

Klonierung und funktionelle Charakterisierung des  
„long transient receptor channel 2“, LTRPC2, einem Mitglied  
der Familie kalziumpermeabler TRP-Kationenkanäle

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen  
Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
**Diplom-Biologin**  
**Edith Maria Wehage**  
aus  
Lohne/Oldenburg

Berichter: Universitätsprofessor Dr. med. Andreas Lückhoff  
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Hermann Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2003

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Teile dieser Arbeit finden sich in folgenden Veröffentlichungen:

Wehage E.\*, Eisfeld J.\*, Heiner I., Jüngling E., Zitt C., Lückhoff A. (2002). Activation of the cation channel Long Transient Receptor Potential Channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* 277: 23150-23156

Heiner I., Eisfeld J., Halaszovich C., Wehage E., Jüngling E., Zitt C., Lückhoff A. (2003). Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through LTRPC2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem J.* (im Druck)

\* gleichberechtigt beteiligte Autoren

in memoriam  
babara rother-rau  
1963 - 2000

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	vii
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die zelluläre Kalziumhomöostase .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die “transient receptor potential” TRP-Familie kalziumpermeabler Kationenkanäle.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Identifizierung der <i>Drosophila melanogaster</i> TRP Proteine .....	3
1.2.2 Charakterisierung der <i>Drosophila melanogaster</i> TRP Proteine als mögliche Kandidaten für speicherabhängige, kalziumpermeable Kanäle .....	4
1.2.3 Identifizierung von Säugerproteinen mit Homologie zum <i>Drosophila</i> TRP Protein .....	5
1.2.4 Einteilung der Säuger-TRP-Proteine in drei Subfamilien.....	7
<b>1.3 Potentielle Aktivierungsmechanismen der speicherabhängigen TRP-Kanäle .....</b>	<b>12</b>
1.3.1.1 Der diffusible „Calcium influx factor“ „CIF“ .....	12
1.3.1.2 Protein-Protein-Interaktionen, das „secretion-like coupling model“ .....	14
1.3.1.3 Protein-Protein-Interaktion das „conformation coupling model“ .....	15
<b>1.4 Neutrophile Granulozyten als Modell zur Untersuchung der physiologischen Funktion von TRP-Kanälen .....</b>	<b>17</b>
1.4.1 Bedeutung neutrophiler Granulozyten für die Immunabwehr .....	17
1.4.2 Ca <sup>2+</sup> -Kanalblocker als Entzündungshemmer ?.....	19
1.4.3 TRP-Moleküle als mögliche Kandidaten des rezeptormediierten Ca <sup>2+</sup> -Influx in neutrophilen Granulozyten .....	20
<b>1.5 Ein potentieller Kandidat zur Untersuchung der physiologischen Relevanz von TRP-Kanälen, der LTRPC2.....</b>	<b>20</b>

<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolation von neutrophilen Granulozyten .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>27</b>
3.2.1	Isolation totaler RNA .....	27
3.2.2	mRNA-Isolation.....	27
3.2.3	Aufbereitung von mRNA.....	27
3.2.4	Oligonukleotide.....	28
3.2.4.1	Oligonukleotide zur Klonierung des 3‘Segments und des 5‘Segments des LTRPC2 .....	28
3.2.4.2	Oligonukleotide zum Nachweis der Spleißvarianten des LTRPC2 in neutrophilen Granulozyten und HL-60 Zellen.....	28
3.2.5	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	29
3.2.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	29
3.2.7	Native Agarose-Gelelektrophorese für DNA.....	30
3.2.8	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegele.....	30
3.2.9	Ethanol-fällung von DNA .....	30
3.2.10	Klonierung von PCR-Amplifikaten .....	31
3.2.11	Anhängen von Desoxyadenosinenden für die Klonierung von PCR-Amplifikaten.....	31
3.2.12	T4-DNA-Ligation.....	32
3.2.13	Vektoren.....	32
<b>3.3</b>	<b>Herstellung rekombinanter Klone.....</b>	<b>33</b>
3.3.1	Medien, Kulturplatten und Antibiotikastammlösungen für Bakterienkolonien... 33	33
3.3.2	Prokaryontische Zellen und deren Kultivierung .....	34
3.3.3	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock.....	34
3.3.4	Transformation durch Elektroporation.....	34
<b>3.4</b>	<b>Präparation und Analyse von Plasmid-DNA.....</b>	<b>35</b>
3.4.1	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräp) .....	35

3.4.2	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräp) .....	35
3.4.3	Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen .....	35
3.4.4	Enzymatischer Verdau von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen .....	35
3.4.5	Umpufferung .....	36
3.4.6	DNA-Sequenzierung .....	36
<b>3.5</b>	<b>Zellkultur und Transfektion .....</b>	<b>37</b>
3.5.1	Eukaryontische Zellen .....	37
3.5.2	Nährmedien .....	38
3.5.3	Transiente Transfektion .....	38
<b>3.6</b>	<b>Funktionale Untersuchungen .....</b>	<b>39</b>
3.6.1	Elektrophysiologische Messungen mit Hilfe der Patch-Clamp Technik .....	39
3.6.2	Messungen der intrazellulären freien Kalziumkonzentration mit dem Fluoreszenzfarbstoff fura2 .....	40
3.6.3	Datenauswertung und Computerprogramme .....	41
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Klonierung des LTRPC2 und seiner Spleißvarianten aus mRNA von HL-60 Zellen .....</b>	<b>42</b>
4.1.1	Klonierungsstrategie .....	42
4.1.2	Subklonierung in pBluescript SK (-) .....	43
4.1.3	Klonierung der Spleißvarianten .....	44
4.1.4	Nachweis der LTRPC2 Varianten in HL-60 Zellen und neutrophilen Granulozyten mittels RT-PCR .....	47
<b>4.2</b>	<b>Klonierung der LTRPC2 Varianten für funktionale Untersuchungen .....</b>	<b>49</b>
4.2.1	Klonierung der LTRPC2-Variante LTRPC2- $\Delta$ C .....	49
4.2.2	Klonierung der LTRPC2 Variante, LTRPC2- $\Delta$ N und Klonierung des LTRPC2 .....	52
4.2.2.1	Nomenklatur .....	53

<b>4.3</b>	<b>Funktionelle Untersuchungen des LTRPC2 und seiner Varianten.....</b>	<b>53</b>
4.3.1	Auswahl geeigneter Expressionssysteme.....	53
4.3.2	Fluorometrische Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration transfizierter CHO-Zellen nach Stimulation mit Thapsigargin.....	54
4.3.3	Fluorometrische Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ transfizierter HEK 293 Zellen nach Stimulation mit Charbachol .....	56
4.3.4	Elektrophysiologische Messungen transfizierter CHO- und HEK Zellen nach Stimulation des $IP_3$ -abhängigen Signaltransduktionsweges .....	61
4.3.5	Fluorometrische Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ LTRPC2- $\Delta N$ - $\Delta C$ transfizierter HEK 293 Zellen nach Stimulation mit hypo- und hyperosmotischen Badlösungen .....	62
4.3.6	Elektrophysiologische Messungen transfizierter HEK 293 Zellen nach Stimulation mit ADP-Ribose .....	65
4.3.7	Elektrophysiologische Messungen von transfizierten HEK 293 Zellen nach Stimulation mit $H_2O_2$ .....	69
4.3.8	Fluorometrische Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration von transfizierten HEK 293 Zellen nach Stimulation mit $H_2O_2$ .....	74
4.3.9	Stimulation von LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta C$ mit $H_2O_2$ unabhängig von $NAD^+$ und ADP-Ribose .....	77
4.3.10	Elektrophysiologische Messungen nach extrazellulärer Stimulation von transfizierten HEK 293 Zellen mit $H_2O_2$ und intrazellulärer Zugabe des Antioxidans Mannitol.....	80
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>82</b>
<b>5.1</b>	<b>Klonierung von LTRPC2 und seiner Spleißvarianten.....</b>	<b>82</b>
<b>5.2</b>	<b>Konstruktion der einzelnen Varianten des LTRPC2.....</b>	<b>83</b>
<b>5.3</b>	<b>Expressionsnachweis der einzelnen Varianten des LTRPC2.....</b>	<b>83</b>
<b>5.4</b>	<b>Überlegungen zur funktionellen Bedeutung der LTRPC2 Spleißvarianten.....</b>	<b>84</b>
5.4.1	Verkürzte Spleißvarianten von weiteren Mitgliedern der TRP-Familie mit regulatorischen Funktionen .....	84

5.4.2	Verkürzte Spleißvariante des TRP6 von <i>Rattus norvegicus</i> mit fehlenden Informationen zur Glykosylierung .....	85
5.4.3	Funktion der LTRPC2 Spleißvarianten möglicherweise als Untereinheiten eines heteromultimeren Kanals .....	86
<b>5.5</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung des LTRPC2 und seiner Spleißvarianten .....</b>	<b>87</b>
5.5.1	Stimulation der LTRPC2 Varianten über den PLC-abhängigen Signaltransduktionsweg .....	87
5.5.2	Stimulation des LTRPC2 durch hypo- oder hyperosmotische Badlösungen .....	89
5.5.3	Stimulation des LTRPC2 durch ADP-Ribose und NAD <sup>+</sup> .....	89
5.5.4	Stimulation des LTRPC2 und LTRPC-ΔC durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> als ein Modell für oxidativen Streß.....	93
5.5.5	Stimulation des LTRPC2 und LTRPC2-ΔC durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> unabhängig von NAD <sup>+</sup> und ADP-Ribose .....	94
5.5.6	Stimulation des LTRPC2 durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> über intrazelluläre oxidative Prozesse.....	95
5.5.7	Vergleiche zu Arbeiten anderer Gruppen zur Stimulation von LTRPC2 mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	96
<b>5.6</b>	<b>Überlegungen zu den funktionellen Eigenschaften der LTRPC2 Varianten im Vergleich zu den Eigenschaften anderer entfernt verwandter TRP-Proteine.....</b>	<b>97</b>
5.6.1	Entfernt verwandte TRP-Proteine mit bifunktionalen Eigenschaften.....	97
5.6.2	Aktivierung entfernt verwandter TRP-Proteine bei sensorischen Prozessen.....	98
<b>5.7</b>	<b>Überlegungen zur physiologischen Relevanz der LTRPC2 Varianten .....</b>	<b>100</b>
5.7.1	Mögliche Beteiligung der LTRPC2 Varianten bei der Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten .....	100
5.7.2	Bedeutung einer H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierten Stimulation der LTRPC2 Varianten für kalziumabhängige, degenerative Zellprozesse .....	102
<b>6</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>104</b>
<b>6.1</b>	<b>Funktionelle Bedeutung der bisher inaktiven Spleißvarianten .....</b>	<b>104</b>
<b>6.2</b>	<b>Überprüfung der Expression der inaktiven LTRPC2 Varianten.....</b>	<b>104</b>



<b>6.3</b>	<b>Überprüfung von Homo- und Heteromultimerisierungen der LTRPC2 Varianten .....</b>	<b>105</b>
<b>6.4</b>	<b>Überlegungen zum Regulationsmechanismus der LTRPC2 Varianten durch ADP-Ribose und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG: .....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>113</b>
	<b>ANHANG.....</b>	<b>137</b>

## Abkürzungsverzeichnis

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre freie Kalziumkonzentration
„CIF“	<i>Calcium influx factor</i>
ACD	Antikoagulant Citrat Dextrose
ARS	<i>arachidonic acid-responsive sequence</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	freies Kalzium
cADP-Ribose	zyklische Adenosindiphosphatribose
CCE	<i>capacitative calcium entry</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
C-Terminus	carboxyterminales Proteinende
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
db-cAMP	Dibutyryl- zyklisches Adenosinmonophosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion
EC <sub>50</sub>	Konzentration halbmaximaler Erregung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
ERK	<i>extracellular-signal-regulated-kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyant
F <sub>max</sub>	maximale Fluoreszenz
fMLP	<i>N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenyl-alanine</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoxid
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-(2-ethanesulphonic acid)
I <sub>CRAC</sub>	<i>calcium release activated calcium current</i>
IL-8	Interleukin-8
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IP <sub>3</sub> -R	Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor
I-V-Beziehung	Strom-Spannungs-Beziehung
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
LTRPC	<i>long transient receptor potential channel</i>

MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MutT	Mutator Gen
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid
NADasen	NAD <sup>+</sup> -Glykohydrolasen
NMDG	<i>N-methyl-D-glucamine</i>
NOS	<i>nitrogen oxidative species</i>
N-Terminus	aminoterminales Proteinende
OAG	1-oleoyl-2-acetal- <i>sn</i> -glycerol
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
OTRPC	<i>osmotic transient receptor potential channel</i>
pA	pico Ampere
PAF	<i>platelet-activating factor</i>
PC	<i>Personal Computer</i>
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pS	pico Siemens
R	Ratio
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
Sf9	Insektenzelllinie von <i>Spodoptera frugiperda</i>
SNAP 25	Synaptosom-assoziiertes Protein von 25 kilo Dalton
SOC	<i>store operated channel</i>
SP	<i>Scaffolding Protein</i>
SR	sakroplasmatisches Retikulum
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxyethyl)aminomethan
trp	<i>transient receptor potential</i>
TRPC	<i>transient receptor potential channel</i>
trpl	<i>transient receptor potential like</i>
TRPM	<i>transient receptor potential channel melastatin</i>
TRPV	<i>transient receptor potential channel vanilloid</i>
v/v	<i>volume/volume</i>
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
VR1	Vanilloid Rezeptor 1
VR-OAC	<i>vanilloid receptor-osmotic activ channel</i>
w/v	<i>weight/volume</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die zelluläre Kalziumhomöostase

Freies Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ist als sekundärer Botenstoff („*second messenger*“) ein bedeutender Faktor für elektrisch erregbare wie auch für elektrisch nicht erregbare Zellen, über den eine große Zahl an zellulären Signaltransduktionswegen gesteuert wird. Ein Anstieg der intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induziert und moduliert verschiedenste Ereignisse, angefangen z.B. bei der Fertilisation, Zellteilung, -migration und -differenzierung über Muskelkontraktion, Neurotransmitterfreisetzung, Genregulierungen, die aber auch den programmierten Zelltod beinhalten [1 - 6].

Ist die Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  jedoch zu hoch, oder ist die Dauer einer  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung zu lang, wirkt  $\text{Ca}^{2+}$  zytotoxisch. Daher muß das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal sowohl flexibel als auch genau geregelt sein. Ein Unterschied im  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal kann durch zeitliche und räumliche Dimensionen, sowie über die Amplitude der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erreicht werden. Viele Zellen nutzen eine Kombination aus diesen Parametern um ein präzises Signal zu erzielen [1, 7 - 9].

Ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wird über zwei Wege bewältigt, durch Depletion kompartimentierter, intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran. Während die Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, wie endoplasmatisches Retikulum (ER) oder sarkoplasmatisches Retikulum (SR), einen kurzzeitigen transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zur Folge hat, ist die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx von längerer Dauer und scheint für weitergehende Signalprozesse von größerer Bedeutung zu sein.

Eine Erniedrigung der freien  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und damit eine zeitliche Begrenzung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals wird anhand unterschiedliche Mechanismen über diverse Proteine gesteuert.

Zum einen pumpen ( $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPasen des SR und des ER (SERCAs), die eine hohe Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen besitzen, diese ins jeweilige Lumen. Zum anderen wird  $\text{Ca}^{2+}$  über Plasmamembran ( $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPasen (PMCA) aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum transportiert. Mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter und -Kanäle sorgen für eine Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins Innere des Organells. Durch direkte Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Metabolite, sowie an zytoplasmatische und intraorganelle Proteine wie Calsequestrin oder Calreticulin wird ebenfalls eine Verringerung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erreicht [5, 7, 10, 11].

In elektrisch erregbaren Zellen wie Neuronen, Muskelzellen und einigen Endokrinzellen erfolgt ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran durch spannungsabhängige,  $\text{Ca}^{2+}$ -selektive Kanäle, die kurzzeitig durch eine, mit dem Aktionspotential einhergehende, Depolarisation aktiviert werden [12 - 14]. Dagegen war jedoch lange Zeit nichts über die Identität und die Eigenschaften derjenigen Kanäle bekannt, die einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in elektrisch nicht erregbaren Zellen wie z.B. Epithelien oder Blutzellen bewirken.

Eine Stimulation der meisten elektrisch nicht erregbaren Zellen nach Bindung von Wachstumsfaktoren oder Hormonen an einen heptahelikalen Rezeptor führt zu einer G-Protein gekoppelten Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die das membranäre Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Der diffusible „second messenger“  $\text{IP}_3$  bewirkt durch Bindung an spezifische  $\text{IP}_3$ -Rezeptorkanäle des ER eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem intrazellulären Speicher. DAG aktiviert die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteinkinase C (PKC), über die weitergehende Siganlkaskaden, anhand phosphorylierender Prozesse, induziert wird [15]. Der mit der Aktivierung des PLC-abhängigen Signalwegs, dem sog. „PI-response“, einhergehenden intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung folgt ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über die Plasmamembran. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx wird auch als „capacitative calcium entry“ (CCE) bezeichnet [16]. Als ein Mechanismus für die Aktivierung einiger membranärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle scheint dabei der Füllzustand der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher ausschlaggebend zu sein. Aufgrund dieser Speicherabhängigkeit werden diese Kanäle auch als „store operated channel“ (SOC) bezeichnet. Andere spannungsunabhängige,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanäle werden wiederum unabhängig von einer Speicherentleerung reguliert, die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt [5, 17 - 22].

Der auf einer Depletion der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher folgende, einwärts gerichtete Kationenstrom („calcium release activated calcium current“,  $I_{\text{CRAC}}$ ) konnte biophysikalisch das erste Mal von Hoth und Penner 1992 charakterisiert werden. Hoth und Penner beschreiben, daß nach intrazellulärer Speicherentleerung mit  $\text{IP}_3$  und durch Pufferung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator Ethylenglykol Tetra-Essigsäure (EGTA) (was langfristig durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Leckströme der ER Membran zur Depletion des Speichers führt) ein spannungsunabhängiger Kationeneinstrom zu beobachten ist. Dieser Strom zeichnet sich durch eine geringe Einzelleitfähigkeit von  $<10$  pS und durch hohe Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus, gefolgt von einer Permeabilität für Barium ( $\text{Ba}^{2+}$ ) (= Strontium ( $\text{Sr}^{2+}$ ))  $\gg$  Mangan

( $Mn^{2+}$ ). In einem divalent freien Puffer, steigt die Permeabilität für monovalente Ionen wie Natrium ( $Na^+$ ) und die Einzelleitfähigkeit auf 30 – 40 pS an. Das charakteristische Umkehrpotential des  $I_{CRAC}$  liegt im positiven Bereich von 40 mV. Der  $I_{CRAC}$  ist durch die divalenten Kationen Zink ( $Zn^{2+}$ ), Cadmium ( $Cd^{2+}$ ), Beryllium ( $Be^{2+}$ ), Cobalt ( $Co^{2+}$ ),  $Mn^{2+}$ , Nickel ( $Ni^{2+}$ ),  $Ba^{2+}$  und durch die trivalenten Kationen Lanthan ( $La^{3+}$ ) und Gadulium ( $Gd^{3+}$ ) blockierbar.  $Mn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  und  $Sr^{2+}$  blockieren den Kanal durch eine geringere Durchflußkinetik als  $Ca^{2+}$ . Die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  auf  $> 10$  nM führt ebenfalls zur Inhibierung des  $I_{CRAC}$  [7, 21, 23].

Zur molekularen Identität, sowie zu den genauen Aktivierungsmechanismen dieses hoch  $Ca^{2+}$ -selektiven Kanals konnten jedoch keine Angaben gemacht werden. Beides ist bis heute Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

## 1.2 Die “transient receptor potential” TRP-Familie kalziumpermeabler Kationenkanäle

### 1.2.1 Identifizierung der *Drosophila melanogaster* TRP Proteine

Ein möglicher Kandidat eines  $Ca^{2+}$ -Kanals, der für einen  $Ca^{2+}$ -Influx nach Aktivierung des PLC-abhängigen Signalweges verantwortlich sein könnte, wurde erstmals in einer Mutante von *Drosophila melanogaster* entdeckt. Photorezeptorzellen von Insekten wurden lange als Modellsystem für einen  $IP_3$ -abhängigen  $Ca^{2+}$ -Signalweg zitiert. Während der Lichttransduktion führt bei Insekten die Absorption eines Photons durch das Rezeptormolekül Rhodopsin zur Aktivierung eines G-Proteins der  $G_q$ -Familie. Die  $\alpha$ -Untereinheit dieses G-Proteins initiiert den PLC-abhängigen Signaltransduktionsweg, der eine transiente  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung durch Entleerung intrazellulärer,  $IP_3$ -sensitiver  $Ca^{2+}$ -Speicher bewirkt. Dieser intrazellulären Speicherdepletion folgt eine länger andauernde  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung, ausgelöst durch einen  $Ca^{2+}$ -Influx über die Plasmamembran und damit einhergehend eine Depolarisation der Rezeptormembran [24 - 27]. Im Elektretinogramm (ERG) einer *Drosophila* Mutante konnte nach Stimulation mit einem lang andauernden Lichtreiz nur ein transientes Rezeptorpotential (*transient receptor potential*; *trp*) gemessen werden, das auf die Depletion intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Speicher zurückgeführt werden konnte [28]. Der Locus des fehlenden Gens dieser Mutante, die nach ihrem Rezeptorpotential als *trp* benannt wurde,

konnte identifiziert und das Genprodukt unabhängig von zwei Arbeitsgruppen kloniert werden [29, 30]. Hydropathieblots dieses sog. TRP Proteins ließen auf ein Transmembranprotein schließen. Außerdem führten Sequenzähnlichkeiten des TRP Proteins zu spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen sowie zu weiteren Ionenkanälen zu der Vermutung, daß das *trp* Gen für einen membranären Kanal kodiert, der für das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal während der Lichtantwort des Insektenphotorezeptors von Bedeutung ist [31, 32].

Kurz darauf konnte in *Drosophila* ein zweites Protein und später ein drittes Protein identifiziert werden, die beide eine hohe Homologie zum TRP besitzen und als TRPL (für transient-receptor-like) und TRP $\gamma$  bezeichnet wurden [33, 34].

### **1.2.2 Charakterisierung der *Drosophila melanogaster* TRP Proteine als mögliche Kandidaten für speicherabhängige, kalziumpermeable Kanäle**

Die ersten experimentellen Befunde an *trp* und *trpl* transfizierten Zellen unterstützten die Hypothese, daß diese Proteine  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kationenkanäle darstellen, die bei dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx nach Aktivierung des PLC-Signaltransduktionsweg eine Rolle spielen. In Patch-Clamp Experimenten an *trp* heterolog transfizierten Zellen konnte, nach Depletion der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch selektive Blockierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mit dem onkogen Thapsigargin, ein vermehrter Kationeneinstrom mit einer höheren Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Na}^+$ -Ionen nachgewiesen werden [35]. Dagegen war in *trpl* transfizierten Zellen ein nicht selektiver, konstitutiver Strom zu messen, der unabhängig ist von einer Speicherentleerung mit Thapsigargin [35 - 37].

Inzwischen ist bekannt, daß bei Stimulation der TRP Proteine durch einen PLC-abhängigen Signalweg die Generierung von DAG, von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und/oder die Reduzierung der  $\text{PIP}_2$  eine Rolle spielen [24, 38].

Außerdem weisen experimentelle Untersuchungen darauf hin, daß möglicherweise die einzelnen TRP Proteine untereinander Heteromultimere ausbilden. Eine Proteininteraktion von TRPL mit TRP konnte nachgewiesen werden [39, 40]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die, bei Einzeltransfektion von einer Speicherentleerung unabhängigen, konstitutiv aktiven Kanäle TRPL und TRP $\gamma$ , bei einer Co-Transfektion durch einen PLC-abhängigen Stimulus aktiviert werden [34].

