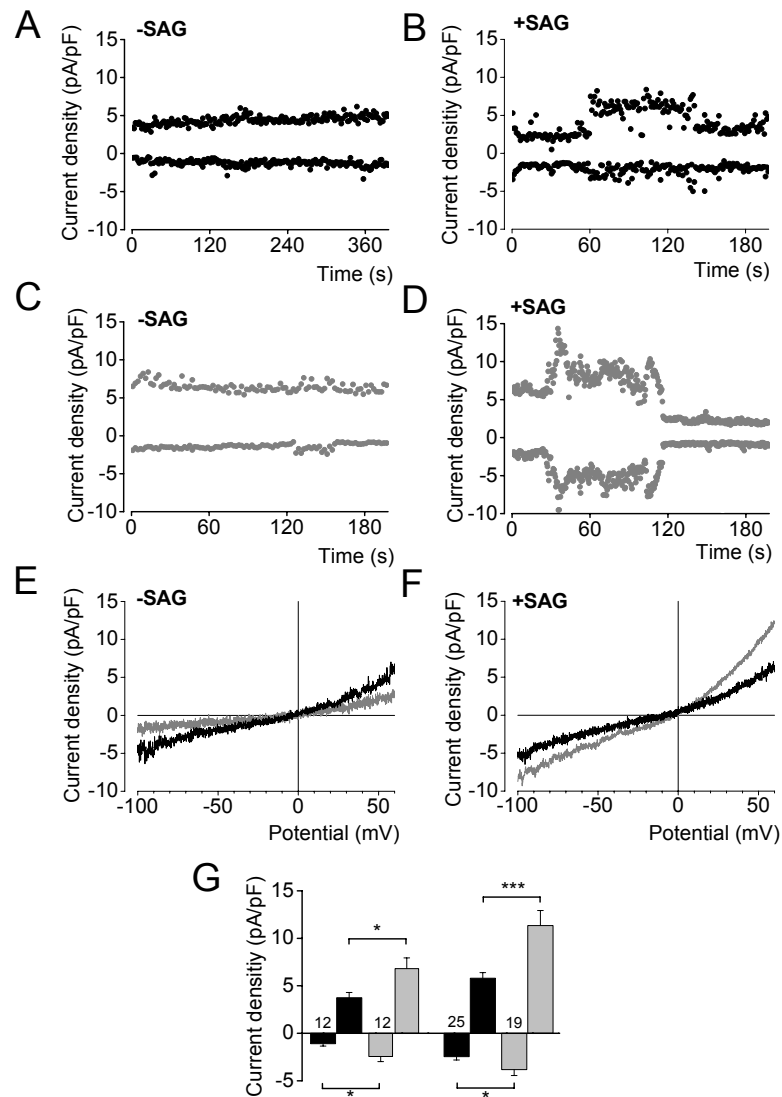


Abbildung 3.3: Vergleich von glatten Wildtyp- und TRPC6^{-/-}-Muskelzellen aus Gehirnarterien.

Exemplarische Stromdichtenzeitverläufe von Ganzzelleableitungen isolierter glatter Muskelzellen aus Wildtyp- (schwarz) und TRPC6^{-/-}-Mäusen (grau) bei Haltepotentialen von ± 60 mV sind dargestellt. Messungen mit 50 μ M SAG (+SAG) und ohne SAG (-SAG) in der Pipettenlösung sind zu sehen (A-D). Charakteristische Strom-Spannungsbeziehungen von Wildtyp- (schwarz) und TRPC6^{-/-}-Gefäßmuskelzellen (grau) in Abwesenheit (E) und Anwesenheit (F) von SAG in der Pipettenlösung werden gezeigt (E und F). Die Zusammenfassungen der Stromdichten in Auswärts- und Einwärtsrichtung bei ± 60 mV von Wildtyp- und TRPC6^{-/-}-Gefäßmuskelzellen mit und ohne SAG-Infusionen sind hier dargestellt (G).

Um die Beteiligung von TRPC-Kanälen an den Ganzzellströmen aufzuzeigen, wurden die SAG-infundierten Gefäßmuskelzellen zusätzlich mit nominell calcium- und magnesiumfreier Badlösung perfundiert, denn eine Stromerhöhung könnte auf eine Potenzierung der TRPC-Kanalaktivität hinweisen (Shi et al., 2004). Diese Applikation führte sowohl bei den glatten Wildtyp-Muskelzellen (n = 7 von 2 Tieren) als auch bei TRPC6^{-/-}-Muskelzellen (n = 6 von 2 Tieren) zu deutlichen, signifikanten Strompotenzierungen mit mittleren Stromzunahmen von 65% bis 75% in Einwärts- und Aus-

wärtsrichtung ($P < 0,05$ bei ± 60 mV sowie $P < 0,05$ bei $+60$ mV und $P < 0,01$ bei -60 mV) (Abbildung 3.4A). Diese Strompotenzierungen waren vollständig reversibel. Diese Potenzierungen sind ein wichtiges Indiz für eine Beteiligung von TRPC-Kanälen an den untersuchten Ganzzellströmen in den isolierten Gefäßmuskelzellen.

Mit Hilfe des äquimolaren Austausches von NaCl durch NMDG-Cl in der Badlösung wurde der Anteil des Natriumstroms am gesamten Ganzzellstrom systematisch untersucht für beide Zelltypen mit und ohne SAG-Infusionen. In allen Fällen wurden die gemessenen Einwärtsströme um mehr als 80% reduziert (Abbildung 3.4B). Das bedeutet, dass die Einwärtsströme hauptsächlich natriumgetriebene Ströme sind und dass sich die restlichen 20% wahrscheinlich aus Chlorid-, Calcium- und Leckströmen zusammensetzen.

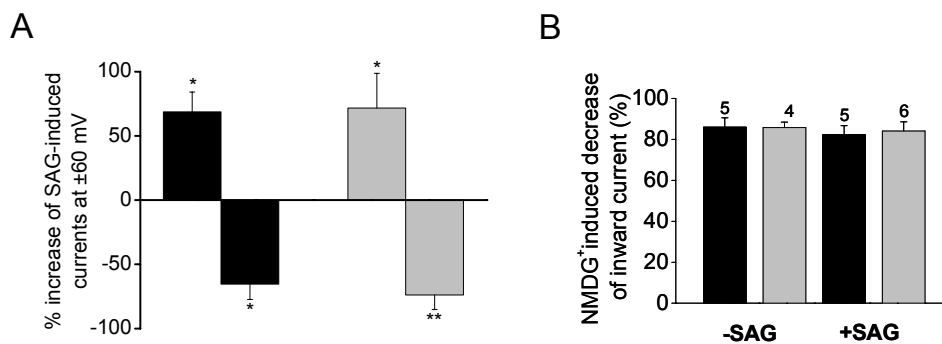


Abbildung 3.4: Kontrollelexperimente mit divalentfreier Lösung und NMDG⁺. Die Zusammenfassung der Strompotenzierungen durch divalentfreie (nominell calcium- und magnesiumfreie) Badlösung bei ± 60 mV mit 50 μ M SAG in der Pipettenlösung ist dargestellt (A). Wildtyp- (schwarz, $n = 7$ von 2 Tieren) und TRPC6^{-/-}-Zellen (grau, $n = 6$ von 2 Tieren) sind zu sehen. Die Zusammenfassung der Abnahme von Einwärtsströmen bei -60 mV durch NMDG⁺ in der Badlösung mit und ohne SAG in der Pipettenlösung ist dargestellt für Wildtyp- (schwarz) in TRPC6^{-/-}-Zellen (grau) (B). Die Zahlen über den Balken stehen für die Anzahl der gemessenen Zellen.

Die beobachteten Strom-Spannungsbeziehungen aus den Spannungsrampen ließen niemals die Vermutung aufkommen, dass spannungsgesteuerte Calciumkanäle (Ca_v) in diesen präparierten glatten Muskelzellen aktiviert waren. Zur Sicherheit wurden zusätzlich depolarisierende Spannungssprünge auf 0 mV appliziert, um eindeutig zu zeigen, dass keine transienten Calciumströme vorhanden waren. Eine weitere zusätzliche Badapplikation des L-Typ-Calciumkanal-Antagonisten Nimodipin in seiner maximalen Hemmkonzentration von 10 μ M deutete ebenfalls auf das Fehlen von Calciumströmen unter allen Kombinationen hin (siehe Tabelle 3.1). Diese Befunde weisen darauf hin, dass Ca_v -Kanäle keinen Anteil an den gemessenen Ganzzellströmen haben. Höchstwahrscheinlich werden diese Kanäle durch den enzymatischen Verdau bei der Isolierung der glatten Muskelzellen zerstört oder inaktiviert.

Die verwendeten Bad- und Pipettenlösungen beinhalteten als Anion nur Chlorid. Um zu untersuchen, welchen Anteil Chloridströme am gesamten Ganzzellstrom besaßen, wurden jeweils verschiedene Chloridkanalblocker herangezogen: 5-Nitro-2-(3-phenyl-propylamino)-benzoesäure (NPPB, 50 μM), Nifluminsäure (100 μM) und 4,4'-Diisothio-cyanostilbene-2,2'-disulfonsäure (DIDS, 300 μM). Alle drei Chloridkanalblocker beeinflussten die Höhe der Stromantworten bei Wildtyp- und TRPC6^{-/-}-Muskelzellen mit und ohne SAG-Infusionen nicht (Tabelle 3.1). Das deutet darauf hin, dass Chloridströme keinen bedeutenden Anteil am Gesamtstrom hatten.

	TRPC6 ^{+/-}	TRPC6 ^{-/-}	TRPC6 ^{+/-}	TRPC6 ^{-/-}
	-SAG	+SAG	-SAG	+SAG
Nimodipine (10 μM)	4	4	6	4
NPPB (50 μM)	6	4	6	3
Niflumic acid (100 μM)	4	4	5	3
DIDS (300 μM)	3	3	4	3

Tabelle 3.1: Kontrollmessungen mit Calciumkanal- und Chloridkanalblockern. Die Anzahl der gemessenen glatten Muskelzellen in Anwesenheit der Chloridkanalblocker NPPB, Nifluminsäure und DIDS und des Calciumkanalblockers Nimodipin mit und ohne SAG in der Pipettenlösung wird angezeigt.

In den untersuchten Gefäßmuskelzellen sind sowohl TRPC3- als auch TRPC6-Kanäle exprimiert, was auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde (Dietrich et al, 2005). Da die typischen Eigenschaften der beiden TRPCs, wie Strom-Spannungskurve und Basalaktivität in diesen nativen Zellen nicht zu beobachten waren, wurde zur Unterscheidung die Gadoliniumsensitivität geprüft. Inoue et al. (2001) beschrieb für heterolog exprimierte TRPC6-Kanäle mittels elektrophysiologischer Ganzzellableitungen eine Gadoliniumhemmung mit einem IC₅₀-Wert von 1,9 μM (Inoue et al., 2001) während Trebak et al. (2002) für TRPC3-Kanäle mittels fluorimetrischer Calciummessungen maximale Hemmkonzentrationen zwischen 0,1 bis 1 μM Gadolinium charakterisierte. Da häufig methodisch bedingte Sensitivitätsänderungen existieren, wurde der IC₅₀-Wert für Gadolinium an TRPC3 exprimierenden HEK293-Zellen mittels vergleichbarer Ganzzellableitungen zu den TRPC6-Untersuchungen von Inoue et al. (2001) durchgeführt. Die Konzentrations-Wirkungskurve ergab hierfür einen IC₅₀-Wert von 2,5 μM (Abbildung 3.5A), was zeigt, dass sich mittels Gadolinium die

TRPC3- und TRPC6-Kanäle nicht diskriminieren lassen. Messungen von isolierten glatten Muskelzellen aus Wildtyp- und TRPC6^{-/-}-Mäusen mit 1 μM oder 5 μM GdCl₃ in der Badlösung zeigten eine Verringerung der Einwärtsströme bei -60 mV um 5 bis 12% (Abbildung 3.5B). Zum einen deutet das darauf hin, dass kapazitive Calciumeinströme, die sehr sensitiv für eine Gadoliniumhemmung sind, offenbar nicht signifikant an den gemessenen Ganzzellströmen beteiligt waren und zum anderen, dass die nativen TRPC-Ströme nicht die erwartete Gadoliniumsensitivität besitzen.

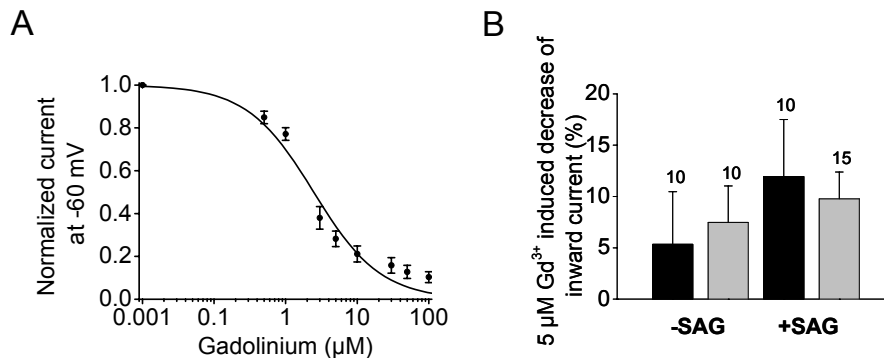


Abbildung 3.5: Hemmung des Einwärtsstroms durch Gadolinium. Die Konzentrationshemmungskurve von Gadolinium, die mittels Ganzzelleitungen von hTRPC3 exprimierenden HEK293-Zellen ($n = 6$) erstellt wurde, ist zu sehen (A). Der IC₅₀-Wert beträgt 2,5 μM und wurde mit der Hill-Gleichung ermittelt. Die Zusammenfassung der Abnahme von Einwärtsströmen von isolierten glatten Muskelzellen bei -60 mV mit 5 μM GdCl₃ in der Badlösung in Anwesenheit und Abwesenheit von SAG in der Pipettenlösung wird gezeigt (B).

Mittels IP₃-Infusionen über die Pipettenlösung wurde eine Beteiligung von speichergesteuerten Kanälen genauer untersucht. Die Infusionen von 100 μM IP₃ in glatte Muskelzellen erhöhten die endogenen Ströme in Abwesenheit von SAG (Abbildung 3.6). Dabei kam es niemals zu instantanen Stromerhöhungen, was darauf hindeutet, dass keine funktionellen speichergesteuerten Kanäle vorhanden waren. Der relative Anstieg der Stromdichten nach 120 s war 3,9fach \pm 0,8 bei +60 mV und 3,8fach \pm 1,1 bei -60 mV im Vergleich zu den Anfangsstromdichten und war damit nicht signifikant unterschiedlich ($P = 0,70$ bei +60 mV und $P = 0,70$ bei -60 mV) in Zellen aus Wildtyp ($n = 9$) und TRPC6^{-/-}-gendifizienten Mäusen ($n = 8$). Das deutet darauf hin, dass TRPC6-Kanäle in isolierten glatten Muskelzellen offenbar nicht an IP₃-aktivierbaren, speichergesteuerten Strömen beteiligt sind.

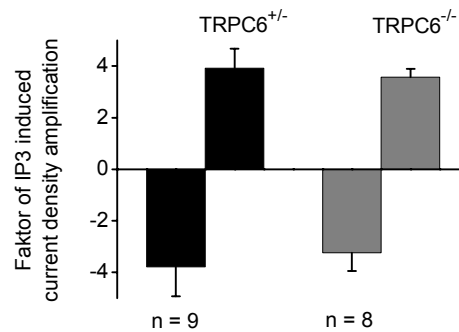


Abbildung 3.6: IP₃-Infusionen in glatte Muskelzellen. Die Stromdichtenerhöhungen durch Infusionen mit 100 μ M IP₃ in glatte Muskelzellen aus Wildtyp- (schwarz) und TRPC6^{-/-}-Mäusen (grau) werden hier dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DAG-sensitive und hauptsächlich natriumgetriebene Kationenströme sowohl aus Wildtyp- als auch aus TRPC6^{-/-}-Muskelzellen in der Spannungsklemme charakterisiert werden konnten. Ca_v-, Chlorid- und speichergesteuerte Kanäle waren am Gesamtstrom nicht oder nur geringfügig beteiligt. Zudem ließen sich die Ganzzellströme durch divalentfreie Lösung potenzieren, was auf eine Beteiligung von TRPC-Kanälen hindeutet. Interessanterweise waren die Stromdichten in TRPC6^{-/-}-Muskelzellen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Aktivators SAG höher als bei Wildtyp-Muskelzellen, was darauf hinweist, dass in glatten TRPC6^{-/-}-Muskelzellen mehr DAG-aktivierbare Kanäle vorhanden waren und/oder dass die vorhandenen Kanäle eine höhere Offenwahrscheinlichkeit besaßen.

3.1.3 Messungen des Membranpotentials

Um die funktionellen Konsequenzen der erhöhten Basalaktivität von isolierten glatten Muskelzellen aus Gehirnarterien von TRPC6-gendefizienten Mäusen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde das Membranpotential in der Ganzzellkonfiguration mittels einer Stromklemme bei 0 mA für mehr als sechs Minuten aufgezeichnet. Bei TRPC6^{-/-}-Zellen war das Ruhemembranpotential um ca. 10 mV depolarisiert im Vergleich zu Wildtypzellen. Die mittleren Membranpotentiale in TRPC6^{-/-}-Muskelzellen wiesen ein signifikant ($P < 0,01$) depolarisiertes Membranpotential auf ($-28,3 \pm 1,4$ mV) im Vergleich zu Wildtypzellen ($-38,6 \pm 2,4$ mV) (Abbildung 3.7). Eine Depolarisation des Ruhemembranpotentials könnte zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von L-Typ spannungsgesteuerten Calciumkanälen führen. Außerdem zeigen diese Daten, dass eine um 10 mV geringere Depolarisation benötigt wird, um diese Kanäle voll zu aktivieren. Überdies wird der permanente Einwärtsstrom von Calciumionen (Fleischmann et al., 1994) erhöht, da die spannungsgesteuerten Calciumkanäle eine Aktivierungsschwelle bei ca. -40 mV besitzen und im

Gleichgewichtszustand erst bei ca. +40 mV eine fast vollständige Inaktivierung aufweisen (Petkov et al., 2001). Das depolarisierte Ruhemembranpotential und der damit verbundene vergrößerte permanente Calciumeinstrom könnten die in diesem Zusammenhang beobachtete erhöhte Sensitivität und Kontraktilität der Gehirnarterien bei TRPC6^{-/-}-Mäusen erklären (Dietrich et al., 2005).

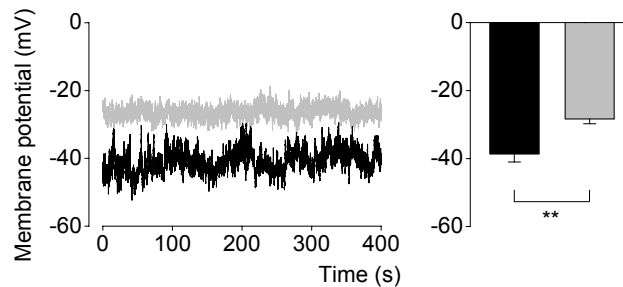


Abbildung 3.7: Messungen des Membranpotentials. Membranpotentialmessungen in der Ganzzellkonfiguration von Wildtyp- (schwarz, n = 20 aus 4 Tieren)- und TRPC6^{-/-}-Zellen (grau, n = 12 aus 4 Tieren) sind dargestellt. Exemplarische Potentialzeitverläufe von beiden Zelltypen sind links und die Zusammenfassung der Messungen ist rechts abgebildet.

3.2 Mechanosensitivität G_{q/11}-gekoppelter Rezeptoren

3.2.1 Calciumanstieg und Manganeinstrom durch osmotisch bedingte Membrandehnung

Nachdem die Arbeitsgruppe von Mark T. Nelson eine Beteiligung der TRPC6-Kanäle in der Gefäßmuskulatur an der Ausbildung des myogenen Gefäßtonus festgestellt hatte (Welsh et al., 2002) und unsere eigenen Untersuchungen an den TRPC6^{-/-}-Mäusen diese Beteiligung nicht ausschlossen, stellten wir die Frage: welche Rolle spielen die TRPC6-Kanäle in der Signalkaskade zur Vasokonstriktion? Lösen sie diese Signalkaskade aus, indem sie die Gefäßdehnung perzipieren oder sind sie bei einer nachgeschalteten Ebene in der Signalkaskade involviert? Würden TRPC6-Kanäle als molekulares Korrelat in der Mechanosensorik der Gefäßmuskulatur fungieren, dann müssten sie in einem heterologen Expressionssystem ebenfalls als Mechanosensoren wirken.

Dazu wurde zunächst an transient transfizierten HEK293-Zellen eine Superfusion mit einer hypoosmolaren Lösung (erhöhtes Wasserpotential) als einfache mechanische Stimulation durchgeführt, was einen Einstrom von Wassermolekülen in die Zelle bewirkt. Dadurch vergrößert sich das Zellvolumen und es kommt unter anderem zu einer Dehnung der Zellmembran. Es wurden räumlich aufgelöste fluorimetrische Messungen von hTRPC6 exprimierenden Fura-2-beladenen HEK293-Zellen mit einer

hypoosmolaren Lösung (250 mOsm kg^{-1}) für 60 s durchgeführt. Dieser Stimulus führte bei hTRPC6 exprimierenden Zellen zu keinerlei Änderung der intrazellulären Calciumkonzentrationen (Abbildung 3.8A), ein erstes Indiz für das Fehlen einer immanenten mechanosensitiven Funktion des TRPC6. Allerdings zeigten beim gleichen Stimulus hTRPC6 und Histamin H_1 -Rezeptor (gpH₁R) koexprimierende HEK293-Zellen deutliche transiente Calciumerhöhungen (Abbildung 3.8C). Es führten sogar alleinige transiente Expressionen von gpH₁R in HEK293-Zellen zu transienten Calciumerhöhungen (Abbildung 3.8B), die jedoch signifikant niedriger ausfielen ($P < 0,001$) im Vergleich zur Koexpression mit hTRPC6 (Abbildung 3.8C). Die alleinige Expression des muskarinischen M₅-Rezeptors (rM₅R) in HEK293-Zellen führte ebenfalls zu transienten Calciumerhöhungen in der gleichen Größenordnung wie in gpH₁R exprimierenden HEK293-Zellen (Abbildung 3.8D). Zur Expressionskontrolle wurde eine nachfolgende Rezeptorstimulation mit Histamin durchgeführt, die zu einer zweiten, transienten Calciumerhöhung führte (Abbildung 3.8B und 3.8C). Nicht transfizierte und mit EYFP transfizierte HEK293-Zellen zeigten keine transienten Calciumerhöhungen durch den gewählte Stimulus, was darauf hinweist, dass nur die Kanal- und Rezeptorexpression an sich die oben genannten Effekte vermitteln (Abbildung 3.8D). Ein Vergleich aller Calciumantworten auf hypoosmolare Stimulation und ihrer basalen Ausgangswerte ist in Abbildung 3.8D dargestellt. Hierbei unterschieden sich die basalen Ausgangswerte der freien intrazellulären Calciumkonzentrationen $[Ca^{2+}]_i$ der verschieden transfizierten HEK293-Zellen nicht voneinander ($P > 0,05$, Einwege-ANOVA), was eine Vergleichbarkeit der Calciumanstiege rechtfertigt. Bei der Stimulation mit Histamin anstelle der Stimulation mit hypoosmolarer Lösung stellte sich heraus, dass sich die transienten Calciumerhöhungen nicht signifikant unterschieden ($P > 0,05$, Einwege-ANOVA, Abbildung 3.8D, vergleiche grauen Balken rechts und letzten schwarzen Balken rechts). Das bedeutet, dass die gewählte hypoosmolare Stimulation einen ebenso großen Effekt bewirkt wie eine Rezeptoraktivierung mit Histamin in maximaler Wirkkonzentration.

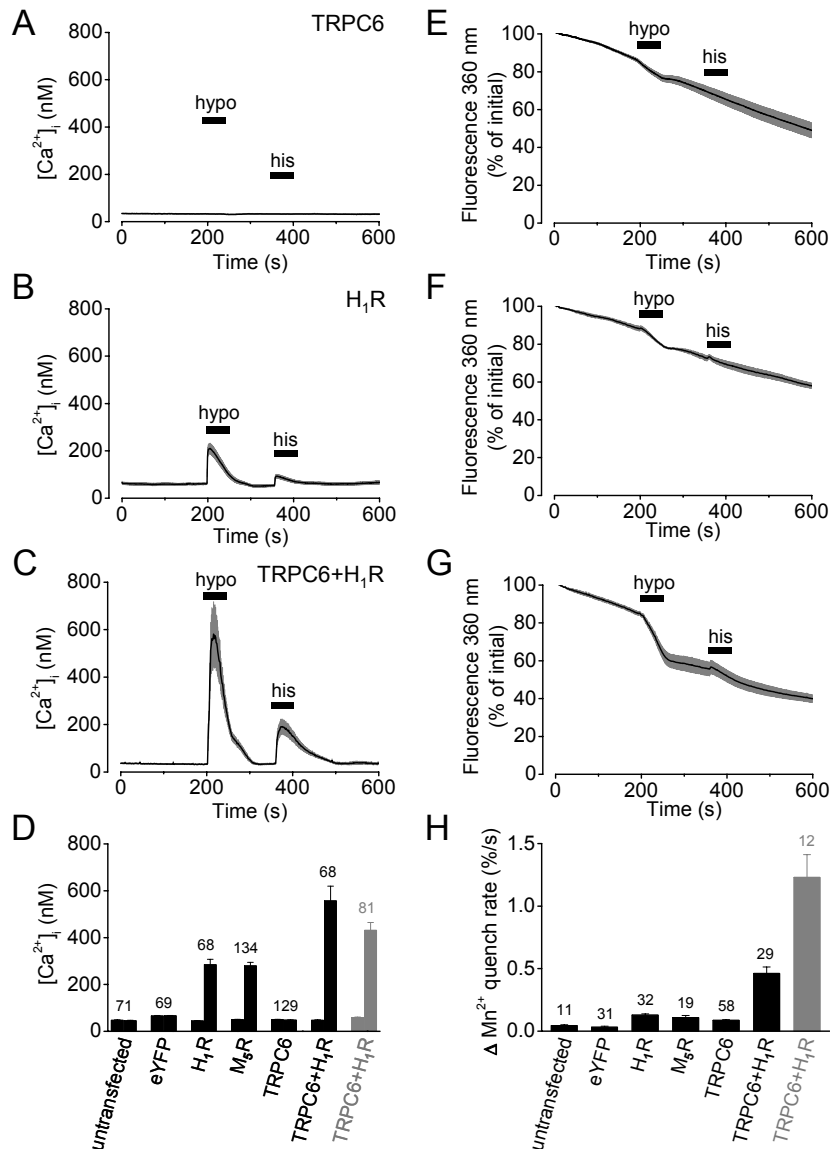


Abbildung 3.8: Osmotisch bedingte Calciumerhöhungen und Manganestrom. Jeweils ein exemplarischer, gemittelter Zeitverlauf der freien intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ (A-C) und der Fluoreszenz bei 360 nm (E-G) von jeweils fünf Fura-2-beladenen hTRPC6 (A und E), hTRPC6 und gpH₁R (B und F) und gpH₁R (C und G) exprimierenden HEK293-Zellen ist dargestellt. Die Balken stellen die Applikationen von hypoosmolarer Lösung (250 mOsm kg⁻¹) und von 100 μM Histamin für jeweils 60 s dar. Nach jeweils 90 s wurde 200 μM MnCl₂ appliziert (E-H). Der graue Bereich repräsentiert den Standardfehler des Mittelwerts der fünf Messungen. D, Die Zusammenfassung aller Calciummessungen unterschiedlich transfizierter HEK293-Zellen ist als Balkendiagramm dargestellt. Die linken Balken zeigen die Ausgangscaliumkonzentrationen vor Stimulation und die rechten Balken die maximale $[Ca^{2+}]_i$ während der hypoosmolaren Stimulation (schwarze Balken) oder während der Agonistenstimulation mit 100 μM Histamin (grauer Balken). H, Die Zusammenfassung der Manganquench-Messungen als Änderungen der Manganquenchraten ist dargestellt. Die schwarzen Balken zeigen die Änderungen der Manganquenchraten nach Stimulation mit hypoosmolarer Lösung, der graue Balken zeigt die Agonistenstimulation mit Histamin. Die Zahlen über den Balken stehen für die Anzahl der gemessenen Zellen (D und H). Zur statistischen Auswertung wurde die Einwege-ANOVA herangezogen.