Lange Zeit wurde die Lichtantwort der Photorezeptoren von Kompaktaugen der Insekten als Beispiel für eine  $\text{IP}_3$ -abhängige Signalkaskade angesehen. Eine *Drosophila* Mutante, der der

einziges IP<sub>3</sub>-Rezeptor fehlt, dessen Lichtantwort jedoch unverändert ist, widersprechen diesem Signalmodell. In dieser Mutante kann über IP<sub>3</sub> keine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Speicherentleerung hervorgerufen werden, es kommt dennoch nach Aktivierung des PLC-Signaltransduktionsweg zu einer Depolarisation der Photorezeptormembran. Die neueren Ergebnisse, die zur Regulation der *Drosophila* TRPs gewonnen wurden, decken sich mit den Befunden zur IP<sub>3</sub>-Rezeptor Mutante, es kann durch die Aktivierung der TRP Proteine, unabhängig von einer IP<sub>3</sub>-gesteuerten Speicherentleerung, ein Kationeneinstrom in *Drosophila* Photorezeptoren bewerkstelligt werden. Zusammenfassend sind daher mittlerweile alternative Metabolite des PLC-abhängigen Signalwegs als Botenstoffe in Betracht zu ziehen, die während der Lichttransduktion von *Drosophila* eine Depolarisation der Rezeptormembran, durch Aktivierung der TRP Proteine, auslösen [25, 31, 38, 41 - 46].

### 1.2.3 Identifizierung von Säugerproteinen mit Homologie zum *Drosophila* TRP Protein

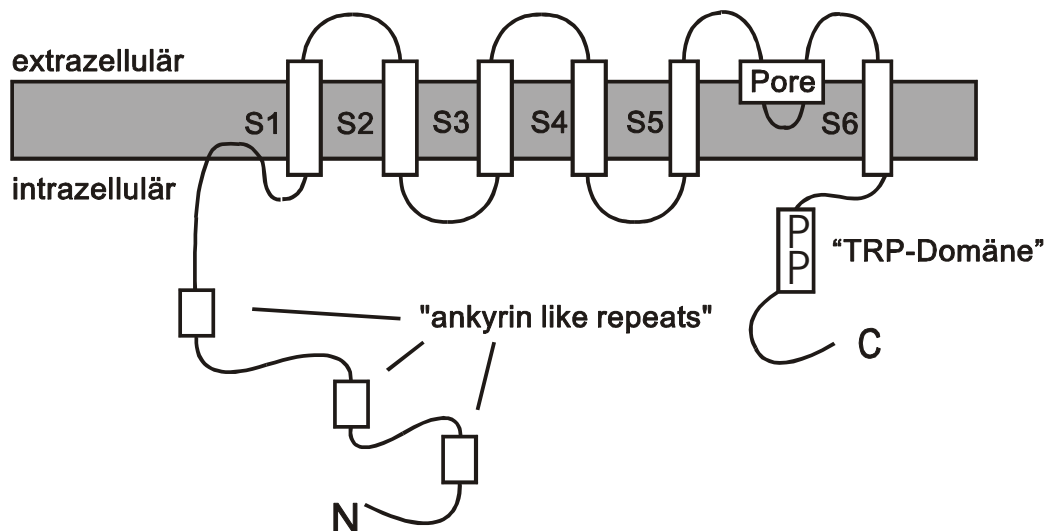
Das Durchsuchen („*Screening*“) von cDNA-Bibliotheken aus Säugergewebe nach homologen Sequenzen zu *trp* sowie *trpl* führte erstmals 1995 gleichzeitig von zwei Arbeitsgruppen zur Identifizierung eines Proteins mit > 30 % Homologie zum *Drosophila* TRP, dem TRPC1 (in früheren Arbeiten auch als HTRP1 bezeichnet) [47, 48].

Inzwischen sind im Säuger zum *Drosophila* TRP sieben Homologe (TRPC1 – TRPC7) mit zusätzlichen Spleißformen entdeckt worden, von denen jedes eine starke Ähnlichkeit zum *Drosophila* TRP aufweist [49 - 55].

Allen Proteinen ist ein hypothetisches Strukturmodell gemeinsam (siehe Abb. 1), das sich wie folgt zusammensetzt: 6 Transmembrandomänen, bei dem zwischen dem 5. und 6. Segment eine hydrophobe Schleife wahrscheinlich die Pore des Kanals bildet, ein intrazellulärer N- und C-Terminus, sowie 3 – 4 Domänen im N-terminalen Bereich, die Ähnlichkeiten zu repetitiven Sequenzen von Ankyrin aufweisen und als „Ankyrin-like repeats“ bezeichnet werden. Die „Ankyrin-like repeats“ werden mit Protein-Protein-Interaktionen, wie z.B. mit dem Zytoskelett, in Verbindung gebracht [56]. Dagegen sind von einer hoch konservierten Prolin reichen Region im C-Terminus, die als „TRP-Domäne“ bezeichnet wird, keine funktionalen Eigenschaften bekannt. Neben der „TRP-Domäne“ ist die höchste Homologie der TRPC-Proteinsequenzen von 30 – 47 % im 5. und 6. transmembranären Segment vorzufinden. Konservierte Argininreste, die in spannungsabhängigen Ionenkanälen am 4.



Segment einen Spannungssensor darstellen, sind bei den TRPC-Proteinen nicht vorhanden [57, 58].



**Abb. 1: Schematisches Strukturmodell der TRP-Proteine**

C = carboxyterminales Ende; N = aminoterminalen Ende; P = prolinreiche Region, unbekannter Funktion; S = transmembranäre Segmente 1 bis 6.

Verändert nach Zitt *et al.* 2002

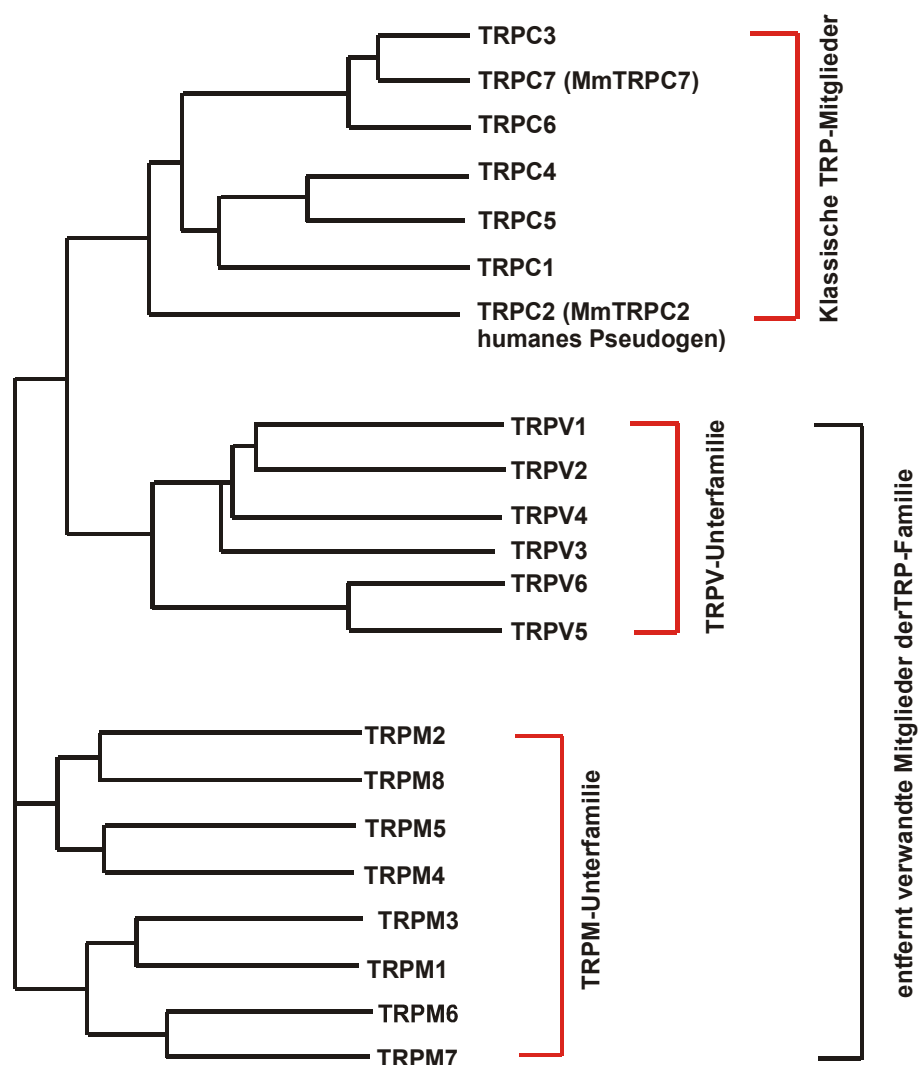
Durch Experimente an heterolog transfizierten Zellen konnte gezeigt werden, daß die TRPC-Proteine spannungsunabhängig über einen PLC-abhängigen Weg aktiviert werden. Die Expression z.B. von TRPC1A, einer Spleißvariante des TRPC1, in verschiedenen Zellmodellen führt zu einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach Depletion intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher mit  $\text{IP}_3$  oder Thapsigargin, sowie zu einem erhöhten Kationeneinwärtsstrom in transfizierten CHO-Zellen („chinese hamster ovarien“). Der TRPC1A konnte als nicht selektiver Kationenkanal mit einer Leitfähigkeit von 16 pS identifiziert werden, der durch speicherabhängige Prozesse reguliert wird [52].

Aufgrund der Homologie zu *Drosophila* TRP und der ersten funktionellen Ergebnisse wurden die TRPC-Proteine als jene Vertreter membranärer,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kanäle betrachtet, die in nicht erregbaren Zellen an einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx nach Aktivierung des PLC-abhängigen Signaltransduktionsweg beteiligt sind, dessen biophysikalischen Eigenschaften sich jedoch von denen des  $I_{\text{CRAC}}$  unterscheiden.

### 1.2.4 Einteilung der Säuger-TRP-Proteine in drei Subfamilien

Neben den klassischen TRP-Proteinen, den TRPC-Proteinen, konnten inzwischen aus humanen Geweben und anderen Säugertierzellen weitere Proteine mit Sequenz- und Strukturähnlichkeit zu Drosophila TRP kloniert werden, die jedoch eine geringere Homologie zum TRP als die TRPC Proteine aufweisen und als entfernt verwandte („*distantly related*“) Mitglieder bezeichnet werden.

Die einzelnen Proteine der TRP-Familie werden aufgrund ihrer Homologien zueinander in drei große Subfamilien unterteilt (siehe. Abb.2 und Tabelle 1) [59, 60].



**Abb.2: Phylogenetischer Stammbaum der Mitglieder der TRP-Familie.**

Die Einteilung basiert auf einen Sequenz-Vergleich (*clustal method*) der einzelnen Mitglieder. In Klammern angegeben, die Mitglieder, die nicht humanen Ursprungs sind (Mm = *Mus musculus*)

Die erste Gruppe bilden die bereits erwähnten klassischen TRPCs mit der höchsten Homologie untereinander, sowie mit der höchsten Homologie zu den *Drosophila* TRP.

Die weiter entfernt verwandten Mitglieder der TRP-Familie werden in eine sog. TRPV-Gruppe (auch OTRPC genannt) und in einen TRPM-Zweig (auch als LTRPC bezeichnet) eingeteilt [57]. Viele Mitglieder der TRPV-Unterfamilie, die nach ihrem ersten Mitglied, dem Vanilloid-Rezeptor (VR1, TRPV1) [61], benannt wurden, spielen bei sensorischen Prozessen eine funktionelle Rolle, da sie auf Schmerzreize nach erhöhten Temperaturen, auf osmotische wie auch mechanische Stimuli und auf Duftstoffe reagieren. Strukturelle Merkmale der Mitglieder der TRPV Gruppe sind ebenfalls 3-4 Ankyrin ähnliche Domänen im N-terminalen Bereich, sie besitzen aber keine „TRP-Domäne“ [62 - 64].

Namen gebend für die dritte Subfamilie, dem TRPM-Zweig, war das erste, in Melanoma Zellen identifizierte, Mitglied Melastatin, das funktionale Eigenschaften eines Tumorsuppressors besitzt [65, 66]. Zu den biophysikalischen Eigenschaften der einzelnen Mitglieder der TRPM Unterfamilie war lange Zeit wenig bekannt. Inzwischen sind, beim TRPM2 (= LTRPC2) und beim TRPM7 bifunktionale Eigenschaften sowohl als Kanal wie auch als Enzym nachgewiesen worden [67, 68]. Der TRPM8 wird durch Temperaturen  $< 26^{\circ}\text{C}$  aktiviert und besitzt wahrscheinlich ebenfalls bei sensorischen Prozessen eine Bedeutung [69]. Einige Mitglieder zeichnen sich strukturell durch recht lange N- und C-terminale Enden, durch *coiled-coil* Strukturen hinter dem 6. transmembranären Segment und/oder durch eine „TRP-Domäne“ im C-Terminus aus. Allen Mitgliedern ist jedoch gemeinsam, daß bei ihnen die „Ankyrin-like repeats“ im N-Terminus nicht vorhanden sind [57 - 60].

Die biophysikalischen Eigenschaften der einzelnen Mitglieder aus der TRP-Familie, unterscheiden sich deutlich voneinander. Einige besitzen eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität mit einer geringen Leitfähigkeit und sind abhängig von einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Andere Mitglieder dagegen zeigen eine wesentlich höhere Leitfähigkeit, sind nicht selektive Kationenkanäle, die unabhängig von einer Speicherentleerung über „*second messenger*“, Metabolite des PLC-Weges wie z.B. DAG, oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren aktiviert werden. Es scheinen aber auch Faktoren unabhängig von einem PLC-Signalweg einen regulierenden oder hemmenden Einfluß auf einige der TRP-Proteine auszuüben [17, 20, 57, 59, 70 - 72].

Da viele Mitglieder der TRP-Familie, sowohl in elektrisch nicht erregbaren als auch in elektrisch erregbaren Zellen, wie in Neuronen des ZNS, exprimiert werden, wird sich wahrscheinlich in Zukunft das Wissen um die Erkenntnisse und um die biophysikalischen Eigenschaften der TRP-Proteine stark erweitern [73]. Die folgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick zur Regulation und zu den funktionellen Eigenschaften der wichtigsten Vertreter der TRP-Kanäle.

**Tabelle 1: Übersicht zu funktionellen Eigenschaften der Mitglieder der TRP-Familie**

<b>Name</b>	<b>Früherer Name</b>	<b>funktionelle Eigenschaften; Stimulation</b>	<b>Gewebe mit der höchsten Expression</b>
<b>TRPC-Unterfamilie</b>			
TRPC1	Trp1	SOC (speicherabhängig)	Herz, Gehirn, Testes
	TRPC1	nicht selektiver Kationenkanal	Ovarien
TRPC2	TRP2	Humanes Pseudogen	
	TRPC2		
TRPC3	TRP3	SOC (speicherabhängig)?	Gehirn
	TRPC3	DAG	
TRPC4	TRP4	SOC (speicherabhängig)?	Gehirn, Endothel, Testes Nebenniere, Retina,
	TRPC4		
TRPC5	TRP5	SOC (speicherabhängig)?	Gehirn
	TRPC5		
TRPC6	TRP6	DAG	Lunge, Gehirn
	TRPC6		
TRPC7	TRP7	SOC (speicherabhängig)	Auge, Herz, Lunge
	TRPC7	DAG	

### TRPV Unterfamilie

TRPV1	VR1 OTRPC1	Temperatur > 43°C Vanilloide (Capsaicin), Anadamide, PIP <sub>2</sub> , Protonen	Trigeminus Nerven, dorsale Wurzelganglien
TRPV2	VRL-1 OTRPC2	Temperatur >52°C Translokalisierung	dorsale Wurzelganglien, Rückenmark, Gehirn, Milz; Dick- und Dünndarm
TRPV3		mittlere Temperaturen 25°C	dorsale Wurzelganglien
TRPV4	OTRPC4 VR-OAC TRP12 VRL-2	Osmolarität Zellvolumen Phorbolster	Nieren, Lunge, Spleen, Testes, Endothelium. Leber, Herz
TRPV5	ECaC1 CaT2	niedrige intrazelluläre [Ca <sup>2+</sup> ] Hyperpolarisation Ca <sup>2+</sup> -selektiver Kanal	Nieren, Duodenum, Jejunum, Plazenta, Pankreas
TRPV6	ECaC2 CaT1 CaT-L	ähnlich wie TRPV5 SOC (Favorit für I <sub>CRAC</sub> ) Ca <sup>2+</sup> -selektiver Kanal	Dünndarm, Pankreas, Plazenta, Prostata, Krebszellen

### TRPM Unterfamilie

TRPM1	Melastatin	Translokalisierung? Nicht selektiver Kationenkanal	Auge, Melanozyten
TRPM2	TRPC7 LTRPC2	ADP-Ribose, NAD <sup>+</sup> ? oxidativer Streß (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ROS; NOS Arachidonsäure nicht selektiver Kationenkanal	Gehirn

TRPM3	KIAA1616 LTRPC3	?	?
TRPM4	TRPM4 LTRPC4	nicht selektiver Kationenkanal ?	Prostata, Kolon, Herz, Nieren
TRPM5	MTR1 LTRPC5	?	Dünndarm, Leber, Lunge
TRPM6	Chak2	?	Niere
TRPM7	TRP-PLIK Chak1 LTRPC7	Phosphorylierung Mg <sup>2+</sup> -ATP	Leber, Nieren
TRPM8	TRP-p8	Temperaturen < 26°C Menthol Icilin	Prostata, dorsale Wurzelganglien

Aufgeführt sind die Namen der Mitglieder nach der neuesten Nomenklatur [60], ihre bisherige Bezeichnung, so weit bekannt Angaben zur funktionellen Regulierung und zu den biophysikalischen Eigenschaften der Kanalproteine, sowie der Ort der höchsten Expression.

Aus der Datenbank wurden folgende *Accession Number* ermittelt: **TRP1**: CAA61447, AAA93252; **TRP2**: X89067, AAD17195, AAD17196, AAG29950, AAG29951, AAD31453; **TRPC2**: CAA06964; **TRP3**: AAC51653; **TRP4**: CAA68125, BAA23599; **TRP5**: AAC13550, CAA06911, CAA06912, **TRP6**: NP\_038866; **TRP7**: AAD42069, NP\_065122; **VR1**: AAC53398; **VRL-1**: AAD26363, AAD26364, BAA78478; **TRPV3**: NP\_659505; **OTRPC4**: AAG17541, AAG16127, AAG28027, AAG28028, AAG28029; **VR-OAC**: CAC20703; **ECaC1**: CAB40138; **CaT1**: AAD47636; **ECaC2**: CAC20416; **CaT-L**: CAC20417; **Melastatin**: AAC13683, AAC80000; **TRPC7**: BAA34700; KIAA1616: AA038185; **TRPM4**: H18835; **MTR1**: AAF26288; **Chak2**: AF350881; **TRP-PLIK**: AAF7313; **TRP-p8**: AC005538

### **1.3 Potentielle Aktivierungsmechanismen der speicherabhängigen TRP-Kanäle**

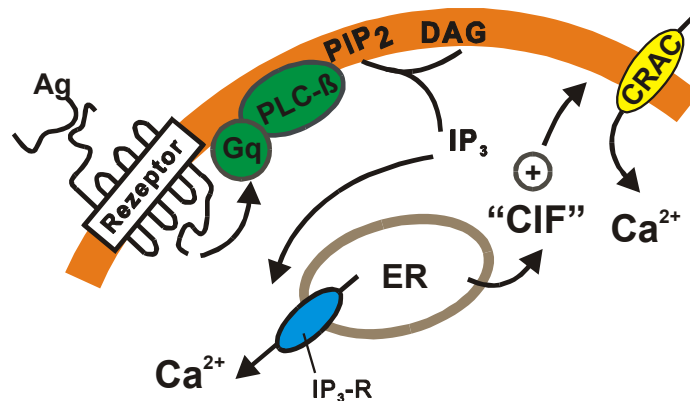
Die genauen Mechanismen, die zur Aktivierung der TRP-Kanäle führen, sind bislang nicht eindeutig geklärt. Vor allem ist nicht bekannt, wie der Aktivierungsmechanismus der TRP-Kanäle bewerkstelligt wird, die durch speicherabhängige Prozesse reguliert werden. Eine besondere Fragestellung dabei ist, wie die Informationen zum Füllzustand des  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichers zur Plasmamembran transformiert wird [10].

Zu den möglichen Aktivierungsmechanismen der speicherabhängigen TRP-Kanäle, SOCs, gibt es zwei grundsätzliche Ansätze, bei denen entweder von einem diffusiblen Botenstoff [17, 74, 75], oder von einer direkten Interaktion von zytosolischen Proteinen mit Proteinen der Plasmamembran ausgegangen wird [76].

#### **1.3.1.1 Der diffusible „Calcium influx factor“ „CIF“**

Der erste Ansatz erwägt eine Freisetzung des sog. „calcium influx factor“ („CIF“) während der Depletion der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, der aber bislang auf molekularer Ebene noch nicht identifiziert werden konnte. Dieses zytosolische Molekül diffundiert zur Plasmamembran und aktiviert die  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanäle [77]. Die Mechanismen einer Aktivierung der SOCs durch „CIF“, z.B. durch direkte Bindung, ist jedoch bislang ungeklärt [78].

### Calcium Influx Factor, "CIF"



**Abb.3: Aktivierung speicherabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle durch den „calcium influx factor“**

Nach Bindung von Agonisten (Ag) an heptahelikale Rezeptoren erfolgt über den IP<sub>3</sub>-sensitiven Weg eine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Speicherentleerung. Gleichzeitig wird vom ER ein diffusibles Signal („CIF“) freigesetzt, das den membranären Ca<sup>2+</sup>-Kanal aktiviert, es kommt zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle. IP<sub>3</sub>-R = Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor

Die ersten Befunde zu einem möglichen „CIF“ wurden durch Zellextrakte von Jurkat T Zellen, einer lymphozytären Zelllinie, gewonnen. Werden vor der Extraktion die Jurkat Zellen mit Thapsigargin stimuliert, so daß deren intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Speicher entleert sind, wird durch Mikroinjektion des Zellextrakts ein [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg in diversen Zelltypen (Astrocyten, Fibroblasten) ausgelöst, der abhängig von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> und nicht durch den IP<sub>3</sub>-Inhibitor Heparin oder durch Antikörper gegen den IP<sub>3</sub>-Rezeptor blockierbar ist. Extrazelluläre Applikation der Zellextrakte genau wie Extrakte nicht stimulierter Zellen besitzen dagegen keinen Effekt [77, 79].

Als sog. „CIF“ werden sowohl ein Produkt des Cytochrom p 450 [80], als auch kleine GTP-bindende Proteine diskutiert [81]. Weitere Überlegungen sind außerdem, daß die Erhöhung der Konzentration an zyklischen Nukleotiden Auswirkungen auf den, durch intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Speicherentleerung regulierten, Ca<sup>2+</sup>-Influx besitzen. Ein Prozeß, wie er ähnlich bei der Lichtantwort der Vertebraten zu beobachten ist, bei dem die Hydrolyse von cGMP zu einer Deaktivierung von membranären, cGMP-gesteuerten Kationenkanälen führt, und damit eine Hyperpolarisierung der Photorezeptormembran erfolgt [82 - 84].



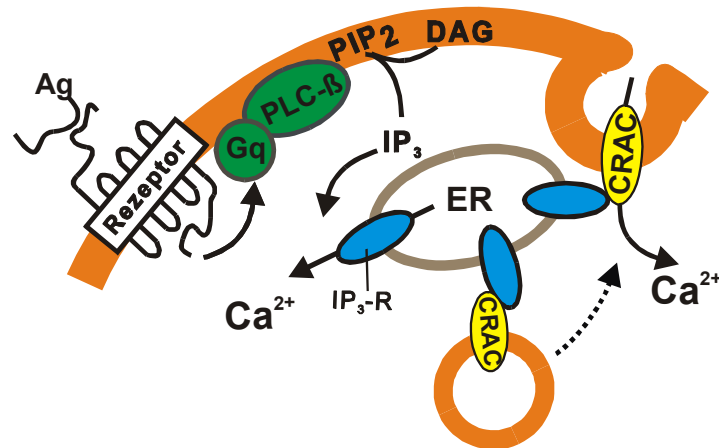
### 1.3.1.2 Protein-Protein-Interaktionen, das „secretion-like coupling model“

Bei der Hypothese einer Aktivierung der SOCs durch Protein-Protein-Interaktion werden Sekretionsprozesse vorgeschlagen („secretion-like coupling model“) wie sie bei der Neurotransmitterfreisetzung stattfinden. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal befindet sich in Vesikel ähnlichen Strukturen. Bei einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch eine  $\text{IP}_3$ -gesteuerte Speicherentleerung, kommt es, über zytoskelettäre Transportprozesse, zur Verschmelzung von Vesikel und Plasmamembran. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran erfolgt [85, 86].

Die Arbeitsgruppe um Yao und Mitarbeiter konnte nachweisen, daß die Proteine SNAP 25 (Synaptosom- assoziiertes Protein von 25 kDa), Syntaxin und VAMP (Vesikel assoziiertes Membranprotein, bzw. synonym Synaptobrevin ), die an der Membranfusion und Sekretion von Vesikeln beteiligt sind [87, 88], ebenfalls eine Rolle bei einem, einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung folgenden,  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, beim sog. CCE, besitzen. So wird z.B. nach Injektion des Botulinum Toxins A, welches spezifisch das Protein SNAP 25 spaltet, signifikant ein CCE in *Xenopus* Oocyten unterdrückt [89].

Andere Befunde sprechen gegen das „secretion-like coupling“ Modell. So kann z.B. nach Spaltung des Proteins VAMP durch das Toxin Botulinum B oder nach Spaltung von SNAP 25 mit Hilfe des Botulinum E, kein inhibierender Einfluß auf einen CCE in *Xenopus* Oocyten festgestellt werden [89, 90]. Außerdem ist die Vesikelsekretion von einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  abhängig, während der mit der Aktivierung eines SOC einhergehende  $I_{\text{CRAC}}$  dagegen inhibiert wird [91, 92]. Einzelkanalmessungen mit der sog. „inside-out“ Patch-Clamp Technik, in denen die zytosolische Seite eines Membranflecks einem künstlichen extrazellulärem Milieu zugewandt wird, ergeben charakteristische Ströme und belegen, daß der Kanal bereits in der Membran vorhanden sein muß [93, 94].

## “Secretion-like Coupling Model”



**Abb. 4:** Das „secretion-like coupling“ Modell zur Aktivierung des Speicher abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals.

Der speicherabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ist vorab in Vesikel verpackt und über den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor mit dem ER gekoppelt. In einem Prozeß, ähnlich dem der Exozytose, geschieht nach Speicherentleerung über den  $\text{IP}_3$ -Weg eine Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran, es erfolgt ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Membran.

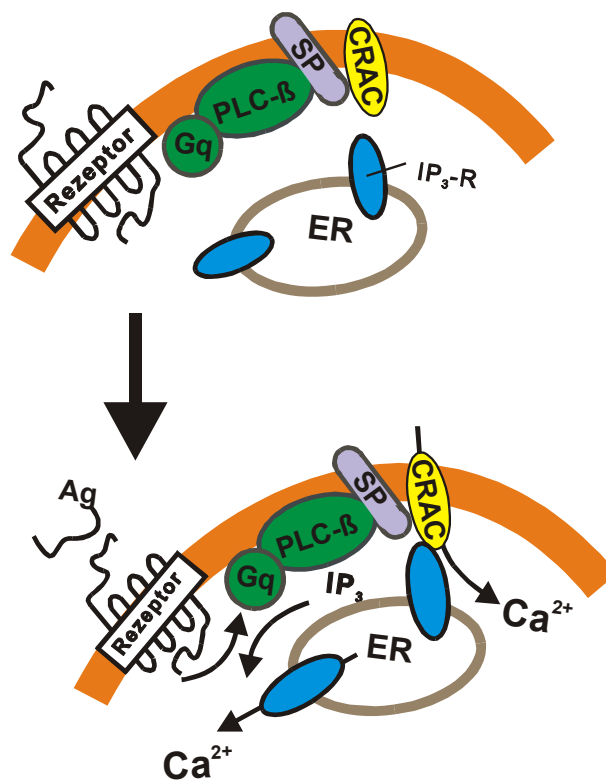
### 1.3.1.3 Protein-Protein-Interaktion das „conformation coupling model“

Ein zweiter Ansatz der zu einer Protein-Protein-Interaktion diskutiert wird, geht von einer direkten Koppelung des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors mit dem plasmamembranären  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal aus („conformation coupling model“) [95]. Die durch  $\text{IP}_3$  ausgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem intrazellulären Speicher (z.B. über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor am luminalen Ende des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors, oder durch Bindung von  $\text{IP}_3$  an den Rezeptor) verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptors. Diese Konformationsänderung wird durch direkte Koppelung von  $\text{IP}_3$ -Rezeptor und plasmamembranären Kanal auf den Kanal übertragen und löst einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx aus.

Als Beispiel für die Koppelung von  $\text{IP}_3$  und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal gilt der TRPC3. In *inside-out* Patch Experimenten konnte anhand TRPC3 stabil transfizierter HEK 293 Zellen gezeigt werden, daß  $\text{IP}_3$  einen Kationenstrom auslöst, während die  $\text{IP}_3$ -Antagonisten Heparin und Xestospongin C einen Strom inhibieren. Nach gründlichem Waschen des Membranflecks, durch das ein Einfluß restlicher, mit der Membran verbundene zytosolische Fragmente ausgeschlossen wird, ist durch  $\text{IP}_3$  alleine kein Strom zu erzielen. Werden jedoch an der

zytosolischen Seite Mikrosomen aus dem Zerebellum von Rind und Ratten angeboten, die mit IP<sub>3</sub>-Rezeptoren angereichert sind, und ist gleichzeitig IP<sub>3</sub> im Badpuffer vorhanden, so ist der Strom reversibel [96]. Darüber hinaus konnte eine Interaktion von IP<sub>3</sub>-Rezeptor Typ I und TRPC3 nachgewiesen werden. Dabei scheinen zwei N-terminale Domänen des IP<sub>3</sub>-Rezeptors in der Lage zu sein, mit einer C-terminalen Region des TRPC3 zu interagieren [97, 98].

### “Conformation Coupling Model”



**Abb. 5:** Das „conformation coupling“ Modell zur Aktivierung des speicherabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanals.

Die Speicherentleerung durch den IP<sub>3</sub>-sensitiven Weg verursacht eine Konformationsänderung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors. Durch direkte Protein-Protein-Interaktion von IP<sub>3</sub>-Rezeptor und membranären Ca<sup>2+</sup>-Kanal wird die Konformationsänderung auf den Kanal übertragen, es erfolgt eine Aktivierung des Ca<sup>2+</sup>-Kanals und damit ein Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle.

SP = *Scaffolding* Protein

Inzwischen konnte auch in anderen TRPC-Proteinen wie TRPC1 und TRPC4 eine gleiche Region zur möglichen Interaktion mit dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor identifiziert werden, welche zugleich ein Bindungsmotiv für Calmodulin ist [99 - 101]. Außerdem konnte nachgewiesen werden,

daß der TRPC3 ebenfalls in der Lage ist, mit einem zweiten  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Rezeptor der ER-Membran, dem Ryanodin-Rezeptor, zu interagieren. Ein Rezeptor, der sensitiv gegenüber Caffein und zyklischer ADP-Ribose (cADP-Ribose) ist und durch Ryanodin und Ruthenium Red gehemmt werden kann [102].

Ergebnisse, die belegen, daß eine enge Assoziation von Plasmamembran und ER gegeben sein muß, sprechen sowohl für das „secretion-like coupling“ Modell als auch für das „conformational coupling“ Modell.

Patterson und Mitarbeiter konnten 1999 in einer Zelllinie von glatten Muskelzellen nachweisen, daß das Toxin Jasplakinolid einen CCE inhibiert. Jasplakinolid verhindert die Aktindepolymerisierung und es kommt zu einer Anhäufung von F-Aktin in der Zellperipherie. Eine nahe Assoziation von ER mit der Plasmamembran wird damit unterbunden. Die gleichen Ergebnisse sind mit Calyculin A zu beobachten, einem Phosphataseinhibitor, durch den ebenfalls die Aktindepolymerisierung verhindert wird. Die inhibierende Wirkung von Calyculin A auf einen CCE kann mit Cytochalasin D, welches die F-Aktin-Polymerisierung inhibiert, aufgehoben werden [103].

Alleine für sich betrachtet, können durch die einzelnen Modelle, die zur Regulierung der speicherabhängigen Kanäle vorgeschlagen werden, nicht alle biophysikalischen Eigenschaften des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms, des CCE, erklärt werden. Möglicherweise besteht zwischen den verschiedenen Mechanismen ein Zusammenhang, der bei der Aktivierung des CCE von Bedeutung ist. Im Zusammenhang mit der Aktivierung speicherunabhängiger TRP-Kanäle zeichnet sich ab, daß, neben den beschriebenen Mechanismen, weitere Regulationsprinzipien existieren, die ebenfalls eine Rolle bei dem CCE besitzen.

## **1.4 Neutrophile Granulozyten als Modell zur Untersuchung der physiologischen Funktion von TRP-Kanälen**

### **1.4.1 Bedeutung neutrophiler Granulozyten für die Immunabwehr**

Zur Untersuchung der physiologischen Relevanz von TRP-Kanälen wurde der neutrophile Granulozyt als Modell genutzt.

Die phagozytierenden Leukozyten, die neutrophilen Granulozyten, sind bei einer mikrobiellen Infektion ein wichtiger Bestandteil der primären Immunantwort.

Die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch Bindung von Zytokinen oder Chemokinen erfolgt durch eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  und führt zur Polarisierung (sog. „*shape change*“) und zur Chemotaxis des neutrophilen Granulozyten, d.h. zum Verlassen der Blutbahn, zur Transmigration in das betroffene Gewebe und zur direkten Wanderung des neutrophilen Granulozyten zum Infektionsherd. Dort werden durch Phagozytose und durch den sog. respiratorischen Burst die Mikroorganismen abgetötet [104, 105].

Die Bindung chemotaktischer Agonisten, die durch Mikroorganismen oder infizierte Zellen freigesetzt werden, wie z.B. „N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenyl-alanine“ (f-MLP), bioaktive Lipidprodukte wie „platelet-activating factor“ (PAF), oder Leukotrien B4 und Interleukin 8 (IL-8) an heptahelikale Oberflächenrezeptoren der neutrophilen Granulozyten löst die Aktivierung eines Pertussistoxin sensitiven  $G_i$ -Proteins und eine Stimulierung der PLC aus. Es folgt die Generierung von  $IP_3$ , sowie ein initialer Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  des neutrophilen Granulozyten durch Depletion intrazellulärer Speicher. Außerdem führt ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran zu einer sekundären Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  [106 - 113]. Weiterführende Signalkaskaden werden über die Tyrosin- und Serin-Threonin-Kinasen RAF, das kleine GTP-bindende Protein RAS und Streßkinasen des MAPK/ERK Signalwegs wie p 38 MAP-Kinase eingeleitet. Eine selektive Aktivierung der Signalkaskaden über Bindung verschiedener Chemokine ermöglichen neutrophilen Granulozyten, unterschiedliche Antwortreaktionen zu erzielen, wie z.B. die Generierung von Superoxidradikalen nach Stimulation mit f-MLP, nicht aber nach Stimulation mit PAF [114 - 120, 120 - 122].

Während der mikrobiellen Infektion kommt es zu einer Zytokin gesteuerten Expression von Selektinen auf den Endothelien der Blutgefäße. Die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führt, während der frühen Phase der Chemotaxis zu einer Wechselwirkung von Oberflächenrezeptoren (L-Selektin, LCAM1) der neutrophilen Granulozyten mit den E- und P-Selektinen auf den Blutgefäßendothelien. Daraufhin wechselt die Zirkulation der neutrophilen Granulozyten im Blutstrom zu einem langsameren sog. „Rollen“ oder Wandern der neutrophilen Granulozyten entlang der Gefäßwände. Die für eine Transmigration erforderliche Anhaftung von Neutrophilen an die Endothelienoberfläche wird durch die

endotheliale Expression von Oberflächenrezeptoren wie E-Selektin (GMP 140) und deren Interaktionen mit neutrophilen Adhäsionsmolekülen der Integrinklasse gesteuert [123 - 125]. Durch Bindung neutrophiler Rezeptoren an Immunglobuline der IgG-Klasse auf der Oberfläche opsoinierter Bakterien, oder durch Bindung an Lipopolysaccharide (LPS) der Bakterienwände, wird die Phagozytose der Bakterienpartikel durch den Granulozyten und dessen respiratorischer Burst eingeleitet. Der respiratorische Burst setzt sich zusammen aus einem oxidativen und einem nicht oxidativen Teil. Im oxidativen Teil, auch als oxidativer Burst benannt, erfolgt durch die Aktivierung eines NADPH-Enzymkomplexes, die Generierung von Sauerstoffradikalen ( $O_2^{\bullet}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxylradikalen ( $OH^{\bullet}$ ) und Chloridradikalen. Beim nicht oxidativen Teil kommt es zu einer Degranulation der neutrophilen Granulozyten und damit zur Freisetzung von proteolytischen Proteinen wie Elastase, Proteinase und Serin-Protease, Cathepsin G, sowie zu einer Freisetzung von Protonen und damit zu einer Ansäuerung des Extrazellulärraums. Diese Faktoren leisten einzeln oder in Komposition einen Beitrag zur Abwehr der Mikroorganismen [126 - 131].

#### **1.4.2 $Ca^{2+}$ -Kanalblocker als Entzündungshemmer ?**

Die Stimulierung neutrophiler Granulozyten durch Zytokine und Chemokine und die damit verbundene Chemotaxis von Neutrophilen zum Infektionsherd hat nicht nur positive Auswirkungen. Viele pathologische und chronische Entzündungsreaktionen gehen auf eine massive Akkumulation von neutrophilen Granulozyten und deren Antwortreaktionen zurück wie z.B. bei Lungenentzündungen, welche auf Infektionen folgen, oder bei der Rheumatischen Arthritis [132 - 134]. Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen beim oxidativen Burst verursacht eine irreversible Stimulierung weiterer Neutrophile und der damit einhergehende, sich selbst verstärkende Effekt der Freisetzung von Radikalen und von proteolytischen Proteinen, führt zur Zerstörung des umliegenden Gewebes [135, 136]. Ferner kommt es durch stimulierte neutrophile Granulozyten zur Synthese und zum Ausstoß von Zytokinen, die sich einerseits positiv auf die physiologische Immunreaktion, aber andererseits auch auf die Aufrechterhaltung und auf die Fortsetzung pathologischer Mechanismen auswirken [137].

Die Inhibierung des Rezeptor abhängigen  $Ca^{2+}$ -Influx Kanals während der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten ist ein potentieller Ansatz zur Entwicklung antiinflammatorischer

Pharmaka, durch die eine Immunantwort der neutrophilen Granulozyten auf einen zeitlichen und lokalen Umfang reduziert werden könnte.

### **1.4.3 TRP-Moleküle als mögliche Kandidaten des rezeptormediierten $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in neutrophilen Granulozyten**

Die molekulare Identität der membranären  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kationenkanäle, die für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx nach Bindung von Agonisten an den entsprechenden Rezeptoren der neutrophilen Granulozyten verantwortlich sind, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Der spannungsunabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx während der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten ist durch Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, nicht aber durch eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzierbar. Desweiteren ist er für divalente Ionen wie  $\text{Mn}^{2+}$  permeabel und durch Ionen wie Ni,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  sowie  $\text{Gd}^{3+}$  blockierbar [138, 139]. Eigenschaften, wie sie bei einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in TRP transfizierten Zellen zu messen sind. Daher kommen als mögliche Kandidaten Mitglieder der TRP-Familie in Frage, durch die ein rezeptormediiertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx bei neutrophilen Granulozyten ausgelöst wird.

Expressionsstudien von neutrophilen Granulozyten mit Hilfe der Reversen Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) belegen eine Expression von diversen Mitgliedern der TRP-Familie, wobei ein entfernt verwandtes Mitglied, der LTRPC2, besonders stark exprimiert wird.

Diese Studien des Instituts gaben Anlaß in dieser Arbeit, den LTRPC2 näher zu charakterisieren, der möglicherweise für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten während Entzündungsreaktionen von Bedeutung ist.

## **1.5 Ein potentieller Kandidat zur Untersuchung der physiologischen Relevanz von TRP-Kanälen, der LTRPC2**

Die Sequenz des LTRPC2 wurde von der Arbeitsgruppe um Nagamine 1998 entdeckt und ursprünglich als TRPC7 bezeichnet [140]. Aufgrund von Änderungen in der Nomenklatur wird er inzwischen auch TRPM2 benannt, in dieser Arbeit wird jedoch weiterhin von LTRPC2 die Rede sein [57, 60].

Nagamine und Mitarbeiter führten Sequenzvergleiche von Regionen des Chromosoms 21 durch, die mit speziellen Erbkrankheiten wie angeborene Taubheit oder Mißbildung des

Schädels in Verbindung gebracht werden. Die von ihnen entdeckte 6.5 kb große Sequenz besteht aus 32 Exons mit einem „open reading frame“ (ORF) von 4509 bp, die in 1503 Aminosäuren translatiert wird. Das errechnete Molekulargewicht des Proteins liegt bei 171 kDa. Durch Homologievergleiche konnte die von der Arbeitsgruppe um Nagamine entdeckte Sequenz der TRP-Familie, besonders der TRPM-Subfamilie entfernt verwandter Mitglieder, zugeordnet werden. Die höchste Homologie des LTRPC2 besteht zu TRP-Proteinen des *Caenorhabditis elegans*, eine geringere Ähnlichkeit ist zu den humanen TRPC1 und TRPC3 zu verzeichnen, wobei die größte Sequenzübereinstimmung von 8,3 – 20 % zwischen den TRP-Proteinen im 5. und im 6. transmembranären Bereich vorhanden ist.

Die durch Hydrophathieblots ermittelte Struktur weist für den LTRPC2, neben den typischen Strukturmerkmalen der Proteine der TRPM-Familie, einen deutlich längeren N-Terminus von 750 Aminosäuren im Vergleich zu den TRPC- und TRPV-Proteinen mit einer Länge von 325 – 450 Aminosäuren auf, was der ursprüngliche Grund für die Namengebung des LTRPC2 als „long transient potential channel“ war.

Exprimiert wird der LTRPC2 in fötalen wie auch in adulten Hirnen vor allem im zerebralen Kortex, im Frontallappen, in der Amygdala, im Nukleus Caudatum und im Hippokampus. Eine schwache Expression wird in der Plazenta, im Knochenmark, in der Milz, im Herz, in der Lunge, in der Leber und in Leukozyten vorgefunden [67, 140].

Funktionelle Eigenschaften des LTRPC2 waren bis zu dem Beginn dieser Arbeit jedoch noch nicht bekannt.



## 2 Zielsetzung

Im Zusammenhang mit der Untersuchung zur Bedeutung von TRP-Kanälen bei einem rezeptorstimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtstrom in elektrisch nicht erregbaren Zellen, sollte in dieser Arbeit als Teilprojekt speziell die Fragestellung nach der Bedeutung und der Regulierung des LTRPC2 nachgegangen werden.

Als Modell für elektrisch nicht erregbare Zellen wurde der neutrophile Granulozyt gewählt. Die rezeptorstimulierte Aktivierung neutrophiler Granulozyten während des Entzündungsgeschehens geht mit einer Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx einher, ausgelöst durch den PLC-abhängigen Signaltransduktionsweg. Bis heute ist die molekulare Identität der Kanäle, die an einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in neutrophilen Granulozyten beteiligt sind, nicht geklärt. Neben weiteren Mitgliedern der TRP-Familie wird gerade LTRPC2 in neutrophilen Granulozyten stark endogen exprimiert. Zum Beginn dieser Arbeit war lediglich die Sequenz des LTRPC2, aber keinerlei biophysikalische Eigenschaften bekannt. Möglicherweise besitzt dieses entfernt verwandte Mitglied der TRP-Kanäle, eine Rolle bei der Funktion des neutrophilen Granulozyten.

Ziele dieser Arbeit waren im Einzelnen:

1.) Als erstes sollte der LTRPC2 anhand der von Nagamine und Mitarbeitern veröffentlichten Sequenz mittels RT-PCR aus HL-60 Zellen, einem Zellmodell für neutrophile Granulozyten, kloniert werden. Im Anschluß an die Klonierungsarbeiten sollte der LTRPC2 funktionell charakterisiert werden.

Erste Befunde aus Sequenzvergleichen und RT-PCR Analysen ergaben, daß sowohl in HL-60 Zellen als auch in neutrophilen Granulozyten zwei Spleißvarianten des LTRPC2 exprimiert werden.

Über geeignete Klonierungsstrategien sollten, entsprechend der Spleißvarianten, verschiedene Konstrukte des LTRPC2 hergestellt und ihre biophysikalischen Eigenschaften mit Hilfe heterolog transfizierter Zellen überprüft werden.

2.) Die Aktivierung der klassischen TRP-Proteine steht im Zusammenhang mit Prozessen des PLC-abhängigen Signaltransduktionsweges. Zur funktionellen Charakterisierung des LTRPC2 und seiner Varianten sollte daher zunächst eine mögliche Relevanz dieser

Proteine für einen rezeptorstimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom überprüft werden, der nach Aktivierung des PLC-gesteuerten Signaltransduktionsweg in elektrisch nicht erregbaren Zellen ausgelöst wird.

Es sollte über geeignete Protokolle in heterolog exprimierenden HEK 293 Zellen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch die Stimulation des PLC-abhängigen Signalwegs mit Charbachol ausgelöst werden. Desweiteren sollte eine mögliche Aktivierung des LTRPC2 und seiner Varianten in Abhängigkeit von Metaboliten des PLC-Signalwegs, sowie in Abhängigkeit einer  $\text{IP}_3$ -gesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung überprüft werden. Dazu sollte, u.a. durch Thapsigargin, in heterolog exprimierenden Zellen intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, entleert werden, was einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in den Zellen zur Folge hat.

Unter diesen Versuchsanordnungen sollte über fluorometrische Messungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator fura2 die Änderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von Kanal transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen verfolgt werden. Außerdem sollten nach Stimulation der heterolog transfizierten Zellen die Ionenströme mit Hilfe der Patch-Clamp Technik zur genaueren Charakterisierung des LTRPC2 und seiner Varianten gemessen werden.

- 3.) In Anlehnung an die entfernt verwandten Mitglieder der TRP-Familie, zu denen der LTRPC2 zählt, sollten zusätzlich alternative Regulationsmechanismen zum PLC-gesteuerten Signalweg getestet werden, die möglicherweise einen Einfluß auf die Regulation des LTRPC2 und seiner Varianten besitzen. Ein Ansatz sollte zunächst sein, unter Verwendung von hypo- und hyperosmotischen Badlösungen ebenfalls die Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von heterolog Kanal transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen über die Zeit mittels fluorometrischer Messungen zu verfolgen.
- 4.) Im Verlauf dieser Arbeit konnte eine Regulierung des LTRPC2 durch ADP-Ribose festgestellt werden. Dabei konnte LTRPC2 als ein nicht selektiver,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Ionenkanal charakterisiert werden. Mit Hilfe der veröffentlichten Protokolle sollte überprüft werden, inwieweit die einzelnen LTRPC2 Varianten ebenfalls durch ADP-Ribose stimuliert und gegebenenfalls deren Ionenselektivität bestimmt werden. Außerdem sollte versucht werden, einen möglichen Regulationsmechanismus zu identifizieren, über den ADP-Ribose seine Wirkung auf die einzelnen Varianten ausübt.

ADP-Ribose steht als  $\text{NAD}^+$ -Derivat im Zusammenhang mit dem Redox-Status einer Zelle. Es sollte überprüft werden inwieweit  $\text{NAD}^+$ , als Ausgangssubstrat für ADP-Ribose, und inwieweit eine Verschiebung des Redox-Potentials, z.B. bei oxidativem Streß, einen Einfluß auf die Aktivierung der LTRPC2 Varianten besitzt. Dabei sollte zu einem nach intrazellulärer Applikation von  $\text{NAD}^+$  in heterolog transfizierten Zellen und zum anderen nach Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , als ein Modell für oxidativen Streß, die jeweiligen Ionenströme mit der Patch-Clamp Technik von Kanal transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen gemessen werden. Außerdem sollte nach Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ebenfalls die Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über die Zeit mit fluorometrischen Messungen verfolgt werden.

Ist eine Stimulation der LTRPC2 Varianten durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  gegeben, lassen sich möglicherweise Rückschlüsse auf eine Bedeutung dieser Kanäle für die Funktion von neutrophilen Granulozyten während des Entzündungsgeschehens, besonders während des oxidativen Bursts, schließen.