Um die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern vom Calcium-einstrom aus dem Extrazellulärraum zu unterscheiden, wurden Fura-2-Quench-Experimente mit Manganionen durchgeführt. Der Manganeinstrom über Kationenkanäle führt zu einer Auslöschung („quenching“) der Fluoreszenz der intrazellulär vorliegenden Fura-2-Moleküle. Die Auslöschung wird bei 360 nm detektiert, dem isosbestischen Punkt, an dem die Fluoreszenz unabhängig von der Calciumkonzentration ist. Eine deutliche Änderung des Fluoreszenzabfalls, berechnet als prozentuale Änderung der Manganquenchraten (siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.2.4), weist in diesem Fall auf einen Manganeinstrom durch Kationenkanäle hin. Alle unterschiedlich transfizierten und nicht-transfizierten HEK293-Zellen ($n = 192$) zeigten keine signifikanten Unterschiede in der basalen Manganquenchraten ($P > 0,05$, Einwege-ANOVA), so dass ein gemeinsamer Mittelwert mit $0,091 \pm 0,003\% \text{ s}^{-1}$ angegeben werden konnte. Während unter der Applikation der hypoosmolaren Lösung die alleinigen Expressionen von gpH₁R (Abbildung 3.8F) und hTRPC6 (Abbildung 3.8E) in HEK293-Zellen keine hohen Manganquenchraten aufwiesen (gpH₁R: $0,22 \pm 0,01\% \text{ s}^{-1}$, $n = 32$, hTRPC6: $0,18 \pm 0,01\% \text{ s}^{-1}$, $n = 58$), zeigten Koexpressionen von gpH₁R mit hTRPC6 (Abbildung 3.8G) mehr als doppelt so hohe Manganquenchraten von $0,54 \pm 0,05\% \text{ s}^{-1}$ ($n = 29$). Zusammenfassend sind die Änderungen der Manganquenchraten durch hypoosmolare Stimulation an untransfizierten, EYFP, gpH₁R, rM₅R, hTRPC6 und gpH₁R mit hTRPC6 exprimierenden HEK293-Zellen in Abbildung 3.8H dargestellt. Die Änderungen der Manganquenchraten von untransfizierten, EYFP, gpH₁R, rM₅R, hTRPC6 exprimierenden HEK293-Zellen waren nicht signifikant unterschiedlich ($P > 0,05$, Einwege-ANOVA). Die signifikant erhöhte Änderung der Manganquenchraten ($P < 0,001$, Einwege-ANOVA) von $0,46 \pm 0,05\% \text{ s}^{-1}$ bei gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden Zellen ($n = 29$), offenbart einen divalenten Kationeneinstrom aus dem Extrazellulärraum und erklärt damit deren signifikant erhöhte, freie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abbildung 3.8D). Das bedeutet, dass sich die transiente Calciumerhöhung bei alleiniger Rezeptorexpression auf Calciumfreisetzungen aus intrazellulären Speichern begründet. Die anstelle hypoosmolarer Stimulation durchgeführte Agonistenstimulation mit der maximalen Wirkkonzentration an Histamin bei gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen (Abbildung 3.8H, grauer Balken) wies die höchste Änderung der Manganquenchraten auf ($1,23 \pm 0,18\% \text{ s}^{-1}$, $n = 12$) und war im Vergleich zur hypoosmolaren Stimulation mit $P < 0,001$ höchst signifikant unterschiedlich. Der Grund für diesen deutlichen Unterschied in der Änderung der Manganquenchraten könnte darin liegen, dass der gewählte hypoosmolare Stimulus von 250 mOsm kg^{-1} submaximal wirkt. Mit dieser Begründung bleibt jedoch ungeklärt, warum die transiente Calciumerhöhung bei der Histaminstimulation gegenüber der osmotischen Stimulation

nicht deutlicher erhöht ist. Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Experimente darauf hindeuten, dass der TRPC6 keine offensichtliche perzipierende Funktion in der Mechanosensorik besitzt, aber eine Verstärkerfunktion in dieser Signaltransduktion haben könnte. Außerdem zeigen diese Ergebnisse, dass die oben genannten überexprimierten $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren möglicherweise eine Rolle in der Mechanosensorik spielen.

3.2.2 Osmotisch bedingte Membrandehnung aktiviert TRPC3-, 6- und 7-Kanäle

In einem weiteren unabhängigen Experiment sollte untersucht werden, ob TRPC6-Kanäle tatsächlich in der durch die osmotisch bedingte Membrandehnung ausgelösten Signalkaskade involviert sind. Dazu wurden Patch-Clamp-Messungen in der Ganzzellkonfiguration unter den gleichen Bedingungen wie bei den fluorimetrischen Calciummessungen durchgeführt. Strom-Spannungsbeziehungen, die dazu dienen Kanäle zu charakterisieren, wurden über trianguläre Spannungsrampen von -100 bis +60 mV gewonnen und gleichzeitig wurden Stromzeitverläufe bei ± 60 mV dokumentiert. Die Stimulation mit hypoosmolarer Lösung führte bei der Koexpression von gpH_1R mit TRPC6 in HEK293-Zellen zur raschen Ausbildung von transienten Auswärts- und Einwärtsströmen bei Haltepotentialen von ± 60 mV (Abbildung 3.9A, kleiner Graph) mit für den TRPC6 charakteristischen Strom-Spannungsbeziehungen, gekennzeichnet durch einen sogenannten doppeltrekifizierenden Verlauf und ein Umkehrpotential nahe 0 mV. Die exemplarischen Strom-Spannungsbeziehungen vor und während der Applikation von hypoosmolarer Badlösung und bei nachfolgender Agonistenstimulation mit Histamin als Expressionskontrolle sind in Abbildung 3.9A dargestellt. Wie im Falle der Calciummessungen konnten bei alleiniger Expression von hTRPC6 in HEK293-Zellen keine TRPC6-Ströme durch die gewählte osmotisch bedingte Membrandehnung beobachtet werden. Eine Expressionskontrolle erfolgte über die Applikation des membranpermeablen DAG-Analogen OAG, was zu einer direkten, rezeptorunabhängigen Aktivierung von TRPC6 führte (Abbildung 3.9C). Eine Kotransfektion von gpH_1R mit hTRPC6 und einer dominant-negativen hTRPC6-Mutante in einem pcDNA-Verhältnis von 1:1 an HEK293-Zellen unterdrückte vollständig die TRPC6-Aktivierung durch Stimulation mit hypoosmolarer Lösung und mit Histamin (Abbildung 3.9C), was zum einen zeigt, dass diese Porenmutante tatsächlich funktionell ist und zum anderen, dass keine endogenen Kationenkanäle an den Stromantworten beteiligt sind.

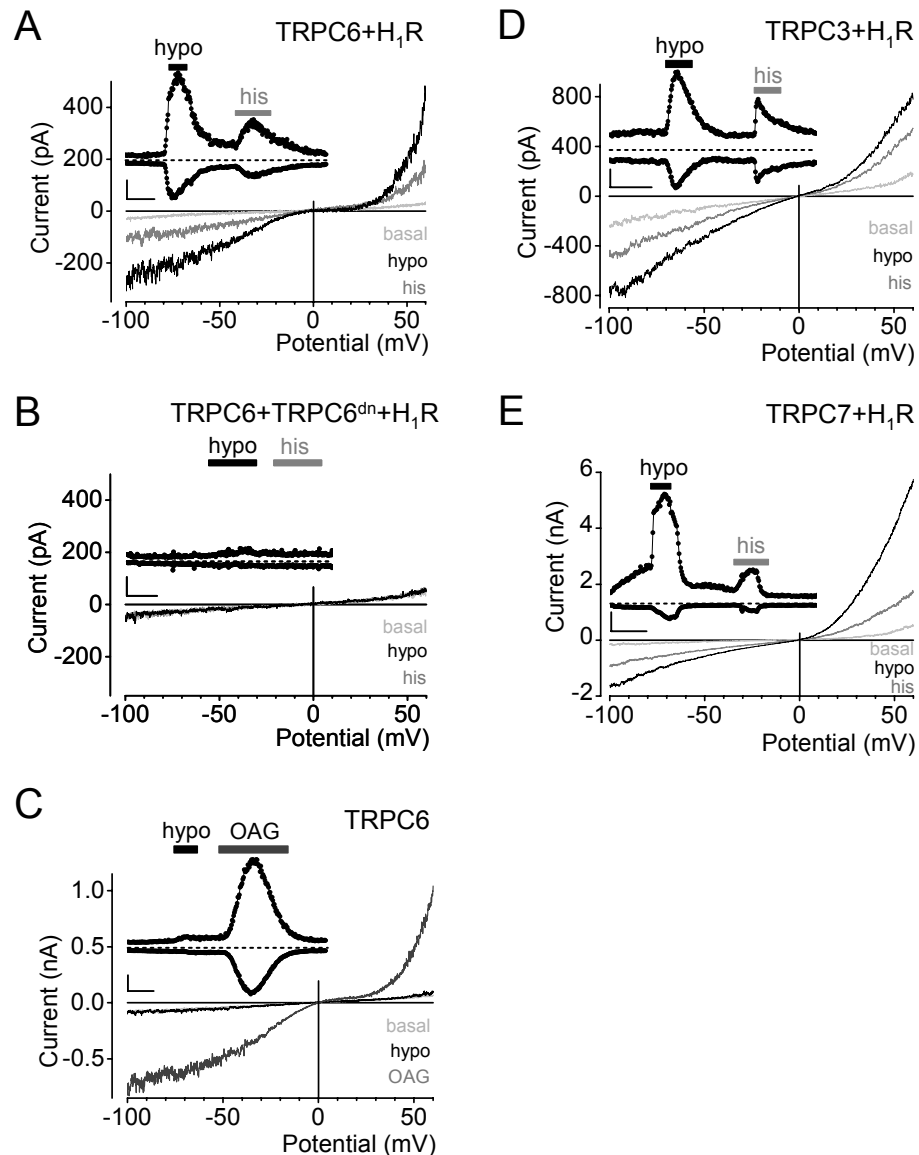


Abbildung 3.9: Membrandehnung aktiviert TRPC3-, 6- und 7-Ströme bei H₁R koexprimierenden HEK293-Zellen. Jeweils eine exemplarische konventionelle Ganzzelleableitung von hTRPC6 und gpH₁R (A, n = 10), hTRPC6 und eine dominant-negativen TRPC6-Mutante (TRPC6^{dn}) und gpH₁R (B, n = 4), hTRPC6 (C, n = 5), hTRPC3 und gpH₁R (D, n = 8) und hTRPC7 und gpH₁R (E, n = 7) exprimierenden HEK293-Zellen ist dargestellt. Repräsentative Strom-Spannungsbeziehungen sind zu sehen vor und während der Applikation von hypoosmolarer Lösung (250 mOsm kg⁻¹) und von 100 μM Histamin (A, B, D, E) oder von 100 μM OAG (C). Die kleinen Graphen zeigen die Stromzeitverläufe bei Haltepotentialen von ±60 mV. Der schwarze Balken steht für die Dauer der Applikation von hypoosmolarer Lösung, der hellgraue für Histamin (A, B, D, E) und der graue für OAG (C). Die gestrichelten Linien stellen das Nullstromniveau dar. Die Skalierung beträgt 50 s und 100 pA (A und B), 50 s und 200 pA (C und D) und 50 s und 1 nA (E).

Um die Frage zu klären, ob die osmotisch induzierte Aktivierung eine exklusive Eigenschaft des TRPC6 ist, wurden die nahe verwandten, ebenfalls DAG-sensitiven Kanäle TRPC3 und TRPC7 hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit untersucht. Beide Kanäle,

koexprimiert mit dem gpH₁R, ließen sich durch eine Stimulation mit hypoosmolarer Lösung aktivieren und zeigten dabei ihre charakteristischen Strom-Spannungsbeziehungen und Basalaktivitäten (Abbildung 3.9D und 3.9E). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der oben genannten Patch-Clamp-Experimente die Ergebnisse der Manganquench-Experimente bestätigen und damit eine direkte Beteiligung des TRPC6 am osmotisch induzierten Calciumeinstrom zeigen. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die gesamte DAG-sensitive Kanalfamilie TRPC3, -6 und -7 das Potential hat, bei osmotisch bedingter Membrandehnung zu aktivieren unter der Voraussetzung einer Überexpression von G_{q/11}-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

3.2.3 Direkte Membrandehnung induziert die Aktivierung von TRPC6

Die bisher verwendete Stimulation der osmotisch bedingten Membrandehnung kann unerwünschte Wirkungen in der Zelle zeigen, wie zum Beispiel Veränderungen des Zytoskeletts durch den Wassereintritt. Um dies auszuschließen, wurden zwei weitere Stimulationen zur Membrandehnung eingesetzt, die keinen Wassereintritt bewirkten. Bei hTRPC6 und gpH₁R koexprimierenden HEK293-Zellen wurde in der Ganzzellkonfiguration zum einen ein positiver Druck von 5 bis 10 cmH₂O über die Pipette appliziert und zum anderen eine vertikale Verschiebung der Pipette um 8 bis 10 µm nach oben durchgeführt – jeweils als Druck oder Zug bedingte Membrandehnung bezeichnet. Bei beiden Stimuli kam es zur Aktivierung von TRPC6-Kanälen mit den eindeutigen elektrischen Charakteristika (Abbildung 3.10). Im Fall der Druck bedingten Membrandehnung zeigten sich meist die typischen Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken wie bei einer Agonist bedingten Rezeptorstimulation, während im Fall der Zug bedingten Membrandehnung immer auffällig langsame Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken auftraten, die wahrscheinlich durch eine mehr lokal auftretende Membranspannung begründet sind. Ein weiterer deutlicher Unterschied bestand in der Erfolgsrate der Aktivierung durch die beiden Stimuli. Bei 40 stabilen Ableitungen zeigte die Druck bedingte Membrandehnung eine Erfolgsrate von 30%, hingegen zeigte bei 25 stabilen Ableitungen die Zug bedingte Membrandehnung nur eine Erfolgsrate von 12%. Die geringere Erfolgsrate kann als nicht gleichmäßig verteilte Membranspannung der Zug bedingten Membrandehnung interpretiert werden. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten zeigen, dass Membrandehnungen - egal ob sie osmotisch, Druck oder Zug bedingt sind - DAG-sensitive TRPC-Kanäle bei Überexpression mit G_{q/11}-gekoppelten Rezeptoren aktivieren können. Aufgrund der höheren Effektivität und der leichteren Handhabung wurde der Stimulus der osmotisch bedingten Membrandehnung bei den folgenden Experimenten weiterhin benutzt.

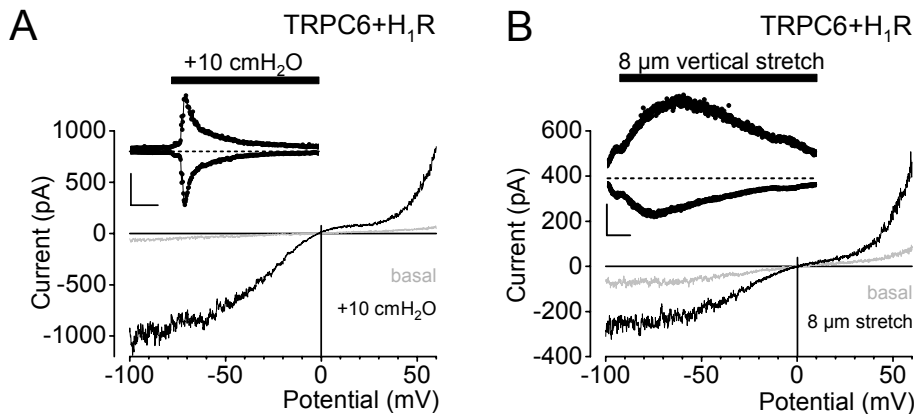


Abbildung 3.10: Druck und Zug bedingte Membrandehnungen aktivieren TRPC6-Kanäle bei Rezeptorkoexpression. Exemplarische Ganzzellaufzeichnungen von gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen sind dargestellt mit positivem Pipettendruck von 5-10 cmH₂O (A, n = 12, Druck bedingte Membrandehnung) und mit vertikaler Verschiebung der Pipette um 8-10 µm (B, n = 3, Zug bedingte Membrandehnung). Strom-Spannungsbeziehungen vor (hellgrau) und während direkter Membrandehnung (schwarz) sind abgebildet. Die kleinen Graphen stellen die Auswärts- und Einwärtsströme bei Haltepotentialen von ±60 mV dar. Die schwarzen Balken stehen für die Dauer der Membrandehnungen. Gestrichelte Linien zeigen den Verlauf des Nullstroms. Die Skalierung betragen 50 s und 500 pA (A) und 100 s und 200 pA (B).

3.2.4 TRPC6-Kanäle sind nicht klassisch mechanosensitiv

Die Arbeitsgruppe von Donald Gill hatte im Jahr 2006 den TRPC6 als mechanosensitiven Kanal charakterisiert (Spasova et al., 2006), was konträr zu unseren bis dato gewonnenen Ergebnissen war, die sich aus den oben beschriebenen Ganzzellaufzeichnungen und Calciummessungen ergaben. Aufgrund dieser Diskrepanz wurden klassische Protokolle herangezogen, um die Mechanosensitivität von Ionenkanälen zu verifizieren. Hierzu wurden auf der Einzelkanalebene kontinuierlich TRPC6-Kanäle im isolierten Membranfleck unter definierten Drücken in der inside-out-Konfiguration untersucht. Als erstes wurde ein Sog von 10 cmH₂O über die Patchpipette gewählt, der zu einer Membranspannung führt, die genauso groß ist wie bei der Druck bedingten Membrandehnung in der Ganzzellkonfiguration. Um die Aktivierung von endogenen, mechanosensitiven Chloridkanälen zu unterdrücken, wurde die Chloridionenkonzentration von Bad- und Pipettenlösung auf 10 mM reduziert. Zusätzlich wurde der Chloridkanalblocker NPPB (50 µM) in der Badlösung eingesetzt. Ohne diese Maßnahmen konnten große, instantan auftretende Chloridkanalströme mit Amplituden von 4 bis 5 pA bei -60 mV und einer Leitfähigkeit von ungefähr 70 pS durch Sogapplikation von 10 cmH₂O hervorgerufen werden. In fünf stabilen Ableitungen der Membranflecken von hTRPC6 exprimierenden HEK293-Zellen konnte keine signifikanten Änderungen der Kanalaktivität beobachtet werden, weder instantan bei Sogapplikation noch nach mehr als einer Minute. Erst eine Applikation von SAG in maximaler Wirkkonzentration

während der Sog bedingten Membrandehnung führte zu charakteristischen TRPC6-Einzelkanalaktivitäten (Hofmann et al., 1999; Jung et al., 2002) mit einer Einzelkanal-amplitude von $-1,7$ pA bei -60 mV und einer mittleren Offenzeit von $0,13 \pm 0,01$ ms (Abbildung 3.11A). Interessanterweise spiegeln die konsekutiven Offenwahrscheinlichkeiten (NPo) zwischen $0,011$ und $0,032$ bei Sogapplikation vor der SAG-Applikation (Abbildung 3.11B, oben) die niedrigen TRPC6-Basalaktivitäten in der Ganzzellkonfiguration von weniger als 5% wider (Dietrich et al., 2003). Sogar eine Erhöhung des Sogs auf bis zu 70 cmH₂O führte nicht zu einer gesteigerten instantanen TRPC6-Kanalaktivität (Abbildung 3.11B, unten). In den vier untersuchten stabilen Ableitungen, die eine erhöhte Kanalaktivität unter SAG-Applikation zeigten, kam es 15 s lang nach erfolgter Sogapplikation zu keiner signifikanten Kanalaktivitätsveränderung. Bei zwei Ableitungen kam es erst nach 15 s zu einem langsamen, in die Sättigung gehenden Anstieg der NPo-Werte bis zu $0,25$. Die anschließende SAG-Applikation zeigt, dass die verzögerte und langsame Kanalaktivitätssteigerung deutlich submaximal war (Abbildung 3.11B, unten und 3.11C), d.h. dass die hier angelegte, hohe Membranspannung offenbar nicht ausreicht, um den TRPC6 mechanisch zu aktivieren. Die Ergebnisse zeigen, dass der TRPC6-Kanal nicht als klassischer, mechanosensitiver Kationenkanal gelten kann, weil er erstens nicht durch die hervorgerufene physiologische Membranspannung aktivierte und zweitens keine instantane Reaktion zeigte.

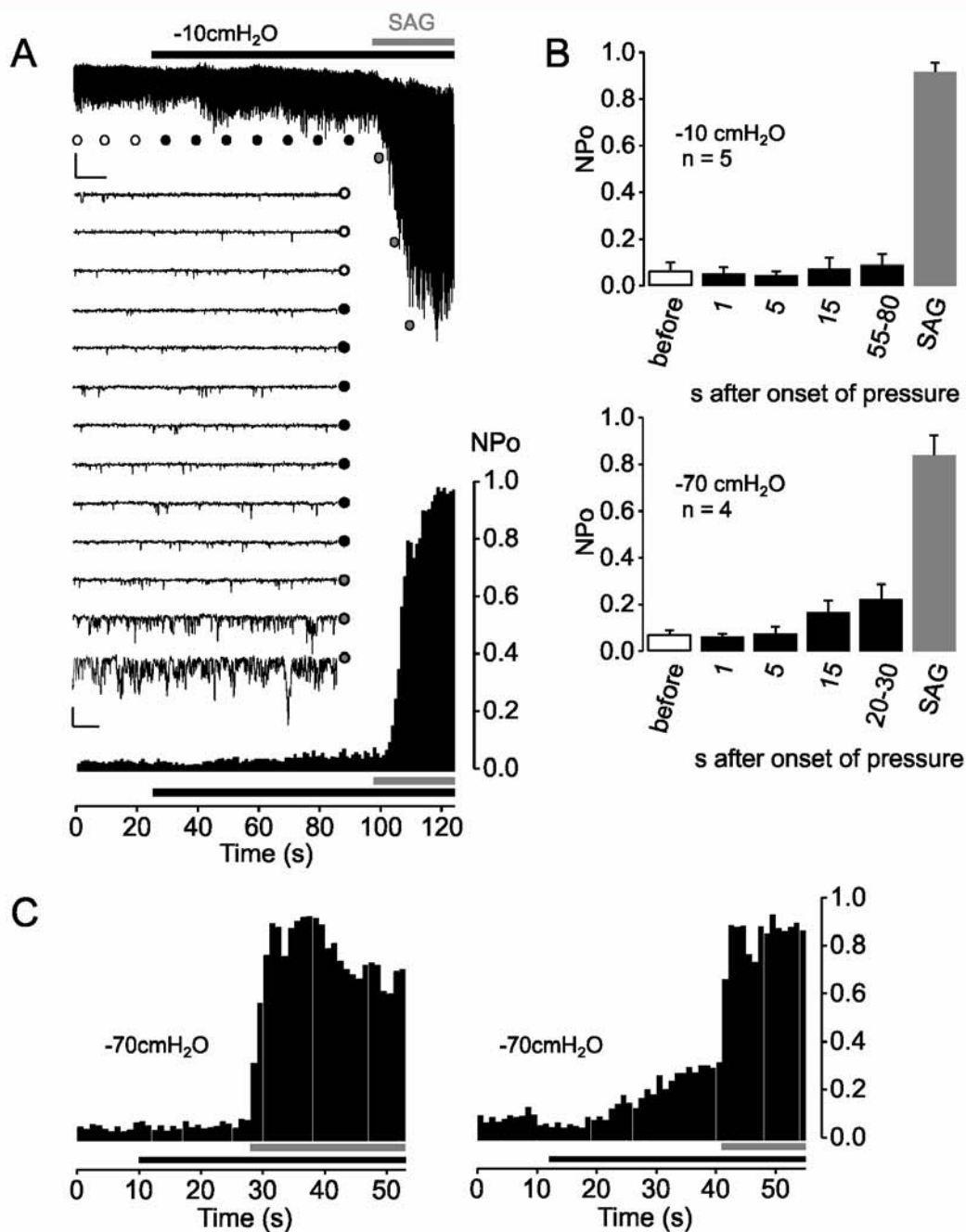


Abbildung 3.11: Einzelkanalableitungen von TRPC6 exprimierenden HEK293-Zellen. Einzelkanalmessungen in der zellfreien inside-out-Konfiguration von hTRPC6-IRES-EGFP exprimierenden HEK293-Zellen (A-C). Eine originale Stromspur bei einem Haltepotential von -60 mV ist oben dargestellt mit einem applizierten Druck von -10 cmH₂O (A, oben). Der applizierte Sog und die Badapplikation von 10 μ M SAG sind zu sehen. Die Skalierung beträgt 2 pA und 2 s. In der Mitte sind 13 konsekutive Stromspuren mit einer gestreckten Zeitskala zu den mit Kreisen markierten Zeitpunkten dargestellt. Die Skalierung beträgt 5 pA und 20 ms. Der dazugehörige Graph der konsekutiven Offenwahrscheinlichkeiten (NPo) in 1 -s-Schritten ist unten zu sehen. B, Die Analyse der NPo-Werte mit einem applizierten Sog von -10 cmH₂O ($n = 5$) (B, oben) und von -70 cmH₂O ($n = 4$) (B, unten) wird gezeigt. Die Mittelwerte der NPo-Werte vor und während der Sogapplikation ($1.$, $5.$, $15.$ und letzte Sekunde vor SAG-Applikation) im Vergleich zu den maximalen NPo-Werten während der nachfolgenden SAG-Applikation sind dargestellt. C, Zwei Graphen von NPo-Werten (in 1 -s-Schritten) (jeweils $n = 4$) mit dem minimalen (C, links) und dem maximalen Effekt (C, rechts) während der Applikation von -70 cmH₂O sind dargestellt. Die Dauer der Sogapplikation und die zusätzliche Badapplikation von 10 μ M SAG sind zu sehen.

3.2.5 Membrandehnung erhöht die Produktion von Inositolphosphaten

Aus den oben aufgeführten Experimenten ergibt sich, dass der TRPC6 wohl nicht mechanosensitiv ist, aber in der Mechanotransduktion eine Verstärkerfunktion besitzt. Außerdem zeigen diese Experimente, dass überexprimierte $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren in der Signalkaskade involviert sind. Um dies zu prüfen, wurde als methodisch unabhängiges Experiment die Produktion von Inositolphosphaten (IP) in gpH_1R exprimierenden COS-7-Zellen als Maß für die Rezeptoraktivierungen gemessen. Hierbei wurde die Stärke der osmotisch bedingten Membrandehnung variiert und mit Histamin in maximaler Wirkkonzentration verglichen, um das Ausmaß der Rezeptoraktivierungen auf der Vielzellebene zu bewerten. Die verschieden starken hypoosmolaren Lösungen (250, 200, 150 und 100 $mOsm\ kg^{-1}$) verursachten einen gradierten Anstieg in der IP-Produktion. Dabei führte eine Erniedrigung der Osmolarität auf 250 $mOsm\ kg^{-1}$ bereits zu einer signifikanten Erhöhung der IP-Produktion ($P < 0,05$ bei drei unabhängigen Experimenten). Die IP-Produktion durch Agonistenstimulation mit Histamin unter isoosmolaren Bedingungen (300 $mOsm\ kg^{-1}$) war am höchsten und vergleichbar mit der durch 100 $mOsm\ kg^{-1}$ erreichten IP-Produktion (Abbildung 3.12). In Analogie zu den Experimenten mit COS-7-Zellen wurden auch Experimente mit gpH_1R exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt, wobei sich ebenfalls gradierte Erhöhungen der IP-Produktion zeigten, allerdings mit deutlich höheren basalen IP-Werten (Daten sind nicht dargestellt), so dass dieses Phänomen als zellsystemunabhängig gelten kann. Hiermit konnte eine Korrelation von unterschiedlich starken Membranspannungen, verursacht durch verschiedene hypoosmolare Lösungen, zur Rezeptoraktivierung festgestellt werden.

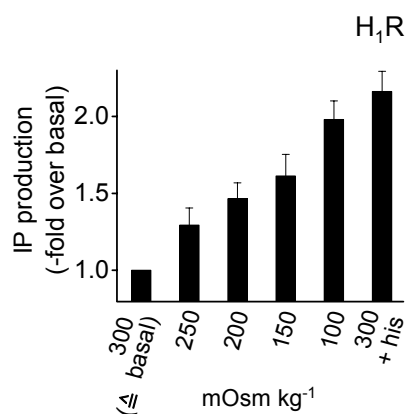


Abbildung 3.12: Osmotisch bedingte Membrandehnung erhöht die Inositolphosphatproduktion. Die Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten mit gpH_1R exprimierenden COS-7-Zellen ist dargestellt. Die IP-Produktion wurde normiert auf die Applikation von isoosmolarer (300 $mOsm\ kg^{-1}$) Lösung. Die verschieden starken, hypoosmolaren Lösungen sind zu sehen. Der rechte Balken zeigt den Maximaleffekt durch Agonistenstimulation mit 100 μM Histamin.

3.2.6 Membrandehnung aktiviert die Phospholipasen C und G-Proteine

Aufgrund der oben gezeigten Akkumulation von Inositolphosphaten durch die osmotisch bedingte Membrandehnung liegt es nahe, eine Beteiligung von PLC an der Mechanotransduktion zu untersuchen. Bei gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen wurde die PLC in der Signaltransduktionskaskade mittels Infusionen mit dem PLC-Inhibitor U73122 gehemmt. Als Kontrolle diente der inaktive PLC-Inhibitor U73343, der ebenfalls infundiert wurde. 10 µM U73122 in der Pipettenlösung unterdrückten vollständig die TRPC6-Aktivierungen durch konsekutive Stimulation mit hypoosmolarer Lösung und mit 100 µM Histamin (Abbildung 3.13A). Im Gegensatz dazu aktivierten TRPC6-Kanäle unbeeinflusst in Anwesenheit von 10 µM U73343 (Abbildung 3.13B). Bei zwei zusätzlichen Experimenten mit U73122 in der Pipettenlösung wurde OAG zur Expressionskontrolle eingesetzt. Somit lässt sich sagen, dass Membrandehnung zur PLC-Aktivierung führt und dass die PLC vermutlich eine wichtige Rolle in der Mechanotransduktion spielen.

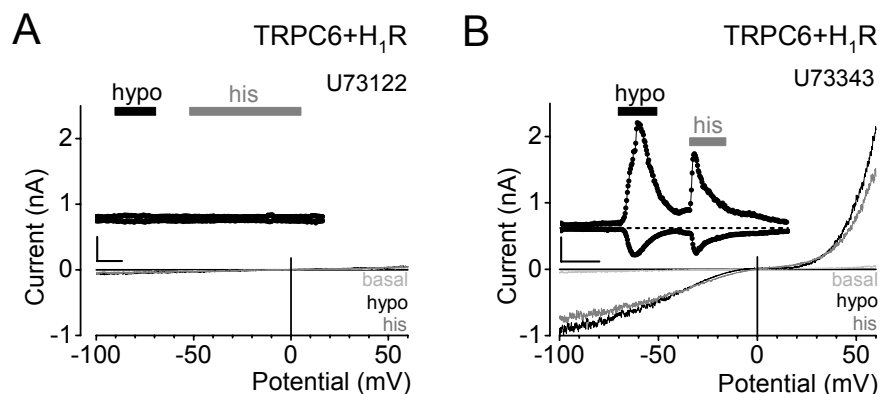


Abbildung 3.13: Aktivierung von PLC durch Membrandehnung. Jeweils eine exemplarische konventionelle Ganzzelleableitung von gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen mit 10 µM U73122 (A, n = 5) und mit 10 µM U73343 in der Pipettenlösung (B, n = 4) ist zu sehen. Die Strom-Spannungsbeziehungen vor, während hypoosmolarer Stimulation mit 250 mOsm kg⁻¹ und während Rezeptorstimulation mit 100 µM Histamin sind dargestellt. Die kleinen Graphen zeigen die Stromzeitverläufe der Auswärts- und Einwärtsströme bei ±60 mV. Die Dauer der hypoosmolaren Stimulation und die Dauer der Agonistenstimulation mit Histamin sind eingezeichnet. Gestrichelte Linien zeigen den Verlauf des Nullstroms. Die Skalierung beträgt 500 pA und 50 s.

Üblicherweise werden die PLC durch G-Proteine aktiviert. Um zu untersuchen, ob G-Proteine in der Mechanotransduktion eine Rolle spielen, wurde der Signalweg auf der Ebene der G-Proteine blockiert. Dazu wurde das nicht-hydrolysierbare GDP-Analogon GDP-β-S (2 mM) über die Pipette in gpH₁R und hTRPC6 koexprimierende HEK293-Zellen infundiert. Dabei verhinderte GDP-β-S, welches die GDP-Form stabilisiert und auf diese Weise zu einer Inaktivierung des G-Proteins führt, vollständig

sowohl die Aktivierungen durch osmotisch bedingte Membrandehnung als auch die Aktivierung über Histamin (Abbildung 3.14). Diese Ergebnisse zeigen, dass die G-Proteinaktivierung ein wichtiger Schritt in der durch Membrandehnung ausgelösten Signaltransduktionskaskade in Rezeptor überexprimierenden Zellen darstellt.

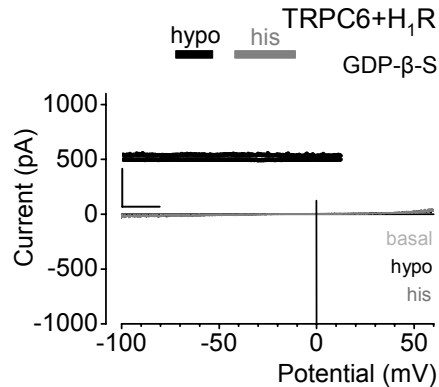


Abbildung 3.14: Aktivierung von G-Proteinen durch Membrandehnung. Eine exemplarische Ganzzellableitung von gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen ist dargestellt mit 2 mM GDP-β-S in der Pipettenlösung (n = 11). Strom-Spannungsbeziehungen vor, während hypoosmolarer Stimulation und während Agonistenstimulation mit 100 μM Histamin sind zu sehen. Der kleine Graph zeigt die Stromzeitverläufe des Auswärts- und Einwärtsstroms bei ±60 mV. Die hypoosmolare Stimulation und die Agonistenstimulation mit Histamin sind markiert. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf des Nullstroms. Die Skalierung beträgt 500 pA und 50 s.

Um zu unterscheiden, ob auch in HEK293-Zellen endogen exprimierte G_{i/o}-Proteine einen Beitrag an der Aktivierung durch Membrandehnung leisten, wurde Pertussistoxin (PTX) als Entkoppler der G_{i/o}-Proteine vom Rezeptor eingesetzt. Somit kann die Bindung und Aktivierung von G_{i/o}-Proteinen verhindert werden. Inkubationen von gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen mit 100 ng ml⁻¹ PTX für 16 Stunden hatten keinen Einfluss auf die Stromamplifikationen durch osmotisch bedingte Membrandehnung und durch Agonistenstimulation mit Histamin (Abbildung 3.15). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass endogene G_{i/o}-Proteine vermutlich keine entscheidende Rolle bei der Aktivierung durch Membrandehnung spielen.

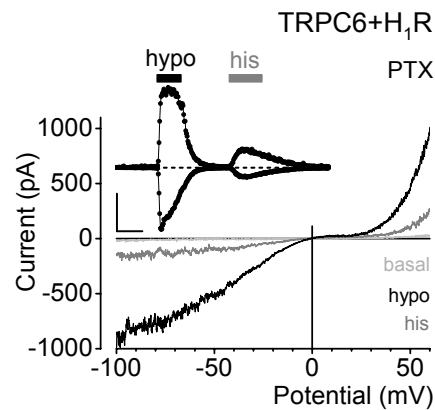


Abbildung 3.15: Endogene $G_{i/o}$ -Protein spielen eine untergeordnete Rolle bei der Aktivierung durch Membrandehnung. Eine exemplarische konventionelle Ganzzelleableitung mit gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen nach Inkubation mit 100 ng ml⁻¹ Pertussisotoxin für 16 Stunden ist dargestellt (n = 3). Strom-Spannungsbeziehungen vor, während hypoosmolarer Stimulation und während Agonistenstimulation mit Histamin sind zu sehen. Der kleine Graph zeigt die Stromzeitverläufe des Auswärts- und Einwärtsstroms bei ±60 mV. Die Applikation von hypoosmolarer Lösung und die Applikation des Agonisten Histamin (100 μM) sind eingezeichnet. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Verlauf des Nullstroms. Die Skalierung beträgt 500 pA und 50 s.

3.2.7 Endogene Rezeptortyrosinkinasen sind nicht an der Aktivierung durch Membrandehnung beteiligt

Da endogene Tyrosinkinasen in die Mechanotransduktion involviert sein können (siehe Diskussion), wurde bei gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen mittels drei verschiedener Tyrosinkinaseinhibitoren deren Einfluss auf die Aktivierung durch osmotisch bedingte Membrandehnung analysiert. Folgende drei Inhibitoren wurden eingesetzt: erstens AG1478, ein bei einer Konzentration von 100 nM selektiver „epidermal growth factor“-Rezeptor-Inhibitor, zweitens Genistein, ein nicht-selektiver Tyrosinkinaseinhibitor mit einem breiteren Hemmspektrum und drittens PP2, ein selektiver Inhibitor von Src-Kinasen, die zur Gruppe der cytoplasmatischen Tyrosinkinasen zählen. 10- bis 15minütige Inkubationen mit 100 nM AG1478 oder mit 10 μM Genistein hatten keinen Einfluss auf die Stromamplifikationen durch Membrandehnung (Abbildung 3.16A und 3.16B). Sowohl die Applikation von hypoosmolarer Lösung als auch die nachfolgende Applikation von Histamin führten zu unbeeinflussten TRPC6-Aktivierungen. Ebenso hatten Inkubationen mit 1 μM PP2 für 30 min keinen Einfluß auf die charakteristischen TRPC6-Stromantworten nach Stimulation weder mit hypoosmolarer Lösung noch mit Histamin (Abbildung 3.16C). Diese Befunde weisen darauf hin, dass endogene Rezeptortyrosinkinasen in diesem Fall offenbar nicht an der Mechanotransduktion beteiligt sind.

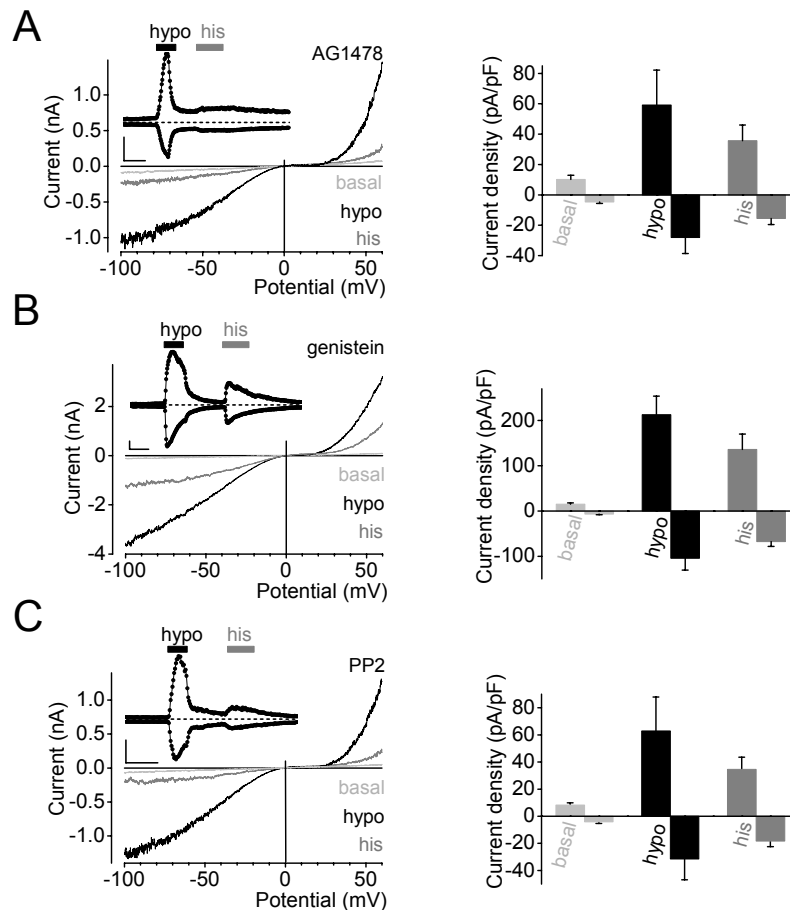


Abbildung 3.16: Endogene Rezeptortyrosinkinasen sind nicht beteiligt an der Aktivierung durch Membrandehnung. Jeweils eine exemplarische Ganzzelleableitung von gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen ist abgebildet (A-C, linke Seite). Die Zellen wurden vorinkubiert mit 100 nM AG1478 (A, n = 6) für 10 bis 15 min, mit 10 μ M Genistein (B, n = 7) für 10 min oder mit 1 μ M PP2 (C, n = 4) für 30 min. Strom-Spannungsbeziehungen vor, während hypoosmolarer Stimulation und während Agonistenstimulation mit 100 μ M Histamin sind zu sehen. Die kleinen Graphen stellen die Stromzeitverläufe bei ± 60 mV dar. Die Dauer der hypoosmolaren Stimulation und der Stimulation mit Histamin ist eingezeichnet. Die gestrichelten Linien repräsentieren den Verlauf des Nullstroms. Die Skalierung beträgt 500 pA und 50 s. Die jeweiligen Zusammenfassungen der Stromdichten sind rechts dargestellt. Die Stromdichten wurden bei Haltepotentialen von ± 60 mV vor, während hypoosmolarer Stimulation und während Stimulation mit Histamin bestimmt.

3.2.8 G_{q/11}-gekoppelte Rezeptoren sind involviert in die Mechanosensorik

Die Ergebnisse der bisher beschriebenen Experimente verifizieren die Aktivierung der klassischen Transduktionsmoleküle G_{q/11}-Proteine und PLC als notwendige Schritte in der Mechanotransduktion. Diese werden in der Regel durch G_{q/11}-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Daher stellte sich die Frage, ob G_{q/11}-Protein-gekoppelte Rezep-

toren direkt durch Membrandehnung aktiviert werden und ob inverse Agonisten bzw. Antagonisten diese Aktivierung hemmen.

3.2.8.1 Diphenhydramin unterdrückt die membrandehnungsinduzierte Aktivierung von H₁R

Dazu wurde als erstes der klassische kompetitive H₁R Antagonist Diphenhydramin (100 µM) an gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen untersucht. Interessanterweise konnte der Antagonist die osmotisch bedingten TRPC6-Aktivierungen unterdrücken (Abbildung 3.17A). Nach dem Auswaschen von Diphenhydramin wurde als Kontrolle entweder Histamin oder hypoosmolare Lösung appliziert. Diese Kontrollapplikationen führten stets zu deutlich größeren TRPC6-Aktivierungen als unter Diphenhydramin. Die Stromdichten unter dieser Kontrollstimulation mit Histamin waren nicht signifikant unterschiedlich, unabhängig von einer vorhergehenden Diphenhydraminapplikation ($P = 0,56$ in Auswärts- und $P = 0,55$ in Einwärtsrichtung, vergleiche graue Balken in Abbildung 3.17B und 3.17C). Damit konnten unterschiedliche Expressionshöhen von Kanal- und Rezeptorproteinen in der Zellmembran ausgeschlossen werden. Bei fünf von insgesamt 14 Messungen ergab sich nach dem Auswaschen von Diphenhydramin durch eine zweite Stimulation mit hypoosmolarer Lösung eine signifikante Stromdichtenerhöhung bei ± 60 mV ($P < 0,05$) im Vergleich zur zweiten Kontrollstimulation mit Histamin, die bei den restlichen 9 Messungen durchgeführt wurde (Abbildung 3.17B). Diese Ergebnisse untermauern, dass Diphenhydramin eine Suppression der Rezeptoraktivierung durch osmotisch bedingte Membrandehnung bewirkt. Ein weiterer statistischer Vergleich zwischen den Stimulationen mit hypoosmolarer Lösung in An- und Abwesenheit von Diphenhydramin (Abbildung 3.17B und 3.17C) zeigt eine signifikante Erniedrigung der Stromdichten in Auswärts ($P < 0,001$)- und Einwärtsrichtung ($P < 0,01$) bei ± 60 mV. Jedoch kommt es nicht zur vollständigen Unterdrückung der Stromantworten durch den Antagonisten in seiner maximalen Wirkkonzentration, denn es sind signifikante Stromerhöhungen in Auswärts- ($P < 0,05$) und Einwärtsrichtung ($P < 0,01$) gegenüber den Ausgangsströmen nachweisbar (Abbildung 3.17B). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Diphenhydramin in seiner hohen maximalen Wirkkonzentration keine starke antagonistische Potenz besitzt. Außerdem zeigten die untersuchten transfizierten HEK293-Zellen vor Applikation der hypoosmolaren Lösungen keine signifikanten Unterschiede der Stromdichten in Auswärts- ($P = 0,25$) und Einwärtsrichtung ($P = 0,82$), so dass eine Vergleichbarkeit zwischen den Messungen der einzelnen Zellen gewährt ist (Abbildung 3.17C und 3.17B). Durch einen selektiven Antagonisten konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass tatsächlich eine Rezeptoraktivierung durch Membrandehnung verursacht wird.

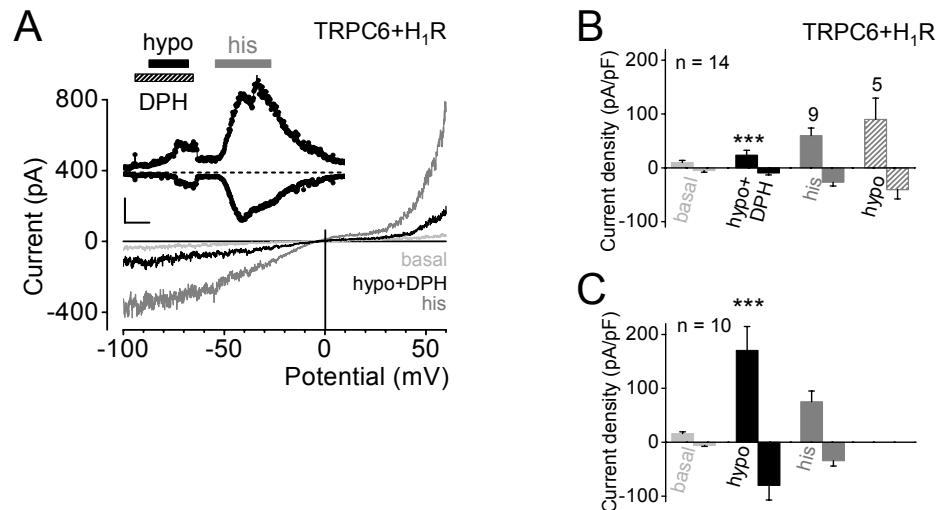


Abbildung 3.17: Diphenhhydramin unterdrückt die H₁R-Aktivierungen durch osmotisch bedingt Membrandehnung. Eine exemplarische Ganzzellableitung von gpH₁R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen ist dargestellt (A, n = 9). Strom-Spannungsbeziehungen vor, während hypoosmolarer Stimulation unter 100 μ M Diphenhhydramin (DPH) und während Agonistenstimulation mit 100 μ M Histamin sind zu sehen. Der kleine Graph stellt die Stromzeitverläufe bei ± 60 mV dar. Die Dauer der hypoosmolaren Stimulation, der Histaminapplikation und der Applikation von Diphenhhydramin sind eingezeichnet. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Verlauf des Nullstroms. Die Skalierung beträgt 200 pA und 50 s. B und C, Die Zusammenfassungen der Stromdichten bei ± 60 mV mit (B) und ohne Diphenhhydramin (C) sind dargestellt. Die Stromdichten vor (B und C), während hypoosmolarer Stimulation in Anwesenheit (B) und in Abwesenheit (C) von Diphenhhydramin, während Agonistenstimulation mit Histamin und während einer zweiten hypoosmolaren Stimulation nach dem Auswaschen von Diphenhhydramin sind zu sehen. Die Zahlen über den Balken repräsentieren die Anzahl der gemessenen Zellen (B).

3.2.8.2 Atropin unterdrückt M₅R-Aktivierung durch osmotisch bedingte Membrandehnung

Aktivieren auch andere G_{q/11}-gekoppelte Rezeptoren durch Membrandehnung? Dazu wurde der rM₅R verwendet, der in Neuronen (Vilaro et al., 1990) und vermutlich im Endothel von Gehirnarterien vorkommt (Wess, 2004). Bei rM₅R und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen führte sowohl die Stimulation mit hypoosmolarer Lösung als auch die Agonistenstimulation mit Carbachol in der maximalen Wirkkonzentration von 100 μ M zu etwa gleich starken TRPC6-Aktivierungen (Abbildung 3.18A). Atropin, allgemein als klassischer Antagonist bekannt, aber als inverser Muskarinrezeptor Agonist seit 1997 von Burstein et al. klassifiziert (Burstein et al., 1997), unterdrückte die Stromantworten durch osmotisch bedingte Membrandehnung konzentrationsabhängig. Während 100 nM Atropin die Rezeptoraktivierung nicht vollständig supprimierte (Abbildung 3.18B), führte die maximale Hemmkonzentration von 1 μ M Atropin zu einer fast vollständigen Unterdrückung der Stromantwort (Abbildung 3.18C). Eine zweite Aktivierung mit Carbachol gelang nur bei der Applikation von 100 nM Atropin, da es sich hier durch Superfusion auswaschen ließ. 1 μ M Atropin konnte nicht

ausgewaschen werden, so dass die zweite Stimulation als Expressionskontrolle rezeptorunabhängig mittels OAG erfolgte. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass die Rezeptoraktivierung durch osmotisch bedingte Membrandehnung keine exklusive Eigenschaft des H_1R ist und zum anderen, dass ein inverser Agonist diese Rezeptoraktivierung potent hemmen kann.

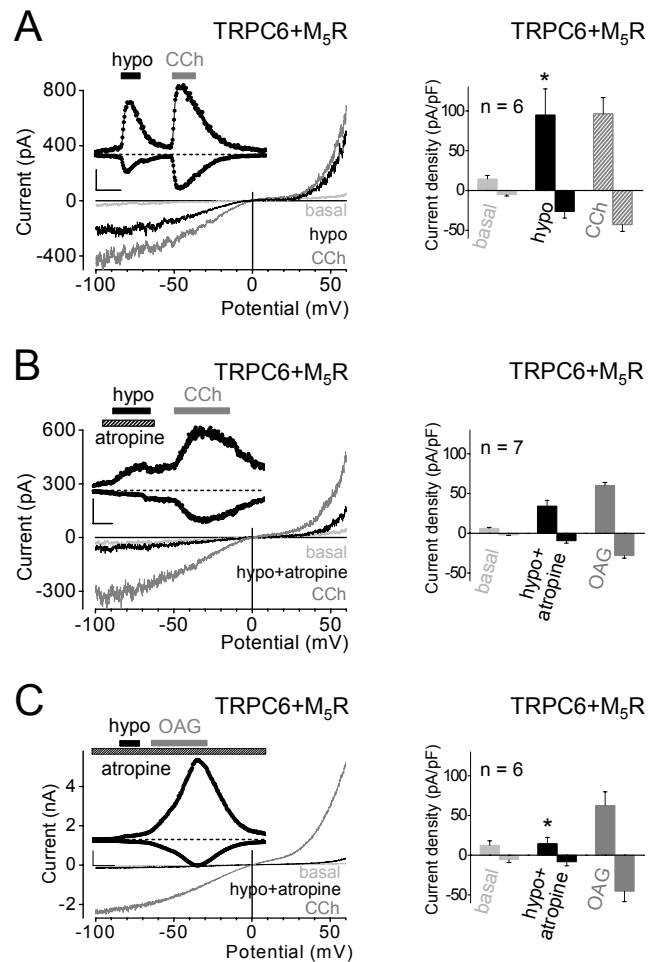


Abbildung 3.18: Atropin unterdrückt rM_5R -Aktivierungen durch osmotisch bedingte Membrandehnung. Jeweils eine exemplarische Ganzzelleableitungen von rM_5R und $hTRPC6$ koexprimierenden HEK293-Zellen ist dargestellt (A-C, linke Reihe). Die Strom-Spannungsbeziehungen vor, während hypo-osmolarer Stimulation ohne (A), mit 100 nM Atropin (B) oder mit 1 μ M Atropin (C) und während der Rezeptorstimulation mit 100 μ M Carbachol (A und B) oder während der rezeptorunabhängigen Aktivierung mit 100 μ M OAG (C) werden dargestellt. Die kleinen Graphen stellen Stromzeitverläufe bei ± 60 mV dar. Die Applikationen von hypo-osmolarer Lösung, von Carbachol (A und B) oder von OAG (C) und die Applikation von Atropin sind eingezeichnet. Die gestrichelten Linien geben den Verlauf des Nullstroms an. Die Skalierungen betragen 200 pA und 50 s (A und B) und 1 nA und 50 s (C). A-C, rechts, Die dazugehörigen Zusammenfassungen der Stromdichten sind dargestellt. Die Stromdichten wurden bei ± 60 mV vor, während hypo-osmolarer Lösung und während Carbachol (A und B) oder OAG (C) in Anwesenheit (B und C) und Abwesenheit (A) von Atropin ermittelt.

Mit Hilfe von Ganzzelleableitungen konnte auf der Einzelzellebene gezeigt werden, dass Atropin die Rezeptoraktivierung durch osmotisch bedingte Membrandehnung potent unterdrückt. In wieweit Atropin verschieden starke Rezeptoraktivierungen durch osmotisch bedingte Veränderungen der Membranspannungen hemmen kann, wurde auf der Vielzellebene über die oben erwähnte IP-Produktion bestimmt. In gleicher Weise wie gpH_1R -zeigende rM_5R exprimierende COS-7-Zellen eine stärkere Erhöhung der IP-Produktion bei höheren Membranspannungen (Abbildung 3.19A). Erstaunlicherweise führte die maximale Hemmkonzentration von Atropin ($1 \mu M$) bei allen unterschiedlich starken Membranspannungen zu einer Suppression der IP-Produktion auf basale Werte (Abbildung 3.19B). Als Expressionskontrolle wurde stets eine Agonistenstimulation mit $100 \mu M$ Carbachol herangezogen, um das Maß der Suppression abzuschätzen. Diese Daten zeigen, dass Atropin Rezeptoraktivierungen durch hohe Membranspannungen sehr potent verhindert.

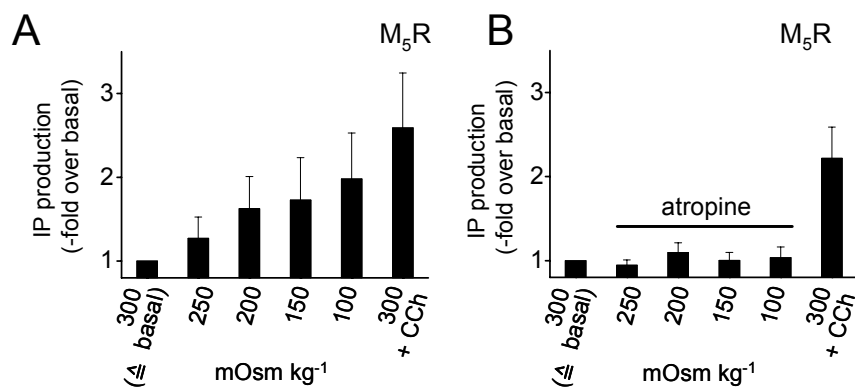


Abbildung 3.19: rM_5R -Aktivierungen durch osmotisch bedingte Membrandehnungen erhöhen die IP-Produktion. Jeweils eine von drei unabhängigen Experimenten mit rM_5R exprimierenden COS-7-Zellen ist dargestellt. Bei jedem Experiment wurde eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Die IP-Produktion wurde normiert auf die isoosmolare Lösung mit 300 mOsm kg^{-1} . Dargestellt sind die unterschiedlich starken hypoosmolaren Lösungen ohne (A) und mit $1 \mu M$ Atropin (B). Die Agonistenstimulation mit $100 \mu M$ Carbachol diente jeweils der Ermittlung des Maximaleffekts.

3.2.9 Rolle der vasokonstriktorisches $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren in der Mechanosensorik

Die bisher untersuchten $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren, gpH_1R und rM_5R , haben sich mit unterschiedlichen Methoden als mechanosensitiv herausgestellt. Da klassische vasokonstriktorisches $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren für die Gefäßregulation eine wichtige Rolle spielen, stellte sich die Frage, ob diese Gefäßregulation allein auf Agonistenstimulation zurückzuführen ist und ob sie eine agonistenunabhängige, mechanosensitive Komponente besitzt.

3.2.9.1 Darusentan unterdrückt die membrandehnungsinduzierte Endothelin-A-Rezeptor (ET_AR)-Aktivierung

Im Gegensatz zu den G_{q/11}-gekoppelten ET_BRs, die im Endothel exprimiert sind und vorwiegend eine vasodilatatorische Funktion ausüben, sind die G_{q/11}-gekoppelten ET_ARs vorwiegend in der Gefäßmuskulatur exprimiert und vermitteln dort eine Vasokonstriktion. In Analogie zu gpH₁R und rM₅R zeigten elektrophysiologische Einzelzelluntersuchungen an hET_AR und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen Rezeptoraktivierungen durch osmotisch bedingte Membrandehnung (Abbildung 3.20A). Diese Rezeptoraktivierungen ließen sich durch den selektiven ET_AR-Antagonisten Darusentan in einer Konzentration von 10 μM unterdrücken. Konzentrationen von 100 nM und 1 μM Darusentan, die maximal hemmen sollten, supprimierten jedoch die TRPC6-Stromantworten nur teilweise. Darusentan hat einen IC₅₀-Wert von 1,4 nM. Diese Diskrepanz kann sich zum einen begründen in der autokrinen Freisetzung von Endothelin-1 aus HEK293-Zellen und andererseits in der Instabilität des Darusentans selbst. Bei Darusentan-behandelten Zellen wurde wiederum OAG als Expressionskontrolle eingesetzt (Abbildung 3.20B). Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein wichtiger vasokonstriktorischer G_{q/11}-gekoppelter Rezeptor mechanosensitiv wirkt.

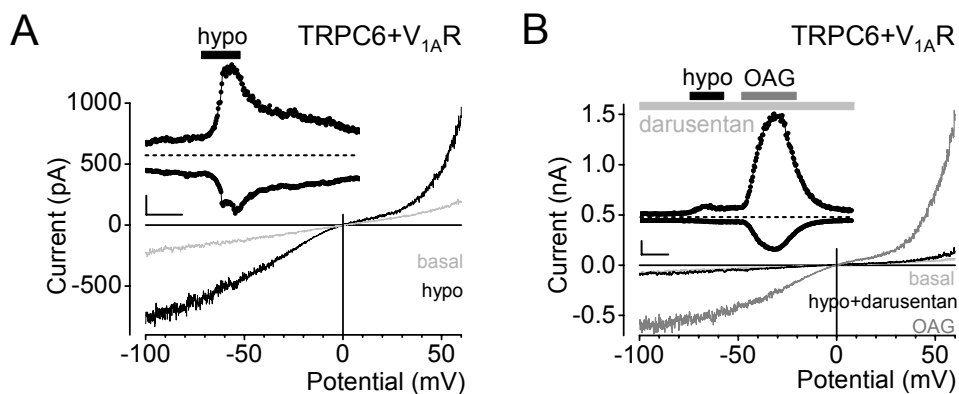


Abbildung 3.20: Darusentan unterdrückt die Aktivierung von ET_AR durch Membrandehnung.

Jeweils eine exemplarische Ganzzellableitung von hET_AR und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen ist dargestellt (A und B). Die Strom-Spannungsbeziehungen vor, während hypoosmolarer Stimulation mit (B, n = 8) und ohne 10 μM Darusentan (A, n = 19) und während 100 μM OAG sind zu sehen. Die kleinen Graphen stellen die Stromzeitverläufe bei ±60 mV dar. Die Applikation von hypoosmolarer Lösung, von OAG und von Darusentan sind eingezeichnet. Die gestrichelten Linien geben den Verlauf des Nullstroms an. Die Skalierungen betragen 200 pA und 50 s.

3.2.9.2 Mechanosensitivität von Vasopressin-1A-Rezeptoren (V_{1A}R)

Interessanterweise zeigte der ebenfalls vasokonstriktorisches rV_{1A}R koexprimiert mit hTRPC6 in HEK293-Zellen deutliche Stromamplifikationen durch osmotisch bedingte Membrandehnung, die allerdings signifikant niedriger waren ($P < 0,05$) als die

nachfolgenden Stromamplifikationen durch Agonistenstimulation mit Vasopressin (1 μM) (Abbildung 3.21). Das könnte darauf hindeuten, dass der $rV_{1A}R$ möglicherweise weniger mechanosensitiv ist als die bisher untersuchten Rezeptoren. Untersuchungen mit einem Vasopressinrezeptorantagonisten oder inversen Agonisten stehen zurzeit noch aus.