### 3 Material und Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Methoden laut Anweisungen des Herstellers durchgeführt, und verwendete Chemikalien, in *pro analysis* Qualität, von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

#### 3.1 Isolation von neutrophilen Granulozyten

Gesunden Probanden beider Geschlechter (im Alter von 25 bis 35 Jahren) wurden 70 ml venöses Blut abgenommen und in einem Verhältnis von 1 : 5 mit der Antikoagulan-Lösung „ACD“ (s.u.) versetzt.

Die Sedimentation der Erythrozyten erfolgte mit Hilfe von Dextran. Das Vollblut wurde mit 8,4 ml vorgelegtem 6 % Macrodex (Pharmalink, Schweden) gemischt und bei Raumtemperatur für 40 – 59 min inkubiert.

Anschließend wurde die Granulozyten beinhaltende obere Phase mit einer PBS/EDTA-Lösung zu einem Volumen von 40 ml aufgefüllt, bei 1700 rpm (350 x g) und 4°C für 10 min in einem SS-34 Rotor zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres mal wiederholt. Zur Lyse der verbliebenen Erythrozyten wurde das Zellpellet in 5 – 10 fachen seines Volumen in Lysis-Puffer resuspendiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert.

Nach einer Zentrifugation von 300 x g für 10 min bei Raumtemperatur schloß sich ein zweimaliger Waschschrift mit PBS-EDTA-Lösung und einer Zentrifugation von 200 x g für 10 min bei Raumtemperatur an, bevor das Pellet für die Ficoll-Gradientenzentrifugation in 10 ml einer PBS/EDTA/FCS-Lösung aufgenommen wurde.

Im Anschluß an die Zentrifugation der Zellsuspension auf 15 ml Ficoll bei 1800 rpm (800 x g) für 20 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt, die verbleibenden Granulozyten in restliche 2 – 3 ml resuspendiert, mit PBS/EDTA-Lösung das Volumen auf 40 ml aufgefüllt und die Lösung bei 900 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde anschließend in 40 ml 4 °C kaltem PBS (ohne EDTA) aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl die Zentrifugation wiederholt.

$10^7$  Zellen ( $1,25 \times 10^{10}$  Zellen/ml) wurden in 80 µl PBS/EDTA/BSA-Puffer resuspendiert und zur Antikörperinkubation mit 20 µl paramagnetischer Beads gekoppelter Anti-CD15 Antikörper (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) bei 6 – 12 °C für 10 – 15 min inkubiert. Vor der magnetischen Separation der neutrophilen Granulozyten erfolgte ein Waschschrift mit

Puffer in 10 – 20 fachen des Antikörper-Zellsuspensions-Volumen und einer Zentrifugation von 300 x g für 10 min bei Raumtemperatur.

Auf vorbereitete LS<sup>+</sup>-Säulen (Miltenyi Biotech) wurden 2 x 10<sup>9</sup> Zellen in einem max. Volumen von 10 ml gegeben und nicht markierte Zellen mit 3 x 3 ml Puffer von der Säule gewaschen. Nach Entfernung der Säule von dem Magneten, wurden die CD15 markierten Zellen mit 5 ml Puffer eluiert.

Zur Überprüfung einer möglichen Kontamination der Granulozyten mit anderen Zellen konnte zusätzlich eine Eosin/Methylenblau (AzurII)-Färbung nach Pappenheim durchgeführt werden.

#### Lösungen:

PBS/EDTA/BSA:	200 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2 mM EDTA
	0,5% BSA (Rinderserum Albumin)
	(pH 7,4)

PBS:	200 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	(pH 7,4)

ACD:	0,2 M tri-Na-Citrat
	0,14 M Zitronensäure
	0,22 M Glucose

Macrodex 6%	(Pharmalink, Schweden)
-------------	------------------------

paramagnetisch gekoppelte Anti-CD-15 Antikörper	(Miltenyi Biotech)
--	--------------------

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Isolation totaler RNA

Unter Verwendung von 2 ml TRIzol, einem Gemisch aus Phenol und Guanidin Isothiocyanat (Life Technologies, Rockville, USA), wurde entweder aus  $1 - 2 \times 10^7$  HL-60 Zellen oder  $2,5$  bis  $5 \times 10^7$  Granulozyten die totale RNA isoliert. Durch Zugabe von 0,4 ml Chloroform und anschließender Zentrifugation bei  $13.000 \times g$  für 15 min bei  $2 - 8^\circ\text{C}$  wurde die, in der wäßrigen Phase befindliche, RNA von der organischen Phase getrennt. Die Fällung der RNA erfolgte mit 1 ml Isopropanol durch Zentrifugation bei  $12.000 \times g$  für 10 min bei  $2 - 8^\circ\text{C}$ . Im Anschluß an einen Waschschrift mit 70% Ethanol wurde das RNA-Pellet in 25  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

### 3.2.2 mRNA-Isolation

Die mRNA wurde nach dem „Batch“-Protokoll des Kits Oligotex (Qiagen, Hilden) extrahiert. Es wurden für 250  $\mu\text{g}$  totale RNA 15  $\mu\text{l}$  Oligotex-Lösung verwendet. Die extrahierte mRNA wurde am Ende des Verfahrens in 25  $\mu\text{l}$  des Elutionspuffer aufgenommen, entweder gleich für einen Desoxyribonuklease- (DNase-) Verdau eingesetzt, oder bei  $-70^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.2.3 Aufbereitung von mRNA

Um eine Kontamination der mRNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde die mRNA einem DNase-Verdau ausgesetzt. Pro  $\mu\text{g}$  mRNA wurde 1 U DNase (Life Technologies) in 10  $\mu\text{l}$  Volumen verwendet, die Reaktion verlief bei Raumtemperatur für 15 min. Anschließend wurde mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) die organische von der wässrigen Phase getrennt. Es wurde dafür der Reaktionsansatz mit gleichem Volumen an PCI (25:24:1) gemischt und zwei mal bei 13.000 rpm ( $12.000 \times g$ ) für 15 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgte die Fällung der mRNA in einem Natriumacetat/Ethanol-Gemisch. Der Fällungsansatz wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  für 30 min inkubiert, bevor eine Zentrifugation bei  $12.000 \times g$  bei  $4^\circ\text{C}$  für 30 min erfolgte. Hinterher erfolgte ein Waschschrift, indem das Präzipitat mit 400  $\mu\text{l}$  70% Alkohol versehen und die Lösung bei  $12.000 \times g$  bei  $4^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert wurde. Anschließend wurde die mRNA in 25  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltem  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei  $-70^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Fällungsansatz: 1/10 Volumen 3 M NaAcetat  
 1 µl Glycogen  
 2 x Volumen 95 % Ethanol

### 3.2.4 Oligonukleotide

Die gesamten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

#### 3.2.4.1 Oligonukleotide zur Klonierung des 3'Segments und des 5'Segments des LTRPC2

Name	Richtung	Sequenz	Lokalisation (bezogen auf LTRPC2-Sequenz)
PK-1	sense	5'TGA AGT TTG TGT CTC ACG GG'3	2625 - 2644
PK-2	antisense	5'CTT GGG GAC GAT GCT GGA G'3	5985 - 6003
PK-3	sense	5'ATC CAG GCC TTC CTG ACC AAG'3	2648 - 2668
PK-4	antisense	5'GGG ATC GAG GAG AAC TTC AG'3	5859 - 5878
PK-5	antisense	5'GGT AGT TCT CCT TCA GGT AG'3	3823 - 2842
PK-6	sense	5'ACA CAT CTC ACG CAG CTG G'3	216 - 234
PK-7	antisense	5'AGG TAG ATG GCA CAC TCG CAC'3	2926 - 2946
PK-8	sense	5'GCG TGG GGG TCT CAG AAT G'3	429 - 448
PK-9	antisense	5'CAC GGG TGC GGT GAA GAA GG'3	2814 - 2833

#### 3.2.4.2 Oligonukleotide zum Nachweis der Spleißvarianten des LTRPC2 in neutrophilen Granulozyten und HL-60 Zellen

Name	Richtung	Sequenz	Lokalisation (bezogen auf LTRPC2-Sequenz)
PS-1	antisense	5'ACC AGC ACT TCC ACG ATC TTC'3	4552 - 4572
PS-2	sense	5'GTT CCT GAT CTA TGA CCC AC'3	4245 - 4264
PS-3	antisense	5'AAA TGA GAA GGT CAC GGA TG'3	2308 - 2327
PS-4	sense	5'AAA GGT GCT GGT GGA GGA TC'3	2056 - 2075
PS-5	sense	5'TTC ATG GAT GAG TGG CAG TG'3	1862 - 1881
PS-6	antisense	5'AGC TTC ACC ACC AGC ACT TC'3	4562 - 4581

PS-7	sense	5' AAC GTG GTG GAT GGC CTG AG'3	4349 – 4368
PS-8	sense	5' TTG CTG AAA GCC TCA CGG AG'3	1754 – 1773
PS-9	antisense	5' TCA AAA GAC GGC CAG TGC TG'3	4670 - 4689

### 3.2.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die reverse Transkription, die Umschreibung von mRNA in cDNA, wurden 500 ng der isolierten und aufbereiteten mRNA und 500 ng Oligo(dT)-*Primer*, oder 2 pmol eines genspezifischen *Primers* (PK5, siehe Abschnitt 3.2.4.1 und Abschnitt 4.1.1), sowie 200 Units MMLV (Moloney murine leukemia virus) Reverse Transkriptase (Superscript II, Life Technologies) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 42°C für 50 min.

Aufbewahrt wurde die cDNA bei –20°C.

### 3.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Klonierung und der Nachweis des LTRPC2 und seiner Varianten erfolgte mit Hilfe der PCR-Technik. Als DNA-Matrize diente cDNA, synthetisiert aus mRNA von HL-60 Zellen, oder synthetisiert aus mRNA von neutrophilen Granulozyten. Zur Klonierung der LTRPC2 Varianten wurde als Matrize der Vektor pBluescript SK(-) mit Insert LTRPC2-ΔN-ΔC (Nomenklatur siehe Abschnitt 4.2.2.1) eingesetzt.

Synthetische Oligonukleotide dienten als *Primer*, um mit Hilfe der *Pfu* DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) die cDNA der zu klonierenden Fragmente zu amplifizieren.

PCR-Ansatz	0,5 – 1 µl cDNA je 0,4 µM <i>sense</i> und <i>antisense Primer</i> je 200 µM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1,25 U <i>Pfu</i> DNA-Polymerase 1 x Enzympuffer <i>ad</i> 50 µl H <sub>2</sub> O
Amplifizierungs-Programm:	10 min 95°C – erstmalige Denaturierung 35 Zyklen an: 1,5 min, 95°C zur Denaturierung 2 min, 58 - 63°C zur Hybridisierung von cDNA und <i>Primern</i> 2 min, 72°C zur Amplifizierung der Fragmente und einmalig 10 min 72°C zur finalen Amplifizierung

Anschließend wurden die Ansätze auf 4°C abgekühlt.



Die Temperatur für die Bindung der *Primer* wurde in Abhängigkeit des G:C- und A:T-Gehalts der synthetischen Oligonukleotide variiert.

Bei einer „*nested*“ PCR wurden als Matrize 1 µl aus einer 1 : 10 Verdünnung der vorausgegangenen PCR-Lösung eingesetzt.

### 3.2.7 Native Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente in 0,75 – 2 % Agarosegelen wurden die Proben zunächst mit 1/10 des Volumens an 1 x Probenpuffer beschwert, der mit Bromphenolblau oder Xylenzyanol versehen worden war. Den Gelen wurde 0,2 µg/µl Ethidiumbromid zugesetzt, um nach Abschluß der Elektrophorese die DNA-Banden mit Hilfe einer UV-Lichtbank lokalisieren zu können. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer, die Spannung betrug konstant 90 V, wenn einzelne DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau aus dem Gel extrahiert werden sollten 60 V.

Als DNA-Längenstandard diente ein Standard DNA-Marker (1 kb DNA-Ladder, Life Technologies, Rockville, USA).

50 x TAE-Puffer:	2 M Tris-Base
	5,7 % (v/v) Eisessig
	50 mM EDTA (pH 8,0)

1 x DNA Probenpuffer:	30% (v/v) Glycerol
	5 mM EDTA
	0,25% (w/v) Bromphenolblau oder Xylenzyanol

### 3.2.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegele

Zur Sequenzierung und Klonierung wurden einzelne DNA-Fragmente im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung mit Hilfe eines Skalpell auf einer UV-Lichtbank aus dem Agarosegel herausgeschnitten und hinterher mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) eluiert und in 25 - 50 µl des Elutionspuffers aufgenommen.

### 3.2.9 Ethanolfällung von DNA

Zur Konzentrierung von verdünnten DNA-Lösungen wurde eine Ethanolfällung durchgeführt.

Die Fällung der DNA erfolgte nach einer 15 minütigen Inkubation des Fällungsansatzes bei -20°C durch eine Zentrifugation bei 14.000 x g (SS-34 Rotor) für 30 min bei 4°C. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit dem dreifachen des ursprünglichen Volumens an eiskaltem 70% Ethanol und einer Zentrifugation bei 14.000 x g für 10 min bei 4°C gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA bei Raumtemperatur wurde sie in einem geeignetem Volumen an H<sub>2</sub>O gelöst.

Fällungsansatz:                    1 µl Glycogen  
    1/10 des Ursprungsvolumen an 4 M LiCl  
    2 faches Volumen 100 % eiskaltes Ethanol

### **3.2.10 Klonierung von PCR-Amplifikaten**

Um mit den anfänglich erzielten PCR-Amplifikaten weitere Klonierungsschritte durchführen zu können, wurden die Amplifikate zunächst mit Hilfe des TA-Cloning Kits (Invitrogen, Groningen, Niederlande) direkt mit dem Vektor pCRII ligiert, bei dem das Prinzip der komplementären Basenpaarung von Desoxythymidin (Vektor) zu Desoxyadenosin (Amplifikat) genutzt wird.

### **3.2.11 Anhängen von Desoxyadenosinenden für die Klonierung von PCR-Amplifikaten**

Für die Ligation der PCR-Produkte mit dem Vektor pCRII mußte den mit der *Pfu*-Polymerase amplifizierten cDNA-Fragmenten vorausgehend freie Desoxyadenosinenden angehängt werden.

Die PCR Produkte wurden mit einfach konzentriertem Polymerasepuffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM dATP in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 30 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde der cDNA beinhaltenden Lösung 2,5 µl einer vorab für 10 min bei 95°C präinkubierten 1:10 Taq-Polymerase-Verdünnung (0.3 Units) (AmpliTag Gold, Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburry, USA) hinzugefügt. Die Anhängungsreaktion verlief bei 72°C für 30 min.

### 3.2.12 T4-DNA-Ligation

Die Ligation eines präparierten DNA-Fragments in einem geeigneten Expressionsvektor erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Invitrogen).

Die Berechnung der Insertmenge erfolgte nach folgender Formel:

$$x \text{ ng Insert} = \frac{(y \text{ bp Insert-Produkt}) (z \text{ ng Vektor})}{(\text{Größe in bp des Vektors})}$$

Die Ligation erfolgte in einem Vektor zu Insert Verhältnis von 1 : 1 bis 1 : 3. Der Reaktionsansatz bestand aus 1 x Ligasepuffer, 4 Units T4-Ligase mit einem Gesamtvolumen von 10 µl. Die Reaktion verlief bei 14°C für mindestens 4 h, oder über Nacht.

Das Ligationsprodukt wurde entweder bei -20°C aufbewahrt, oder unverzüglich für die Transformation aufbereitet.

### 3.2.13 Vektoren

pBluescript SK(-)                      prokaryontischer Klonierungsvektor (Stratagene, Heidelberg)

pCR<sup>TM</sup>II                                      prokaryontischer Klonierungsvektor (Invitrogen)

pcDNA3-EGFP                              eukaryontischer Expressionsvektor pcDNA3, dem die Neomycinresistenzkassette durch das Gen für das grün fluoreszierende Markerprotein („enhanced green fluorescent protein“, EGFP) ersetzt wurde

### 3.3 Herstellung rekombinanter Klone

#### 3.3.1 Medien, Kulturplatten und Antibiotikastammlösungen für Bakterienkolonien

LB-Medium:	1 % (w/v) Baktotrypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 20 mM NaCl pH-Wert 7,0 – 7,5 (NaOH)
SOB-Medium:	2 % (w/v) Baktotrypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl pH-Wert 6,8 – 7,0 (NaOH)
Agarplatten:	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium nach dem Autoklavieren wurden je nach Bedarf Selektionsantibiotika zugefügt
Antibiotikastammlösungen:	Ampicillin-Stock: 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O (75 µg/ml Endkonzentration) Kanamycin-Stock: 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O (50 µg/ml Endkonzentration) Tetrazyklin-Stock: 5 mg/ml in Ethanol (50 µg/ml Endkonzentration; bei Herstellung elektrokompetenter Zellen 12 µg/ml Endkonzentration)

Die Stammlösungen wurden bis zur Verwendung bei –20°C aufbewahrt

### 3.3.2 Prokaryontische Zellen und deren Kultivierung

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Klonierungsschritte wurden mit Hilfe folgender *Escherichia coli* (*E.coli*) Stämme durchgeführt:

XL1-Blue MRF<sup>'</sup> (Stratagene)

INF  $\alpha$  F<sup>'</sup> (ONE SHOT™ cells; Invitrogen)

### 3.3.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Nach Auftauen von 50 – 100  $\mu$ l kompetenter XL-1 Blue MRF<sup>'</sup> Zellen auf Eis wurden die Zellen mit 2  $\mu$ l 0,5 M  $\beta$ -Mercaptoethanol und 2  $\mu$ l einer Ligationslösung versehen und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Erhitzen der Zellen auf 42°C für 30 - 90 s und sofortiger Abkühlung auf Eis für weitere 2 min wurden die Zellen in 250  $\mu$ l - 1000  $\mu$ l geeignetem Flüssigmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 37°C und 225 rpm („rounds per minute“) inkubiert und hinterher auf Agarplatten, versehen mit Selektionsantibiotikum, über Nacht kultiviert. Nachfolgend wurden rekombinante Klone analysiert.

### 3.3.4 Transformation durch Elektroporation

Aliquots elektrokompetenter XL-1 Blue MRF<sup>'</sup> Zellen wurden auf Eis aufgetaut, je 40  $\mu$ l Bakteriensuspension mit 2  $\mu$ l (0,01 – 10 ng) einer DNA-Lösung gemischt, in Küvetten (*E.coli* Pulser; BioRad, München) überführt und ein Elektropuls von 1,8 kV (200 Ohm und 25  $\mu$ F) für ca. 5 s appliziert. Sofort im Anschluß wurde zu den Zellen 1 ml kaltes SOC-Medium gegeben und die Zellen bei 37°C, 250 rpm für 1 h inkubiert.

Hinterher wurde die Vorkultur auf Agarplatten, mit Selektionsantibiotikum, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am anderen Tag erfolgte die Analysierung der rekombinanten Klone.

## **3.4 Präparation und Analyse von Plasmid-DNA**

### **3.4.1 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräp)**

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus rekombinanten Klonen im kleinen Maßstab diente zur schnellen Charakterisierung der Klone z.B. durch Sequenzierungs- oder Restriktionsanalysen. Die Präparation von 3 ml Übernachtskulturen erfolgte mit Hilfe eines Mini-plasmidpräparationskits (Qiagen).

### **3.4.2 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräp)**

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA in größeren Mengen wurden von 3 ml Vorkulturen 1,5 ml in 100 ml frisches, vorgewärmtes LB-Medium überführt, über Nacht kultiviert und anschließend die Zellen mit Hilfe eines Maxi-Plasmidpräparationskit (Qiagen) aufgearbeitet.

### **3.4.3 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen**

Zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen wurde die optische Dichte der Proben photometrisch (UV-Spektrometer, Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt ( $OD_{260}$ ). Beträgt der Wert der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $E_{260}$ ) = 1 entspricht das einer doppelsträngigen DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer Konzentration an einzelsträngiger RNA von 40 µg/ml. Der Reinheitsgrad wurde mit Hilfe des Quotienten aus  $E_{260}:E_{280}$  bestimmt und sollte zwischen 1,8 – 2,0 liegen.

### **3.4.4 Enzymatischer Verdau von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen**

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (New England, USA) bezogen, verwendete Restriktionsenzyme waren:

BamHI	EcoRI	KpnI	NotI	SpeI
SphI	XbaI	XhoI	XmnI	

Für die jeweiligen Enzyme wurde in den Reaktionsansätzen der vom Hersteller empfohlene 10 x Puffer verwendet.

1 – 2 µg Plasmid-DNA wurden in einem Standardansatz aus 1 x Puffer, 1 µl (10 – 20 U) Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 20 µl bei 37°C für 1 h enzymatisch verdaut.

Bei einem präparativen Verdau wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl 20 µg Plasmid-DNA und 10 µl Restriktionsenzym verwendet.

Bei einem Restriktionsverdau mit zwei Enzymen wurde ein Herstellerpuffer eingesetzt, bei dem die Enzyme mindestens 50 % ihrer maximalen Aktivität erreichen. Erwiesen sich die Puffersysteme als unverträglich, wurde nach dem ersten Restriktionsverdau die DNA umgepuffert (s.u.) und im Anschluß mit dem zweiten Enzym geschnitten.

Sollten Plasmide partiell fragmentiert werden, erfolgte eine Inaktivierung der Enzyme nach empirisch ermittelter Reaktionszeit von 0,5 bis 2 min durch Erhitzen auf 65°C für 15 – 30 min.

### 3.4.5 Umpufferung

Für einige Enzymreaktionen war es notwendig, die DNA umzupuffern. Dazu wurde der QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet.

### 3.4.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Konstrukte wurden über das Didesoxy-Prinzip nach Sanger unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden mit dem Big-DYE-Terminator-Kit (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems) sequenziert.

Reaktionsansatz:	4 µl Terminator Mix, 200 – 500 ng Plasmid-DNA, oder 3 – 10 ng PCR-Amplifikate, 3,2 pmol <i>Primer</i> ad 20 µl H <sub>2</sub> O
PCR-Programm:	25 Reaktionszyklen an: 30 s, 96°C zur Denaturierung 30 s, 50°C zur <i>Primer</i> -Bindung, im Falle von Plasmid-DNA, (oder 15 s, 50°C zur <i>Primer</i> -Bindung, im Falle von PCR-Amplifikaten) 240 s, 60°C zur Elongation

Im Anschluß an die PCR wurde die DNA-Probe mit 2 µl 3 M Natrium-Acetetat (pH 4,6) und 50 µl 95% Ethanol durch Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation für 20 min bei 14000 rpm gefällt. Das DNA-Pellet wurde nach einem Waschschrift mit 150 µl 70% Ethanol und Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Kapillarelektrophorese mit einem ABIprism Modell 310 Sequenzierer (Applied Biosystems, Langen) wurden vom Institut für Biochemie am Klinikum der RWTH übernommen.

Einzelheiten der in dieser Arbeit als LTRPC2- $\Delta$ N $\Delta$ C beschriebenen Variante des LTRPC2 sind in der EMBL-Datenbank unter der *Accession-Number*: AJ417076 eingereicht.

### 3.5 Zellkultur und Transfektion

#### 3.5.1 Eukaryontische Zellen

CHO-Zellen	adhärent wachsende Ovarienzelllinie des chinesischen Hamsters (Chinese Hamster Ovarien cells) („Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“, Braunschweig)
HEK 293 Zellen	adhärent wachsende humane, embryonale Nierenzellen, (Human Ebryonic Kidney 293 cells) (A.T.C.C., Manassas, VA, USA)
HL-60 Zellen	in Suspension wachsende Zelllinie humaner, leukozytärer Melanomzellen („Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“)



### 3.5.2 Nährmedien

DMEM Flüssigmedium (Biochrom, Berlin) für HEK 293 Zellen, versetzt mit:	10% (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS; Biochrom) 1 mM Natrium-Pyruvat 4 mM L-Glutamin (Biochrom)
Ham's F12 Medium (Biochrom) für CHO-Zellen, versetzt mit:	10% (v/v) FCS 2 mM L-Glutamin

Alle Zellen wurden bei 5 % atmosphärischem CO<sub>2</sub> und einer Temperatur von 37 °C kultiviert.