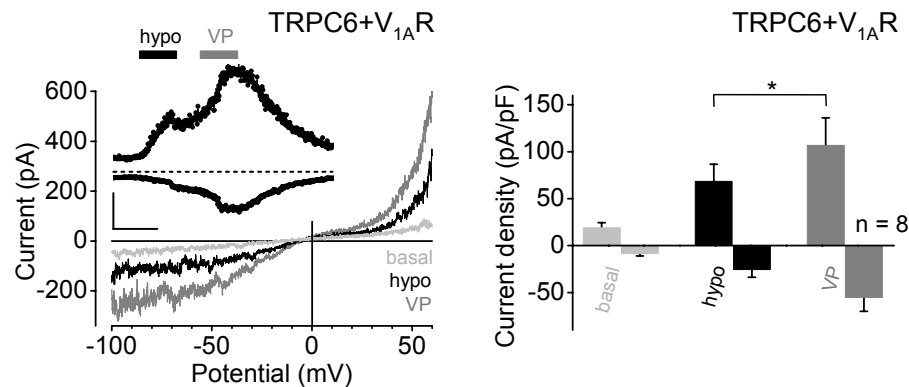


Abbildung 3.21: $rV_{1A}R$ -Aktivierung durch osmotisch bedingte Membrandehnung. Eine exemplarische Ganzzelleableitung von $rV_{1A}R$ und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen ist dargestellt (links, $n = 8$). Die Strom-Spannungsbeziehungen vor, während hypoosmolarer Stimulation und während Agonistenstimulation mit 1 μM Vasopressin werden gezeigt. Der kleine Graph stellt die Stromzeitverläufe in Einwärts- und Auswärtsrichtung bei ± 60 mV dar. Die hypoosmolare Stimulation und die Agonistenstimulation mit Vasopressin sind eingezeichnet. Die gestrichelte Linie gibt den Verlauf des Nullstroms an. Die Skalierung beträgt 200 pA und 100 s. Die Zusammenfassung der Stromdichten ist rechts dargestellt. Die Stromdichten bei ± 60 mV vor, während hypoosmolarer Stimulation und während Stimulation mit Vasopressin sind zu sehen.

3.2.9.3 Der vasokonstriktorische Angiotensin II $AT_{1A}R$ -Rezeptor ($AT_{1A}R$) ist ebenfalls mechanosensitiv

Hat der auffällig stark exprimierte $AT_{1A}R$ in glatten Muskelzellen von kleinen Widerstandsgefäßen eine agonistenunabhängige Funktion, die den myogenen Gefäßtonus beeinflusst? Die Stimulation von $mAT_{1A}R$ und hTRPC6 koexprimierenden HEK293-Zellen mit hypoosmolarer Lösung führte wie bei den bisher untersuchten Rezeptoren zur Aktivierung von TRPC6-Strömen (Abbildung 3.22A). Ebenfalls unterdrückten die selektiven inversen Agonisten Losartan (1 μM) und Candesartan (100 nM) fast vollständig die Rezeptoraktivierungen durch osmotisch bedingte Membrandehnung (Abbildungen 3.22B und 3.22C). Die OAG-Applikation diente hier wiederum zur Expressionskontrolle. Des Weiteren wurde untersucht, ob der $mAT_{1A}R$ auch durch Druck bedingte Membrandehnung aktivierbar ist. Dieser Druckstimulus von 8 bis 10 cmH_2O auf das Zellinnere führte zu transienten TRPC6-Aktivierungen, die jedoch eine auffällig langsamere Kinetik aufwiesen als bei den osmotisch bedingten Membrandehnungen (Abbildung 3.22D). Die Ursache hierfür ist bislang noch nicht bekannt. Doch auch hierbei unterdrückte Losartan die Rezeptoraktivierungen fast

vollständig (Abbildung 3.22E). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der vasokonstriktorische $mAT_{1A}R$ ebenfalls mechanosensitiv ist und dass diese agonistunabhängige Rezeptoraktivierung durch selektive inverse Agonisten hemmbar ist.

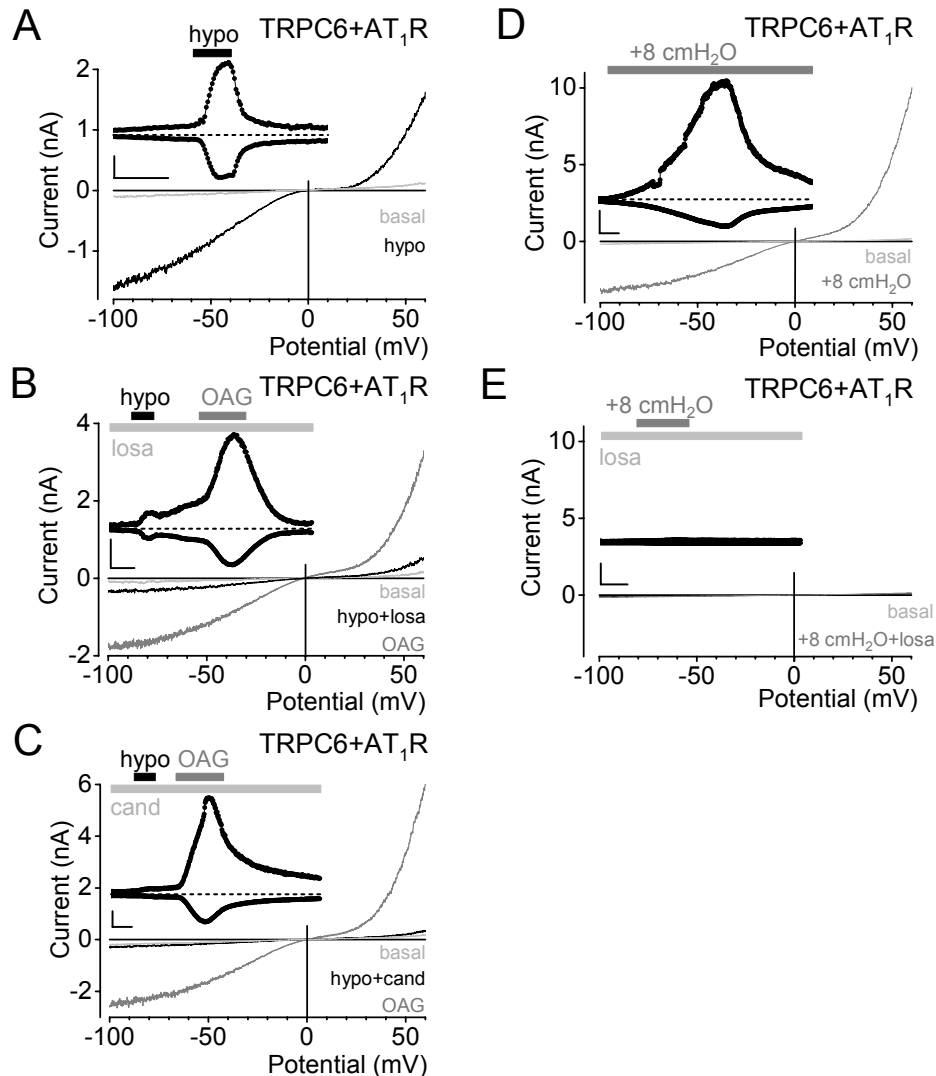


Abbildung 3.22: Der AT_{1A}R ist mechanosensitiv. Jeweils eine exemplarische Ganzzelleableitung von hTRPC6 und $mAT_{1A}R$ (A bis C) koexprimierenden HEK293-Zellen und von einer transient hTRPC6 und stabil $hAT_{1A}R$ -Venus exprimierenden HEK293-Zelllinie (D und E) sind dargestellt. Die kleinen Graphen stellen die Stromzeitverläufe bei ± 60 mV dar. Die gestrichelten Linien geben den Verlauf des Nullstroms an. Die Strom-Spannungsbeziehungen vor, während hypoosmolarer Stimulation ohne (A, $n = 12$), mit $10 \mu M$ Losartan (B, $n = 5$) oder mit $100 nM$ Candesartan (C, $n = 5$) und während der rezeptorunabhängigen Stimulation mit $100 \mu M$ OAG (B und C) werden gezeigt. Die Applikation von hypoosmolarer Lösung, von OAG (B und C) und von Losartan (B) oder Candesartan (C) sind zu sehen. D und E, Exemplarische Strom-Spannungsbeziehungen vor, während Applikation von positivem Druck von 8-10 cmH₂O mit (E, $n = 6$) und ohne $1 \mu M$ Losartan (D, $n = 6$) sind dargestellt. Die Dauer des positiven Drucks und der Applikation von Losartan sind dargestellt. Die Skalierungen betragen $500 pA$ und $50 s$ (A und B), $1 nA$ und $50 s$ (C) und $2 nA$ und $100 s$ (D und E).

3.2.9.4 Vergleich der hemmenden Wirkung von inversen Agonisten und Antagonisten bezüglich der agonistenunabhängigen, osmotisch bedingten Rezeptoraktivierungen

Die Zusammenfassung der elektrophysiologischen Untersuchungen von gpH₁R, hET_AR, mA_T_{1A}R und rM₅R koexprimierenden HEK293-Zellen zeigt für die entsprechenden neutralen Antagonisten Diphenhydramin und Darusentan und für die inversen Agonisten Atropin, Losartan und Candesartan eine Unterdrückung der membran-dehnungsinduzierten Stromantworten bei +60 mV zwischen 50 und 90% (Abbildung 3.23). Die Applikation von 100 nM Atropin in submaximaler Hemmkonzentration bewirkte die kleinste Stromunterdrückung von 48,0 ± 8,7%. Damit war die Unterdrückung des Auswärtsstroms signifikant niedriger als nach Applikation von 1 µM Atropin ($P < 0,001$, 95,0 ± 1,8%), was ein Indiz für eine konzentrationsabhängige Hemmung dieser Rezeptoraktivierung ist. Die beiden inversen Agonisten Losartan (1 µM) und Candesartan (100 nM) waren stark wirksam und unterdrückten die Stromerhöhungen durch osmotisch bedingte Membrandehnung um 87,5 ± 2,2% bzw. um 89,4 ± 3,1%, ähnlich wie der Antagonist Darusentan (10 µM), der ebenfalls eine starke Unterdrückung der Stromantwort um 89,0 ± 2,4% bewirkte. Hingegen war der klassische Antagonist Diphenhydramin (100 µM) weniger stark wirksam (72,0 ± 3,8%). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Antagonisten als auch inverse Agonisten die Rezeptoraktivierungen durch Membrandehnung unterdrücken können.

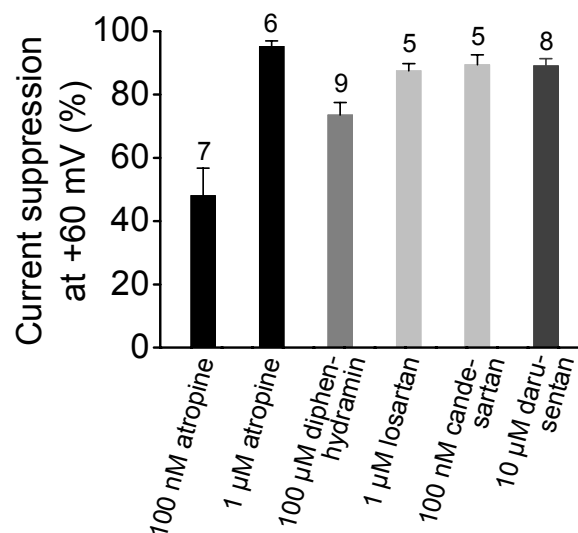


Abbildung 3.23: Zusammenfassung der Ergebnisse mit Antagonisten und inversen Agonisten. Die Zusammenfassung der Experimente mit neutralen Antagonisten und inversen Agonisten an hTRPC6 und unterschiedliche Rezeptoren, rM₅R (schwarz), gpH₁R (grau), hET_AR (dunkelgrau) und mA_T_{1A}R (hellgrau), koexprimierende HEK293-Zellen. Die Unterdrückung des Auswärtsstroms bei +60 mV wurde auf den Maximalstrom nach Applikation von OAG (bei rM₅R, hET_AR und mA_T_{1A}R) oder von Carbachol (bei rM₅R

und 100 nM Atropinapplikation) und von Histamin (bei gpH₁R) normiert. Die Zahlen über den Balken stehen für die Anzahl der gemessenen Zellen.

3.2.10 Überexpression von AT_{1A}R in A7r5-Zellen führt zu Aktivierungen durch Membrandehnung

Um die physiologische Rolle von AT_{1A}R in glatten Muskelzellen zu untersuchen, wurde die sogenannte A7r5-Zelllinie herangezogen, die sowohl funktionell AT_{1A}R als auch TRPC6, ET_AR und V_{1A}R exprimiert (Jung et al., 2002). Die A7r5-Zelllinie ist aus glatten Muskelzellen der thorakalen Rattenaorta, einem elastischen Gefäß, generiert. Untransfizierte A7r5-Einzelzellen zeigten interessanterweise keine Veränderungen des Auswärts- und Einwärtsstroms bei ± 60 mV durch osmotisch bedingte Membrandehnung (Abbildung 3.24A, links), d.h. die endogen vorliegenden vasokonstriktorisches G_{q/11}-gekoppelten Rezeptoren reichten nicht aus, um eine agonistenunabhängige Mechano-transduktion einzuleiten. Jedoch leiteten zusätzliche Überexpressionen von mAT_{1A}R in A7r5-Zellen eine agonistenunabhängige Mechano-transduktion ein, die als deutliche TRPC6-ähnliche Stromantworten sichtbar wurde (Abbildung 3.24B, rechts). Eine konsekutive Agonistenstimulation mit 1 μ M Vasopressin führte sowohl bei nicht transfizierten als auch bei mAT_{1A}R überexprimierenden A7r5-Zellen zu vergleichbaren, transienten Stromerhöhungen mit TRPC6-ähnlichen Strom-Spannungsbeziehungen. Die gleich großen Aktivierungen durch Vasopressin weisen einerseits darauf hin, dass die Zellen intakt waren und andererseits, dass V_{1A}R in diesen Zellen offenbar keine dominante Rolle in der Mechano-transduktion spielen. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen der Messungen von rV_{1A}R überexprimierenden HEK293-Zellen, bei denen der rV_{1A}R eine signifikant geringe Mechano-sensitivität aufwies. Strom-dichtenanalysen bestätigten die Vergleichbarkeit zwischen den untersuchten, untransfizierten und transfizierten A7r5-Zellen (Abbildung 3.24B), indem sowohl die Ausgangsströme als auch die vasopressininduzierten Ströme in beiden Fällen sich nicht unterschieden ($P = 0,76$ und $P = 0,36$ in Auswärtsrichtung und $P = 0,98$ und $P = 0,72$ in Einwärtsrichtung), was darauf hindeutet, dass die Transfektion und Überexpression von mAT_{1A}R in A7r5-Zellen weder die Ausgangskationenströme noch die endogene Expression von V_{1A}R beeinträchtigte. Erstaunlicherweise zeigten mAT_{1A}R überexprimierende A7r5-Zellen höchst signifikante Stromerhöhungen durch osmotisch bedingte Membrandehnung ($P < 0,001$ in Auswärts- und $P < 0,01$ in Einwärtsrichtung bei 7 unabhängigen Transfektionen). Eine weitere Messserie zeigte, dass die Agonistenstimulationen mit 100 nM Angiotensin II bei mAT_{1A}R überexprimierenden A7r5-Zellen ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Stromdichten bei ± 60 mV führte ($P < 0,01$) (Abbildung 3.24B, untere kleine Graphen), so dass sich die Stromerhöhungen bei hypoosmolarer Stimulation durch eine erhöhte Rezeptoranzahl begründen lassen.

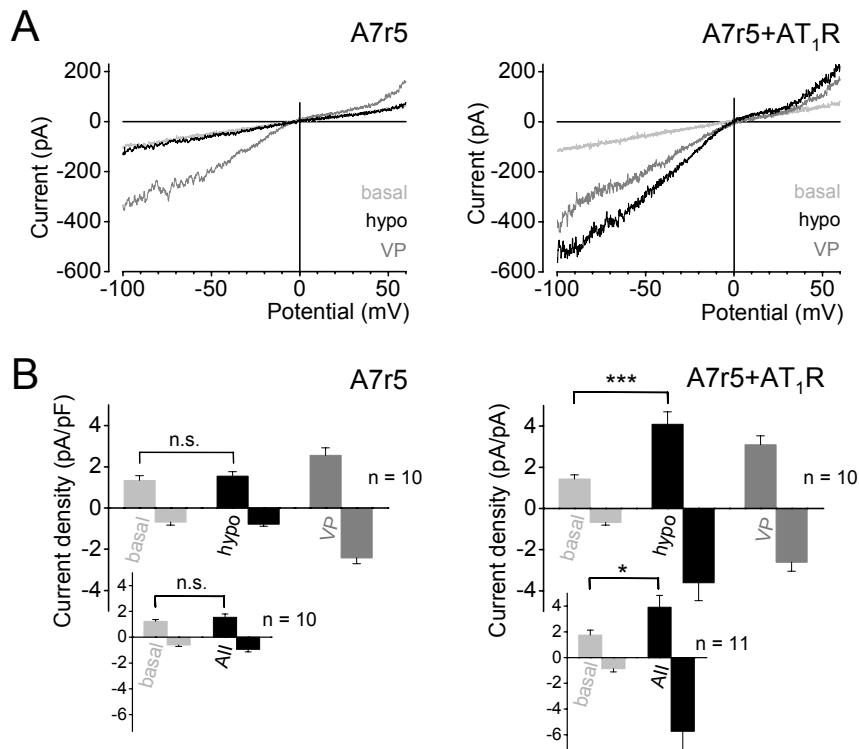


Abbildung 3.24: mAT_{1A}R-Überexpression führt zur membrandehnungsinduzierten Aktivierung von A7r5-Zellen. Jeweils eine exemplarische Ganzzelleableitung von nicht transfizierten (A, linke Abbildung) und mAT_{1A}R überexprimierenden A7r5-Zellen (A, rechte Abbildung) ist dargestellt. Die Strom-Spannungsbeziehungen vor, während hypoosmolarer Stimulation mit 250 mOsm kg⁻¹ und während der Rezeptorstimulation mit 1 μ M Vasopressin sind zu sehen. Die Stromdichtenanalysen von nicht (B, links) und mit mAT_{1A}R-transfizierten A7r5-Zellen (B, rechts) sind dargestellt. Die Stromdichten wurden bei Haltepotentialen von ± 60 mV vor und während der Applikation von hypoosmolarer Lösung und von 1 μ M Vasopressin ermittelt. Die unteren kleinen Graphen zeigen die Stromdichten von untransfizierten und transfizierten A7r5-Zellen. Die Stromdichten wurden vor und während der Agonistenstimulation mit 100 nM Angiotensin II bestimmt.

Um eine Beteiligung von eventuell autokrin gebildetem Angiotensin II in A7r5-Zellen an der beobachteten Aktivierung durch Membrandehnung auszuschließen, wurde ein neutralisierender Antikörper gegen Angiotensin II eingesetzt. In mAT_{1A}R überexprimierenden A7r5-Zellen beeinflusste die Gegenwart von 100 μ g ml⁻¹ neutralisierenden Antikörpern die Aktivierungen durch osmotisch bedingte Membrandehnung nicht (Abbildung 3.25B). Diese Antikörperkonzentration war ebenfalls ausreichend, um die Aktivierungen durch Agonistenstimulation mit Angiotensin II in der maximalen Wirkkonzentration von 100 nM zu verhindern (Abbildung 3.25A). Konzentrationen von 10 bzw. 20 μ g ml⁻¹ neutralisierenden Antikörpern (jeweils n = 2) konnten die Aktivierungen durch 100 nM Angiotensin II nicht vollständig unterdrücken. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Rezeptoraktivierung durch Membrandehnung unabhängig von einem Agonisten geschehen kann.

Mittels einer einfachen Überexpression von $AT_{1A}R$ konnten hier zum ersten Mal nicht durch Membrandehnung aktivierbare Aortenzellen umgewandelt werden in mechanosensitive, reaktive glatte Muskelzellen. Das ist ein deutliches Indiz dafür, dass eine bestimmte $AT_{1A}R$ -Rezeptordichte erforderlich ist, um eine Mechanosensitivität hervorzurufen.

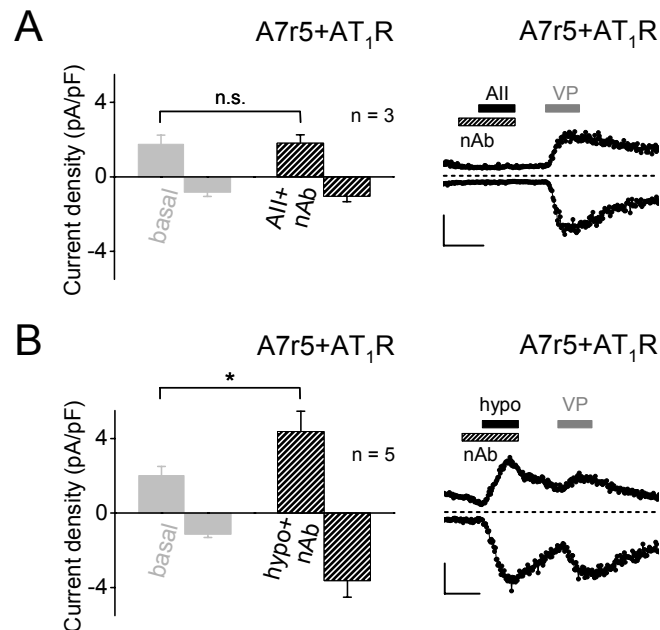


Abbildung 3.25: Die membrandehnungsinduzierte Aktivierung ist unabhängig von einer autokrinen Angiotensin II-Sekretion. Jeweils ein exemplarischer Stromzeitverlauf bei ± 60 mV von $mAT_{1A}R$ überexprimierenden $A7r5$ -Zellen (A und B, rechte Abbildungen) ist hier dargestellt. Die Applikationen von neutralisierendem Antikörper gegen Angiotensin II („nAb“, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$), von hypoosmolarer Lösung und von $1 \mu\text{M}$ Vasopressin sind eingezeichnet. Die gestrichelten Linien geben den Verlauf des Nullstroms an. Die Skalierung beträgt 50 s und 100 pA. Die Zusammenfassungen der Stromdichten sind links dargestellt. Die Stromdichten bei ± 60 mV vor (A und B, links) und während hypoosmolarer Stimulation (B, links, $n = 3$) oder während Agoniststimulation mit 100 nM Angiotensin II (A, links, $n = 3$) in Anwesenheit des neutralisierenden Antikörpers sind zu sehen.

3.2.11 Ermittlung der für eine Mechanosensitivität erforderlichen AT_{1A} -Rezeptordichte

Da die Rezeptordichte von endogenen $AT_{1A}R$ in Aortenzellen für eine Mechanosensitivität nicht ausreichte, die Rezeptordichte von überexprimierten $AT_{1A}R$ hingegen groß genug war, um mechanische Stimuli zu perzipieren, stellte sich die Frage, welche Rezeptordichte erforderlich ist, um membrandehnungsinduzierte Rezeptoraktivierungen auszulösen. Um die Rezeptordichte zu messen, wurden Bindungsexperimente mit einem radioaktiv jodierten Angiotensin II durchgeführt, bei denen die Dissoziationskonstante und die maximale Rezeptoranzahl bestimmt wurden für Transfektionen mit verschiedenen Expressionsvektormengen, die C-terminal mit Venus fusionierte $hAT_{1A}R$

codieren. Die unterschiedlichen maximalen Rezeptoranzahlen, bestimmt an jeweils 100.000 HEK293-Zellen, wurden korreliert mit ihrer Venus-Gesamtfluoreszenz, so dass ein Zusammenhang zwischen der Rezeptoraktivierung, die als Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Fura-2 gemessen wurde, und der Rezeptordichte - als Fluoreszenzintensität gemessen - hergestellt werden konnte. Der osmotische Stimulus mit 250 mOsm kg^{-1} hypoosmolarer Lösung führte bei verschieden stark hAT₁R-Venus exprimierenden HEK293-Zellen nur zu kleineren transienten Calciumerhöhungen als die nachfolgende Agonistenstimulation mit 100 nM Angiotensin II (Abbildung 3.26). In Abhängigkeit zur AT₁-Rezeptormenge stieg die freie $[Ca^{2+}]_i$ einzelner Zellen durch osmotisch bedingte Membrandehnung an (Abbildung 3.26, links). Bereits Rezeptormengen von 600 fmol/mg führten zu einer deutlichen Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Calciumspeichern. Ab 1900 fmol/mg war der maximale Effekt erreicht. Diese Rezeptormenge ergab durch eine Transfektion mit einer Expressionsvektormenge von $0,5 \mu\text{g}$ und einer Expressionszeit von zwei Tagen. Ein ähnliches Bild ergab sich aus der konsekutiven Agonistenstimulation mit 100 nM Angiotensin II mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und einem maximalen Effekt bei 1900 fmol/mg (Abbildung 3.26, rechts). Verglichen mit den Maximalwerten der $[Ca^{2+}]_i$ verursacht durch osmotisch bedingte Membrandehnung, zeigten die konsekutiven Agonistenstimulationen höhere Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$. Dies weist darauf hin, dass die Stimulation mit 250 mOsm kg^{-1} hypoosmolarer Lösung nicht die maximale Wirkung hervorruft. Damit lässt sich sagen, dass die Mechanosensitivität des AT₁R tatsächlich von seiner Rezeptordichte abhängt.

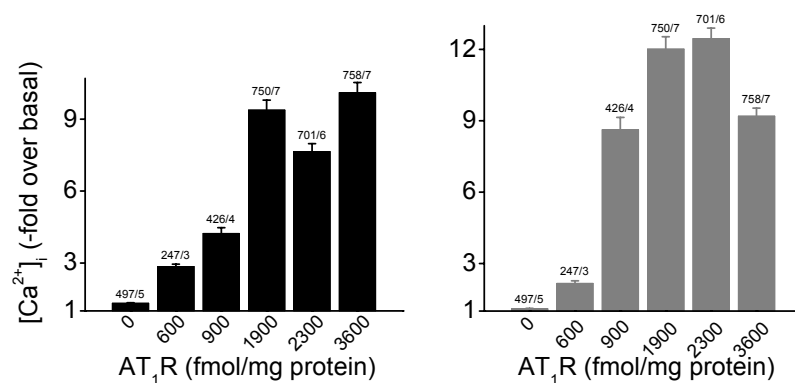


Abbildung 3.26: Korrelation zwischen Mechanosensitivität und Rezeptordichte. Zusammenfassung der fluorimetrischen $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen von hAT₁R-Venus exprimierenden HEK293-Zellen. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bei den verschiedenen, angezeigten Rezeptormengen ist normiert auf die basale $[Ca^{2+}]_i$. Die schwarzen Balken zeigen den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ während der Stimulation mit hypoosmolarer Lösung. Die grauen Balken zeigen die Calciumerhöhungen während der nachfolgenden Agonistenstimulation mit 100 nM Angiotensin II. Die Zahlen über den Balken geben die Anzahl der gemessenen Zellen und die Anzahl der Transfektionen an.

3.2.12 Membrandehnung aktiviert endogene AT₁R in glatten Muskelzellen aus renalen Widerstandsarterien

Nachdem geklärt war, dass eine bestimmte Rezeptordichte für den Effekt der Mechanosensitivität erforderlich ist, stellte sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieses Phänomens. Ist die Mechanosensitivität der G_{q/11}-gekoppelten Rezeptoren ein Überexpressionsartefakt oder spielt die Mechanosensitivität auch für endogene AT₁R in glatten Muskelzellen eine Rolle? Dazu wurden glatte Muskelzellen aus Widerstandsgefäßen herangezogen, die eine fast 40-fach höhere AT₁-Rezeptordichte aufweisen als glatte Muskelzellen aus der Aorta (Nickenig et al., 1998; Ruan et al., 1997). Da die relativ leicht einer Präparation zugänglichen glatten Muskelzellen aus Gehirnarterien, die bereits für die Messungen der TRPC6-gendefizienten Mäuse benutzt worden waren, nach diversen Zellisolationen mit unterschiedlichsten Enzymen nie funktionelle AT₁R aufwiesen, wurde auf eine andere, enzymfreie Zellisolationemethode zurückgegriffen. Hierzu wurden mittels der Siebmethode glatte Muskelzellen aus Mäusenieren isoliert. Tatsächlich zeigten fluorimetrische Calciummessungen der isolierten, vier bis fünf Tage kultivierten, renalen Gefäßmuskelzellen wiederholbare, transiente Anstiege der [Ca²⁺]_i durch osmotisch bedingte Membrandehnung mit hypoosmolarer Lösung (Abbildung 3.27, links). Außerdem ließen sich die Calciumerhöhungen durch Applikation des inversen Agonisten Losartan unterdrücken. Nach dem Auswaschen von Losartan führte eine nachfolgende Stimulation mit hypoosmolarer Lösung sogar zu einer weiteren Aktivierung mit transienten Calciumerhöhungen. Losartan unterdrückte den [Ca²⁺]_i-Anstieg durch osmotisch bedingte Membrandehnung höchst signifikant ($P < 0,001$) (Abbildung 3.27, rechts). Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Mechanosensitivität des AT₁R tatsächlich in nativen Gefäßmuskelzellen vorhanden ist und möglicherweise eine physiologische Bedeutung hat.

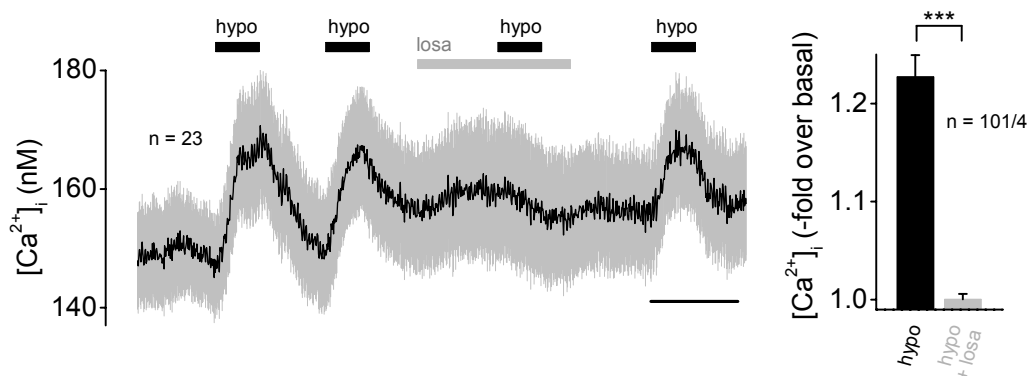


Abbildung 3.27: Membrandehnung aktiviert endogene AT₁R in glatten Muskelzellen aus Nierenarteriolen. Fluorimetrische [Ca²⁺]_i-Messungen von isolierten renalen Gefäßmuskelzellen sind dargestellt. Ein exemplarischer, gemittelter Zeitverlauf von 23 Fura-2-beladenen glatten Muskelzellen ist links darge-

stellt. Der graue Bereich repräsentiert den Standardfehler des Mittelwerts. Die Applikationen von hypoosmolarer Lösung und von 1 μM Losartan sind eingezeichnet (links). Die Zeitskalierung beträgt 2 min. Die Zusammenfassung der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege aus vier unabhängigen Experimenten während hypoosmolarer Stimulation und während hypoosmolarer Stimulation in Anwesenheit von Losartan sind rechts dargestellt.

3.2.13 Losartan reduziert den myogenen Gefäßtonus

Da endogen stark exprimierte AT_1R in glatten Muskelzellen aus Widerstandsgefäßen mechanosensitiv sind, stellte sich die folgende Frage: Sind AT_1R eine Komponente für die druckinduzierte Vasokonstriktion bzw. den myogenen Gefäßtonus? Dazu wurde der Gefäßdurchmesser von intakten Gehirnarterienabschnitten männlicher Ratten bei einem konstanten intravaskulären Druck von 60 mmHg kontinuierlich videomikroskopisch gemessen (Abbildung 3.28A). Nach der myogenen Konstriktion wurde Losartan (1 μM) eingewaschen und führte zu einer deutlichen Dilatation. Dieser Effekt war reversibel und wiederholbar. Die Gefäße wurden mit 60 mM KCl maximal konstringiert. Für eine maximale Dilatation diente die Applikation von nominell calciumfreier Badlösung. Die Wirkung von Losartan auf den myogenen Gefäßtonus zeigt eindrucksvoll, dass die mechanosensitiven AT_1R maßgeblich an der myogenen Gefäßkonstriktion beteiligt sind. Um auszuschließen, ob die Wirkung von Losartan auf einer Verdrängung des autokrin produzierten Angiotensin II in der Gefäßmuskelwand beruht, wurde der ACE-Hemmers Captopril in seiner maximalen Hemmkonzentration von 1 μM eingesetzt. Die losartaninduzierten Dilatationen bei Captopril-behandelten Gefäßabschnitten unterschieden sich nicht ($P = 0,78$) (Abbildung 3.28B). Die Erniedrigung des myogenen Tonus durch Losartan war in beiden Fällen hoch signifikant ($P < 0,001$) (Abbildung 3.28C). Außerdem scheint eine autokrine Produktion von Angiotensin II in der glatten Muskulatur keine bedeutende Rolle für die AT_1R -Aktivierungen bei Erhöhung des intravaskulären Druckes zu spielen. Das bedeutet, AT_1R in myogenen Gefäßen könnten tatsächlich als Mechanosensoren fungieren.

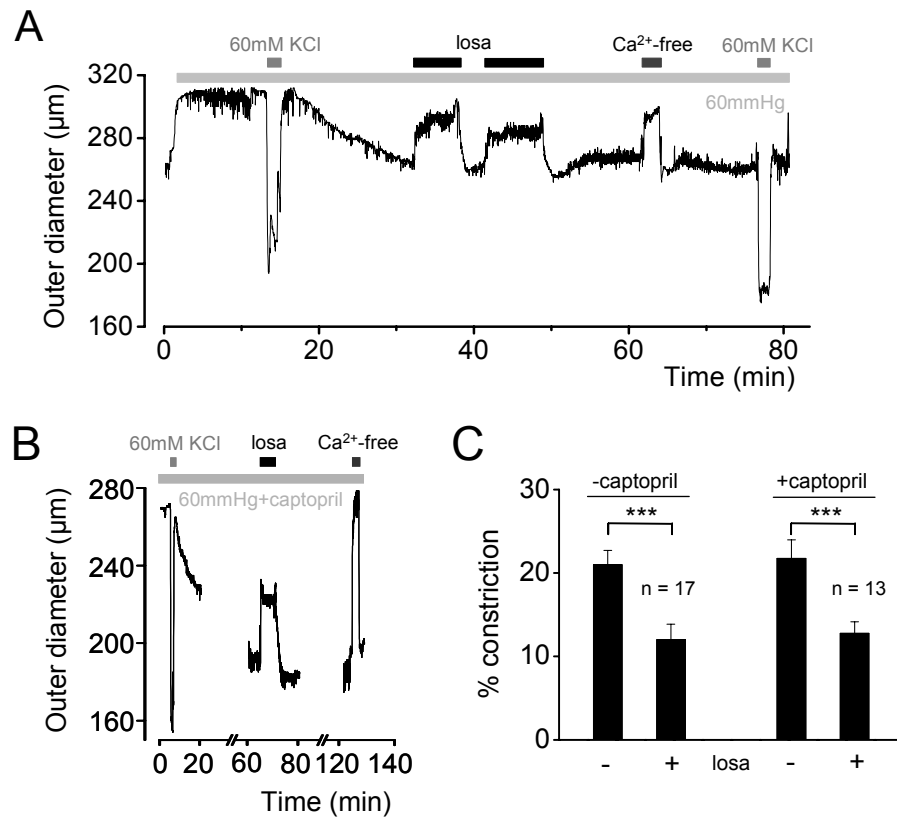


Abbildung 3.28: Wirkung von Losartan auf den myogenen Gefäßtonus. Jeweils eine repräsentative, kontinuierliche Messung des Durchmessers von isolierten Ratten-Gehirnarterien (A und B) ist dargestellt. Die Applikationen von 60 mmHg intravaskulärem Druck (A) und von 60 mmHg intravaskulärem Druck in Anwesenheit von 1 µM Captopril (B), von 60 mM KCl-Lösung, von nominell calciumfreier Lösung und von 1 µM Losartan sind eingezeichnet. C, Die Zusammenfassung der gemessenen Gehirnarterien zeigt die prozentuale Konstriktion der Arterien in Anwesenheit und in Abwesenheit von Captopril und während der Applikation von Losartan (C).

4 Diskussion

4.1 TRPC-defiziente Mausmodelle

Um die physiologische Rolle von Kanalproteinen im Organismus aufzuschlüsseln, sind Experimente sinnvoll, bei denen die Funktion des Kanals ausgeschaltet wird. Die einfachste Möglichkeit, die Funktion des Kanals *in situ* auszuschalten, ist die Verwendung von selektiven Kanalblockern. Weitere Möglichkeiten des Ausschaltens bestehen darin, die Bildung von Kanalproteinen mittels Antisense-Oligodesoxy-nukleotiden und „small interfering RNA“ (siRNA) selektiv zu hemmen. Schließlich können gentechnische Manipulationen eingesetzt werden, bei denen das Gen des Kanalproteins selbst ausgeschaltet wird oder bei denen die funktionelle Kanalexpression indirekt verhindert wird (Freichel et al., 2005). Da es bis heute keine selektiven TRPC-Kanalblocker gibt, um die Rolle der TRPC-Kanäle *in vivo* auf einfache Weise zu untersuchen, wurden folgende TRPC-defiziente Mauslinien generiert: TRPC1^{-/-} (Dietrich et al., 2007), TRPC2^{-/-} (Stowers et al., 2002), TRPC4^{-/-} (Freichel et al., 2001) und TRPC6^{-/-} (Dietrich et al., 2005b).

TRPC1-Proteine, die ubiquitär exprimiert werden, sind vermutlich am SOC-Einstrom beteiligt (Sweeney et al., 2002; Xu und Beech, 2001). Außerdem wurden TRPC1-Kanäle als mechanosensitive Kationenkanäle in *Xenopus*-Oozyten und in Säugerzellen beschrieben (Maroto et al., 2005). Die von Alexander Dietrich generierte TRPC1^{-/-}-Maus zeigte weder auf Verhaltensebene noch auf Organ- oder zellulärer Ebene Funktionsverluste (Dietrich et al., 2007). So war der myogene Gefäßtonus in TRPC1^{-/-}-Mäusen nicht beeinträchtigt, ebenso wenig wie die durch osmotisch und Druck bedingte Membrandehnungen hervorgerufenen Kationenströme in isolierten glatten Gefäßmuskelzellen aus Gehirnarterien. Auch der SOC-Einstrom in isolierte Gefäßmuskelzellen war unverändert, so dass TRPC1 weder als distinktive Komponente des SOC-Einstroms in glatten Muskelzellen noch als mechanosensitiv gelten kann.

Das von Emily Liman beschriebene Expressionsmuster des TRPC2 in Ratten (Liman et al., 1999), deutet darauf hin, dass dieser Kationenkanal eine wichtige Rolle im Pheromonsignalweg des Vomeronasalorgans von Nagetieren spielt. Zwei unabhängig generierte TRPC2-gendefiziente Mauslinien wiesen ein in gleicher Weise verändertes Sexual- und Aggressionsverhalten bei adulten Mäusen auf (Leypold et al., 2002; Liman et al., 1999; Stowers et al., 2002).

Hingegen zeigte die von Marc Freichel generierte TRPC4^{-/-}-Mauslinie keine offensichtlichen Verhaltensänderungen, aber einen Funktionsverlust auf zellulärer Ebene (Freichel et al., 2001): Die aus der TRPC4^{-/-}-Aorta gewonnen Endothelzellen besitzen nicht mehr den speicheroperierten Calciumeinstrom. Dadurch kommt es zu einer verminderten agonistinduzierten Vasodilatation auf Organebene.

Die von Alexander Dietrich et al. (2005) generierte TRPC6^{-/-}-Mauslinie wies ebenfalls keine offensichtlichen Verhaltensänderungen auf. Im Gegensatz zur TRPC4^{-/-}-Mauslinie trat der erwartete Funktionsverlust in den untersuchten Aorten und Gehirnarterien nicht auf. Jedoch konnte eine indirekte Funktionsänderung beobachtet werden, die sich in einer genetisch bedingten Überexpression von verwandten TRPC3- und TRPC7-Kanälen äußerte. Allerdings zeigte sich in glatten Muskelzellen aus Pulmonalarterien eine unikale Rolle des TRPC6-Kanals für die akute hypoxische Vasokonstriktion, da in diesen Zellen keine TRPC3- oder TRPC7-Überexpressionen vorhanden waren (Weissmann et al., 2006).

4.2 Überexpression von TRPC3 in TRPC6^{-/-}-Mäusen

In der Regel überschneiden sich die Expressionsmuster von TRPC3 und TRPC6 in den meisten glatten Muskelgeweben und in glatten Muskelzelllinien auf RNA-Ebene stark (Beech et al., 2004). Ebenso bestätigte Yip et al. (2004) diese Koexpression auf RNA- wie auf Proteinebene beim Menschen in der Gefäßmuskulatur und im Endothel (Yip et al., 2004). Auch die von uns untersuchte Gefäßmuskulatur von Mäusen wies diese Koexpression auf, wobei die quantitative Untersuchung bei Aorten und Gehirnarterien stets einen niedrigeren RNA-Gehalt an TRPC6 als an TRPC3 ergab (Dietrich et al., 2005b). Zudem zeigten diese quantitativen Untersuchungen, dass der RNA-Gehalt von TRPC3 bei TRPC6^{-/-}-Mäusen zweifach in Gehirnarterien und fünffach in Aorten erhöht war.

In Aorten und Gehirnarterien wurde TRPC7-RNA gefunden (Dietrich et al., 2005b), aber vermutlich spielt dieses Kanalprotein in der glatten Gefäßmuskulatur keine Rolle, da Yip et al. (2004) TRPC7-RNA ausschließlich im Endothel detektierte. Dies unterstützt auch der Befund, dass bisher keine Expression von TRPC7 in Zelllinien aus glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen wurde (Brueggemann et al., 2006; Inoue et al., 2001; Jung et al., 2002; Moneer et al., 2005). Ein zweifach erhöhter RNA-Gehalt von TRPC7 wurde in Aorten bei TRPC6^{-/-}-Mäusen bestimmt, was darauf hindeutet, dass in diesem Endothel TRPC7 überexprimiert war.

Die beobachteten erhöhten Bariumeströme und Stromdichten der nicht-aktivierten Kationenkanäle von frisch isolierten glatten Muskelzellen aus TRPC6^{-/-}- gegenüber TRPC6^{+/+}- bzw. TRPC6^{+/-}-Aorten und Gehirnarterien könnten in der oben beschriebenen

en Überexpression von TRPC3-Kanalproteinen begründet sein. An frisch isolierten glatten Muskelzellen dieser Gefäße zeigten sowohl Bariumstrom- als auch Stromdichten-Messungen verstärkte Antworten durch DAG-Analoga bei TRPC6^{-/-} gegenüber TRPC6^{+/+} bzw. TRPC6^{+/-}. Diese beiden unabhängigen Experimente weisen daraufhin, dass DAG-aktivierbare Kationenkanäle vermehrt funktionell exprimiert sind. Unter der Voraussetzung, dass die DAG-aktivierbaren TRPC7-Kanäle nicht in Gefäßmuskelzellen vorkommen, ist die Überexpression von TRPC3-Proteinen, die eine konstitutive Kanalaktivität besitzen, der Grund für die erhöhten Stromdichten im aktivierten und nicht-aktivierten Zustand. Um zu ermitteln, ob die Überexpression von TRPC3 in der Gefäßmuskulatur verantwortlich für den erhöhten basalen Kationeneinstrom ist, wurde siRNA gegen TRPC3-RNA über eine Infektion von rekombinanten adenoassoziierten Viren vom Serotyp 1 in isolierten glatten Muskelzellen aus TRPC6^{-/-}-Arten exprimiert. Nach drei Tagen in Kultur führte diese Behandlung zur Reduktion des Bariumstroms, was ein weiteres Indiz für die gesteigerte TRPC3 Kanalaktivität in TRPC6^{-/-} ist. Überexpressionen von TRPC6-Proteinen in TRPC6^{-/-} zeigten wiederum eine Reduktion des Bariumstromes, was darauf hinweist, dass das Verhältnis von funktionell exprimierten TRPC3- zu TRPC6-Proteinen die Größe des basalen Kationeneinstroms bzw. die basale Kationenkanalaktivität bestimmt.

4.3 Physiologische Relevanz der TRPC3-Überexpression

Die erhöhte basale Kationenkanalaktivität bei TRPC6^{-/-}-Gefäßmuskelzellen sollte sich in einer erhöhten Membranpermeabilität für Natriumionen widerspiegeln. Da das Ruhemembranpotential einer Zelle von den einzelnen Permeabilitäten für Kalium-, Chlorid- und Natriumionen bestimmt wird, ist ein Vergleich des Membranpotential von frisch isolierten glatten Muskelzellen aus TRPC6^{-/-}- zu TRPC6^{+/+}-Gehirnarterien unter physiologischen Ruhebedingungen mit Hilfe der Stromklemme ($I = 0$ pA) in der konventionellen Ganzzellkonfiguration sinnvoll. Zudem, bedingt durch die gleichen Manipulationen an den Zellen wie bei den Stromdichtenmessungen, besitzt die oben genannte Meßmethode des Ruhemembranpotentials weitere Vorteile. Messungen in der Stromklemme mit intrazellulären „scharfen“ Elektroden erlauben aber eine Aufnahme des Membranpotentials von einem kompletten und unbeeinflussten Gefäßabschnitt, denn die Gefäßmuskelzellen sind über „gap junctions“ untereinander und auch mit den innenliegenden Endothelzellen verbunden (Hill et al., 2002; Yamazaki und Kitamura, 2003) und bilden daher ein elektrisches Synzytium. Die konventionellen Ganzzelleitungen ergaben ein im Mittel um ca. 10 mV depolarisiertes Ruhemembranpotential bei frisch isolierten glatten Muskelzellen aus TRPC6^{-/-}-Gehirnarterien. Zum einen führt diese Depolarisation des Ruhemembranpotentials von

-38 mV auf -28 mV, zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der spannungsgesteuerten L-Typ Calciumkanäle, zum anderen braucht man eine um 10 mV kleinere Depolarisation, um diese Kanäle voll zu aktivieren. Außerdem verursacht das depolarisierte Ruhemembranpotential einen vergrößerten permanenten Einwärtsstrom von Calciumionen (Fleischmann et al., 1994), da diese Calciumkanäle eine Aktivierungsschwelle bei ca. -40 mV besitzen und im Gleichgewichtszustand eine fast vollständige Inaktivierung erst bei ca. +40 mV aufweisen (Petkov et al., 2001). Diese beiden Eigenschaften – das depolarisierte Ruhemembranpotential und der damit verbundene vergrößerte permanente Calciumeinstrom – erklären die erhöhte Kontraktilität und Sensitivität gegenüber dem intravaskulären Druck von Gehirnarterien bei TRPC6^{-/-}-Mäusen. In Übereinstimmung mit den beobachteten Folgen der TRPC3-Überexpression bei TRPC6^{-/-}-Mäusen, fand sich eine TRPC3- und TRPC6-Überexpression im Lungengewebe und in glatten Muskelzellen von Lungenarterien bei Patienten, die an einer idiopathischen pulmonalen arteriellen Hypertonie litten (Yu et al., 2004).

4.4 Heteromultimerisierungspotential

Mittels Coimmunpräzipitationen und der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Technik konnte Hofmann et al. (2002) die möglichen Heteromultimerisierungen zwischen den einzelnen TRPC-Proteinen im heterologen Expressionssystem systematisch aufzeigen (Hofmann et al., 2002). Ein Ergebnis war, dass die Expressionskombination aus TRPC3- und TRPC6-Proteinen zu einer Assemblierung führt. *In vivo* konnte diese Assemblierung an frisch isolierten Synaptosomen aus dem Gehirn von Ratten (Goel et al., 2002) und an einer Nierenepithelzelllinie aus einem Cockerspaniel (Bandyopadhyay et al., 2005) nachgewiesen werden. Diese guten Evidenzen für ein Heteromultimerisierungspotential zwischen TRPC3- und TRPC6-Proteinen und die charakterisierten Phänomene in der Gefäßmuskulatur von TRPC6^{+/+}- und TRPC6^{-/-}-Mäusen führen zu folgenden Behauptungen:

1. Die *in vivo* vorkommenden TRPC6-homomultimeren Kanäle sind strikt rezeptoroperiert.
2. Die bei TRPC6^{-/-}-Mäusen aus TRPC3-Proteinen gebildeten homomultimeren Kanäle weisen konstitutive Kanalaktivitäten auf.
3. Die konstitutive Kanalaktivität eines homomultimeren TRPC3-Kanals wird bei einem Austausch von einem TRPC3-Protein durch ein TRPC6-Protein deutlich erniedrigt.

4. Der strikt rezeptoroperierte homomultimere TRPC6-Kanal wird bei einem Austausch von einem TRPC6-Protein durch ein TRPC3-Protein konstitutiv aktiv.

Erst die Herstellung homo- und heteromultimer fusionierter Kanalproteine und die Charakterisierung ihrer Kanalaktivitäten in einem heterologen Expressionssystem könnten diese Behauptungen bestätigen. Interessanterweise findet sich ein ähnliches Phänomen durch eine Heteromultimerisierung zweier TRP-Proteine im Facettenauge der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Beide homomultimeren Kanäle sind konstitutiv aktiv, während die heteromultimeren Kanäle aus beiden TRP-Proteinen rezeptoroperiert sind (Xu et al., 2000).

4.5 Myogener Gefäßtonus in Gehirnarterien von TRPC6^{-/-}-Mäusen

Gehirnarterien besitzen einen ausgeprägten myogenen Gefäßtonus, der vor allem bei Ratten durch die Arbeitsgruppe von Mark T. Nelson gut untersucht ist. Diese Arbeitsgruppe zeigte mit Antisense-Oligodesoxynukleotiden gegen TRPC6, dass bei vier bis fünf Tage lang kultivierten Gehirnarterien von Ratten ein nur bis auf 10% verminderter myogener Gefäßtonus vorhanden war (Welsh et al., 2002). Sense-Oligodesoxynukleotide, die die endogene TRPC6-Expression nicht beeinflussen, führten zu einem 40%igen Gefäßtonus. Mit den gleichen Antisense-Oligodesoxynukleotiden konnte ein Jahr zuvor ein rezeptoroperierter TRPC6-Strom in kultivierten glatten Muskelzellen aus der Pfortader von Kaninchen fast vollständig ausgelöscht werden (Inoue et al., 2001). Der Verlust des myogenen Gefäßtonus von Gehirnarterien zeigte sich jedoch nicht bei den TRPC6^{-/-}-Mäusen. Weitere Untersuchungen an den Gehirnarterien von TRPC6^{-/-}-Mäusen ergaben sogar, dass der myogene Gefäßtonus bereits bei 55 statt bei 78 mmHg einsetzte (Dietrich et al., 2005b). Diese Linksverschiebung des Einsetzens des Bayliss-Effektes deutet eher darauf hin, dass, verglichen mit TRPC6^{+/+}- die TRPC6^{-/-}-Gehirnarterien gegenüber ihren intravasalen Drücken sensitiviert sind. Die oben beschriebene Überexpression von TRPC3 in TRPC6^{-/-}-Gehirnarterien könnte auch hier der Grund für diese Sensitivierung sein: In dieser Signalkaskade ist die Offenwahrscheinlichkeit für spannungsgesteuerte L-Typ Calciumkanäle erhöht durch eine Depolarisation, bedingt durch die konstitutiven TRPC3-Kanalaktivitäten. Die folgende erhöhte Permeation von Calciumionen versorgt verstärkt die Kontraktionsmaschinerie der glatten Muskelzellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden Experimente mit Antisense-Oligodesoxynukleotiden gegen TRPC6 zu einem Funktionsverlust führten, während die TRPC6-gendefiziente Gefäßmuskulatur eine Funktionsänderung hervorbrachte. Diese

Funktionsänderung lässt sich durch eine Langzeitadaptation begründen, bei der eine Überexpression des konstitutiv aktiven TRPC3-Kanals stattfindet. Somit lassen sich TRPC3- und TRPC6-Kanäle nicht funktionell austauschen, was die besondere physiologische Rolle des TRPC6 in der Gefäßmuskulatur verdeutlicht.

4.6 Potentielle Mechanosensoren

In der Vergangenheit sind diverse Zellstrukturen in den glatten Gefäßmuskelzellen als Mechanosensoren, die die Membrandehnung bzw. die Membranspannung messen, in Betracht gezogen worden. Neben integralen und akzessorischen Membranproteinen sind auch intrazelluläre Strukturen diskutiert worden.

4.6.1 Intrazelluläre Strukturen

Die intrazellulär vorliegenden „dense bands“, die die kontraktilen Filamente der glatten Muskelzellen mit ihrer Zellmembran verbinden, sind als Kandidaten für Mechanosensoren beschrieben worden (Levick, 1998). Unter „dense bands“ versteht man elektronendichte Streifen aus Vinculin und α -Aktinin, die membranständig aber auch cytoplasmatisch vorkommen (Small, 1985). In den glatten Muskelzellen von Arteriolen sind sie asymmetrisch verteilt mit einem stärkeren Vorkommen auf der adluminalen Seite (Gabella, 1983). Aufgrund dieser asymmetrischen Verteilung könnten sie eine sensorische Funktion haben.

4.6.2 Integrale Membranproteine

Die „dense bands“ an der Zellmembran haben eine Adapterfunktion, um an Integrine, die man als integrale Membranproteine klassifiziert, zu binden. Integrine sind heterodimere Glykoproteine und besitzen extrazellulär eine adhäsive Bindestelle für extrazelluläre Strukturproteine wie Fibronectin, Laminin und Collagen. Aufgrund dieser Fähigkeit, extrazelluläre sowie intrazelluläre Strukturelemente zu binden, wurden sie neuerdings als mögliche Mechanosensoren bei der Vermittlung des myogenen Gefäßtonus in Betracht gezogen (Martinez-Lemus et al., 2005; Waitkus-Edwards et al., 2002). Da Tyrosinkinasen der Src-Familie die Verbindung zwischen den Integrinen und den intrazellulären Strukturproteinen beeinflussen (Felsenfeld et al., 1999), konnten kürzlich drei verschiedene Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Methoden und Zellmodellen ihre Rolle in der Mechanosensorik bzw. -transduktion aufzeigen (Sawada et al., 2006; Wang et al., 2005; Wijetunge und Hughes, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde keine Beteiligung an der Mechanosensorik beobachtet, wobei bislang nur endogene Tyrosinkinasen in transient exprimierenden HEK293-Zellen untersucht wur-

den. Eine Untersuchung der Rolle von Tyrosinkinase in intakten myogenen Gefäßabschnitten steht noch aus.

Neben den Integrinen und den damit verbundenen, regulierenden Molekülkomplexen, die als Mechanosensoren fungieren könnten, gibt es als integrale Membranproteine die klassischen mechanosensitiven Ionenkanäle. In allen drei Domänen des zellulären Lebens, nämlich Bakterien, Archaeen und Eukaryoten, treten mechanosensitive Kanäle auf (Martinac und Kloda, 2003). Diese Kanäle dienen bei Bakterien und Archaeen der Osmoregulation, was vermutlich auch ihre ursprüngliche Funktion war (Kung, 2005). Bei den mechanosensitiven Kanälen aus Bakterien konnte eindeutig ihre immanente Mechanosensitivität belegt werden, indem rekonstruierte Kanalproteine in künstlichen Lipiddoppelschichten durch erhöhte Membranspannungen aktiviert wurden (Martinac et al., 1990; Perozo et al., 2002). In der Ionenselektivität, der Leitfähigkeit und der Spannungsabhängigkeit können sich die mechanosensitiven Kanäle aus den Bakterien und Archaeen jedoch stark unterscheiden. Dies gilt auch für mechanosensitive Kanäle aus Eukaryoten.

Die zuerst identifizierten mechanosensitiven Kanäle in Eukaryoten waren aus der Familie der DEG/ENaC-Kanäle (Degenerin-/epitheliale Natriumkanäle). Aus dieser großen Familie konnte bei zwei Kanalproteinen, MEC-4 und MEC-10, ihre Mechanosensitivität im Nematoden *Caenorhabditis elegans* eindeutig nachgewiesen werden (Driscoll und Chalfie, 1991; Huang und Chalfie, 1994). Zwei weitere Kanalproteine des Nematoden, die aber zur TRPV-Familie gehören, OSM-9 und OCR-2, sind wahrscheinlich in der Mechanotransduktion involviert (Colbert et al., 1997; Tobin et al., 2002), während es bei den beiden TRPP-Proteinhomologen, LOV-1 und PKD2, umstritten ist, ob sie in der Mechanosensorik oder in der Chemosensorik eine Funktion ausüben (Barr et al., 2001; Barr und Sternberg, 1999). Neben diesem Nematoden ist ein weiterer Invertebrat, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, hinsichtlich ihrer Mechanosensitivität gut untersucht worden. Zurzeit gilt der TRPN1 als Kandidat für die mechanosensorische Funktion in Fliegenborsten und im Johnstonschen Organ, die dem Tastsinn und dem Hörsinn dienen (Eberl et al., 2000; Walker et al., 2000). Für den Hörsinn werden zwei weitere Kandidaten aus der Familie der TRPV-Kanalproteine, Nanchung und lav, diskutiert (Gong et al., 2004). Die Rolle des TRPA als noxischer Mechanosensor ist weder bei *D. melanogaster* noch bei Vertebraten endgültig aufgeklärt (Kwan et al., 2006; Tracey et al., 2003). Zudem sind die Sensoren für nicht-noxische mechanische Reize in Vertebraten derzeit noch nicht identifiziert. Hier gilt der TRPV4 als bester Kandidat für einen mechanosensitiven Kanal (Liedtke et al., 2000; Suzuki et al., 2003). Im auditiven Sinnensystem der Vertebraten werden zurzeit sogar vier TRP-Kanäle in Betracht gezogen, TRPA1, TRPML3, TRPN1 und TRPV4, die der Mechano-

transduktion dienen (Christensen und Corey, 2007). Bei all diesen Kanalproteinen ist nicht klar, ob sie direkt mechanosensitiv sind oder indirekt wirken, indem sie an der Mechanotransduktion beteiligt sind.

Um explizit als direkter mechanosensitiver Ionenkanal gelten zu können, sollten folgende Kriterien erfüllt sein: eine schnelle Kanalaktivierung in wenigen Millisekunden, die sich auf eine intramolekulare Bewegung zurückführen lässt, eine Aktivierungsschwelle bei physiologischen Membranspannungen und ein Erhalt der Mechanosensitivität bei Rekonstruktion des Kanals in einer künstlichen Lipiddoppelschicht. Da es experimentell aufwändig ist, diese Untersuchungen durchzuführen, sind diese Kriterien für die meisten Kanäle nicht erfüllt.