Die adhärent wachsenden CHO- und HEK 293 Zellen wurden alle 2 - 3 Tage in einer Verdünnung von 1 : 5 bis 1 : 20 umgesetzt, indem pro 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche die HEK Zellen mit 1 ml PBS/EDTA(0,5mM), die CHO-Zellen mit 1 ml Trypsin(0,05%)/EDTA(0,02%)-Lösung (Biochrom) für 1,5 min bei 37°C inkubiert und so von der Bodenplatte gelöst wurden. Anschließend wurden die Zellen in entsprechende Volumina an frischem Medium aufgenommen.

Die in Suspension wachsenden HL-60 Zellen wurden beim Erreichen einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$ /ml mit einer max. Verdünnung von 1 : 5 umgesetzt oder zum Erreichen eines granulozytären Phänotyps mit Medium, dem 400 µM Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) zugesetzt worden war, differenziert und für weitere 2 – 3 Tage kultiviert.

### 3.5.3 Transiente Transfektion

Für transiente Transfektion der CHO- und HEK 293 Zellen auf Grundlage von sog. Liposomen wurden die Zellen in einer Dichte von  $1 - 2 \times 10^3$  Zellen/mm<sup>2</sup> zunächst für 24 h auf Poly-Lysin (0,1 µg/µL) beschichteten Glasobjektträgern ausgesetzt.

Am folgenden Tag wurden 700 µl serumfreies Medium vorgelegt, mit 2,5 - 5 µg Plasmid-DNA und 3,75 µl – 7,5 *Trans Fast* Reagenz (Promega) gemischt und für 10 – 15 min zur Komplexbildung inkubiert. Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen, für 1h bei 37°C mit

dem Transfektionsgemisch versehen und nach dessen Entfernung in frischem, serumhaltigem Medium 24 - 48 h bis zur funktionellen Untersuchung kultiviert.

### 3.6 Funktionale Untersuchungen

Die Experimente wurden bei einer Raumtemperatur von 21-23°C durchgeführt.

#### 3.6.1 Elektrophysiologische Messungen mit Hilfe der Patch-Clamp Technik

CHO- oder HEK 293 Zellen, die 24 – 48 h vor Beginn der Experimente transfiziert worden waren und die sich durch eine grüne Fluoreszenz auszeichneten, wurden mit Hilfe der Patch-Clamp Technik im sog. Ganzzellmodus untersucht. Das Haltepotential betrug –60 mV.

Verwendet wurde ein EPC9 Verstärker der Firma HEKA (Lamprecht), und ein PC der ausgestattet war mit der Software für das Rechenprogramm „Pulse“ und für das Aufzeichnungsprogramm „X chart“ (HEKA).

Standardbadlösung:	140 mM NaCl 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM KCl 10 mM HEPES pH 7,4 (KOH)
natriumfreie Lösungen:	Standardbadlösung statt Natrium 150 mM NMDG (titriert mit HCl)
NMDG-Lösungen mit Ca <sup>2+</sup> :	NMDG wurde partiell mit 11,2 mM CaCl <sub>2</sub> ausgetauscht (Osmolarität von 300 mOsm/l)
Standardpipettenlösung:	145 mM Cs-Glutamat 8 mM NaCl 2 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM Cs-EGTA 10 mM HEPES pH 7,2 (CsOH)

Bei einer Pipettenlösung mit ADP-Ribose/NAD<sup>+</sup> wurde zur Standardpipettenlösung 0,3 mM ADP-Ribose oder 1mM NAD<sup>+</sup> zugegeben (der Pipettenlösung wurde von einer 70 mM NAD<sup>+</sup>-Stocklösung in Ethanol so viel zugefügt, daß die Endkonzentration 1 mM betrug).

Das Haltepotential betrug -60 mV, Strom-Spannungs- (I-V-) Beziehungen wurden durch Spannungsrampen von -90 bis +60 mV über 400 ms erzielt.

### **3.6.2 Messungen der intrazellulären freien Kalziumkonzentration mit dem Fluoreszenzfarbstoff fura2**

Vor Beginn der Messungen wurden CHO- oder HEK Zellen, die 24 – 48 h vor Beginn der Experimente transfiziert worden waren, mit dem fluoreszierenden, Ca<sup>2+</sup>-bindenden Farbstoff fura2 beladen, indem sie für 30 min bei 37°C mit dem Ladepuffer inkubiert wurden.

Bei Stimulation des IP<sub>3</sub>-Signalweges oder bei der Ca<sup>2+</sup>-Speicherentleerung wurden ein Badwechsel der Zellen mit dem Standardmeßpuffer durchgeführt, dem entweder 200 µM Charbachol oder 1 mM Thapsigargin zugefügt worden war. Wurde ein Ca<sup>2+</sup>-freies Milieu benötigt, war im Standardmeßpuffer das CaCl<sub>2</sub> durch 1mM EGTA ersetzt worden.

Für die Ermittlung der maximalen Fluoreszenz (F<sub>max</sub>) wurden die Zellen im Standardmeßpuffer, dessen CaCl<sub>2</sub>-Konzentration auf 10 mM erhöht worden war, mit 10 µM Ionomycin permeabilisiert.

Die Messungen wurden mit einem digitalen Fluoreszenz Imaging System (T.I.L.L. Photonics, München) durchgeführt. Positiv transfizierte Zellen wurden mit einem 40 x Öl-Immersions-Objektiv (Zeiss, Jena) visualisiert und mit Hilfe der Programmsoftware manuell ausgewählt, in dem die Oberflächen der einzelnen Zellen umfaßt und als sog. „regions of interests“ (ROI) definiert wurden.

Das Verhältnis (Ratio, R) der Fluoreszenzwerte (Emissionswellenlänge von 510 nm), die sich bei einer Anregungsdauer von je 4 ms und einer Anregungswellenlänge von 340 nm (F<sub>340</sub>) und 380 nm (F<sub>380</sub>) ergaben, wurden alle 2,5 sec aufgenommen, über die Software digitalisiert und analysiert.

Zur Kompensation des Hintergrunds wurde der Ratiowert einer Region ohne Zellen von den Meßwerten subtrahiert.

Ladepuffer: 138 mM NaCl  
 6 mM KCl  
 1 mM MgSO<sub>4</sub>  
 5 mM NaHCO<sub>3</sub>  
 5,5 mM D-Glucose  
 20 mM HEPES  
 0,1 % (w/v) BSA  
 pH 7,4 (NaOH)  
 2 µM fura2 Acetoxymethylester (Calbiochem, Bad Soden)

Standardmeßpuffer: 138 mM NaCl  
 6 mM KCl  
 1 mM MgSO<sub>4</sub>  
 5,5 mM D-Glucose  
 1,6 mM CaCl<sub>2</sub>  
 20 mM HEPES  
 (pH 7,4)

Badlösungen, die Hydrogenperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (5-30 mM; Merck, Darmstadt) enthielten, wurden täglich frisch angesetzt und im Dunkeln bis zur Verwendung aufbewahrt.

fura2/AM wurde als eine 1 mM Stocklösung in DMSO bei -20°C aufbewahrt.

### 3.6.3 Datenauswertung und Computerprogramme

Daten wurden als Mittelwert ± SD aufgeführt. Statistische Berechnungen wurden nach dem Student's t-test und dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikant angegeben.

Computerprogramme:

DNASTAR	DNASTAR (Inc, Madison, USA)
CorelDRAW 9	Corel Corporation (Ottawa, Kanada)
Windows Exel	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Windows Word	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Quantity One	BioRad

## 4 Ergebnisse

Diese Arbeit setzte sich in erster Linie zusammen aus der Klonierung des LTRPC2, einem Mitglied der kalziumpermeablen TRP-Kanäle, und dessen anschließender funktionellen Charakterisierung über fluorometrische und elektrophysiologische Messungen.

### 4.1 Klonierung des LTRPC2 und seiner Spleißvarianten aus mRNA von HL-60 Zellen

Der LTRPC2 wurde erstmals 1998 von Nagamine und Mitarbeitern bei genetischen Vergleichsstudien beschrieben [140]. Aufgrund der Sequenzhomologie und dem hypothetischen Strukturaufbau ließ sich der LTRPC2 der Familie der TRP-Kationenkanäle zuordnen.

Eine starke endogene Expression von Mitgliedern der TRP-Familie, besonders des LTRPC2, wurde u.a. in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen, deren Aktivierung mit einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  einhergeht. Da zu Beginn dieser Arbeit keinerlei funktionelle Eigenschaften des LTRPC2 bekannt waren, sollte der LTRPC2 funktionell näher charakterisiert werden. Möglicherweise lassen sich anhand funktioneller Daten Rückschlüsse auf eine Bedeutung des LTRPC2 für den neutrophilen Granulozyten ziehen, z.B. während des Entzündungsgeschehens.

#### 4.1.1 Klonierungsstrategie

Die Synthetisierung der cDNA, die den gesamten kodierenden Bereich (ORF) des LTRPC2 enthält, erfolgte über zwei PCR Schritte. Aufgrund der Größe des ORF von 5,2 kb, die möglicherweise problematisch für eine Amplifizierung gewesen wäre, wurden zwei Segmente mit annähernd gleicher Größe amplifiziert. Über eine geeignete Restriktionsschnittstelle wurden diese Segmente ein 5'-Segment von 2,5 kb, das für das sog. aminoternale Ende (N-Terminus) kodiert und ein 3'-Segment von 3,2 kb, das entsprechend für das carboxyterminale Ende (C-Terminus) kodiert, anschließend zum gesamten ORF zusammengefügt. Als Restriktionsschnittstelle wurde die SphI Site an Position 2736 gewählt (Positionsangaben beziehen sich auf die von Nagamine und Mitarbeitern veröffentlichten Sequenz; *Accession Number* A001535).

Für die einzelnen PCR Schritte wurden als *Primer* synthetische Oligonukleotide verwendet, abgeleitet von der durch Nagamine und Mitarbeitern veröffentlichten Sequenz (Information zu Sequenz und Lokalisation der *Primer* siehe Abschnitt 3.2.4.).

Zur Amplifizierung des 5'Segments war zu beachten, daß es bei der vorausgehenden Reversen Transkription von langen RNA Matrizen zu einem vorzeitigen Kettenabbruch der Reversen Transkriptase kommen kann, z. B durch Sekundärstrukturen. Daher wurde zur Amplifizierung des 5'Bereichs von LTRPC2 bei der cDNA Synthese aus mRNA von HL-60 Zellen anstelle von Oligo(dT) *Primern*, das LTRPC2 genspezifische Oligonukleotid PK5 als *Primer* eingesetzt. Hinterher konnte mit dem *Primer*paar PK6/PK7 und in einer folgenden *nested* PCR mit den *Primern* PK8/PK9 das 5'Segment amplifiziert werden.

Das 3'Segment, konnte aus mRNA von HL-60 Zellen mit den *Primern* PK1/PK2 und über eine *nested* PCR mit den *Primern* PK3/PK4 amplifiziert werden.

Sowohl das 5'- als auch das 3'Segment wurden über das *TA-Cloning*-Verfahren mit dem Vektor pCRII ligiert und standen weiteren Klonierungsschritten zur Verfügung.

#### 4.1.2 Subklonierung in pBluescript SK (-)

Wie bereits erwähnt sollte die Ligation der beiden Teilsegmente zur vollständig kodierenden Sequenz an der SphI Restriktionsschnittstelle beider Segmente erfolgen.

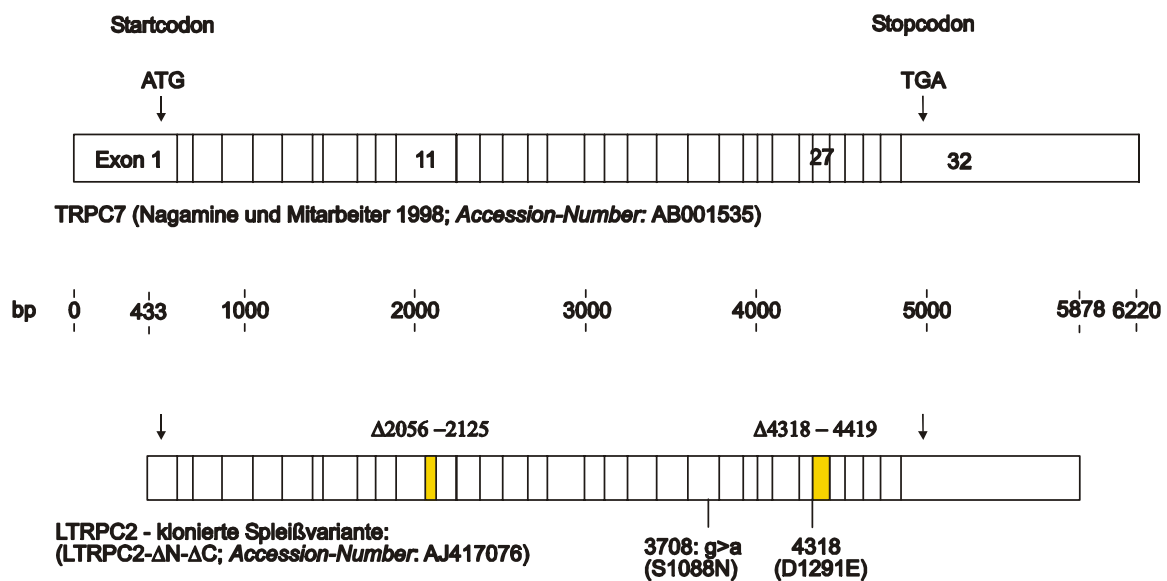
Da der pCRII-Vektor zwei SphI Schnittstellen und ein für anschließende funktionelle Untersuchungen ausgewähltes eukaryontisches Vektorkonstrukt (pcDNA3-EGFP) drei SphI Schnittstellen besitzt, war für das Zusammenfügen der beiden Teilsegmente eine Subklonierung notwendig, für das der prokaryontische Expressionsvektor pBluescript SK(-) ausgewählt wurde.

Das 5'Segment des LTRPC2 wurde mit Hilfe der Restriktionsstellen XhoI und SpeI aus den Vektor pCRII isoliert und in den multiplen Klonierungsbereich (MCS) des Vektor pBluescript SK(-) eingefügt. Für das 3'Segment erfolgte ein enzymatischer Verdau mit den Endonukleasen SphI und SpeI. Nach entsprechender Linearisierung des Vektors pBluescript SK(-) mit dem 5'Segment als Insert, konnten beide Teilsegmente über die Schnittstelle SphI zum gesamten ORF ligiert werden.

Das resultierende 5.2 kb große Insert wurde hinterher gerichtet in das eukaryontische Vektorkonstrukt pcDNA3-EGFP über die Restriktionsschnittstellen KpnI und XbaI der MCS des Vektors kloniert.

### 4.1.3 Klonierung der Spleißvarianten

Sequenzvergleiche mit der von Nagamine und Mitarbeitern veröffentlichten Sequenz des LTRPC2, am Ende der molekularbiologischen Arbeiten ergaben, daß es sich bei der in dieser Arbeit aus undifferenzierten HL-60 Zellen gewonnene cDNA um eine Spleißvariante des LTRPC2 handelt (Siehe Abb. 6; Abb. 7 und Abb. 8)



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Sequenz von LTRPC2-ΔN-ΔC im Vergleich zur ursprünglich von Nagamine und Mitarbeitern veröffentlichten Sequenz des LTRPC2 (TRPC7).

In der unteren Sequenz sind die fehlenden Bereiche des LTRPC2-ΔN-ΔC durch gelbe Markierungen angedeutet. Nukleotidmutationen des Guanin an Stelle 3708 zu Adenin hat einen Austausch der Aminosäure 1088, Serin, zu Asparagin zur Folge, desweiteren führt die Deletion an Stelle 4318 zu dem Austausch der Aminosäure 1291, Aspartat, zu Glutamat.

5'Bereich	
LTRPC2	GGACCACCAG CTGAAACTGG CAGTGGCATG GAATCGCGTG GACATTGCCG GCAGTGAGAT CTTCATGGAT GAGTGGCAGT GGAAGCCTTC AGATCTGCAC 1900
LTRPC2	CCCACGATGA CAGCTGCACT CATCTCCAAC AAGCCTGAGT TTGTGAAGCT CTTCCCTGGAA AACGGGGTGC AGCTGAAGGA GTTTGTCAAC TGGGACACCT 2000
LTRPC2-ΔN	CCCACGATGA CAGCTGCACT CATCTCCAAC AAGCCTGAGT TTGTGAAGCT CTTCCCTGGAG AACGGGGTGC AGCTGAAGGA GTTTGTCAAC TGGGACACCT 1568
LTRPC2	TGCTCTACCT GTACGAGAAC CTGGACCCCT CCTGCCTGTT CCACAGCAAG CTGCAAAAGG TGCTGGTGGG GGATCCCGAG CGCCCGGCTT GCGCGCCCGC 2100
LTRPC2-ΔN	TGCTCTACCT GTACGAGAAC CTGGACCCCT CCTGCCTGTT CCACAGCAAG CTGCA----- ----- 1623
LTRPC2	GGCGCCCGC CTGCAATGC ACCACGTGGC CCAGTGCTG CGGGAGCTGC TGGGGGACTT CACGCAGCCG CTTTATCCCC GGCCCGGCA CAACGACCGG 2200
LTRPC2-ΔN	----- -GATGC ACCACGTGGC CCAGTGCTG CGGGAGCTGC TGGGGGACTT CACGCAGCCG CTTTATCCCC GGCCCGGCA CAACGACCGG 1708
LTRPC2	CTGCGGCTCC TGCTGCCCGT TCCCCAGTC AAGCTCAACG TGCAGGGAGT GAGCCTCCGG TCCCTCTACA AGCCTTCCTC AGGCATGTG ACCTTCACCA 2300
LTRPC2	TGGACCCCAT CCGTGACCTT CTCATTTGGG CCATTGTCCA GAACCGTCGG GAGCTGGCAG GAATCATCTG GGCTCAGAGC CAGGACTGCA TCGCAGCGGC 2400

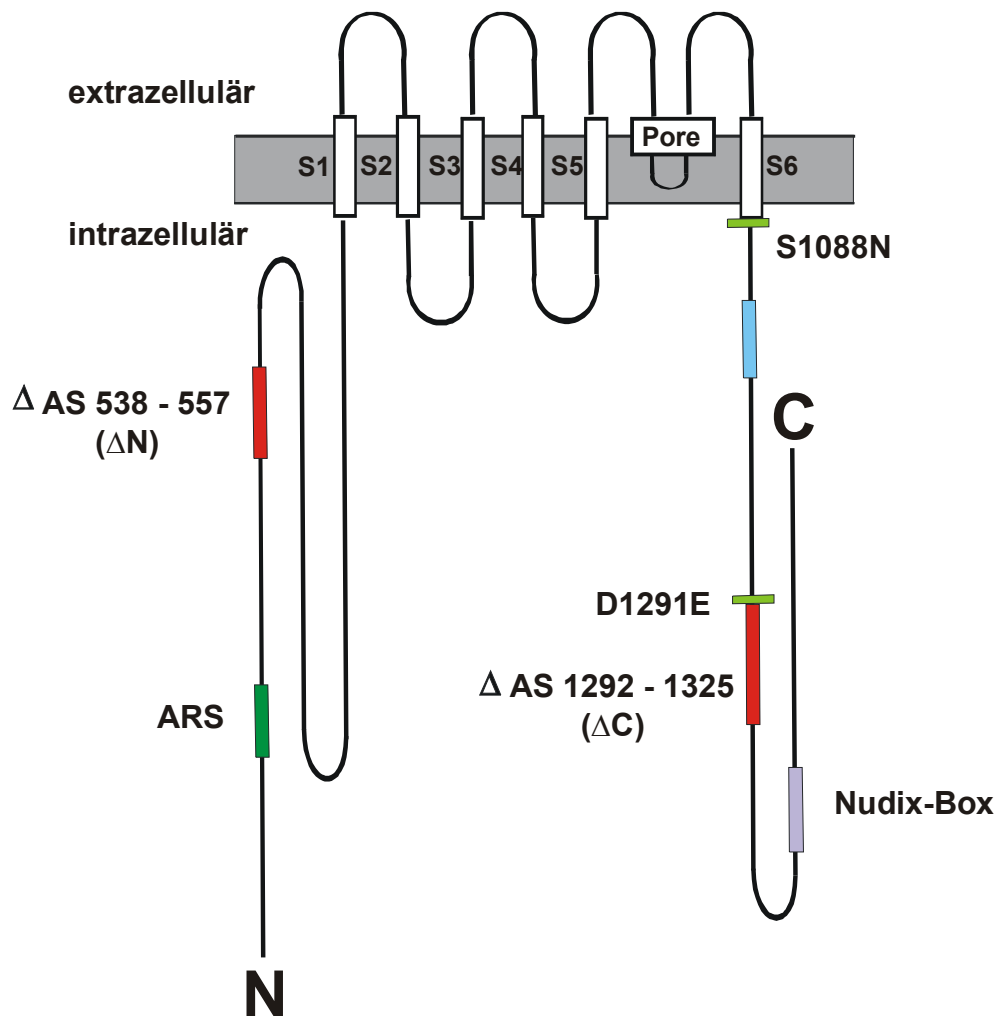
  

3'Bereich	
LTRPC2	GACAGCTACC ACGTGAATGC CCGGCACCTC CTCTACCCCA ACTGCCCTGT CACGCGCTTC CCCGTGCCCA ACGAGAAGGT GGCCTGGGAG ACGGAGTTCC 4250
LTRPC2	TGATCTATGA CCCACCCTTT TACACGGCAG AGAGGAAGGA CGCGGCCGCC ATGGACCCCA TGGGAGACAC CCTGGAGCCAC TGTCCACGAT CCACTACAA 4350
LTRPC2-ΔC	TGATCTATGA CCCACCCTTT TACACGGCAG AGAGGAAGGA CGCGGCCGCC ATGGACCCCA TGGGAGAG----- 3824
LTRPC2	CTGGTGGAT GGCCTGAGGG ACCCGCGGAG CTTCCACGGG CCGTACACAG TGCAGGCCGG GTTCCCTTG AACCCCATGG GCCGCACAGG ACTGCGTGGG 4450
LTRPC2-ΔC	----- -G AACCCCATGG GCCGCACAGG ACTGCGTGGG 3856
LTRPC2	CGCGGGAGCC TCAGTGCTTT CGGACCCCAAC CACACGCTGT ACCCCATGTT CACGCGGTGG AGGCGGAACG AGGATGGAGC CATCTGCAGG AAGAGCATAA 4550
LTRPC2	AGAAGATGCT GGAAGTGCTG GTGGTGAAGC TCCCTCTCTC CGAGCACTGG GCCTGCCTG GGGGCTCCCG GGAGCCAGGG GAGATGCTAC CTCGGAAGCT 4650

**Abb. 7: Informationen zu den Sequenzen von LTRPC2-ΔN-ΔC im Vergleich zu LTRPC2**

In Rot angedeutet sind die Nukleotidveränderungen der Spleißvariante. Pfeile stellen schematisch *Primer* da, über die die Expression der beiden Varianten des 5'Bereichs und 3'Bereichs in HL-60 Zellen und in neutrophilen Granulozyten mittels PCR nachgewiesen wurde (siehe auch Abschnitt 4.1.4).





**Abb. 8: Theoretisches Strukturmodell des LTRPC2**

Neben dem langen N-terminalen und C-terminalen Ende sind die bislang bekannten Domänen des LTRPC2 angedeutet, die „Achrachidonic acid-responsive sequence“ (ARS), die „TRP-Domäne, deren Eigenschaften noch nicht geklärt sind, und die „Nudix-Box“, die Merkmale einer Pyrophosphatase aufweist. Außerdem sind schematisch die Spleißstellen im N-terminalen Ende von der Aminosäure 538 – 557 und im C-terminalen Ende von der Aminosäure 1292 – 1325 dargestellt, sowie Aminosäureaustauscher an Position 1088, Serin gegen Asparagin, und an Position 1291, Aspartat gegen Glutamat, jene Bereiche, die sich von der ursprünglich veröffentlichten Sequenz unterscheiden [140].