4.6.3 Mechanosensitive Ionenkanäle in glatten Muskelzellen

Die Mechanosensorik dient nicht nur der Informationsaufnahme aus der Umwelt, sondern kann auch wichtige Informationen über den Status des Organismus liefern, wie z.B. über die Stärke des Blutflusses oder über die Höhe des Gefäßdruckes. Der Ort der Perzeption für den intravaskulären Druck ist die glatte Gefäßmuskulatur und nicht das Endothel (Bevan und Laher, 1991). Daher wurden in glatten Muskelzellen Ionenkanäle als Mechanosensoren vermutet wie z.B. mechanosensitive Chloridkanäle und Kationenkanäle (Greenwood und Large, 1998; Welsh et al., 2002; Welsh et al., 2000; Yamazaki et al., 1998). Auch die epithelialen Natriumkanäle aus der DEG/ENaC-Kanalfamilie (Drummond et al., 2004) gelten dort als mechanosensitiv. Zwei Kanäle der TRP-Kanalfamilie, TRPC6 und TRPM4, spielen für die myogene Vasokonstriktion eine Schlüsselrolle. Die Unterdrückung der Expression von TRPC6- und TRPM4-Kanälen führte jeweils zu einer Reduktion der myogenen Vasokonstriktion (Earley et al., 2004; Welsh et al., 2002). Man kann daher folgende Hypothese aufstellen, dass TRPC6- und TRPM4-Kanäle in glatten Muskelzellen als Mechnosensoren fungieren. Auch andere TRP-Kanäle wie z.B. der TRPV2 (Muraki et al., 2003) wurden als molekulare Korrelate für mechanosensitive Kationenkanäle in glatten Muskelzellen in Betracht gezogen. Interessanterweise wurde dem TRPM7-Kanal zuerst eine direkte mechanosensitive Funktion zugeschrieben (Numata et al., 2007a; Numata et al., 2007b), die kürzlich falsifiziert wurde, in dem sich herausstellte, dass die osmotisch bedingte Membrandehnung diesen Kanal nur indirekt aktivierte (Bessac und Fleig, 2007). Außerdem scheint der TRPC1-Kanal ein mechanosensitiver Kationenkanal in *Xenopus*-Oozyten und in Säugerzellen zu sein (Maroto et al., 2005). Dies konnte in der glatten Gefäßmuskulatur allerdings nicht bestätigt werden (Dietrich et al., 2007).

Die Mitglieder einer weiteren Kanalfamilie, die L-Typ Ca_v -Kanäle, könnten ebenfalls an der Mechanosensorik beteiligt sein, da sie einerseits für die myogene Gefäßkon-

striktion unerlässlich sind (Moosmang et al., 2003) und andererseits durch Membrandehnung aktiviert werden (Langton, 1993; Lyford et al., 2002). Es ist aber noch unklar, ob es sich hierbei um eine direkte Kanalaktivierung handelt (Davis und Hill, 1999).

4.6.4 Enzyme

Ebenfalls besitzen membranständige Proteine das Potential mechanosensorisch zu sein. Dazu gehört die Phospholipase A_2 , die schon bei geringen osmotischen Veränderungen ihre Enzymaktivität verändert (Lehtonen und Kinnunen, 1995). Auch Phospholipasen C wurden als Mechanosensoren in Betracht gezogen (Ko und McCulloch, 2000). Mit komprimiertem Heliumgas, das zur Steigerung des Außendruckes diente, konnten an kultivierten Mesangialzellen erhöhte PLC-Aktivierungen über 100 Stunden beobachtet werden (Kato et al., 1999). Besonders an Blutgefäßen sind mechanosensitive PLC-Aktivierungen von verschiedenen Arbeitsgruppen gut dokumentiert (Jarajapu und Knot, 2002; Matsumoto et al., 1995; Narayanan et al., 1994; Osol et al., 1993), was die bedeutende Rolle der PLC unterstreicht. In der vorliegenden Arbeit konnte die Rolle der PLC bestätigt und in der Signaltransduktionskaskade eingeordnet werden.

4.7 Vergleich verschiedener Stimuli zur Membrandehnung

Die membranbezogenen Prozesse, die bei einer Membrandehnung ablaufen, sind bis heute nicht genau beschrieben. Selbst bei der trivialen Überlegung, ob sich das Membranvolumen bei einer Membrandehnung vergrößert oder konstant bleibt, ist bisher nicht geklärt. Ein seitliches Druckspannungsprofil („lateral pressure profile“) dient als Modell für die in der Phospholipiddoppelschicht auftretenden Zug- und Druckspannungen, die bisher noch nicht innerhalb der Membran messbar sind. Die Summe aller Zug- und Druckspannungen über die gesamte Dicke der Membran muss im thermodynamischen Gleichgewichtszustand Null ergeben. Auf der Ebene der hydrophilen Kopfgruppen zeichnet sich das seitliche Druckspannungsprofil darin aus, dass große Zugspannungen lokalisiert sind, die sich durch elektrostatische Wechselwirkungen erklären lassen. Schwächere Zugspannungen befinden sich auf der Ebene der hydrophoben Schwanzgruppen, die sich durch Abstoßungen zwischen den Kohlenwasserstoffgruppen erklären lassen. Diese beiden Zugspannungen werden ausgeglichen durch eine entgegen gesetzte, große Druckspannung, die sich genau an der Grenzfläche zwischen den hydrophilen Kopfgruppen und den hydrophoben Schwanzgruppen befindet (Cantor, 1997; Cantor, 1999).

Das seitliche Druckspannungsprofil kann durch den Einbau unterschiedlicher Lipide variiert werden. Der Zusatz von Alkoholen, Fettsäuren und lipophilen Lokalanästhetika

verändert ebenfalls das seitliche Druckspannungsprofil, wobei die Summe aller seitlichen Zug- und Druckspannungen immer Null ergibt. Die Veränderung des Druckspannungsprofils wirkt auf die integralen Membran- und die akzessorischen Proteine und kann somit zu einer Konformationsänderung führen (Kung, 2005). Bei Ionenkanälen kann sich z.B. das Schaltverhalten verändern, bei Tyrosinkinase Rezeptoren die quaternäre Struktur und damit die Enzymaktivität. Nicht nur organische Substanzen verändern das Druckspannungsprofil, sondern auch mechanische Kräfte, die von außen auf die Membran wirken und zu einer Membrandehnung führen. Für den mechano-sensitiven MscL-Kanal aus *Escherichia coli* wurde ein Simulationsmodell beschrieben, bei dem eine äußere Kraftereinwirkung das seitliche Druckspannungsprofil so verändert, dass es zu einer instantanen Kanalöffnung kommt (Gullingsrud und Schulten, 2003).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Membrandehnungen zu verursachen und zu messen. Mittels osmotischer Gradienten über die Zellmembran wurden Membrandehnungen optisch vermessen (Evans et al., 1976). Lokal applizierter Sog auf einen Membranfleck über eine Glaskapillare mit einem Durchmesser von 5 bis 8 μm ist eine weitere standardisierte Methode der Zug bedingten Membrandehnung (Wolfe und Steponkus, 1983). Auch Patchpipetten eignen sich hervorragend, um Zug bedingte Membrandehnungen durchzuführen. Einerseits kann mittels Sog über die Patchpipette selbst in der „cell-attached“-Konfiguration eine lokale Membranspannung erzeugt werden (Hamill, 1983; Hamill, 2006), andererseits kann mit Hilfe von zwei Patchpipetten, die die Zelle auseinander ziehen, eine über die gesamte Membran verteilte Membranspannung generiert werden (Wu und Davis, 2001). Zudem lassen sich über die Patchpipette in der Ganzzellkonfiguration Überdrücke applizieren, was ebenfalls die gesamte Membran unter Spannung setzt (Setoguchi et al., 1997). In dieser Konfiguration lässt sich auch die Membrankapazität, ein Maß für die Membranfläche, mit einer Genauigkeit bis zu 0,4 fF bestimmen (Neher und Marty, 1982). Membranintegrierte Polystyrolkugeln dienen einerseits zur Bestimmung der Membrandehnung, andererseits zur Erzeugung von lokalen Membrandehnungen über Laserpinzetten (Sheetz und Dai, 1996; Svoboda und Block, 1994). Eine weitere Möglichkeit, bei der im Gegensatz zu den oben erwähnten Methoden nicht nur Einzelzellen manipuliert werden, sondern viele Zellen gleichzeitig, ist von Vandeburgh und Kaufmann 1979 etabliert worden (Vandeburgh und Kaufman, 1979). Hierbei werden Zellen auf einer Silikonmembran kultiviert, die um 10 bis 20% gedehnt wird (Sadoshima et al., 1992), was bei adhären-ten Zellen zu Membranspannungen führt. Die Arbeitsgruppe um Issei Komuro benutzten diese Stimulation (Zou et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit sind vier verschiedene Stimulationen angewendet worden, die eine Membrandehnung der Zellen verursachen. Die Membrandehnung erfolgte in der konventionellen Ganzzellkonfiguration

1. durch eine vertikale Aufwärtsbewegung der Patchpipette,
2. durch eine Druckapplikation über die Patchpipette und
3. durch extrazelluläre Applikation von hypoosmolarer Lösung.

Als vierte Stimulation wurde Sog über eine Patchpipette auf einen Membranfleck in einer zellfreien Konfiguration appliziert, wobei die Membraninnenseite von der Patchpipette abwies und die Öffnung der Patchpipette abgedichtet war. Dieser Stimulus dient zur paradigmatischen Klassifizierung mechanosensitiver Ionenkanäle. Die erste Stimulation wird hier als Zug bedingte, die zweite als Druck bedingte, die dritte als osmotisch bedingte und die vierte als Sog bedingte Membrandehnung bezeichnet (siehe Ergebnisse Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4). Die osmotisch bedingte Membrandehnung wurde nicht nur eingesetzt bei Zellen, deren Zellmembran und Zytoplasma durch die konventionelle Ganzzelleitung geschädigt ist, sondern auch bei Zellen, die eine intakte Zellmembran besitzen und deren Zytoplasma kaum beeinflusst bzw. unbeeinflusst war (siehe Kapitel 3 Abschnitte 3.2.1 und 3.2.5). Da Zellmembranen eine begrenzte Dehnbarkeit aufweisen, die zwischen 6 und 8% der ursprünglichen Membranfläche liegt (Sackmann et al., 1973; Stoekenius und Engelman, 1969), mussten insbesondere für die Ganzzelleitungen die Stimulationen so gewählt werden, dass sich die erfolgten Membrandehnungen im elastischen Bereich befinden.

Für die osmotisch bedingte Membrandehnung wurde eine hypoosmolare Lösung mit 250 mOsm kg^{-1} eingesetzt, was einen osmotischen Gradienten von 50 mOsm kg^{-1} erzeugt im Vergleich zu Gradienten von 80 (Vriens et al., 2004) und 100 mOsm kg^{-1} (Strotmann et al., 2000).

Die Druck bedingte Membrandehnung erfolgte über Patchpipetten, die Pipettenöffnungen im Bereich von $1 \mu\text{m}$ aufweisen. Der applizierte Überdruck war im Bereich von 5 bis $10 \text{ cmH}_2\text{O}$ über dem Atmosphärendruck - das entspricht 3,7 bis $7,4 \text{ mmHg}$. Alle höheren Drücke führten unweigerlich zum sofortigen Verlust der Membranintegrität. Ein ähnliches Druckverhalten zeigten die Membranen von Protoplasten (Wolfe und Steponkus, 1981) und Tonoplasten (Sutter et al., 2000). Damit wurde die Elastizitätsgrenze von 230 mN m^{-1} für biologische Membranen (Wolfe und Steponkus, 1981) nicht überschritten, und da mechanosensitive Ionenkanäle bei einer Membranspannung von etwa 12 mN m^{-1} aktivieren (Orr et al., 2006), reichen die beiden oben beschriebenen Stimulationen völlig aus.

Die Zug bedingte Membrandehnung, die durch eine vertikale Aufwärtsbewegung von 8 bis $10 \mu\text{m}$ einer 20° zur vertikalen Achse stehenden Patchpipette realisiert wur-

de, führte zu einer lokalen Membrandehnung, deren Membranspannung schwierig abzuschätzen ist. Verglichen mit den beiden Stimulationen, die eine gleichmäßig über die gesamte Membran verteilte Membranspannung erzeugen, zeigte die lokal wirkende Membranspannung nur in 12% aller Einzelzellmessungen TRPC6-Kationenströme. Auch die Erfolgsrate bei der Zug bedingten Membrandehnung war mit einer von acht durchgeführten Einzelzellmessung ohne Membranriss gering. Anscheinend führen lokale Membranspannungen leichter zu einem Membranriss als eine gleichmäßig verteilte Membranspannung.

Alle drei Arten der Stimulation in der Ganzzellkonfiguration führten zu TRPC6-Kationenströmen, doch bezüglich der Stromkinetik fanden sich Unterschiede. In einigen Fällen erzeugten Druck und Zug bedingte Membrandehnungen deutlich langsamere Stromkinetiken als bei osmotisch bedingten Membrandehnungen. Dieser Unterschied könnte sich mit dem zusätzlichen Wassereinstrom begründen, der bei den anderen beiden Membrandehnungen nicht vorhanden ist und der zusätzlich das seitliche Druckspannungsprofil der Membran stärker verändert.

4.8 Fehlende Mechanosensitivität des TRPC6

Während G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren und TRPC6-Kanal koexprimierende HEK293-Zellen in der Ganzzellkonfiguration durch osmotisch bedingte Membrandehnungen aktiviert wurden, konnten bei alleiniger Expression des TRPC6-Kanals keine Kanalaktivierungen beobachtet werden. Experimente mit Hilfe der Sog bedingten Membrandehnung, die der eindeutigen Charakterisierung von mechanosensitiven Kanälen dienen, bestätigten, dass es sich beim TRPC6 nicht um einen per se mechanosensitiven Kanal handelt. Diese Befunde stehen im Widerspruch zu einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, in der der TRPC6 als immanent mechanosensitiv charakterisiert wurde (Spasova et al., 2006a). Diese Diskrepanz lässt sich durch folgendes erklären:

1. Bei Spasova et al. war der Schwellenwert des applizierten Druckes höher als 80 mmHg, um den TRPC6 zu aktivieren. Ein Vergleich zu dem potentiell mechanosensitiven TRPC1-Kanal zeigt, dass ein Druck zwischen 10 und 20 mmHg zur halbmaximalen Kanalaktivierung ausreicht (Maroto et al., 2005). Auch eukaryotische mechanosensitive Kaliumkanäle weisen eine halbmaximale Aktivierung bei 40 mmHg auf (Hamill, 2006; Martinac, 2004). Selbst der als Sicherheitsventil für extreme Drücke beschriebene prokaryotische MscL mit seiner großen Leitfähigkeit besitzt eine halbmaximale Aktivierung bei 80 mmHg (Levina et al., 1999). Somit erscheint ein Schwellendruck von 80 mmHg exuberant, da im Allgemeinen Drücke von ca. 4 mmHg (6 cmH₂O) ausreichen (Sackin, 1995), um im physiologischen

Bereich mechanosensitive Ionenkanäle zu aktivieren. Zum Beispiel reichte in isolierten Gefäßmuskelzellen von Widerstandsgefäßen ein Druck von 7 mmHg (10 cmH₂O) aus, um dehnungsaktivierte Kationenströme hervorzurufen (Setoguchi et al., 1997). Dieser Druck reichte in isolierten Membranflecken von TRPC6-exprimierenden HEK293-Zellen nicht zur TRPC6-Kanalaktivierung aus. Jedoch wurden dehnungsaktivierte Chloridkanäle unter diesen Bedingungen sofort aktiviert, was darauf hindeutet, dass bei dieser zellfreien Konfiguration der Stimulus adäquat ist. Ebenfalls konnten in diesen Membranflecken TRPC6-Kanalaktivierungen durch SAG hervorgerufen werden, was zeigt, dass dort TRPC6-Kanäle funktionell exprimiert waren. Des Weiteren führte eine Erhöhung des Druckes auf 51 mmHg (70 cmH₂O) niemals zu instantanen Kanalaktivierungen, einem wichtigen Kriterium für mechanosensitive Ionenkanäle (Hamill, 2006). In 50% der Fälle kam es zu Kanalaktivierungen mit einer Latenzzeit von mindestens 20 Sekunden, die im Vergleich zu den SAG-induzierten Kanalaktivierungen nur etwa ein Drittel so groß waren, was sicherlich nicht für ein typisches mechanosensitives Verhalten spricht.

2. Im Gegensatz zu den Experimenten in Kapitel 3 Abschnitt 3.2.4 konnte in der Arbeit von Spassova et al. (2006) der heterolog exprimierte TRPC6 durch osmotisch bedingte Membrandehnung (240 mOsm kg⁻¹) aktiviert werden. Osmotisch bedingte Membrandehnungen mit 150 mOsm kg⁻¹ an RBL 2H3-Zellen (Dai et al., 1997) und an Schneckenneuronen (Dai et al., 1998) verursachen Membranspannungen bis zu 0,4 mN m⁻¹. Diese Diskrepanz könnte darauf beruhen, dass die von Spassova et al. verwendeten HEK293-Zellen eine hohe endogene Rezeptordichte aufwiesen.
3. Die Sog bedingte Membrandehnung, die bei Spassova et al. zur Aktivierung von TRPC6-Kanälen erforderlich war, entspricht einer Membranspannung von 4 bis 5 mN m⁻¹. In dieser Größenordnung dient dieser Stimulus nur noch zur Aktivierung von prokaryotischen MscL-Kanälen und gilt sogar als zelllytisch (Hamill, 2006). Des Weiteren bleibt unklar, warum bei Spassova et al. zur TRPC6-Kanalaktivierung in isolierten Membranflecken eine 40fach höhere Membranspannung erforderlich war im Vergleich zur osmotisch bedingten Membrandehnung.
4. Außerdem ist es fraglich, ob die Mechanosensitivität des TRPC6-Kanals mittels des Tarantulapeptids GsMTx-4, das derzeit als spezifischer Blocker für mechanosensitive Ionenkanäle gilt, verifiziert werden kann, da sich bereits beschriebene mechanosensitive Kanäle wie MscKs und der TRPC1

nicht durch GsMTx-4 blockieren lassen (Hamill, 2006), so dass die Blockierbarkeit kein Entscheidungskriterium darstellen kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der TRPC6-Kanal bei Spassova et al. erst bei nahezu lytischen Membranspannungen aktiviert, so dass die physiologische Relevanz dieses Phänomens daher fraglich erscheint. Abschließend kann festgestellt werden, dass sowohl transient TRPC6 exprimierende und Ponasteron-induzierbare, TRPC6 exprimierende HEK293-Zellen als auch endogen TRPC6 exprimierende A7r5-Zellen nicht durch osmotisch bedingte Membrandehnungen aktivierbar waren. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Ryuji Inoue (Inoue et al., 2004). Erst Koexpressionen mit G_q -gekoppelten Rezeptoren verursachten eine mechanosensitive Kanalaktivierung, die über PLC vermittelt wurde.

4.9 Agonistenunabhängige Aktivierungen von GPCRs

Bis heute sind drei unabhängige Arbeiten veröffentlicht worden (Chachisvilis et al., 2006; Makino et al., 2006; Zou et al., 2004), die zeigen, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren unabhängig von einem Agonisten durch Membrandehnung direkt aktiviert werden können. Der erste G-Protein-gekoppelte Rezeptor, bei dem eine Mechanosensitivität beobachtet wurde, ist der G_q -gekoppelte AT_1R (Zou et al., 2004). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurde hierbei die Phosphorylierung von „extracellular signal regulated“ Kinasen (ERKs) als Maß für die Rezeptoraktivierung bestimmt. Diese Phosphorylierungen befinden sich in der Signalkaskade distal zum Rezeptor, während sich die vorliegende Arbeit auf die proximale Signalkaskade fokussiert, um stärkere Evidenzen für die direkte Rezeptoraktivierung durch Membrandehnung zu erhalten. Dennoch können Zou et al. mit Hilfe eines selektiven inversen Agonisten den experimentellen Beweis führen, dass der Rezeptor agonistenunabhängig, direkt membran-dehnungsinduziert aktiviert, was auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 3 Abschnitt 3.2.9.3). Weitere wesentliche Unterschiede zu der vorliegenden Arbeit liegen in der Stimulationsdauer, die bei Zou et al. fünf bis acht Minuten im Gegensatz zu maximal einer Minute (siehe Kapitel 3 Abschnitt 3.2.9.3) betrug und in der Beobachtung des rezeptorvermittelten Effekts, die bei Zou et al. punktuell und nicht kontinuierlich war. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Membrandehnungen zu instantanen Rezeptoraktivierungen führen. Unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie beim AT_1R konnte eine mechanische Aktivierbarkeit der $ET_A R$ von Zou et al. ausgeschlossen werden, obwohl pathophysiologische Indizien für ihre Mechanosensitivität vorlagen (Yamazaki et al., 1996). Im Gegensatz dazu zeigt die vorliegende Arbeit (siehe Kapitel 3 Abschnitt 3.2.9.1), dass heterolog überexprimierte ET_A -Rezeptoren mechanosensitiv sind, was folglich die

Mechanosensitivität als exklusive Eigenschaft des AT_1R s entkräftet. Darüber hinaus stellte sich bei den Überexpressionsexperimenten heraus, dass weitere G_q -gekoppelte Rezeptoren das Potential besitzen, mechanosensitiv zu wirken wie ein dritter peptidischer Rezeptor, $V_{1A}R$, und zwei weitere Transmitter-gesteuerte Rezeptoren, H_1R und M_5R . Vermutlich können viele G_q -gekoppelte Rezeptoren als Mechanosensoren fungieren, wenn sie stark genug funktionell exprimiert werden.

Die fehlende Mechanosensitivität des überexprimierten G_s -gekoppelten β_2 -adrenergen Rezeptors von Zou et al., die mittels radioaktiv-biochemischer cAMP-Bestimmung ermittelt wurde, konnte bestätigt werden (Mederos & Storch et al., 2008, unter Revision). Ob prinzipiell alle G_s -gekoppelten Rezeptoren nicht mechanosensitiv sind, könnte ein interessanter Forschungsgegenstand sein.

Mittels eines intramolekularen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) am G_q -gekoppelten, heterolog exprimierten Bradykinin B_2 -Rezeptor, konnte festgestellt werden, dass sowohl osmotisch bedingte Membrandehnungen als auch Scherkräfte ähnliche Rezeptorkonformationsänderungen hervorrufen wie Agonisten (Chachisvilis et al., 2006). Eine physiologische Relevanz dieses Befundes ist allerdings zurzeit noch unklar, da nicht gezeigt wurde, dass die beobachteten Rezeptorkonformationsänderungen auch zu einer G-Proteinaktivierung führen.

Eine weitere intramolekulare FRET-Untersuchung am G_i -gekoppelten Formylpeptid-Rezeptor in Leukozyten zeigt eine Abnahme der konstitutiven Rezeptoraktivität durch Scherkräfte (Makino et al., 2006), was ebenfalls auf eine Mechanosensitivität dieses Rezeptors hinweist. Zurzeit ist die Wirkung der Membrandehnung auf G_i -gekoppelte Rezeptoren noch nicht untersucht. Hier stellt der adrenerge α_2 -Rezeptor die interessanteste Zielstruktur dar.

Darüber hinaus wurde kürzlich am Beispiel des muskarinischen M_2 -Rezeptors gezeigt, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nicht nur Sensoren für chemische Signale und für mechanische Kräfte darstellen, sondern dass sie auch Transmembranpotentialsänderungen perzipieren (Ben-Chaim et al., 2006). Membrandepolarisationen führten hierbei zu einer Erhöhung der Agonistenbindungsaffinität, die sich im Effektor-system physiologisch bemerkbar machte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren neben der klassischen Agonistenbindung auch andere Reize perzipieren können. Diese Reize können agonistenunabhängig oder gemeinsam mit dem Agonisten modulatorisch wirken.

4.10 Folgen der Rezeptorkonformationsänderung durch Membrandehnung

4.10.1 β -Arrestinrekrutierung

Unter basalen Bedingungen in Abwesenheit von Agonisten liegen viele Rezeptoren in einem thermodynamischen Gleichgewicht in zwei Konformationszuständen vor, dem aktiven und dem inaktiven (Lefkowitz et al., 1993; Leurs et al., 1998). Um die Folgen der aktiven Konformationszustände nachzuweisen, kann die Technik des Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfers (BRET) herangezogen werden, mit der Proteininteraktionen nachgewiesen werden können. Die Aktivierung von GPCRs führt zur Aktivierung und Dissoziation von G-Proteinen. Die $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivieren G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen, die den C-Terminus der Rezeptoren phosphorylieren, was eine notwendige Voraussetzung für eine β -Arrestin-Bindung darstellt. Durch diese β -Arrestin-Rekrutierung werden die Rezeptoren vollständig desensibilisiert. Darüber hinaus können von β -Arrestin weitere Signalwege wie z.B. ERKs angeschaltet werden.

Um die Rekrutierung von β -Arrestin zu messen, wurde ein AT_1 -Rezeptor, der C-terminal mit dem stabilen YFP (Venus) fusioniert war, mit einem Luciferase-gekoppelten β -Arrestin (luc- β -Arrestin) koexprimiert. In Anwesenheit des Substrates Coelenteracin H für die Luciferase kann es nach Rezeptoraktivierung zu einer β -Arrestin-Rekrutierung kommen. Bei einer Annäherung des luc- β -Arrestins an den AT_1 R-Venus auf weniger als 10 nm kommt es dabei zu einer strahlenlosen Energieübertragung von der Luciferase auf das Venus-Fluorochrom, was eine gradierte Biolumineszenz hervorruft.

Sowohl osmotisch bedingte Membrandehnung als auch Agonistenstimulation mit Angiotensin II führten bei AT_1 R-Venus und luc- β -Arrestin koexprimierenden COS-7-Zellen zu gleich großen BRET-Effizienzen mit ähnlicher Kinetik (Abbildung 4.1), was darauf hindeutet, dass beide Stimulationen die Rezeptoren in ihre aktive Rezeptorkonformation überführen, die β -Arrestin binden kann. Der inverse Agonist Losartan verhinderte in beiden Fällen die β -Arrestin-Rekrutierung, indem er das thermodynamische Gleichgewicht in Richtung des inaktiven Rezeptorzustands verschob. Das bedeutet, dass sowohl bei Agonisten als auch bei Membrandehnungen aktive Rezeptorkonformationen angenommen werden, die zu einer ähnlichen, konsekutiven Rezeptordesensibilisierung durch β -Arrestin-Rekrutierung führen.

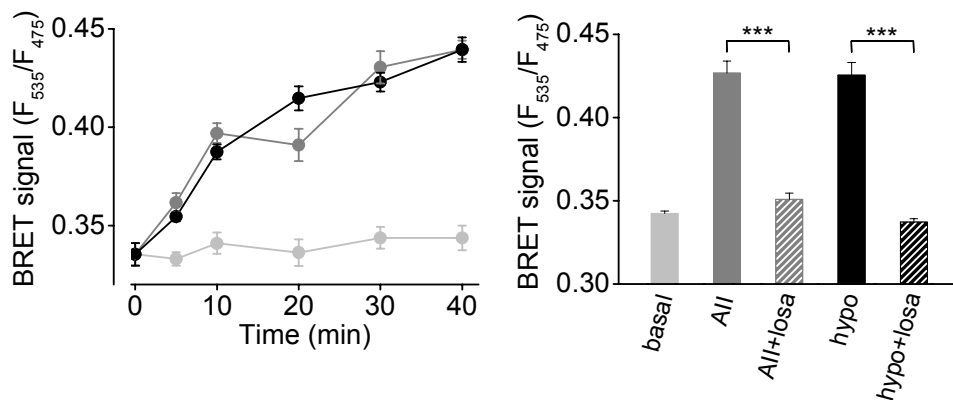


Abbildung 4.1: Membrandehnung führt zur β -Arrestin-Rekrutierung. Messungen der BRET-Signale von hAT₁R-Veuns und luc- β -Arrestin koexprimierenden COS-7-Zellen. Die linke Abbildung zeigt Biolumineszenz-Zeitverläufe während der Applikation von 100 nM Angiotensin II (grau), von hypoosmolarer Lösung mit 273 mOsm kg⁻¹ (schwarz) und von isomolarer Lösung mit 300 mOsm kg⁻¹ (hellgrau). Rechts sind die BRET-Signale nach 30 Minuten mit isomolarer Lösung (basal), mit Angiotensin II (All), mit hypoosmolarer Lösung (hypo) und in Anwesenheit von 1 μ M Losartan (+losa) dargestellt (Mederos & Storch et al., 2008, unter Revision).

4.10.2 Myogener Gefäßtonus

Um einen direkten Beweis für die physiologische Relevanz der Mechanosensitivität von vasokonstriktorisches Rezeptoren zu erhalten, wurde der myogene Gefäßtonus in isolierten Gehirnarterien von Ratten untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass der inverse AT₁R Agonist Losartan die myogene Vasokonstriktion reversibel und wiederholbar verringern konnte.

Um die Frage zu klären, ob es sich bei der druckinduzierten AT₁R-Aktivierung um eine agonistenunabhängige Aktivierung handelt oder ob endogen produziertes Angiotensin II dafür verantwortlich ist, wurde der „angiotensin converting enzyme“ (ACE)-Hemmer Captopril in maximaler Hemmkonzentration eingesetzt. Die Angiotensin II-Bildung in Ratten wird im Gegensatz zu Menschen und anderen Spezies nur durch ACE im Gefäßendothel vermittelt (Jin et al., 2000; Miyazaki und Takai, 2001). In den meisten Spezies wird Angiotensin II auch durch andere Enzyme gebildet. Zum einen kann die Chymase in Mastzellen Angiotensin II bilden, das dann vesikulär gespeichert vorliegt und zum Beispiel bei einer verletzten Gefäßwand durch Degranulation freigesetzt wird. Zum anderen kann die Cathepsin G-Protease in neutrophilen Granulozyten Angiotensin II bilden (Klickstein et al., 1982). Auch die Protease Tonin, die in Astrozyten und Speicheldrüsen vorkommt, besitzt die Fähigkeit, Angiotensin II zu bilden (Araujo et al., 2002). Da die eingesetzten Gehirnarterien frei von Gehirngewebe und Blutplasma waren, spielen diese Proteasen kaum eine Rolle. Die ACE-Hemmung durch Captopril beeinflusste die experimentell beobachtete losartaninduzierte Gefäß-

dilatation nicht, d. h. eine mögliche auto- und parakrine Angiotensin II-Produktion in den untersuchten Gefäßabschnitten hatte hier keine Auswirkung auf die Regulation des myogenen Gefäßtonus.