N = N-terminales (aminoterniales) Ende, C = C-terminales (carboxyterminales) Ende, S1 - S6 = transmembranäre Domäne 1 – 6

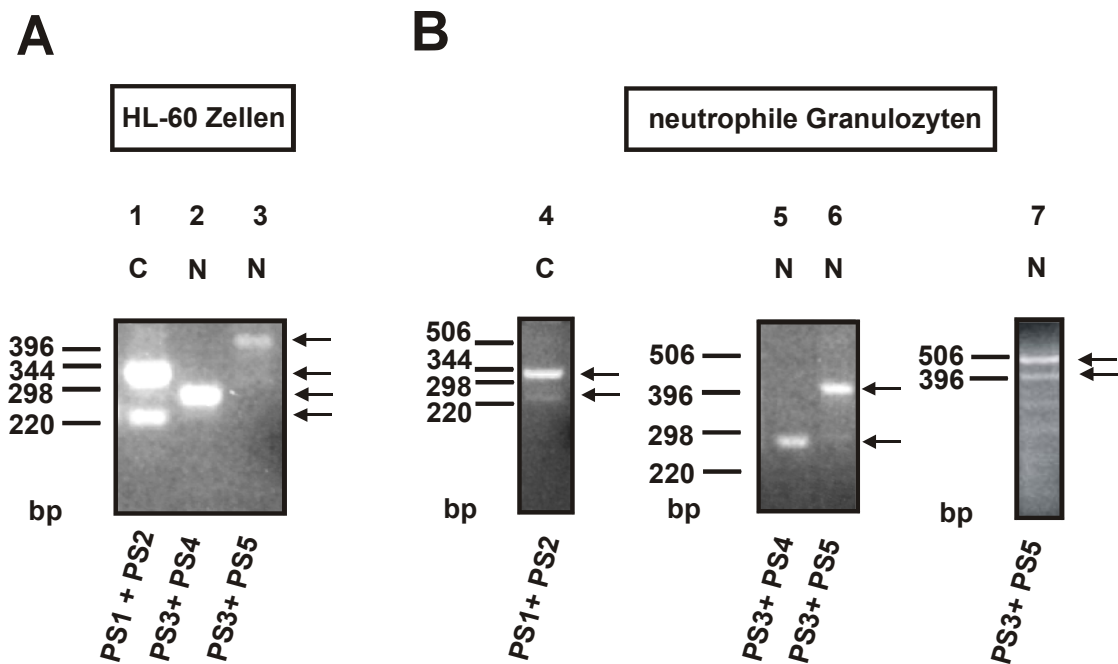
Bezogen auf das theoretische Strukturmodell von LTRPC2 (Abb. 8) besitzt die anfänglich klonierte Form strangaufwärts der hydrophobe Regionen eine Deletion von 20 Aminosäuren im N-terminalen Bereich, beginnend von der Aminosäure 538 bis 557 und zusätzlich eine

Deletion strangabwärts der hydrophoben Regionen im C-terminalen Bereich, die 34 Aminosäuren umfaßt, beginnend von der Aminosäure 1292 bis 1325. Außerdem kommt es in der klonierten Variante durch eine Punktmutationen zu dem Austausch der Aminosäure 1088, Serin, die sich direkt der 6. Transmembrandomäne anschließt, die zu Asparagin (S1088N) wird. Die Aminosäure 1291, Aspartat, wird aufgrund des Spleißens zu Glutamat (D1291E). Diese ursprünglich gewonnene Variante mit den zwei Deletionen (LTRPC2- $\Delta$ 538-557- $\Delta$ 1292-1325) wird in dieser Arbeit weiterhin als LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C (*Accession-Number*: AJ417076) bezeichnet (siehe auch Nomenklatur Abschnitt 4.2.2.1).

#### **4.1.4 Nachweis der LTRPC2 Varianten in HL-60 Zellen und neutrophilen Granulozyten mittels RT-PCR**

Um sicher zu gehen, daß es sich bei der klonierten Variante um keinen PCR-Artefakt handelt, wurde mittels PCR die Expression der mRNA, die für die jeweiligen Spleißvarianten kodieren, in HL-60 Zellen und neutrophilen Granulozyten überprüft. Als *Primer* für die Polymerase dienten spezifische Oligonukleotide PS-1 bis PS-9, die ausgehend von der LTRPC2- Sequenz synthetisiert wurde (Informationen zu den *Primern* siehe Abb. 7 und Abschnitt 3.2.4.2).

In Abb. 9 A sind die in einem Agarosegel aufgetrennten Banden der cDNA-Segmente zu sehen, die aus mRNA undifferenzierter HL-60 Zellen amplifiziert werden konnten. Pfeile weisen auf die spezifischen Banden hin.



**Abb. 9:** Expression der kurzen und langen Form der 5' (N-terminale) und 3' (C-terminale) Region der LTRPC2 mRNA in HL-60 Zellen (A) und in neutrophile Granulozyten (B).

Jede Spur repräsentiert das Ergebnis einer RT-PCR mit einem spezifischen *Primer*paar. Pfeile deuten auf die spezifischen Banden mit der zu erwartenden Größe hin (genauere Information siehe Text).

Die Bandengröße der cDNA Segmente in Spur 1 entsprechen den theoretisch ermittelten Größen von 327 bp und 225 bp, die sich bei der Verwendung von *Primer* PS-1 und PS-2 ergeben, wenn mRNA exprimiert wird, die jeweils für eine der beiden Spleißvarianten des C-Terminus kodieren. In Spur 2 ist ein Amplifikat zu sehen, das dem errechneten Wert von 272 bp entspricht, wenn das *Primer*paar PS-3 und PS-4 eingesetzt wird. Dieses Fragment kann nur gewonnen werden, wenn mRNA exprimiert wird, die für die lange Form des N-Terminus kodiert (siehe Abb. 7). Anhand der Größe des cDNA-Fragment in Spur 3, das mit dem *Primer*paar PS-3 und PS-5 amplifiziert wurde, kann man auf die Expression von mRNA schließen, die für die kurze Form des N-Terminus kodiert, welches bei diesem *Primer*paar eine theoretische Länge von 406 bp umfaßt. Ein Amplifikat, das der errechneten Größe von 466 bp entspricht, wenn mRNA exprimiert wird, die für die lange Form des N-Terminus kodiert, konnte mit dem *Primer*paar PS-3 und PS-5 nur gewonnen werden, wenn eine *nested* PCR durchgeführt wurde (nur gezeigt für neutrophile Granulozyten in Spur 7, Abb. 9 B).

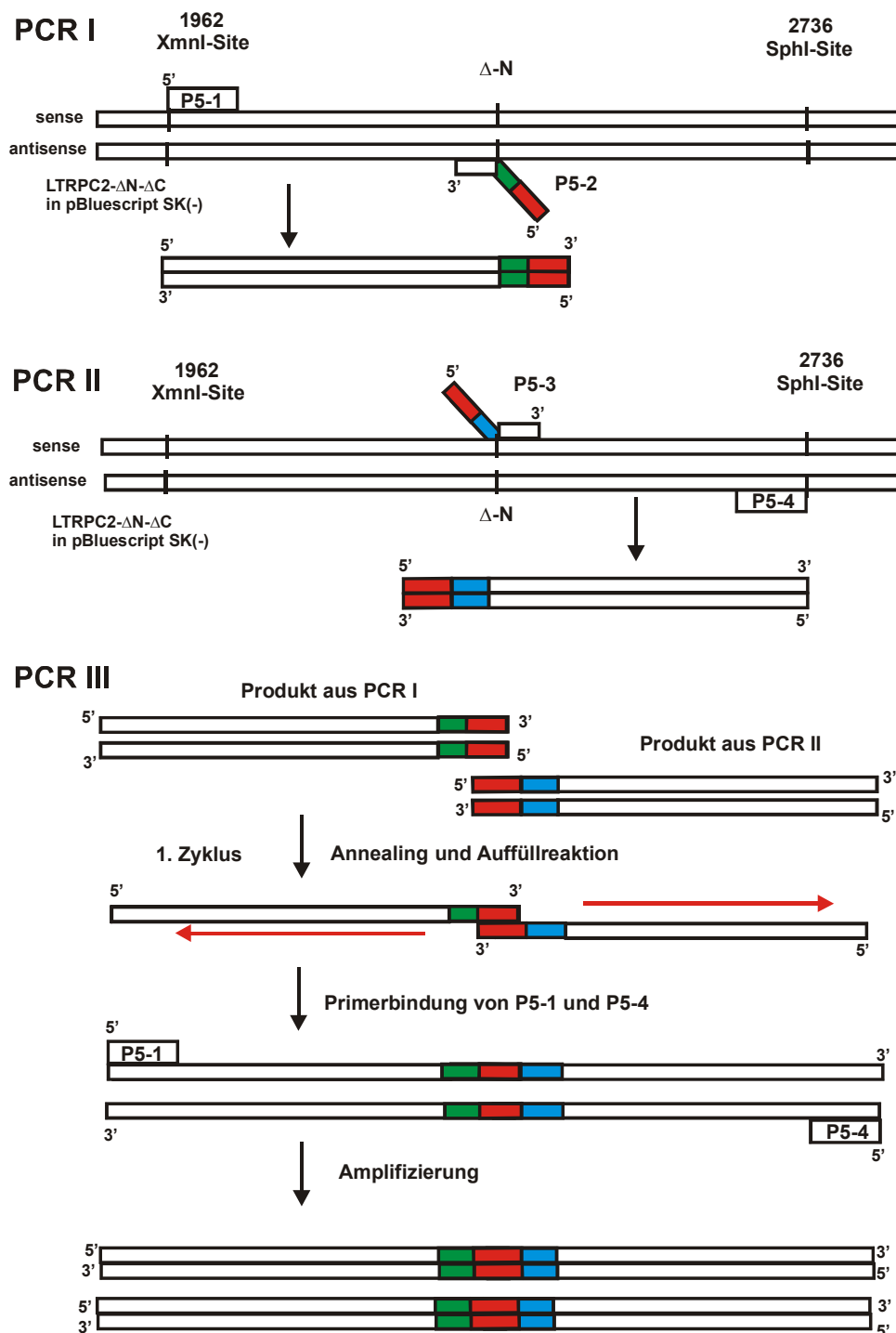
In Abb. 9 B sind die Amplifikate zu sehen, die aus mRNA von neutrophilen Granulozyten gewonnen wurden, wie sie mit den gleichen *Primer*paaren aus mRNA von HL-60 Zellen erzielt werden konnten. Spur 4 zeigt die cDNA Segmente mit den erwarteten Größen, die sich bei einer Expression der mRNA ergeben, die für beide Varianten des C-Terminus kodiert. In Spur 5 ist das Ergebnis zu sehen, das sich bei einer Expression von mRNA ergibt, aus der die lange Form des N-Terminus resultiert, in Spur 6 entsprechend einer mRNA-Expression für die kurze Form.

Diese Ergebnisse ließen sich sowohl anhand leicht modifizierter *Primer*paare (Kombinationen aus den Primern PS-1 bis PS-9) als auch in mehreren voneinander unabhängigen mRNA-Isolationen reproduzieren (Daten nicht gezeigt). Alle PCR-Ergebnisse konnten durch anschließende Sequenzierungen bestätigt werden.

## **4.2 Klonierung der LTRPC2 Varianten für funktionale Untersuchungen**

### **4.2.1 Klonierung der LTRPC2-Variante LTRPC2- $\Delta$ C**

Für funktionelle Untersuchungen bzw. zum Erhalt des ungespleißten LTRPC2, war es notwendig, die fehlenden Sequenzbereiche in die Spleißvariante LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C einzufügen. Zur Vervollständigung des N-Terminus wurden auf der entsprechenden cDNA zwei Restriktionsschnittstellen strangaufwärts und strangabwärts der Deletion gewählt die *XmnI-Site* an Position 1962 und die bereits erwähnte *SphI-Site* an Position 2736. Ein cDNA-Segment, das den ungespleißten 5' Bereich umfaßt, wurde mit Hilfe drei aufeinanderfolgenden PCR-Läufe amplifiziert (Siehe Abb. 10).



**Abb. 10: Klonierung der LTRPC2 Variante mit vollständigen N-Terminus**

In der RT-PCR I und II werden mit Hilfe der *Primer* P5-2 und P5-3 zwei Teilstücke der einzufügenden Sequenz amplifiziert. Beide Teilstücke besitzen einen komplementären Bereich. Werden diese Amplifikate aus PCRI und II in einer dritten PCR als Matrize eingesetzt, kommt es nach Denaturierung und beim Annealing im ersten Zyklus der dritten PCR zu einer komplementären Basenbindung der Teilsequenzen im entsprechenden Bereich. Durch die Polymerase erfolgt eine

Auffüllreaktion der beiden Teilstücke zum kompletten, einzufügenden Fragment, das die Restriktionsschnittstelle XmnI bis SphI, einschließlich der 60 Nukleotide der Deletionsstelle, umfaßt. Anschließend kann mit den *Primern* P5-1 und P5-4 das komplette Fragment exponentiell amplifiziert und über die Schnittstellen in LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C substituiert werden.

$\Delta$ N = Deletionsstelle im N-Terminus der verkürzten LTRPC2 Variante.

Dabei wurden folgende *Primer* verwendet:

für die erste PCR der *Sense-Primer* (P5-1) 5'-TGTGAAGCTCTTCCTGGACG-3' und der *Antisense-Primer* (P5-2) 5'-CGCGCAACGCGGGCGCTCGGGATCCTCCACCAGCACCTTTGCAGCTTGCT-3' für die zweite PCR der *Sense-Primer* (P5-3) 5'-CCGAGCGCCCGGCTTGCGCGCCCGCGGGCGCCCCGCCTGCACATGCACCA CG-3', sowie der *Antisense-Primer* (P5-4) 5'-CTGCATGCACAGGGTCACACG-3'.

Als Matrize für die beiden ersten PCR wurde der LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C in pBluescript SK(-) eingesetzt.

Die *Primer* der ersten PCR wurden so konstruiert, daß der *Sense-Primer* P5-1 an der XmnI-*Site* und der *Antisense-Primer* P5-2 strangaufwärts direkt vor der Deletionsstelle bindet, dabei trägt P5-2 zusätzlich 40 Nukleotide des fehlenden Sequenzbereiches. Das Amplifikat reicht entsprechend von der XmnI-*Site* bis zur Deletionsstelle, ist aber um 40 Nukleotide zusätzlich zur Deletionsstelle länger.

Für den zweiten PCR-Lauf wurden die *Primer* so gewählt, daß *Sense-Primer* P5-3 mit den letzten 11 Nukleotiden seines 3' Bereich strangabwärts direkt nach der Deletionsstelle bindet, im vorangehenden 5' Bereich ebenfalls 40 Nukleotide der fehlenden Sequenz trägt. *Antisense-Primer* P5-4 bindet an der SphI-Schnittstelle. Das Produkt dieser PCR beinhaltet den Bereich von der Deletionsstelle bis zur SphI-*Site*, ist aber ebenfalls um 40 Nukleotide der fehlenden Sequenz länger. Da die Deletionsstelle 60 Nukleotide lang ist, überlappen sich komplementär zueinander die beiden PCR-Produkte in einem Bereich von 20 Nukleotiden, entsprechend der *Sense*- und *Antisense*-Richtung von *Primer* P5-3 und P5-2.

Im dritten PCR-Lauf werden von der ersten und der zweiten PCR jeweils 0,5  $\mu$ l als Matrize und als *Primer* P5-1 und P5-4 eingesetzt. Die Überlegung dabei war, daß nach dem ersten Denaturierungsschritt die Amplifikate aus 1 und 2 durch ihre überlappenden Bereiche beim Annealing komplementär zueinander binden und entsprechend die Stränge bis zur jeweiligen Schnittstelle durch die Polymerase aufgefüllt werden. In den weiteren Zyklen der PCR wird durch die *Primer* P5-1 und P5-4 exponentiell der Bereich zwischen XmnI-*Site* und SphI-*Site*, inklusive der vollständigen 60 Nukleotide der Deletionsstelle, vervielfältigt.

Über die Schnittstellen wurde dieses Segment mit den zusätzlichen 60 Nukleotiden in den Klon LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C in pBluescript SK(-) substituiert, so daß eine neue Variante des LTRPC2 mit vollständigem N-Terminus, der LTRPC2- $\Delta$ C in pBluescript, konstruiert wurde. Wie bereits für LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C beschrieben, wurde auch die neue Variante, LTRPC2- $\Delta$ C anhand der erwähnten Schnittstellen in das Vektorkonstrukt pcDNA3-EGFP gerichtet kloniert.

#### 4.2.2 Klonierung der LTRPC2 Variante, LTRPC2- $\Delta$ N und Klonierung des LTRPC2

Zur Klonierung der cDNA Variante, die für den vollständigen C-terminalen Bereich des LTRPC2 kodiert, wurden für einen PCR-Lauf folgender *Sense-Primer* ausgewählt:

(P3-1) 5'-GCGGCCGCCATGGACCCCATGGGAGACACCCTGGAGCCACTGTCCACGATCCAGTACAACGTGGTGGATGGCCTGAGGGACCGCCG-3', der an der NotI Restriktionsschnittstelle an Position 4298 bindet, den Bereich bis zur Deletionsstelle und zusätzlich 60 Nukleotide der Deletion umfaßt (deren Größe insgesamt 102 Nukleotide beträgt).

Für den Gegenstrang wurde folgender *Antisense-Primer* verwendet: (P3-2) 5'-GCATACTAGTCAGTCAGTAGTGAGCCCCG-3'. Dieser *Primer* war so konstruiert, daß er am Stop-Codon bindet und eine zusätzliche, in der ursprünglichen Sequenz nicht vorhandene SpeI Schnittstelle besitzt. Über diese Schnittstelle nach dem Stop-Codon war es möglich, das amplifizierte Teilsegment in die Spleißvariante LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C einzufügen.

Als Matrize für den PCR-Lauf wurde cDNA von HL-60 Zellen eingesetzt. Durch die bereits erwähnten Expressionsstudien (siehe Abb. 9) konnte gezeigt werden, daß in HL-60 Zellen mRNA exprimiert werden, die für beide Varianten des C-Terminus kodieren, so daß der *Sense-Primer* P3-1 in der Lage ist, komplementär an die entsprechend ungespleißte cDNA zu binden. Mit Hilfe des *Antisense-Primers* P3-2 konnte ein Produkt amplifiziert werden, das von der NotI-Site bis zum Stop-Codon den ungespleißten Bereich des 3' Segments umfaßt.

Über die Schnittstelle NotI und die künstlich, nach dem Stop-Codon angefügte Schnittstelle SpeI, wurde dieses 650 bp große Produkt sowohl in LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C als auch in LTRPC2- $\Delta$ C, jeweils in pBluescript SK(-), ersetzt. Die resultierenden cDNA-Konstrukte

kodieren für eine LTRPC2 Variante mit ungespleißtem C-Terminus, LTRPC2- $\Delta$ N, und für den gesamten LTRPC2.

Beide Varianten wurden anschließend, wie bereits beschrieben, über die Schnittstellen XbaI und KpnI in den Vektor pcDNA3-EGFP gerichtet kloniert.

Alle Konstrukte wurden durch Restriktionsanalysen und durch Sequenzierungen an den Ligationstellen überprüft und bestätigt. Rekombinante Klone wurden durch Restriktionsanalysen bestätigt.

#### 4.2.2.1 Nomenklatur

Zusammengefaßt lagen am Ende der Klonierungsarbeiten folgende vier Varianten vor:

<b>Name</b>	<b>Deletion</b>
LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C	Deletion im N-Terminus von AS 538 – 557 und Deletion im C-Terminus von AS 1292 - 1325
LTRPC2- $\Delta$ N	Deletion im N-Terminus von AS 538 – 557
LTRPC2- $\Delta$ C	Deletion im C-Terminus von AS 1292 – 1325
LTRPC2	Protein mit kompletter Aminosäuresequenz

### 4.3 Funktionelle Untersuchungen des LTRPC2 und seiner Varianten

#### 4.3.1 Auswahl geeigneter Expressionssysteme

Für die funktionelle Charakterisierung des LTRPC2 und seiner Varianten wurden eukaryontische Expressionssysteme ausgewählt, die sich bereits bei der Untersuchung anderer Ionenkanäle bewährt haben. Als Modell für Säugertierzellen wurden CHO-Zellen, und in Anlehnung an ein humanes System, wurden HEK 293 Zellen transient transfiziert.

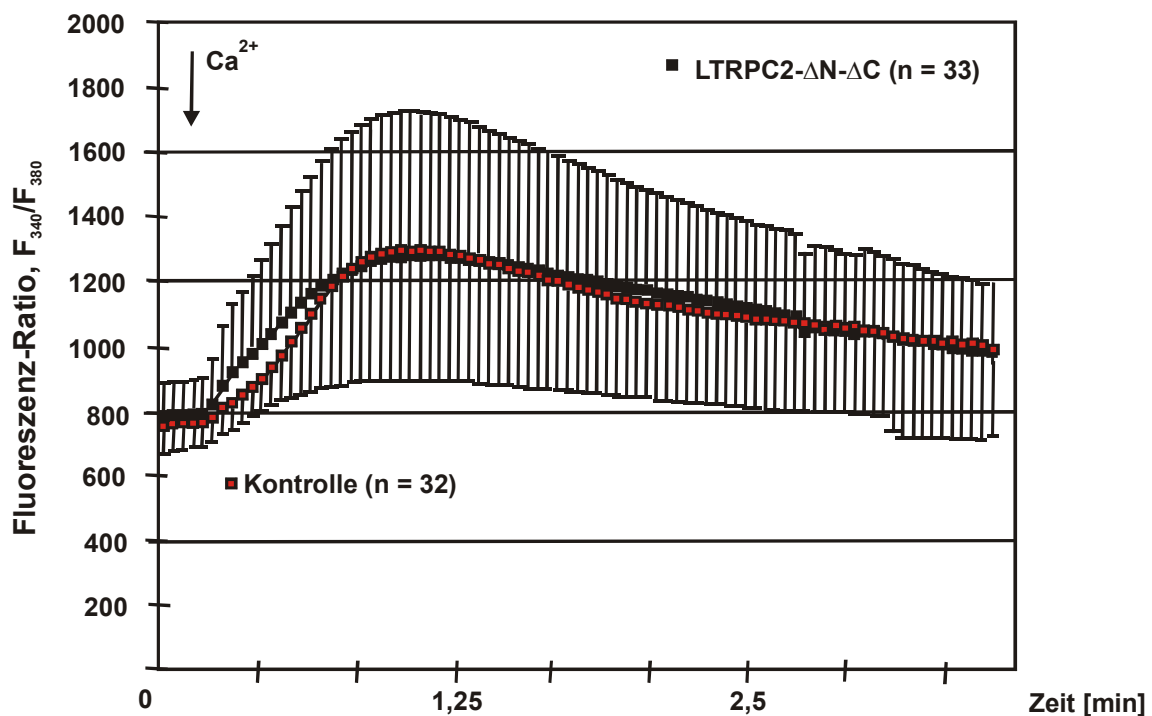


### 4.3.2 Fluorometrische Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration transfizierter CHO-Zellen nach Stimulation mit Thapsigargin

Über Fluoreszenzmessungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator fura2 kann eine quantitative Aussage über die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  einzelner Zellen gewonnen werden. Aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten, gemessen bei 510 nm, die sich für fura2 beladene Zellen bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm ergeben, lassen sich Rückschlüsse auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ziehen. Wird der Farbstoff fura2 mit der 340 nm angeregt, so verstärkt sich die Fluoreszenzintensität mit zunehmender Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an fura2 (bei Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), während die Intensität gleichzeitig bei der Anregung mit 380 nm abnimmt. Die Änderung des Quotienten, gebildet aus der Fluoreszenzintensität nach Anregung des Farbstoffes mit den beiden Wellenlängen spiegelt demnach die Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wider.

Abb. 11 zeigt als Beispiel das Ergebnis aus 8 unabhängigen Messungen von LTRPC- $\Delta\text{N}$ - $\Delta\text{C}$  transfizierten CHO-Zellen und Kontrollzellen (Vektor transfizierte Zellen), bei denen nach intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung mit Thapsigargin die Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über die Zeit verfolgt wurde. Nach dem Beladen der transfizierten Zellen, wurden die Zellen zu Beginn der Messung zur Speicherentleerung für fünf Minuten in einem Puffer inkubiert, der 5  $\mu\text{M}$  Thapsigargin und 1 M EGTA enthielt. Wird nach der Speicherentleerung anschließend die extrazelluläre Lösung durch einen Puffer ausgetauscht, der 1,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  enthält, kommt es zu einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , der auf einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Zellmembran basiert.