Ein weiteres Argument gegen signifikant produziertes Angiotensin II stellt die Beobachtung dar, dass es während der langen Messzeit bis zu drei Stunden nie zu einer Abnahme der druckinduzierten Vasokonstriktion kam, die bei einem Verbrauch des vesikulär gespeicherten Angiotensin II zu erwarten wäre. Darüber hinaus konnte in den konditionierten Badlösungen, die die Gefäßabschnitte superfundierten, kein Angiotensin II über der Nachweisgrenze von 1 pg/ml (entspricht 300 fMol) nachgewiesen werden (Mederos & Storch et al., 2008, unter Revision).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die druckinduzierte, agonistenunabhängige Aktivierung von AT₁R in Gefäßmuskelzellen die myogene Vasokonstriktion vermittelt. Darüber hinaus muss bemerkt werden, dass etwa 50% der myogenen Vasokonstriktion AT₁R-vermittelt waren. Die restliche Vasokonstriktion könnte durch weitere vasokonstriktorisch wirkende, mechanosensitive G_{q/11}-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der glatten Gefäßmuskulatur, wie z.B. ET_AR und H₁R, hervorgerufen werden.

Ein möglicher Prozessablauf zur myogenen Gefäßkonstriktion über G_{q/11}-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Mechanosensoren ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Die Druck induzierte, agonistenunabhängige Rezeptoraktivierung stellt den ersten Schritt in der Signalkaskade dar. Diese Rezeptoraktivierung leitet eine G-Protein- und PLC-abhängige Signaltransduktionskaskade ein, die zu einer Aktivierung von TRPC-Kanälen führen kann. Diese Kanalaktivierungen verursachen eine Membrandepolarisation, wodurch spannungsgesteuerte Calciumkanäle geöffnet werden, die einen massiven Calciumeinstrom in die Zelle bewirken. Die erhöhte Konzentration an freien zytosolischen Calciumionen aktiviert verstärkt den Kontraktionsapparat der glatten Gefäßmuskelzellen, was in einer Gefäßkonstriktion endet.

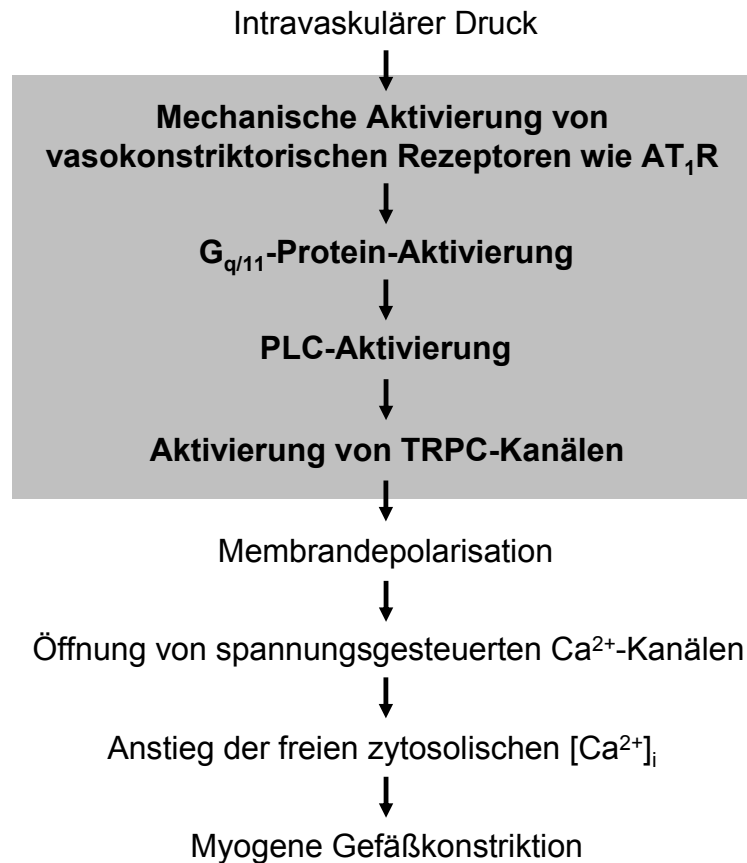


Abbildung 5.2: Potentieller Signalweg zur myogenen Gefäßkonstriktion. Vasokonstriktorisches G_{q/11}-Protein-gekoppelte Rezeptoren perzipieren den intravaskulären Druckanstieg und dienen somit als Mechanosensoren. Eine agonistenunabhängige, druckinduzierte Rezeptoraktivierung bewirkt eine G-Protein- und PLC-vermittelte Aktivierung von TRPC-Kanälen, wodurch eine Membrandepolarisation verursacht wird, die zur Öffnung von spannungsgesteuerten Calciumkanälen führt. Der massive Calciumeinstrom erhöht die freie zytosolische Calciumkonzentration und aktiviert somit die Kontraktionsmaschinerie der glatten Muskelzellen, was sich als Vasokonstriktion terminiert. Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Schritte sind in der Signalkaskade grau hinterlegt.

4.11 Rezeptordichte

Aufgrund der physiologischen Befunde an den Gehirnarterien, dem Nierenarteriensystem (Mederos & Storch et al., 2008, unter Revision), den aus Nieren kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen und der Aortenzelllinie A7r5 scheinen AT₁-Rezeptoren elementare Bestandteile des Vasokonstriktionsapparats im Gefäßsystem zu sein. Da die beobachtete mechanosensitive Wirkung des AT₁R von seiner Rezeptordichte abhängt (siehe Kapitel 3 Abschnitt 3.2.11), wurden an transfizierten A7r5-Zellen und an transfizierten HEK293-Zellen radioaktive Bindungsstudien durchgeführt, die verglichen wurden mit untransfizierten Zellen.

Die Bindungsstudien an A7r5-Zellen wiesen AT₁-Rezeptordichten von 88 fmol/mg bei nicht transfizierten A7r5-Zellen auf, die für die gewählte osmotisch bedingte

Membrandehnung unempfindlich waren. Hingegen besaß eine mechanosensitive AT₁R überexprimierende A7r5-Zelllinie eine 15fach höhere AT₁-Rezeptordichte von 1305 fmol/mg.

Um die Frage zu beantworten, welche genaue Rezeptordichte für eine Mechano-sensitivität erforderlich ist, wurde eine Korrelation zwischen Rezeptoraktivität und Rezeptordichte hergestellt, indem auf Einzelzellniveau die Rezeptoraktivierung mit Hilfe von Calciummessungen bestimmt wurde (siehe Kapitel 3 Abschnitt 3.2.11). Dazu wurden verschieden stark AT₁R-Venus exprimierende HEK293-Zellen verwendet, deren Fluoreszenz ein Maß für die Rezeptordichte darstellt. Bereits bei einer Rezeptordichte von 600 fmol/mg kam es zu membrandehnungsinduzierten Rezeptoraktivierungen und bei einer Rezeptordichte von 1900 fmol/mg wurden maximale Rezeptoraktivierungen erreicht. Das bedeutet zum einen, dass die verwendeten Expressionsvektormengen der Rezeptoren bei allen Untersuchungen nahezu Maximaleffekte verursachen und zum anderen, dass die kritische Rezeptordichte zwischen 88 und 600 fmol/mg liegen muss. Zudem wiesen die Vasopressinrezeptoren, die in beiden A7r5-Zelllinien nicht mechanosensitiv waren, Rezeptordichten von ca. 118 fmol/mg auf (Mederos & Storch et al. 2008, unter Revision). Da überexprimierte V₁-Rezeptoren in HEK293-Zellen jedoch mechanosensitiv wirkten, deutet das Ergebnis in A7r5-Zellen darauf hin, dass die kritische Rezeptordichte somit zwischen 118 und 600 fmol/mg liegen muss.

Bindungsstudien an frisch isolierten Gefäßen von Ratten bestätigten diese Eingrenzung der kritischen Rezeptordichte, denn myogene afferente Arteriolen besaßen eine AT₁-Rezeptordichte von ca. 200 fmol/mg (Ruan et al., 1997) und nicht myogene Aorten wiesen eine fast 40fach niedrigere Rezeptordichte von ca. 5 fmol/mg auf (Nickenig et al., 1998). Ebenfalls besaß die humane Aorta eine AT₁-Rezeptordichte von ca. 5 fmol/mg (Viswanathan et al., 2000), während die humane *A. cerebelli media* eine ca. 15fach erhöhte AT₁-Rezeptordichte aufwies (ca. 75 fmol/mg), was aber deutlich unter dem kritischen Grenzbereich liegt. Vermutlich sind die deutlich größeren, humanen *Aa. cerebelli mediae* nicht myogen und besitzen eher eine Leitungs- und Verteilungsfunktion im Blutgefäßsystem des Gehirns. Aber die eindeutig myogenen, glomerulären Arteriolen besaßen beim Menschen AT₁-Rezeptordichten von ca. 140 fmol/mg (Viswanathan et al., 2000), was genau in dem oben diskutierten Grenzbereich liegt. Zudem erwiesen sich kultivierte glatte Muskelzellen aus Nierenarteriolen als AT₁R-vermittelt mechanosensitiv (siehe Kapitel 3 Abschnitt 3.2.12), was darauf hindeutet, dass die endogene AT₁R-Expression hinreichend groß war und die funktionelle Bedeutung der Rezeptordichte untermauert.

Abgesehen von dem kritischen Einfluss der Rezeptordichte bei der Perzeption und Transduktion der Membrandehnung könnten die distalen Effektoren einen Einfluss auf

die Mechanotransduktion ausüben. Hierzu wurde die Expression des TRPC6-Kanals, der in der Mechanotransduktion möglicherweise eine Vermittlerrolle spielt, untersucht. Dazu wurde die Anzahl der endogenen TRPC6-Kanäle pro Zelle in A7r5-Zelllinien und der heterolog exprimierten TRPC6-Kanäle in transfizierten HEK293-Zellen bestimmt. Es stellte sich heraus, dass sich die Anzahl der TRPC6-Kanäle pro Zelle mit 360 bei A7r5- und mit 470 bei HEK293-Zellen nicht signifikant unterschied, was zeigt, dass sich endogene und exogene TRPC6-Kanalexpressionen in der gleichen Größenordnung befanden und dass es sich bei den beobachteten rezeptorvermittelten Effekten nicht um Artefakte durch massive Kanalüberexpressionen handelt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expressionsdichte von vasokonstriktorisches $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren vermutlich der entscheidende Faktor für die Mechanosensitivität der Gefäßmuskelzellen ist.

5 Zusammenfassung

Um die funktionelle Rolle der TRPC6-Kanäle in der glatten Gefäßmuskulatur zu analysieren, wurde eine TRPC6-gendefiziente Mauslinie herangezogen. Die Ausschaltung des TRPC6-Gens verursachte in isolierten Gehirnarterien eine erhöhte Sensitivität gegenüber intravaskulären Drücken, was sich in einer bei niedrigeren Drücken einsetzenden myogenen Gefäßkonstriktion äußerte. Auf Einzellzebene wiesen elektrophysiologische Ganzzelluntersuchungen an frisch isolierten glatten TRPC6^{-/-}-Muskelzellen aus Gehirnarterien signifikant höhere basale Ausgangstromdichten auf. Ebenso konnten erhöhte DAG-Analoga induzierte Stromdichten im Vergleich zu Wildtypzellen beobachtet werden. Darüber hinaus war das Membranpotential in TRPC6^{-/-}-Zellen deutlich stärker depolarisiert, was eine erhöhte Erregbarkeit widerspiegelt. Der erhöhte Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und die höheren Stromdichten einzelner Gefäßmuskulaturzellen von TRPC6^{-/-}-Mäusen konnten sich durch eine kompensatorische Genexpression von TRPC3 erklären lassen und bestätigten die distinktive Rolle der TRPC6-Kanalproteine in der Gefäßmuskulatur. Um die bisher unbekanntenen Mechanosensoren in der Signalkaskade der myogenen Gefäßkonstriktion zu identifizieren, wurden zunächst TRPC6-Kanäle hinsichtlich ihrer Mechanosensitivität untersucht. Osmotisch und Sog bedingte Membrandehnungen führten jedoch nicht zu instantanen TRPC6-Kanalaktivierungen, so dass der TRPC6 nicht als mechanosensitiver Kationkanal gelten kann. Stattdessen konnten G_{q/11}-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Mechanosensoren in glatten Gefäßmuskulaturzellen identifiziert werden. Diese Rezeptoren setzen die klassische Signaltransduktionskaskade in Gang, die zu einer PLC-abhängigen Aktivierung der DAG-sensitiven Kanalfamilie TRPC3, -6 und -7 führt. Diese Kanäle verursachen eine Membrandepolarisation und triggern damit die spannungsgesteuerten L-Typ Calciumkanäle (Ca_v). Die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der Ca_v-Kanäle bewirkt einen massiven Calciumeinstrom in die Zelle, wodurch die Kontraktionsmaschinerie der glatten Muskelzellen in Gang gesetzt wird und in einer myogenen Gefäßkonstriktion resultiert. Sowohl osmotisch bedingte, als auch Druck und Zug bedingte Membrandehnungen bewirkten agonistenunabhängige Rezeptoraktivierungen. Die ausgelöste Signalkaskade konnte auf den Ebenen der Phospholipasen C und der G-Proteine gehemmt werden. Darüber hinaus konnten selektive Antagonisten und inverse Agonisten die membrandehnungsinduzierten Effekte fast vollständig unterdrücken. Membrandehnungen verursachten aktive Rezeptorkonformationen, die in einer ähnlichen, konsekutiven Rezeptordesensibilisierung durch β -Arrestin-Rekrutierung endeten wie nach Agonistenstimulationen. Heterologe Überexpressionen von Angio-

tensin II AT₁-Rezeptoren (AT₁Rs) in der nicht mechanosensitiven A7r5-Rattenaortenzelllinie verursachten eine deutliche Mechanosensitivität dieser Zellen, was darauf hindeutet, dass die Rezeptordichte für die Mechanosensorik eine entscheidende Rolle spielt. Isolierte glatte Muskelzellen aus Nierenarteriolen, die einen ausgeprägten myogenen Gefäßtonus aufweisen, besaßen eine ausreichend hohe endogene AT₁-Rezeptordichte, denn osmotisch bedingte Membrandehnungen führten zu intrazellulären Calciumanstiegen, die durch den inversen Agonisten Losartan unterdrückbar waren. Ebenfalls konnte der myogene Gefäßtonus in isolierten Gehirnarterien von Ratten durch Losartan in Abwesenheit von endogen produziertem Angiotensin II deutlich vermindert werden. Abschließend lässt sich sagen, dass G_{q/11}-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Gefäßmuskulatur eine agonistenunabhängige Funktion als Mechanosensoren ausüben können.

Summary

To investigate the functional role of TRPC6 channels in vascular smooth muscle cells, TRPC6 gene-deficient (TRPC6^{-/-}) mice were used. In cerebral arteries disruption of the TRPC6 gene caused an enhanced responsiveness to intravascular pressure with the onset of myogenic vasoconstriction at lower pressures. Electrophysiological whole-cell measurements from freshly-isolated TRPC6^{-/-} cerebral arteries smooth muscle cells revealed an increase in basal current densities compared to wildtype. Furthermore, currents activated by DAG analogs were larger in TRPC6^{-/-} mice. In addition, the membrane potential of TRPC6^{-/-} smooth muscle cells was more depolarized, suggesting that voltage-gated calcium channels are more likely to be activated. The increases in vascular tone and in current densities in TRPC6^{-/-} mice might be due to the compensatory gene expression of TRPC3. The data on TRPC6^{-/-} mice provide evidence that TRPC6-channel proteins play a distinctive role in the control of vascular smooth muscle tone. Since the nature of the mechanosensors in the signalling cascade leading to myogenic vasoconstriction are still elusive, the mechanosensitivity of individual steps in the signalling cascade was examined. As a first step, the mechanosensitivity of TRPC6 was tested. Neither suction-induced nor osmotically-induced membrane stretch caused the rapid activation of TRPC6 which would be expected for a mechanosensitive channel. Instead, G_{q/11} protein-coupled receptors were identified as the mechanosensors in vascular smooth muscle cells. These receptors initiate the classical signalling cascade leading to a PLC-dependent activation of the DAG-sensitive TRPC3/6/7-channel family. Subsequent membrane depolarisation activates voltage-gated L-type calcium channels, which are the decisive

components for myogenic vasoconstriction. Osmotically-induced membrane stretch, as well as direct membrane stretch either by applying a positive pipette pressure or by vertically shifting the patch pipette, caused agonist-independent receptor activation. The following signalling cascade could be blocked at the levels of the G protein und the PLC. Furthermore, specific receptor antagonists and inverse agonists suppressed mechanically-induced receptor activation. Membrane stretch induced active receptor conformations like those that occur upon agonist stimulation which resulted in G protein coupling and receptor desensitisation by the recruitment of β -arrestin. Additional overexpression of Angiotensin II AT₁ receptors (AT₁R) in mechanically-unresponsive A7r5 cells from rat aorta conferred mechanosensitivity on the cells, indicating that this property depends on the receptor density. Isolated smooth muscle cells from myogenic renal arterioles had a high endogenous density of the AT₁R sufficient for receptor activation in response to osmotically-induced membrane stretch. Receptor activation was profoundly diminished by the inverse agonist losartan. Likewise, in rat cerebral arteries myogenic tone was strongly decreased by losartan in the absence of endogenously-produced Angiotensin II. These findings suggest that G_{q/11}-coupled receptors function agonist-independently as mechanosensors in vascular smooth muscle cells.

Literaturverzeichnis

Araujo, R. C., Lima, M. P., Lomez, E. S., Bader, M., Pesquero, J. B., Sumitani, M., and Pesquero, J. L. (2002). Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II. *Physiol Behav* 76, 327-333.

Bandyopadhyay, B. C., Swaim, W. D., Liu, X., Redman, R. S., Patterson, R. L., and Ambudkar, I. S. (2005). Apical localization of a functional TRPC3/TRPC6-Ca²⁺-signaling complex in polarized epithelial cells. Role in apical Ca²⁺ influx. *J Biol Chem* 280, 12908-12916.

Barr, M. M., DeModena, J., Braun, D., Nguyen, C. Q., Hall, D. H., and Sternberg, P. W. (2001). The *Caenorhabditis elegans* autosomal dominant polycystic kidney disease gene homologs *lov-1* and *pkd-2* act in the same pathway. *Curr Biol* 11, 1341-1346.

Barr, M. M., and Sternberg, P. W. (1999). A polycystic kidney-disease gene homologue required for male mating behaviour in *C. elegans*. *Nature* 401, 386-389.

Basora, N., Boulay, G., Bilodeau, L., Rousseau, E., and Payet, M. D. (2003). 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *J Biol Chem* 278, 31709-31716.

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

Beck, B., Zholos, A., Sydorenko, V., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Bordat, P., Prevarskaya, N., and Skryma, R. (2006). TRPC7 is a receptor-operated DAG-activated channel in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 126, 1982-1993.

Beech, D. J. (2005). Emerging functions of 10 types of TRP cationic channel in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32, 597-603.

Beech, D. J., Muraki, K., and Flemming, R. (2004). Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP. *J Physiol* 559, 685-706.

Ben-Chaim, Y., Chanda, B., Dascal, N., Bezanilla, F., Parnas, I., and Parnas, H. (2006). Movement of 'gating charge' is coupled to ligand binding in a G-protein-coupled receptor. *Nature* 444, 106-109.

Bergdahl, A., Gomez, M. F., Dreja, K., Xu, S. Z., Adner, M., Beech, D. J., Broman, J., Hellstrand, P., and Sward, K. (2003). Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca²⁺ entry dependent on TRPC1. *Circ Res* 93, 839-847.

Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *Journal of Physiology* 499, 291-306.

- Berridge, M. J., Dawson, R. M., Downes, C. P., Heslop, J. P., and Irvine, R. F. (1983). Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem J* 212, 473-482.
- Bessac, B. F., and Fleig, A. (2007). TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells. *J Physiol* 582, 1073-1086.
- Bevan, J. A., and Laher, I. (1991). Pressure and flow-dependent vascular tone. *Faseb J* 5, 2267-2273.
- Bezzierides, V. J., Ramsey, I. S., Kotecha, S., Greka, A., and Clapham, D. E. (2004). Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* 6, 702-720.
- Bockaert, J., and Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18, 1723-1729.
- Boulay, G., Zhu, X., Peyton, M., Jiang, M., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1997). Cloning and expression of a novel mammalian homologue of Drosophila transient receptor potential (TRP) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* 272, 29672-29680.
- Brueggemann, L. I., Markun, D. R., Henderson, K. K., Cribbs, L. L., and Byron, K. L. (2006). Pharmacological and Electrophysiological Characterization of Store-operated Currents and Capacitative Ca²⁺ Entry in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Pharmacol Exp Ther*.
- Bunemann, M., Frank, M., and Lohse, M. J. (2003). Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 16077-16082.
- Burstein, E. S., Spalding, T. A., and Brann, M. R. (1997). Pharmacology of muscarinic receptor subtypes constitutively activated by G proteins. *Mol Pharmacol* 51, 312-319.
- Cantor, R. S. (1997). The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry* 36, 2339-2344.
- Cantor, R. S. (1999). The influence of membrane lateral pressures on simple geometric models of protein conformational equilibria. *Chem Phys Lipids* 101, 45-56.
- Cayouette, S., Lussier, M. P., Mathieu, E. L., Bousquet, S. M., and Boulay, G. (2004). Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* 279, 7241-7246.
- Chachisvilis, M., Zhang, Y. L., and Frangos, J. A. (2006). G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15463-15468.
- Christensen, A. P., and Corey, D. P. (2007). TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci* 8, 510-521.
- Civelli, O. (2005). GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters. *Trends Pharmacol Sci* 26, 15-19.

- Civelli, O., Saito, Y., Wang, Z., Nothacker, H. P., and Reinscheid, R. K. (2006). Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacol Ther* 110, 525-532.
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524.
- Clapham, D. E., Julius, D., Montell, C., and Schultz, G. (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 57, 427-450.
- Clapham, D. E., Montell, C., Schultz, G., and Julius, D. (2003). International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 55, 591-596.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., and Strubing, C. (2001a). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2, 387-396.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., and Strübing, C. (2001b). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2, 387-396.
- Colbert, H. A., Smith, T. L., and Bargmann, C. I. (1997). OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 17, 8259-8269.
- Cosens, D. J., and Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224, 285-287.
- Dai, J., Sheetz, M. P., Wan, X., and Morris, C. E. (1998). Membrane tension in swelling and shrinking molluscan neurons. *J Neurosci* 18, 6681-6692.
- Dai, J., Ting-Beall, H. P., and Sheetz, M. P. (1997). The secretion-coupled endocytosis correlates with membrane tension changes in RBL 2H3 cells. *J Gen Physiol* 110, 1-10.
- Davenport, A. P. (2002). International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54, 219-226.
- Davis, M. J., Donovitz, J. A., and Hood, J. D. (1992). Stretch-activated single-channel and whole cell currents in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 262, C1083-1088.
- Davis, M. J., and Hill, M. A. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 79, 387-423.
- Dietrich, A., Kalwa, H., Storch, U., Mederos, Y. S. M., Salanova, B., Pinkenburg, O., Dubrovskaja, G., Essin, K., Gollasch, M., Birnbaumer, L., and Gudermann, T. (2007). Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch* 455, 465-477.
- Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T., and Gudermann, T. (2003). N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem* 278, 47842-47852.

- Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Kalwa, H., Storch, U., and Gudermann, T. (2005a). Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371, 257-265.
- Dietrich, A., Mederos, Y. S. M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaja, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., *et al.* (2005b). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 25, 6980-6989.
- Driscoll, M., and Chalfie, M. (1991). The mec-4 gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* 349, 588-593.
- Drummond, H. A., Gebremedhin, D., and Harder, D. R. (2004). Degenerin/epithelial Na⁺ channel proteins: components of a vascular mechanosensor. *Hypertension* 44, 643-648.
- Earley, S., Waldron, B. J., and Brayden, J. E. (2004). Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ Res* 95, 922-929.
- Eberl, D. F., Hardy, R. W., and Kernan, M. J. (2000). Genetically similar transduction mechanisms for touch and hearing in *Drosophila*. *J Neurosci* 20, 5981-5988.
- Eguchi, S., Matsumoto, T., Motley, E. D., Utsunomiya, H., and Inagami, T. (1996). Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca²⁺/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *J Biol Chem* 271, 14169-14175.
- Endlich, N., Endlich, K., Taesch, N., and Helwig, J. J. (2000). Culture of vascular smooth muscle cells from small arteries of the rat kidney. *Kidney Int* 57, 2468-2475.
- Evans, E. A., Waugh, R., and Melnik, L. (1976). Elastic area compressibility modulus of red cell membrane. *Biophys J* 16, 585-595.
- Felsenfeld, D. P., Schwartzberg, P. L., Venegas, A., Tse, R., and Sheetz, M. P. (1999). Selective regulation of integrin--cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat Cell Biol* 1, 200-206.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179-185.
- Fleischmann, B. K., Murray, R. K., and Kotlikoff, M. I. (1994). Voltage window for sustained elevation of cytosolic calcium in smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11914-11918.
- Fleming, I., Bauersachs, J., and Busse, R. (1996). Paracrine functions of the coronary vascular endothelium. *Mol Cell Biochem* 157, 137-145.

- Flemming, P. K., Dedman, A. M., Xu, S. Z., Li, J., Zeng, F., Naylor, J., Benham, C. D., Bateson, A. N., Muraki, K., and Beech, D. J. (2006). Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *J Biol Chem* 281, 4977-4982.
- Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., *et al.* (2001). Lack of an endothelial store-operated Ca^{2+} current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* 3, 121-127.
- Freichel, M., Vennekens, R., Olausson, J., Stolz, S., Philipp, S. E., Weissgerber, P., and Flockerzi, V. (2005). Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *J Physiol* 567, 59-66.
- Gabella, G. (1983). Asymmetric distribution of dense bands in muscle cells of mammalian arterioles. *J Ultrastruct Res* 84, 24-33.
- Goel, M., Sinkins, W. G., and Schilling, W. P. (2002). Selective Association of TRPC Channel Subunits in Rat Brain Synaptosomes. *J Biol Chem* 277, 48303-48310.
- Gohla, A., Schultz, G., and Offermanns, S. (2000). Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res* 87, 221-227.
- Gong, Z., Son, W., Chung, Y. D., Kim, J., Shin, D. W., McClung, C. A., Lee, Y., Lee, H. W., Chang, D. J., Kaang, B. K., *et al.* (2004). Two interdependent TRPV channel subunits, inactive and Nanchung, mediate hearing in Drosophila. *J Neurosci* 24, 9059-9066.
- Greenwood, I. A., and Large, W. A. (1998). Properties of a Cl⁻ current activated by cell swelling in rabbit portal vein vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 275, H1524-1532.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450.
- Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M., and Dietrich, A. (2004). Receptor-operated cation entry--more than esoteric terminology? *Sci STKE* 2004, pe35.
- Guimaraes, S., and Moura, D. (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 53, 319-356.
- Gullingsrud, J., and Schulten, K. (2003). Gating of MscL studied by steered molecular dynamics. *Biophys J* 85, 2087-2099.
- Hamill, O. P. (1983). Potassium and chloride channels in red blood cells. In *Single Channel Recordings*, B. a. N. Sakmann, E, ed. (New York, Plenum Press), pp. 451-471.
- Hamill, O. P. (2006). Twenty odd years of stretch-sensitive channels. *Pflugers Arch* 453, 333-351.
- Hamm, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273, 669-672.

- Harteneck, C., Plant, T. D., and Schultz, G. (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci* 23, 159-166.
- Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., and Schaefer, M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* 118, 917-928.
- Hersch, E., Huang, J., Grider, J. R., and Murthy, K. S. (2004). Gq/G13 signaling by ET-1 in smooth muscle: MYPT1 phosphorylation via ETA and CPI-17 dephosphorylation via ETB. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1209-1218.
- Hill, C. E., Rummery, N., Hickey, H., and Sandow, S. L. (2002). Heterogeneity in the distribution of vascular gap junctions and connexins: implications for function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 620-625.
- Hofmann, T., Chubanov, V., Gudermann, T., and Montell, C. (2003). TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol* 13, 1153-1158.
- Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259-263.
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7461-7466.
- Hoth, M., and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-355.
- Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S., and Worley, P. F. (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 8, 1003-1010.
- Huang, M., and Chalfie, M. (1994). Gene interactions affecting mechanosensory transduction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 367, 467-470.
- Hughes, A. D. (1995). Calcium channels in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 32, 353-370.
- Hurst, R. S., Zhu, X., Boulay, G., Birnbaumer, L., and Stefani, E. (1998). Ionic currents underlying TRP3 mediated agonist-dependent Ca²⁺ influx in stably transfected HEK293 cells. *FEBS Lett* 422, 333-338.
- Inoue, R., Morita, H., and Ito, Y. (2004). Newly emerging Ca²⁺ entry channel molecules that regulate the vascular tone. *Expert Opin Ther Targets* 8, 321-334.
- Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y., and Mori, Y. (2001). The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular α_1 -adrenoceptor-activated Ca²⁺-permeable cation channel. *Circ Res* 88, 325-332.

- Irvine, R. F. (1992). Inositol phosphates and Ca^{2+} entry: toward a proliferation or a simplification? *Faseb J* 6, 3085-3091.
- Jackson, W. F. (2000). Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 35, 173-178.
- Jarajapu, Y. P., and Knot, H. J. (2002). Role of phospholipase C in development of myogenic tone in rat posterior cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2234-2238.
- Jin, D., Takai, S., Yamada, M., Sakaguchi, M., and Miyazaki, M. (2000). The functional ratio of chymase and angiotensin converting enzyme in angiotensin I-induced vascular contraction in monkeys, dogs and rats. *Jpn J Pharmacol* 84, 449-454.
- Johnson, P. C. (1989). The myogenic response in the microcirculation and its interaction with other control systems. *J Hypertens Suppl* 7, S33-39; discussion S40.
- Jung, S., Strotmann, R., Schultz, G., and Plant, T. D. (2002). TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C347-359.
- Kalapesi, F. B., Tan, J. C., and Coroneo, M. T. (2005). Stretch-activated channels: a mini-review. Are stretch-activated channels an ocular barometer? *Clin Experiment Ophthalmol* 33, 210-217.
- Kato, H., Osajima, A., Uezono, Y., Okazaki, M., Tsuda, Y., Tanaka, H., Oishi, Y., Izumi, F., and Nakashima, Y. (1999). Involvement of PDGF in pressure-induced mesangial cell proliferation through PKC and tyrosine kinase pathways. *Am J Physiol* 277, F105-112.
- Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L., and Muallem, S. (1998). Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated channels. *Nature* 396, 478-482.
- Klickstein, L. B., Kaempfer, C. E., and Wintroub, B. U. (1982). The granulocyte-angiotensin system. Angiotensin I-converting activity of cathepsin G. *J Biol Chem* 257, 15042-15046.
- Ko, K. S., and McCulloch, C. A. (2000). Partners in protection: interdependence of cytoskeleton and plasma membrane in adaptations to applied forces. *J Membr Biol* 174, 85-95.
- Kung, C. (2005). A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* 436, 647-654.
- Kunichika, N., Yu, Y., Remillard, C. V., Platoshyn, O., Zhang, S., and Yuan, J. X. (2004). Overexpression of TRPC1 enhances pulmonary vasoconstriction induced by capacitative Ca^{2+} entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L962-969.
- Kwan, K. Y., Allchorne, A. J., Vollrath, M. A., Christensen, A. P., Zhang, D. S., Woolf, C. J., and Corey, D. P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50, 277-289.

- Langton, P. D. (1993). Calcium channel currents recorded from isolated myocytes of rat basilar artery are stretch sensitive. *J Physiol* 471, 1-11.
- Lefkowitz, R. J., Cotecchia, S., Samama, P., and Costa, T. (1993). Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* 14, 303-307.
- Lehtonen, J. Y., and Kinnunen, P. K. (1995). Phospholipase A2 as a mechanosensor. *Biophys J* 68, 1888-1894.
- Lemonnier, L., Trebak, M., Lievreumont, J. P., Bird, G. S., and Putney, J. W., Jr. (2006). Protection of TRPC7 cation channels from calcium inhibition by closely associated SERCA pumps. *Faseb J* 20, 503-505.
- Leung, T., Manser, E., Tan, L., and Lim, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* 270, 29051-29054.
- Leurs, R., Smit, M. J., Alewijnse, A. E., and Timmerman, H. (1998). Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem Sci* 23, 418-422.
- Levick, J. (1998). *Physiologie des Herz-Kreislauf-Systems*, 1 edn (Heidelberg, Leipzig, Johann Ambrosius Barth Verlag).
- Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A., and Booth, I. R. (1999). Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *Embo J* 18, 1730-1737.
- Leypold, B. G., Yu, C. R., Leinders-Zufall, T., Kim, M. M., Zufall, F., and Axel, R. (2002). Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6376-6381.
- Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M., and Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103, 525-535.
- Lievremont, J. P., Bird, G. S., and Putney, J. W., Jr. (2004). Canonical transient receptor potential TRPC7 can function as both a receptor- and store-operated channel in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1709-1716.
- Liman, E. R., Corey, D. P., and Dulac, C. (1999). TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5791-5796.
- Lin, M. J., Leung, G. P., Zhang, W. M., Yang, X. R., Yip, K. P., Tse, C. M., and Sham, J. S. (2004). Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 95, 496-505.

- Liu, X., Cheng, K. T., Bandyopadhyay, B. C., Pani, B., Dietrich, A., Paria, B. C., Swaim, W. D., Beech, D., Yildirim, E., Singh, B. B., *et al.* (2007). Attenuation of store-operated Ca²⁺ current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(/) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17542-17547.
- Locht, C., and Antoine, R. (1995). A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie* 77, 333-340.
- Lopez, J. J., Salido, G. M., Pariente, J. A., and Rosado, J. A. (2006). Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *J Biol Chem* 281, 28254-28264.
- Lyford, G. L., Strege, P. R., Shepard, A., Ou, Y., Ermilov, L., Miller, S. M., Gibbons, S. J., Rae, J. L., Szurszewski, J. H., and Farrugia, G. (2002). α (1C) (Ca_v1.2) L-type calcium channel mediates mechanosensitive calcium regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C1001-1008.
- Ma, H. T., Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K., and Gill, D. L. (2000). Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science* 287, 1647-1651.
- Maguire, J. J., and Davenport, A. P. (2005). Regulation of vascular reactivity by established and emerging GPCRs. *Trends Pharmacol Sci* 26, 448-454.
- Majumdar, M., Seasholtz, T. M., Buckmaster, C., Toksoz, D., and Brown, J. H. (1999). A rho exchange factor mediates thrombin and Galpha(12)-induced cytoskeletal responses. *J Biol Chem* 274, 26815-26821.
- Makino, A., Prossnitz, E. R., Bunemann, M., Wang, J. M., Yao, W., and Schmid-Schonbein, G. W. (2006). G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C1633-1639.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T. G., Kurosky, A., Martinac, B., and Hamill, O. P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 7, 179-185.
- Martinac, B. (2004). Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *J Cell Sci* 117, 2449-2460.
- Martinac, B., Adler, J., and Kung, C. (1990). Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. *Nature* 348, 261-263.
- Martinac, B., and Kloda, A. (2003). Evolutionary origins of mechanosensitive ion channels. *Prog Biophys Mol Biol* 82, 11-24.
- Martinez-Lemus, L. A., Crow, T., Davis, M. J., and Meininger, G. A. (2005). α v β 3- and α 5 β 1-integrin blockade inhibits myogenic constriction of skeletal muscle resistance arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H322-329.
- Maruyama, Y., Nakanishi, Y., Walsh, E. J., Wilson, D. P., Welsh, D. G., and Cole, W. C. (2006). Heteromultimeric TRPC6-TRPC7 channels contribute to arginine

vasopressin-induced cation current of A7r5 vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 98, 1520-1527.

Matsumoto, H., Baron, C. B., and Coburn, R. F. (1995). Smooth muscle stretch-activated phospholipase C activity. *Am J Physiol* 268, C458-465.

Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Gollasch, M., and Gudermann, T. (2008). G_q-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *Unter Revision*.

Miyazaki, M., and Takai, S. (2001). Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase. *Hypertens Res* 24, 189-193.

Moneer, Z., Pino, I., Taylor, E. J., Broad, L. M., Liu, Y., Tovey, S. C., Staali, L., and Taylor, C. W. (2005). Different phospholipase-C-coupled receptors differentially regulate capacitative and non-capacitative Ca²⁺ entry in A7r5 cells. *Biochem J* 389, 821-829.

Montell, C. (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2001, RE1.

Montell, C., Birnbaumer, L., and Flockerzi, V. (2002a). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108, 595-598.

Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R. J., Bruford, E. A., Caterina, M. J., Clapham, D. E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., *et al.* (2002b). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 9, 229-231.

Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J. W., Hofmann, F., and Klugbauer, N. (2003). Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J* 22, 6027-6034.

Muraki, K., Iwata, Y., Katanosaka, Y., Ito, T., Ohya, S., Shigekawa, M., and Imaizumi, Y. (2003). TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93, 829-838.

Narayanan, J., Imig, M., Roman, R. J., and Harder, D. R. (1994). Pressurization of isolated renal arteries increases inositol trisphosphate and diacylglycerol. *Am J Physiol* 266, H1840-1845.

Neher, E., and Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6712-6716.

Nickenig, G., Strehlow, K., Roeling, J., Zolk, O., Knorr, A., and Bohm, M. (1998). Salt induces vascular AT1 receptor overexpression in vitro and in vivo. *Hypertension* 31, 1272-1277.

Nilius, B. (2004). Store-operated Ca²⁺ entry channels: still elusive! *Sci STKE* 2004, pe36.

- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., and Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87, 165-217.
- Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Vennekens, R., Freichel, M., Wissenbach, U., and Flockerzi, V. (2003). Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 278, 30813-30820.
- Numata, T., Shimizu, T., and Okada, Y. (2007a). Direct mechano-stress sensitivity of TRPM7 channel. *Cell Physiol Biochem* 19, 1-8.
- Numata, T., Shimizu, T., and Okada, Y. (2007b). TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C460-467.
- Offermanns, S., Hu, Y. H., and Simon, M. I. (1996). Galph12 and galph13 are phosphorylated during platelet activation. *J Biol Chem* 271, 26044-26048.
- Offermanns, S., Laugwitz, K. L., Spicher, K., and Schultz, G. (1994). G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 504-508.
- Ohya, Y., Adachi, N., Nakamura, Y., Setoguchi, M., Abe, I., and Fujishima, M. (1998). Stretch-activated channels in arterial smooth muscle of genetic hypertensive rats. *Hypertension* 31, 254-258.
- Oishi, Y., Uezono, Y., Yanagihara, N., Izumi, F., Nakamura, T., and Suzuki, K. (1998). Transmural compression-induced proliferation and DNA synthesis through activation of a tyrosine kinase pathway in rat astrocytoma RCR-1 cells. *Brain Res* 781, 159-166.
- Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kurosaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., Imoto, K., and Mori, Y. (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. *J Biol Chem* 274, 27359-27370.
- Orr, A. W., Helmke, B. P., Blackman, B. R., and Schwartz, M. A. (2006). Mechanisms of mechanotransduction. *Dev Cell* 10, 11-20.
- Osol, G., Laher, I., and Kelley, M. (1993). Myogenic tone is coupled to phospholipase C and G protein activation in small cerebral arteries. *Am J Physiol* 265, H415-420.
- Patterson, R. L., van Rossum, D. B., and Gill, D. L. (1999). Store-operated Ca²⁺ entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 98, 487-499.
- Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Nikolaidis, N., Gill, D. L., and Snyder, S. H. (2005). Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem Sci* 30, 688-697.
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 38, 233-252.

- Perozo, E., Cortes, D. M., Sompornpisut, P., Kloda, A., and Martinac, B. (2002). Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. *Nature* 418, 942-948.
- Petitcolin, M. A., Spitzbarth-Regrigny, E., Bueb, J. L., Capdeville-Atkinson, C., and Tschirhart, E. (2001). Role of G(i)-proteins in norepinephrine-mediated vasoconstriction in rat tail artery smooth muscle. *Biochem Pharmacol* 61, 1169-1175.
- Petkov, G. V., Fusi, F., Saponara, S., Gagov, H. S., Sgaragli, G. P., and Boev, K. K. (2001). Characterization of voltage-gated calcium currents in freshly isolated smooth muscle cells from rat tail main artery. *Acta Physiol Scand* 173, 257-265.
- Putney, J. W., Jr. (1977). Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland. *J Physiol* 268, 139-149.
- Putney, J. W., Jr. (2004). The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels. *Trends Cell Biol* 14, 282-286.
- Putney, J. W., and McKay, R. R. (1999). Capacitative calcium entry channels. *BioEssays* 21, 31-46.
- Reading, S. A., Earley, S., Waldron, B. J., Welsh, D. G., and Brayden, J. E. (2005). TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H2055-2061.
- Rohacs, T., Lopes, C. M., Michailidis, I., and Logothetis, D. E. (2005). PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8, 626-634.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., *et al.* (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 169, 435-445.
- Ruan, X., Wagner, C., Chatziantoniou, C., Kurtz, A., and Arendshorst, W. J. (1997). Regulation of angiotensin II receptor AT1 subtypes in renal afferent arterioles during chronic changes in sodium diet. *J Clin Invest* 99, 1072-1081.
- Sackin, H. (1995). Mechanosensitive channels. *Annu Rev Physiol* 57, 333-353.
- Sackmann, E., Trauble, H., Galla, H. J., and Overath, P. (1973). Lateral diffusion, protein mobility, and phase transitions in *Escherichia coli* membranes. A spin label study. *Biochemistry* 12, 5360-5369.
- Sadoshima, J., Jahn, L., Takahashi, T., Kulik, T. J., and Izumo, S. (1992). Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 267, 10551-10560.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B. J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M. P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015-1026.

- Schaefer, M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflugers Arch* 451, 35-42.
- Schaefer, M., Plant, T. D., Obukhov, A. G., Hofmann, T., Gudermann, T., and Schultz, G. (2000). Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* 275, 17517-17526.
- Setoguchi, M., Ohya, Y., Abe, I., and Fujishima, M. (1997). Stretch-activated whole-cell currents in smooth muscle cells from mesenteric resistance artery of guinea-pig. *J Physiol* 501 (Pt 2), 343-353.
- Sheetz, M. P., and Dai, J. (1996). Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. *Trends Cell Biol* 6, 85-89.
- Shi, J., Mori, E., Mori, Y., Mori, M., Li, J., Ito, Y., and Inoue, R. (2004). Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol* 561, 415-432.
- Small, J. V. (1985). Geometry of actin-membrane attachments in the smooth muscle cell: the localisations of vinculin and alpha-actinin. *Embo J* 4, 45-49.
- Smani, T., Zakharov, S. I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E. S., and Bolotina, V. M. (2004). A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* 6, 113-120.
- Soboloff, J., Spassova, M., Xu, W., He, L. P., Cuesta, N., and Gill, D. L. (2005). Role of endogenous TRPC6 channels in Ca²⁺ signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 280, 39786-39794.
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W., and Gill, D. L. (2006). Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 281, 20661-20665.
- Spassova, M. A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., and Gill, D. L. (2006a). A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16586-16591.
- Spassova, M. A., Soboloff, J., He, L. P., Xu, W., Dziadek, M. A., and Gill, D. L. (2006b). STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4040-4045.
- Spitzbarth-Regrigny, E., Petitcolin, M. A., Bueb, J. L., Tschirhart, E. J., Atkinson, J., and Capdeville-Atkinson, C. (2000). Pertussis toxin-sensitive G(i)-proteins and intracellular calcium sensitivity of vasoconstriction in the intact rat tail artery. *Br J Pharmacol* 131, 1337-1344.
- Stoeckenius, W., and Engelman, D. M. (1969). Current models for the structure of biological membranes. *J Cell Biol* 42, 613-646.

- Stowers, L., Holy, T. E., Meister, M., Dulac, C., and Koentges, G. (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295, 1493-1500.
- Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G., and Plant, T. D. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* 2, 695-702.
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29, 645-655.
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2003). Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* 278, 39014-39019.
- Sutter, J. U., Homann, U., and Thiel, G. (2000). Ca²⁺-stimulated exocytosis in maize coleoptile cells. *Plant Cell* 12, 1127-1136.
- Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K., and Imai, M. (2003). Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* 278, 22664-22668.
- Svoboda, K., and Block, S. M. (1994). Biological applications of optical forces. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23, 247-285.
- Sweeney, M., Yu, Y., Platoshyn, O., Zhang, S., McDaniel, S. S., and Yuan, J. X. (2002). Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca²⁺ entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L144-155.
- Mederos y Schnitzler, M., Storch, U., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Gollasch, M., and Gudermann, T. (2008). G_q-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *Unter Revision*.
- Tanaka, Y., Hata, S., Ishiro, H., Ishii, K., and Nakayama, K. (1994). Stretching releases Ca²⁺ from intracellular storage sites in canine cerebral arteries. *Can J Physiol Pharmacol* 72, 19-24.
- Tang, J., Lin, Y., Zhang, Z., Tikunova, S., Birnbaumer, L., and Zhu, M. X. (2001). Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem* 276, 21303-21310.
- Thorneloe, K. S., and Nelson, M. T. (2005). Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol* 83, 215-242.
- Tobin, D., Madsen, D., Kahn-Kirby, A., Peckol, E., Moulder, G., Barstead, R., Maricq, A., and Bargmann, C. (2002). Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in *C. elegans* neurons. *Neuron* 35, 307-318.
- Tracey, W. D., Jr., Wilson, R. I., Laurent, G., and Benzer, S. (2003). *painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell* 113, 261-273.

- Trebak, M., Bird, G. S., McKay, R. R., and Putney, J. W., Jr. (2002). Comparison of human TRPC3 channels in receptor-activated and store-operated modes. Differential sensitivity to channel blockers suggests fundamental differences in channel composition. *J Biol Chem* 277, 21617-21623.
- Trebak, M., St, J. B. G., McKay, R. R., Birnbaumer, L., and Putney, J. W., Jr. (2003). Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels. *J Biol Chem* 278, 16244-16252.
- Triggle, C. R., Hollenberg, M., Anderson, T. J., Ding, H., Jiang, Y., Ceroni, L., Wiehler, W. B., Ng, E. S., Ellis, A., Andrews, K., *et al.* (2003). The endothelium in health and disease--a target for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res* 39, 249-267.
- VanBavel, E., Wesselman, J. P., and Spaan, J. A. (1998). Myogenic activation and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Circ Res* 82, 210-220.
- Vandenburgh, H., and Kaufman, S. (1979). In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science* 203, 265-268.
- Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., Brown, A., Rodriguez, S. S., Weller, J. R., Wright, A. C., *et al.* (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4903-4908.
- Vazquez, G., Bird, G. S., Mori, Y., and Putney, J. W., Jr. (2006). Native TRPC7 channel activation by an inositol trisphosphate receptor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281, 25250-25258.
- Venkatachalam, K., Ma, H. T., Ford, D. L., and Gill, D. L. (2001). Expression of functional receptor-coupled TRPC3 channels in DT40 triple receptor InsP3 knockout cells. *J Biol Chem* 276, 33980-33985.
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76, 387-417.
- Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A., *et al.* (2006). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* 16, 2073-2079.
- Vilaro, M. T., Palacios, J. M., and Mengod, G. (1990). Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neurosci Lett* 114, 154-159.
- Viswanathan, M., Selby, D. M., and Ray, P. E. (2000). Expression of renal and vascular angiotensin II receptor subtypes in children. *Pediatr Nephrol* 14, 1030-1036.
- Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Droogmans, G., Voets, T., and Nilius, B. (2004). Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 396-401.

- Waitkus-Edwards, K. R., Martinez-Lemus, L. A., Wu, X., Trzeciakowski, J. P., Davis, M. J., Davis, G. E., and Meininger, G. A. (2002). $\alpha(4)\beta(1)$ Integrin activation of L-type calcium channels in vascular smooth muscle causes arteriole vasoconstriction. *Circ Res* 90, 473-480.
- Walker, R. G., Willingham, A. T., and Zuker, C. S. (2000). A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science* 287, 2229-2234.
- Wang, X., Pluznick, J. L., Wei, P., Padanilam, B. J., and Sansom, S. C. (2004). TRPC4 forms store-operated Ca^{2+} channels in mouse mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C357-364.
- Wang, Y., Botvinick, E. L., Zhao, Y., Berns, M. W., Usami, S., Tsien, R. Y., and Chien, S. (2005). Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* 434, 1040-1045.
- Watanabe, J., Karibe, A., Horiguchi, S., Keitoku, M., Satoh, S., Takishima, T., and Shirato, K. (1993). Modification of myogenic intrinsic tone and $[Ca^{2+}]_i$ of rat isolated arterioles by ryanodine and cyclopiazonic acid. *Circ Res* 73, 465-472.
- Weissmann, N., Dietrich, A., Fuchs, B., Kalwa, H., Ay, M., Dumitrascu, R., Olschewski, A., Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Ghofrani, H. A., *et al.* (2006). Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19093-19098.
- Welsh, D. G., Morielli, A. D., Nelson, M. T., and Brayden, J. E. (2002). Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* 90, 248-250.
- Welsh, D. G., Nelson, M. T., Eckman, D. M., and Brayden, J. E. (2000). Swelling-activated cation channels mediate depolarization of rat cerebrovascular smooth muscle by hyposmolarity and intravascular pressure. *J Physiol* 527 Pt 1, 139-148.
- Wes, P. D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., and Montell, C. (1995). TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *PNAS* 92, 9652-9656.
- Wess, J. (2004). Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 423-450.
- Wesselman, J. P., VanBavel, E., Pfaffendorf, M., and Spaan, J. A. (1996). Voltage-operated calcium channels are essential for the myogenic responsiveness of cannulated rat mesenteric small arteries. *J Vasc Res* 33, 32-41.
- Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85, 1159-1204.
- Wijetunge, S., and Hughes, A. D. (2007). Src family tyrosine kinases mediate contraction of rat isolated tail arteries in response to a hyposmotic stimulus. *J Hypertens* 25, 1871-1878.

- Wolfe, J., and Steponkus, P. L. (1981). The stress-strain relation of the plasma membrane of isolated plant protoplasts. *Biochim Biophys Acta* 643, 663-668.
- Wolfe, J., and Steponkus, P. L. (1983). Mechanical properties of the plasma membrane of isolated plant protoplasts. *Plant Physiol* 71, 276-285.
- Wu, X., and Davis, M. J. (2001). Characterization of stretch-activated cation current in coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1751-1761.
- Xu, S. Z., and Beech, D. J. (2001). TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca(2+) channels in native vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 88, 84-87.
- Xu, S. Z., Boulay, G., Flemming, R., and Beech, D. J. (2006a). E3-targeted anti-TRPC5 antibody inhibits store-operated calcium entry in freshly isolated pial arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H2653-2659.
- Xu, S. Z., Muraki, K., Zeng, F., Li, J., Sukumar, P., Shah, S., Dedman, A. M., Flemming, P. K., McHugh, D., Naylor, J., *et al.* (2006b). A sphingosine-1-phosphate-activated calcium channel controlling vascular smooth muscle cell motility. *Circ Res* 98, 1381-1389.
- Xu, X. Z., Chien, F., Butler, A., Salkoff, L., and Montell, C. (2000). TRPgamma, a drosophila TRP-related subunit, forms a regulated cation channel with TRPL. *Neuron* 26, 647-657.
- Yamazaki, J., Duan, D., Janiak, R., Kuenzli, K., Horowitz, B., and Hume, J. R. (1998). Functional and molecular expression of volume-regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells. *J Physiol* 507 (Pt 3), 729-736.
- Yamazaki, J., and Kitamura, K. (2003). Intercellular electrical coupling in vascular cells present in rat intact cerebral arterioles. *J Vasc Res* 40, 11-27.
- Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., Hiroi, Y., Mizuno, T., Maemura, K., Kurihara, H., Aikawa, R., *et al.* (1996). Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271, 3221-3228.
- Yao, Y., Ferrer-Montiel, A. V., Montal, M., and Tsien, R. Y. (1999). Activation of store-operated Ca²⁺ current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* 98, 475-485.
- Yip, H., Chan, W. Y., Leung, P. C., Kwan, H. Y., Liu, C., Huang, Y., Michel, V., Yew, D. T., and Yao, X. (2004). Expression of TRPC homologs in endothelial cells and smooth muscle layers of human arteries. *Histochem Cell Biol* 122, 553-561.
- Yu, S. M., Tsai, S. Y., Guh, J. H., Ko, F. N., Teng, C. M., and Ou, J. T. (1996). Mechanism of catecholamine-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 94, 547-554.
- Yu, Y., Fantozzi, I., Remillard, C. V., Landsberg, J. W., Kunichika, N., Platoshyn, O., Tigno, D. D., Thistlethwaite, P. A., Rubin, L. J., and Yuan, J. X. (2004). Enhanced

expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13861-13866.

Yu, Y., Sweeney, M., Zhang, S., Platoshyn, O., Landsberg, J., Rothman, A., and Yuan, J. X. (2003). PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C316-330.

Zeng, F., Xu, S. Z., Jackson, P. K., McHugh, D., Kumar, B., Fountain, S. J., and Beech, D. J. (2004). Human TRPC5 channel activated by a multiplicity of signals in a single cell. *J Physiol* 559, 739-750.

Zhang, L., and Saffen, D. (2001). Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. *J Biol Chem* 276, 13331-13339.

Zhang, S., Remillard, C. V., Fantozzi, I., and Yuan, J. X. (2004). ATP-induced mitogenesis is mediated by cyclic AMP response element-binding protein-enhanced TRPC4 expression and activity in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1192-1201.

Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A., and Cahalan, M. D. (2005). STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* 437, 902-905.

Zhang, Z., Tang, J., Tikunova, S., Johnson, J. D., Chen, Z., Qin, N., Dietrich, A., Stefani, E., Birnbaumer, L., and Zhu, M. X. (2001). Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3168-3173.

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

Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1996). trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* 85, 661-671.

Zitt, C., Obukhov, A. G., Strübing, C., Zobel, A., Kalkbrenner, F., Lückhoff, A., and Schultz, G. (1997). Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *Journal of Cell Biology* 138, 1333-1341.

Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., *et al.* (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol* 6, 499-506.

Eigene Publikationen

Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Kalwa, H., **Storch, U.**, and Gudermann, T. (2005). Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371, 257-265.

Dietrich, A., Mederos, Y. S. M., Gollasch, M., Gross, V., **Storch, U.**, Dubrovskaja, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., *et al.* (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 25, 6980-6989.

Weissmann, N., Dietrich, A., Fuchs, B., Kalwa, H., Ay, M., Dumitrascu, R., Olschewski, A., **Storch, U.**, Mederos y Schnitzler, M., Ghofrani, H. A., *et al.* (2006). Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19093-19098.

Dietrich, A., Kalwa, H., **Storch, U.**, Mederos, Y. S. M., Salanova, B., Pinkenburg, O., Dubrovskaja, G., Essin, K., Gollasch, M., Birnbaumer, L., and Gudermann, T. (2007). Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch* 455, 465-477.

Mederos y Schnitzler, M.*, **Storch, U.***, Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Gollasch, M., and Gudermann, T. (2008). G_q-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *Unter Revision*. *Beide Autoren teilen sich die Erstautorenschaft.

Kongressbeiträge

Mederos y Schnitzler, M., **Storch, U.**, Dietrich, A., and Gudermann, T. (2004). Increased currents in isolated smooth muscle cells of TRPC6-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369, Supplement 1, 247. Postervortrag in Mainz bei der 45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT).

Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., **Storch, U.**, Lauterbach, B., Essin, K., Obst, M., Gross, V., Gollasch, M., Birnbaumer, L., and Gudermann, T. (2004). TRPC6 deficient mice develop an elevated blood-pressure and an early onset of the myogenic tone in cerebral arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369, Supplement 1, 242. Vortrag in Mainz bei der 45. Frühjahrstagung der DGPT.

Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Gollasch, M., and Gudermann, T. (2006). The role of G-protein-coupled receptors for TRPC-channel dependent myogenic tone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372, Supplement 1, 206. Vortrag in Mainz bei der 47. Frühjahrstagung der DGPT.

Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Meibers, S., Breit, A., Gollasch, M., and Gudermann, T. (2006). The role of G_q-coupled receptors for TRPC channel-dependent myogenic tone. *Acta Physiologica* 186, Supplement 1, 175. Postervortrag in München bei der 85. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG).

Kalwa, H., **Storch, U.**, Schmidt, M., Hildebrandt, F., Gudermann, T., and Dietrich, A. (2007). A role for PLC ϵ in the regulation of TRPC6 mediated cation influx in glomerular podocytes? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375, Supplement 1, 184. Postervortrag in Mainz bei der 48. Frühjahrstagung der DGPT.

Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Meibers, S., Nurwakagari, P., Breit, A., Gollasch, M., and Gudermann, T. (2007). The role of G-Protein coupled receptors in the mechanosensitivity of vascular smooth muscle. Vortrag in Rostock beim Joint workshop Research Network Rostock-Aarhus.

Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Meibers, S., Essin, K., Breit, A., Gollasch, M., and Gudermann, T. (2008). The role of mechanosensitive G-protein-coupled receptors in vascular smooth muscle. Postervortrag in Mainz bei der Frühjahrstagung der DGPT.

Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Meibers, S., Breit, A., Gollasch, M., and Gudermann, T. (2008). G_q-coupled receptors act as the mechanosensors in myogenic vasoconstriction. Postervortrag in Köln beim 87th Annual Meeting der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG).

Mederos y Schnitzler, M., **Storch, U.**, Meibers, S., Essin, K., Breit, A., Gollasch, M., and Gudermann, T. (2008). G_q-coupled vasopressor receptors are essential mechanosensitive components for the myogenic vasoconstriction. Postervortrag in San Diego beim Experimental Biology Meeting 2008.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Die physiologische Rolle von TRPC6 und $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren in der glatten Gefäßmuskulatur“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 16. Januar 2008

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael Mederos y Schnitzler bedanken für seine intensive wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Josef Kriegelstein danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Tim Plant für seine Hilfsbereitschaft und die fruchtbaren Diskussionen.

Vor allem bedanke ich mich herzlich bei Eva Braun für ihre hervorragende technische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Elektrophysiologie Janine Wäring, Marcus Semptner und Frauke Kepura danke ich vor allem für das freundliche Miteinander im Labor.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn PD Dr. Alexander Dietrich für die Überlassung der gendefizienten Mäuse und bei Hermann Kalwa für die Unterstützung bei den Nierenpräparationen.

Ich danke allen Mitgliedern des Instituts, die mir geholfen haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und all meinen Freunden, die mich stets unterstützt haben und die mir immer hilfreich zur Seite standen.