Zu sehen sind die gemittelten Fluoreszenzratiowerte von LTRPC- $\Delta\text{N}$ - $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen und Kontrollzellen mit den jeweiligen Standardabweichungen. Für die Messungen wurden Zellen ausgewählt, die eine grüne Fluoreszenz aufwiesen und als positiv transfiziert angesehen wurden.



**Abb. 11: Fluorometrische Messungen von LTRPC- $\Delta$ N- $\Delta$ C transfizierten CHO-Zellen und Kontrollzellen (Vektor transfizierte Zellen) nach Speicherentleerung mit Thapsigargin**

Die Zellen wurden vor der Messung für 5 min in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffer inkubiert, der 5  $\mu\text{M}$  Thapsigargin enthielt. Während der Messung wurde der Puffer gegen eine Badlösung ausgetauscht, die 1,2 mM  $\text{CaCl}$  enthielt. Der Pfeil deutet den Wechsel der Puffer an.

Abgebildet sind die gemittelten Fluoreszenzratiowerte mit Standardabweichungen von Kontrollzellen und LTRPC- $\Delta$ N- $\Delta$ C transfizierten CHO-Zellen, gebildet aus dem Quotienten der Fluoreszenzintensität bei 510 nm und einer Anregungswellenlänge von 340 zu 380 nm.

Die minimalen Ratiowerte, aufgrund minimaler  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach Speicherentleerung und Pufferung des  $\text{Ca}^{2+}$  durch EGTA zu Beginn der Messungen, sind von LTRPC- $\Delta$ N- $\Delta$ C transfizierten Zellen ( $n = 33$ ) und Kontrollzellen ( $n = 32$ ) erwartungsgemäß annähernd gleich. Nach Zugabe von 1,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in die Badlösung kommt es sowohl bei LTRPC- $\Delta$ N- $\Delta$ C transfizierten Zellen als auch in Kontrollzellen durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx zu einem steten Anstieg der Ratiowerte, die bei LTRPC- $\Delta$ N- $\Delta$ C transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen erhöht sind, die sich aber nicht signifikant voneinander unterscheiden (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,498$  bis  $0,102$  für den Zeitraum der Messung von 0,4 bis 0,8 Minuten). 1 bis 1,25 min nach Beginn der Messung wird nach dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ein Maximum in den Ratiowerten erreicht, das sich zwischen den beiden Zellgruppen ebenfalls nicht signifikant voneinander unterscheidet (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,236$ ). Im Vergleich von

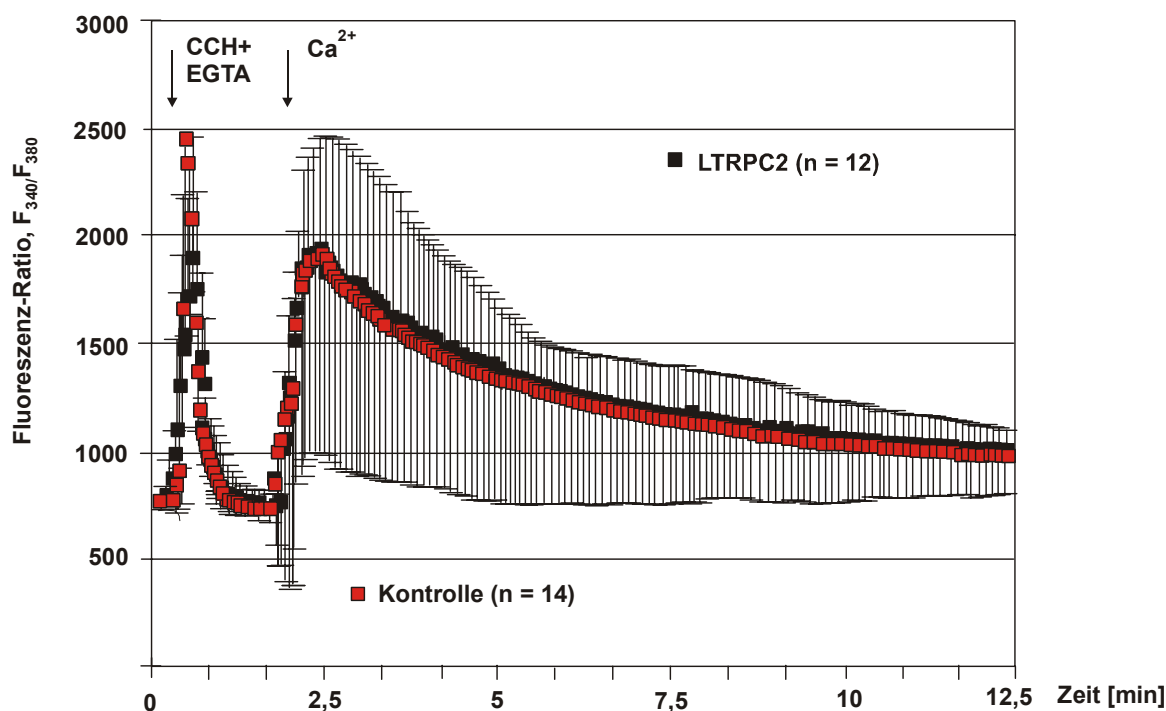
LTRPC- $\Delta$ N- $\Delta$ C transfizierten Zellen zu Kontrollzellen hat die vorausgehende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung mit Thapsigargin keinen Einfluß auf den sich anschließenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran. Ist LTRPC- $\Delta$ N- $\Delta$ C ein  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kanal, der in Abhängigkeit einer intrazellulären Speicherentleerung aktiviert wird, wäre unter diesen Versuchsbedingungen ein gesteigerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und damit eine erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den Kanal exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zu erwarten. Nach Erreichen der maximalen Ratiowerte sinkt bei beiden Zellgruppen der Fluoreszenzquotient, durch Abnahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Nach 2,5 bis 3,5 min pendeln sich die Fluoreszenzwerte bis zum Ende des Experiments, im Vergleich zu den Anfangswerten, auf leicht erhöhte Werte ein, die auf basale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zurückzuführen sind. Die hohen Standardabweichungen deuten auf große individuelle Schwankungen in der Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  hin, besonders nach Gabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffers. Auch bei Zellen, die mit LTRPC2 transfiziert wurden ( $n = 19$  aus 5 unabhängigen Messungen, Daten nicht gezeigt) sind im Vergleich zu den Kontrollzellen ( $n = 9$ ) keine signifikanten Unterschiede in den maximalen Fluoreszenzratiowerten nach Speicherentleerung mit Thapsigargin meßbar (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,381$ ). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß beide Varianten LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C in CHO-Zellen nicht durch einen von der Depletion intrazellulärer Speicher abhängigen Prozeß reguliert werden.

#### **4.3.3 Fluorometrische Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transfizierter HEK 293 Zellen nach Stimulation mit Charbachol**

Ein nächster Ansatz zur Charakterisierung des LTRPC2 und seiner Varianten war, den kompletten  $\text{IP}_3$ -Signaltransduktionsweg und damit dessen Metabolite als Regulatoren des Proteins zu berücksichtigen. In HEK 293 Zellen kann über Charbachol die  $\text{IP}_3$ -Signalkaskade ausgelöst werden, da diese Zellen den G-Protein gekoppelten, muskarinen Acetylcholinrezeptor M2 stabil exprimieren.

Nach Beladen transfizierter HEK Zellen mit dem Farbstoff fura2 wurden zunächst die Fluoreszenz Ratiowerte in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Meßpuffer bestimmt, bevor die Zellen mit einem Puffer inkubiert wurden, der 200  $\mu\text{M}$  Charbachol und 1 mM EGTA enthielt.

In Abb. 12 zu sehen, sind die gemittelten Quotienten zweier unabhängiger, repräsentativer Messungen mit LTRPC2 transfizierten HEK 293 Zellen ( $n = 12$ ) und Kontrollzellen (Vektor transfizierte Zellen,  $n = 14$ ).



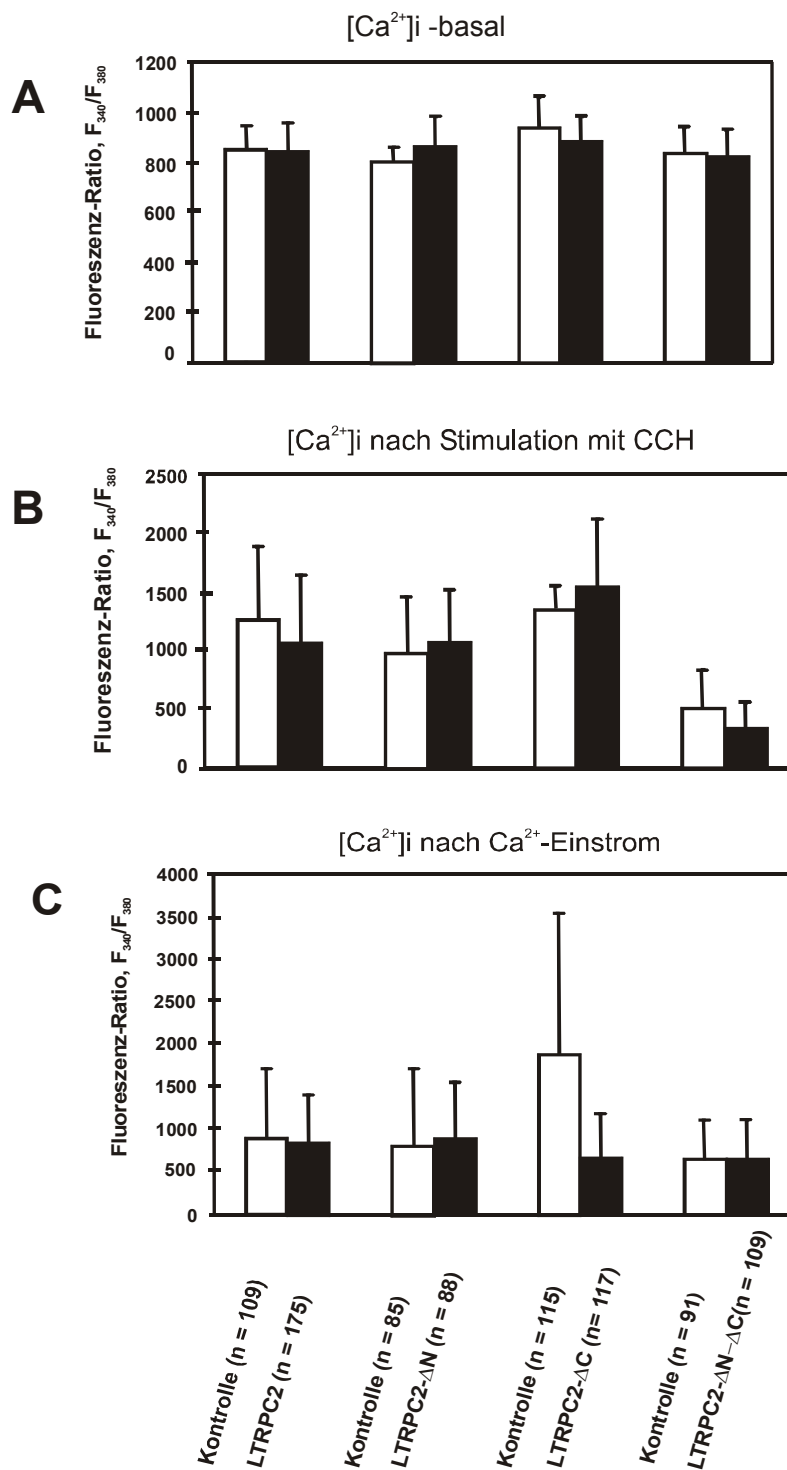
**Abb. 12: Fluorometrische Messungen von LTRPC2 transfizierten HEK 293 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nach Stimulation des  $IP_3$ -Signaltransduktionsweg mit Charbachol**

Nach Inkubation der Zellen im Standardbadpuffer (1,2 mM  $CaCl$ ) wurde die Stimulation des  $IP_3$ -Signaltransduktionswegs mit Charbachol (200  $\mu$ M) in einen  $Ca^{2+}$ -freien Puffer ausgelöst. Nach intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Speicherentleerung und Rückgang der  $[Ca^{2+}]_i$  auf minimale Werte wurde der Puffer durch eine  $Ca^{2+}$ -haltige Badlösung (1,2 mM) ausgetauscht. Pfeile deuten den Wechsel der jeweiligen Puffer an.

Abgebildet sind die gemittelten Fluoreszenzratiowerte mit Standardabweichungen von LTRPC2 transfizierten Zellen und Kontrollzellen aus zwei unabhängigen, repräsentativen Messungen.

Zu Beginn der Messungen ist der Fluoreszenzquotient, der auf basale  $[Ca^{2+}]_i$  beruht, für LTRPC2 transfizierte und Kontrollzellen gleich, eine konstitutive Aktivität des Kanals scheint demnach nicht gegeben zu sein. Nach Wechsel der Badlösung kommt es sowohl in LTRPC2 transfizierten als auch in Kontrollzellen durch intrazelluläre Speicherentleerung unmittelbar zu einem transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , die durch Pufferung des  $Ca^{2+}$  mit EGTA (1M) innerhalb von 1 min auf minimale Werte zurückkehren, was sich durch einen entsprechenden Peak in den Ratiowerten widerspiegelt. Wird nach Erreichen der minimalen  $[Ca^{2+}]_i$ , in einer EGTA-gepufferten Badlösung, der Puffer durch eine  $Ca^{2+}$ -haltige (1.2 mM) Lösung ausgetauscht, ist ein zweiter Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  bzw. ein Anstieg der Ratiowerte infolge eines  $Ca^{2+}$ -Einstroms über die Zellmembran bei allen Zellen zu beobachten. Die erhöhten Werte kehren langsam, in einem Zeitraum von 10 bis 15 min, auf basale Werte zurück. Obwohl die

Höhe der Konzentrationsänderungen zwischen den einzelnen Zellen stark schwankt, sind die Kinetiken der  $[Ca^{2+}]_i$ - Änderungen für alle Zellen nahezu gleich. In Abb. 13 zusammengefaßt sind die Ergebnisse der Messungen von HEK Zellen, die jeweils mit einer der vier LTRPC2 Varianten transfiziert worden sind.



**Abb. 13:** Vergleich der gemittelten Fluoreszenzratiowerten nach Stimulation von HEK 293 Zellen, transfiziert mit einer der LTRPC2 Varianten und dazugehörigen Kontrollzellen, mit Charbachol

In A sind dargestellt die gemittelten Fluoreszenzratiowerte mit Standardabweichungen, die sich bei einer basalen  $[Ca^{2+}]_i$  ergeben.

In B sind zu sehen, die maximalen Ratiowerte mit Standardabweichungen nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung durch Charbachol (200  $\mu\text{M}$ ) in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Badpuffer, abzüglich der basalen Fluoreszenzratiowerte.

In C sind die gemittelten, maximalen Ratiowerte mit Standardabweichung abgebildet, die sich im Anschluß an den „PI-Response“ durch Wechsel des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffer mit dem Standardpuffer (1,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) ergeben. Fluoreszenzratiowerte, die vorausgehend bei der minimalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu messen sind, wurden subtrahiert (siehe zum Kurvenverlauf auch Abb. 12 und Text).

Zu sehen sind die gemittelten Fluoreszenzratiowerte der einzelnen Varianten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen für drei Meßpunkte. In A sind die Ratiowerte der Fluoreszenz bei basalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  abgebildet, in B die Fluoreszenzwerte, die sich beim Erreichen der maximalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung, abzüglich der basalen Werte, ergeben. Die Ratiowerte in C resultieren aus der maximalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle nach Austausch des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffer gegen die Standardbadlösung (mit 1,2 mM  $\text{CaCl}$ ), abzüglich der Ratiowerte, die bei der minimalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffer gemessen werden.

Bei allen drei Meßpunkten sind für keine der vier Varianten signifikante Unterschiede der Fluoreszenzratio im Vergleich zu den Kontrollzellen vorhanden. Bei den basalen Werten ist kein Unterschied zu erkennen, der auf eine konstitutive Aktivität einer der Varianten schließen ließe (Mann-Whitney-U-Test  $p = 1,0$  bei LTRPC2- $\Delta\text{N}$ - $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen,  $p = 0,396$  bei LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen,  $p = 0,171$  bei LTRPC2- $\Delta\text{N}$  transfizierten Zellen, sowie  $p = 0,119$  bei LTRPC2 transfizierten Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen). Auch die Ratiowerte, die sich bei  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach Speicherentleerung (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,124$  bei LTRPC2- $\Delta\text{N}$ - $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen,  $p = 0,141$  bei LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen,  $p = 0,271$  bei LTRPC2- $\Delta\text{N}$  transfizierten Zellen und  $p = 0,732$  bei LTRPC2 transfizierten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen), oder durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ergeben, wenn nach Speicherentleerung ein  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Badpuffer eingewechselt wird, unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,951$  bei LTRPC2- $\Delta\text{N}$ - $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen,  $p = 0,055$  bei LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen,  $p = 0,404$  bei LTRPC2- $\Delta\text{N}$  transfizierten Zellen und  $p = 0,184$  bei LTRPC2 transfizierten Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen). Eine Regulierung einer der Varianten über den  $\text{IP}_3$ -abhängigen Signalweg scheint damit nicht gegeben zu sein.

#### 4.3.4 Elektrophysiologische Messungen transfizierter CHO- und HEK Zellen nach Stimulation des IP<sub>3</sub>-abhängigen Signaltransduktionsweges

Parallel zur Bestimmung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurden zur funktionellen Charakterisierung des LTRPC2 und seiner Varianten mit Hilfe der Patch-Clamp Technik Ströme über die Membran transfizierter Zellen gemessen.

Die ersten Experimente wurden an LTRPC2-ΔN-ΔC transfizierten CHO-Zellen und entsprechend an Kontrollzellen durchgeführt, da zunächst nur diese LTRPC2 Variante zur Verfügung stand, und erst später die übrigen Varianten kloniert wurden.

Zunächst wurde überprüft, ob durch die Expression der LTRPC2 Variante zusätzliche Ionenströme im Vergleich zu Kontrollzellen zu messen sind, die auf eine konstitutive Aktivität des LTRPC2-ΔN-ΔC schließen ließe.

Bei einem Haltepotential von – 60 mV und nach Erreichen der Ganzzellkonfiguration waren in einem Standardpuffer zum Teil erhöhte Basalströme in LTRPC2-ΔN-ΔC transfizierten Zellen (n = 3 von 16) sowie in Kontrollzellen (n = 2 von 11) nachweisbar, die sich aber in ihren Amplituden nicht signifikant voneinander unterschieden. Auch konnten diese erhöhten Basalströme bei beiden Zellpopulationen nicht selektiv durch das nicht permeable Kation N-methyl-D-glucamine (NMDG) im Austausch von Na<sup>+</sup> in der Badlösung gehemmt werden.

Wird eine Speicherentleerung über Thapsigargin (1 μM in der Badlösung) induziert, ist wiederum, weder bei LTRPC2-ΔN-ΔC transfizierten CHO-Zellen (n = 5 von 4 unabhängigen Experimenten) noch bei Kontrollzellen (n = 4) eine Erhöhung der Ströme meßbar. Auch eine Speicherentleerung durch IP<sub>3</sub> (10 μM) in der Pipettenlösung führt zu keiner Zunahme der Ströme in LTRPC2-ΔN-ΔC transfizierten CHO-Zellen (n = 6 in 4 voneinander unabhängigen Experimenten) und in Kontrollzellen (n = 4). Wird dem Badpuffer das DAG-Analogon OAG (100 μM) zugefügt, hat auch das keine Wirkung auf die meßbaren Ströme bei LTRPC2-ΔN-ΔC transfizierten CHO-Zellen (n = 12 in 5 voneinander unabhängigen Transfektionen), oder bei Kontrollzellen (n = 4).

Unterstützt werden die vorangegangene Ergebnisse durch Versuche an LTRPC2-ΔN-ΔC transfizierten HEK Zellen und durch Versuche, die mit HEK Zellen durchgeführt wurden, die mit einer der später klonierten LTRPC2 Varianten transfiziert worden waren.

Unter Verwendung des Standardpuffers konnte bei erhöhten Basalströmen kein Unterschied in der Amplitude zwischen den mit einer der LTRPC2 Varianten transfizierten Zellen



(LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C = 3 von 23; LTRPC2 n = 5 von 24; LTRPC2- $\Delta$ N n = 3 von 10; LTRPC2- $\Delta$ C n = 2 von 12) im Vergleich zu Kontrollzellen (n = 3 von 18) festgestellt werden. Auch ließen sich diese Ströme nicht durch NMDG blockieren.

Werden die einzelnen Zellen mit Charbachol (200  $\mu$ M) Badlösung stimuliert, entwickelt sich nach Stimulation des IP<sub>3</sub>-Weges weder bei den, mit einer der Varianten transfizierten HEK Zellen, noch bei den Kontrollzellen eine Stromzunahme (LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C n = 6 in 6 unabhängigen Experimenten; LTRPC2 n = 7 in 6 unabhängigen Transfektionen; LTRPC2- $\Delta$ N n = 5 in 5 Transfektionen; LTRPC2 - $\Delta$ C n = 7 in 5 Transfektionen; Kontrollzellen n = 6 in 6 unabhängigen Experimenten).

Im Zusammenhang mit den fluorometrischen Messungen zeigen die Resultate der Patch-Clamp Experimente, daß sowohl eine konstitutive Aktivität der LTRPC2 Varianten als auch eine Aktivierung über eine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Speicherentleerung, sowie eine Regulierung in Abhängigkeit von dem IP<sub>3</sub>-gesteuerten Signaltransduktionsweg ausgeschlossen werden kann. Diese Ergebnisse werden für den LTRPC2 in den veröffentlichten Arbeiten der Gruppen um Perraud, um Sano und um Hara bestätigt [67, 141, 142].

#### **4.3.5 Fluorometrische Messungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C transfizierter HEK 293 Zellen nach Stimulation mit hypo- und hyperosmotischen Badlösungen**

Mehrere veröffentlichte Daten zeigen, daß gerade die entfernt verwandten Mitglieder der TRP-Familie, zu denen der LTRPC2 zählt, nicht im Zusammenhang mit dem IP<sub>3</sub>-Signaltransduktionsweg stimuliert werden. Möglicherweise spielen alternative Mechanismen wie z.B. erhöhte Temperaturen durch Hitzeeinwirkung, osmotische Veränderungen des extrazellulären Milieus, oder Reagenzien wie Capsaicin eine Rolle [58, 59].

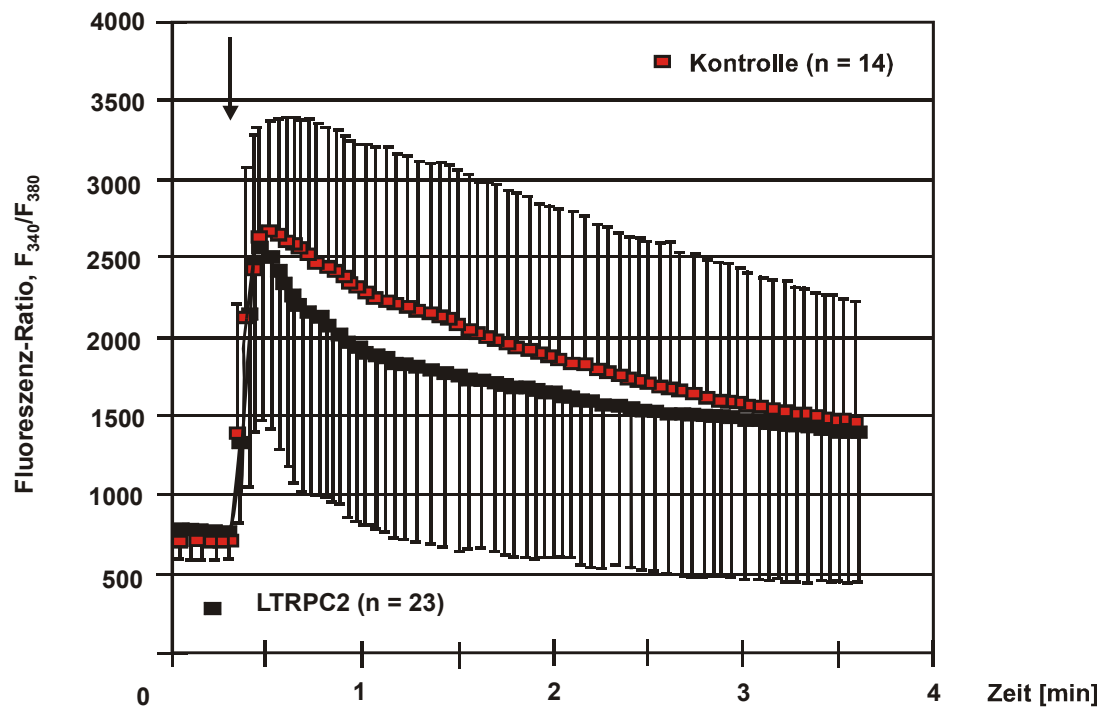
Unter diesem Aspekt wurde als Ansatz geprüft, inwiefern eine hyper- bzw. hypotonische Badlösung möglicherweise einen vermehrten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über den LTRPC2 in transfizierten HEK Zellen bewirkt.

Dazu wurde wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fluorometrisch über die Zeit verfolgt. Der isotonische Badpuffer wurde dabei durch einen Badpuffer ausgetauscht, dessen Osmolarität 270 mOsm bzw. 330 mOsm (durch Zugabe von Mannitol) betrug. Nach Austausch des Standardbadpuffers mit einem der osmotisch veränderten Puffer kommt es bei

allen Zellen unmittelbar zu einem Anstieg der Fluoreszenzwerte und damit zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , die langsam innerhalb von 7 min auf basale Werte zurückkehren.

Ein statistischer Unterschied in der maximalen  $[Ca^{2+}]_i$  nach Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ist zwischen LTRPC2 transfizierten HEK 293 Zellen weder bei einem hyperosmotischen Puffer ( $n = 16$  in 4 voneinander unabhängigen Messungen, Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,152$ ), noch bei einem hypoosmotischen Puffer ( $n = 49$  bei 8 voneinander unabhängigen Messungen, Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,106$ ) im Vergleich zu Kontrollzellen (Kontrollzellen  $n = 7$  bei hyper- und  $n = 30$  bei hypoosmotischen Puffer) zu sehen. Als Beispiel ist in Abb. 14 das Ergebnis aus sechs unabhängigen repräsentativen fluorometrischen Messungen von LTRPC2 transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen bei Verwendung eines hypoosmotischen Badpuffers zu sehen. Unmittelbar nach Wechsel des isotonischen Puffers gegen einen hypoosmotischen Puffers werden sowohl in LTRPC2 transfizierten Zellen, als auch in Kontrollzellen maximale Fluoreszenzwerte erreicht, die sich allmählich in einem Zeitraum von  $> 4$  min verringern und auf basale Werte zurückkehren. Unterschiede in den  $[Ca^{2+}]_i$ , die nach Erreichen der maximalen Werte bei LTRPC2 transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zu sehen sind, sind nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,053$ ).

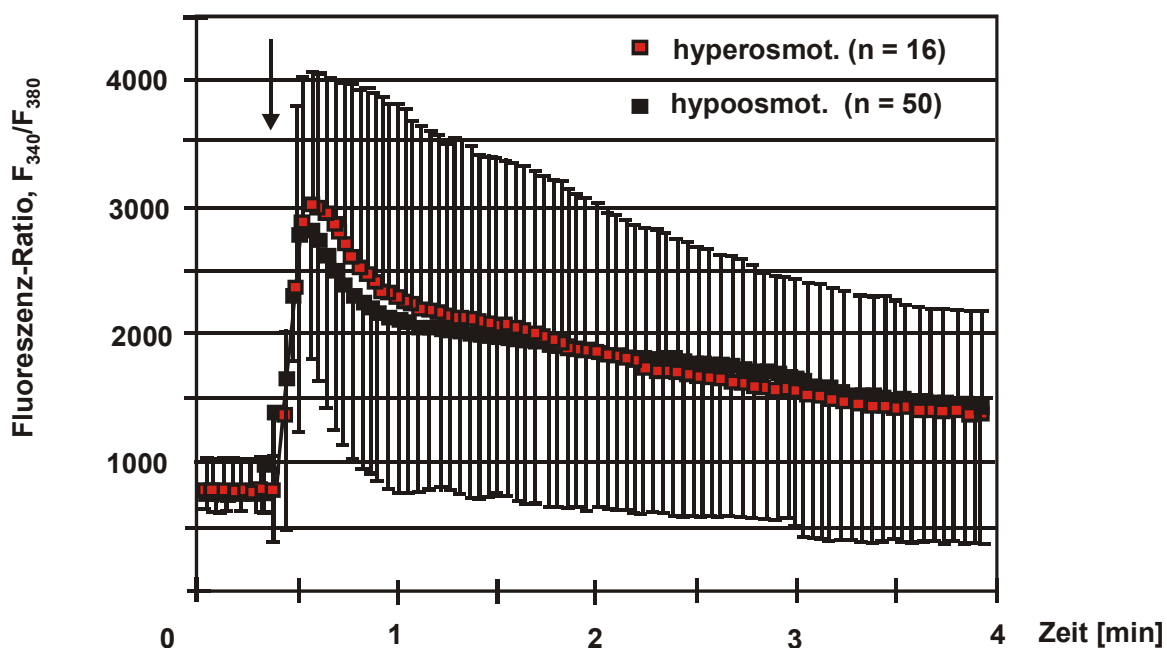
Vergleicht man die Änderung der Fluoreszenzwerte zwischen hyperosmotisch behandelten Zellen zu denen von hypoosmotisch behandelten Zellen ist zwar ein geringer Unterschied in der Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  zu erkennen (Abb. 15), der aber ebenfalls nicht signifikant ist (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,77$ ). Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, daß der LTRPC2 nicht in Abhängigkeit der Osmolarität reguliert wird.



**Abb. 14 Fluorometrische Messungen von LTRPC2 transfizierten HEK 293 Zellen und Kontrollzellen unter Verwendung eines hypoosmotischen Badpuffers**

Nach Inkubation der Zellen im Standardbadpuffer wurde der Puffer durch einen hypoosmotischen Puffer (270 mOsm) ausgetauscht. Der Pfeil deutet den Wechsel der Badlösungen an.

Abgebildet sind die gemittelten Fluoreszenzratiowerte mit Standardabweichungen beider Zellgruppen aus sechs unabhängigen, repräsentativen Messungen.



**Abb. 15: Vergleich der fluorometrischen Messungen von LTRPC2 transfizierten Zellen unter Verwendung von hyper- und hypoosmotischen Badlösungen**

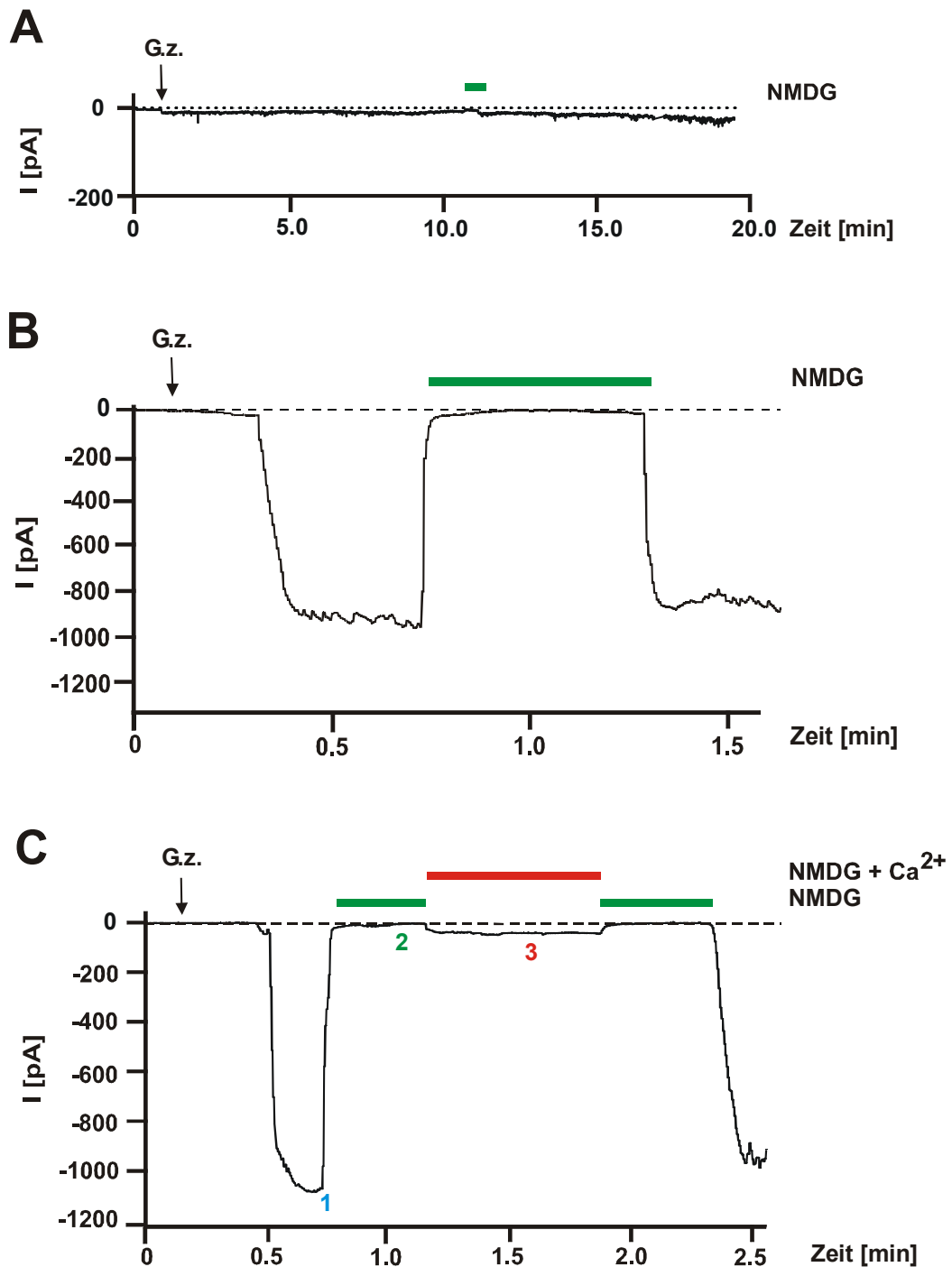
Nach Inkubation der Zellen im Standardbadpuffer wurde die Lösung durch einen hyper- bzw. hypoosmotischen Badpuffer ausgetauscht, angedeutet durch einen Pfeil. Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichungen für LTRPC2 transfizierte Zellen aus vier unabhängigen Messungen ( $n = 16$ ) bei Verwendung eines hyperosmotischen (330 mOsm) und aus acht unabhängigen Messungen ( $n = 50$ ) bei Verwendung eines hypoosmotischen (270 mOsm) Badpuffers.

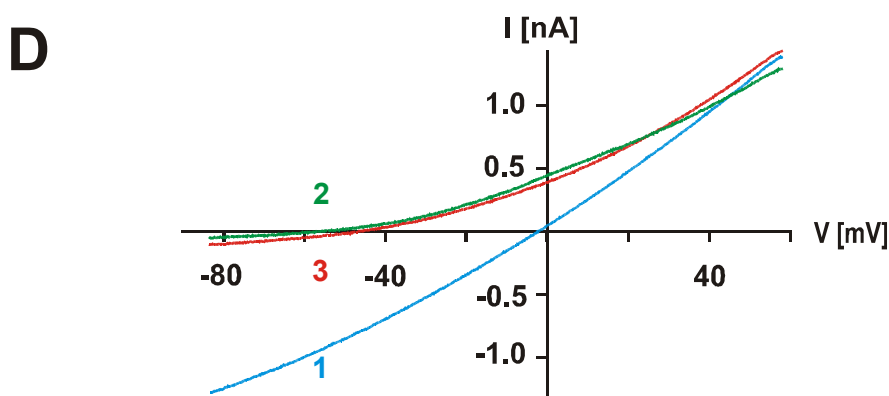
#### 4.3.6 Elektrophysiologische Messungen transfizierter HEK 293 Zellen nach Stimulation mit ADP-Ribose<sup>1</sup>

Die Arbeitsgruppe um Perraud berichtet zur Charakterisierung des LTRPC2, daß der LTRPC2 im C-terminalen Bereich eine Homologie zu dem Protein NUDT9 und zu dessen „Nudix box sequence motif“, dem MutT-Motiv, besitzt. Proteine mit einem „Nudix box motif“ verfügen über Eigenschaften von Pyrophosphatasen, die Phosphodinukleoside hydrolysieren [143]. Das spezifische Substrat für das Protein NUDT9 ist freie ADP-Ribose. Es konnte gezeigt werden, daß in LTRPC2 transfizierten HEK 293 Zellen über freie ADP-Ribose ein charakteristischer Strom stimuliert werden kann [67].

<sup>1</sup>Die elektrophysiologischen Messungen mit der Patch-Clamp Technik wurden am Institut in Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Eisfeld und Eberhard Jüngling durchgeführt.

Die Ergebnisse von Perraud und Mitarbeitern konnten, mit der in dieser Arbeit klonierten Form des LTRPC2, bestätigt werden (siehe Abb. 16).





**Abb. 16: Ganzzellmessung von repräsentativen LTRPC2 transfizierten HEK 293 Zellen**

A) Originale Aufzeichnung einer Vektor transfizierten HEK Zelle wenn 0,3 mM ADP-Ribose in der Patchpipette vorhanden ist. Das Haltepotential betrug bei A bis C  $-60$  mV. Der grüne Balken deutet ein Austausch des Standardbadpuffers gegen eine Lösung mit dem nicht permeablen Molekül NMDG (150 mM) statt  $\text{Na}^+$  an.

B) Originale Aufzeichnung einer LTRPC2 transfizierten HEK Zelle, wenn 0,3 mM ADP-Ribose in dem Pipettenpuffer vorhanden ist. Der grüne Balken deutet wie in A den Austausch eines NMDG-haltigen Puffers gegen den  $\text{Na}^+$ -haltigen Standardpuffer an.

C) zeigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität des LTRPC2. Nach Stimulation einer LTRPC2 exprimierenden Zelle mit ADP-Ribose (0,3 mM im Pipettenpuffer) im Standardbadpuffer (140 mM  $\text{Na}^+$ ), erfolgt ein Austausch des Puffers gegen eine NMDG-haltige,  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung (150 mM NMDG; grüner Balken) sowie eine Inkubation in einem NMDG- und  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Badpuffer (125 mM NMDG; 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ; roter Balken). Im Anschluß folgt eine wiederholte Inkubation in einem NMDG –Puffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$ , sowie im Standardbadpuffer.

D) zeigt die Strom-Spannungsbeziehung ADP-Ribose induzierter Ströme in einer LTRPC2 transfizierten HEK Zelle in Anwesenheit unterschiedlicher Ionenbedingungen (Experiment in C); Kurvenverlauf und Zeitpunkt (angedeutet in C) der jeweiligen Spannungsrampen sind durch Zahlen gekennzeichnet.

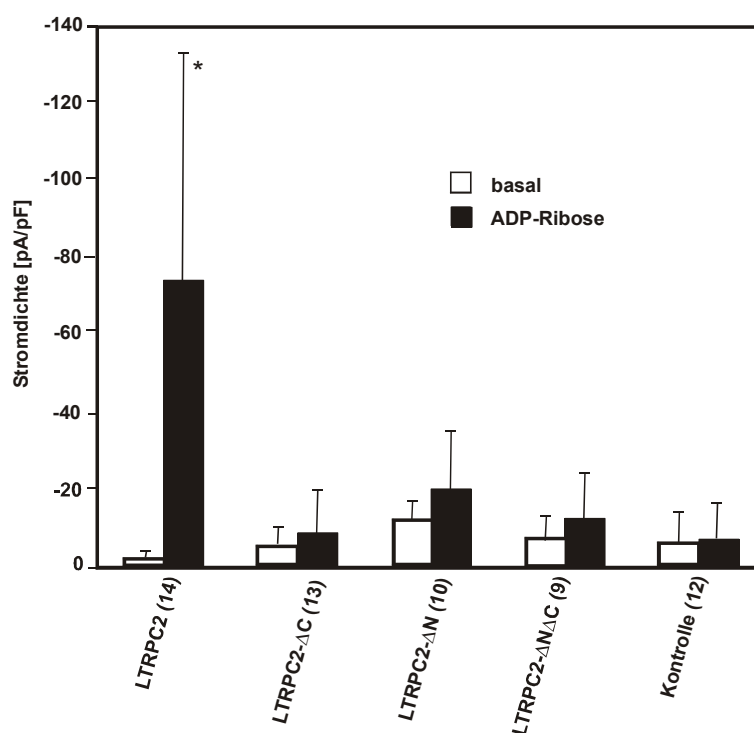
G.z. gibt den Zeitpunkt der jeweiligen Ganzzellkonfiguration in A bis C an.

Mit einem Standardpipettenpuffer konnte zunächst kein Unterschied in den basalen Strömen bei einem Haltepotential von  $-60$  mV bei LTRPC2-transfizierten HEK Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen gemessen werden (siehe auch Abschnitt 4.3.4). Bestimmt man die Ströme in Abhängigkeit der Zellkapazität (die von der Zellgröße abhängig ist) werden bei beiden Zelltypen Werte von  $-2$  bis  $-10$  pA/pF erreicht. Wird dem Standardpipettenpuffer jedoch 0,3 mM ADP-Ribose zugesetzt, entwickelt sich in LTRPC2-transfizierten Zellen mit einer Verzögerung von 0,5 bis 8 min nach Erreichen des Ganzzellmodus ein Strom von  $-70$  pA/pF (Abb. 16, Abb. 17), der sich signifikant von den basalen Strömen unterscheidet ( $p = 0,05$ ).

Bei den Kontrollzellen ist kein erhöhter Strom nach Applikation von ADP-Ribose im Vergleich zu den basalen Strömen nachweisbar (Abb. 16, Abb. 17).

Anhand der Strom-Spannungslinie (Abb. 16, D), durch die das Umkehrpotential und damit die Ionenselektivität eines Kanals ermittelt werden kann, ist zu sehen, daß bei Verwendung des Standardbadpuffers das Umkehrpotential für den LTRPC2 bei 0 mV liegt. Nach Ersatz der  $\text{Na}^+$ -Ionen in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Badpuffer durch das nicht permeable Molekül NMDG (150 mM), sieht man, daß der Einwärtsstrom nahezu vollständig blockiert wird, während gleichzeitig der Auswärtsstrom, der anhand des Standardpipettenpuffers hauptsächlich durch  $\text{Cs}^+$ -Ionen getragen wird, nicht betroffen ist. Nach Auswaschen des NMDG aus dem Badpuffer ist der Strom reversibel (Abb. 16, B). Werden NMDG (125 mM) und  $\text{CaCl}_2$  (10 mM) gleichzeitig dem Badpuffer zugeführt, ist ein geringer Einwärtsstrom nachweisbar (Abb. 16, C, D). Die aus den vorangegangenen Protokollen erhobenen Daten, bestätigen den LTRPC2 als einen unspezifischen Kationenkanal mit einer einwärts gerichteten Permeabilität für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, mit einer geringen Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gegenüber  $\text{Na}^+$ -Ionen. und mit einer auswärts gerichteten Permeabilität für  $\text{Cs}^+$ -Ionen.

Nur bei HEK 293 Zellen, die mit dem LTRPC2 in seiner ursprünglich langen Form transfiziert worden waren, konnte eine Veränderung der Ströme durch ADP-Ribose nachgewiesen werden. Bei einer Transfektion von HEK 293 Zellen mit einer der anderen LTRPC2 Varianten wurden nach einer Stimulation mit ADP-Ribose Ströme von  $-5$  bis  $-18$  pA/pF gemessen, die sich im Vergleich zu den einzelnen Basalwerten nicht unterscheiden und ebenfalls bei Kontrollzellen erreicht werden (Abb. 17).



#### Abb. 17: Unterschiedliche Stimulation der LTRPC2 Varianten mit ADP-Ribose

Vergleich der basalen Stromdichten bei einem Haltepotential von  $-60$  mV, dividiert durch die Zellkapazität (offene Balken) zu den maximalen Stromdichten nach Applikation von ADP-Ribose (0,3mM im Pipettenpuffer, dunkle Balken) von HEK 293 Zellen, transfiziert mit einer der LTRPC2 Varianten und von Vektor transfizierten Zellen.

In Klammern angegeben ist die Anzahl der gemessenen Zellen, signifikante Unterschiede von  $p = 0,05$  sind mit einem Stern versehen.

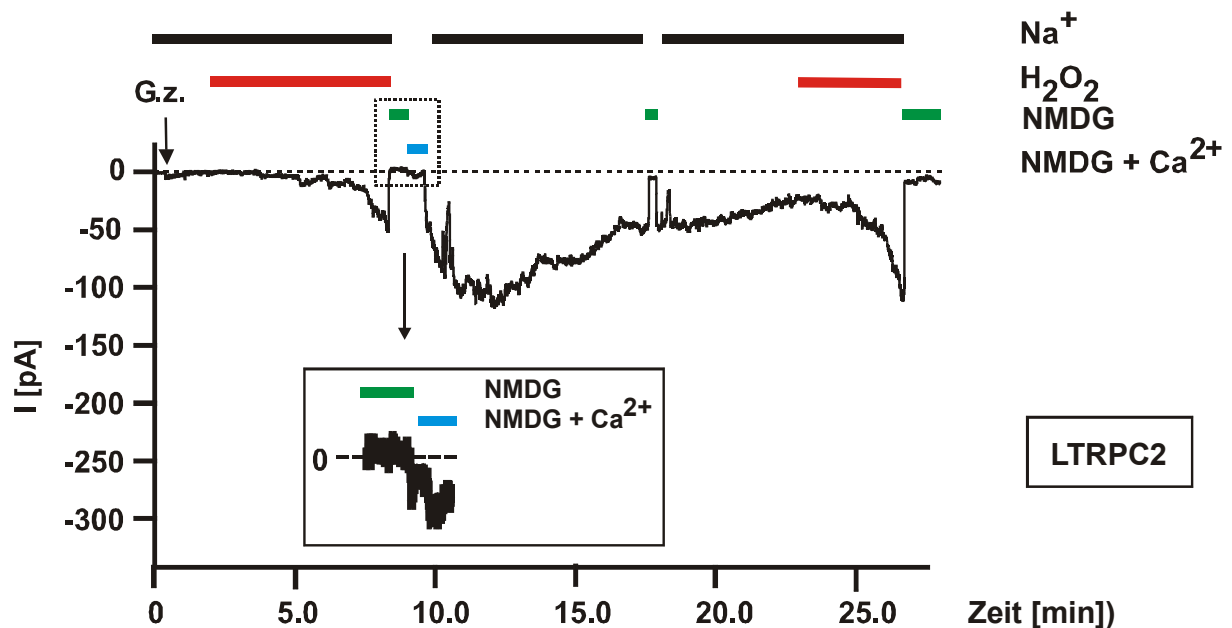
Desgleichen entwickeln sich bei einer Co-Transfektion von HEK Zellen mit LTRPC2-ΔN und LTRPC2-ΔC, deren Deletionen sich komplettieren (langer C-Terminus, sowie langer N-Terminus) und nach anschließender intrazellulärer Stimulation mit ADP-Ribose (0,3 mM) keine unterschiedlichen Ströme im Vergleich zu Kontrollzellen ( $n = 4$ , Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.7 Elektrophysiologische Messungen von transfizierten HEK 293 Zellen nach Stimulation mit $H_2O_2$

Da ADP-Ribose u.a. aus  $NAD^+$  gebildet wird (siehe Abschnitt 5.5.3 bzw. Abb. 24) [144, 145], könnte eine erhöhte  $NAD^+$ -Konzentration möglicherweise für eine erhöhte Syntheserate von ADP-Ribose und damit für eine Stimulation des LTRPC2 eine Rolle spielen. Dies ist z.B. bei oxidativem Streß der Fall, bei dem sich das Redox-Potential der Zelle von  $NAD^+/NADH$  zugunsten von  $NAD^+$  verschiebt [146].



Als ein Modell für oxidativen Streß konnte durch extrazelluläres  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einer Endkonzentration von 5 mM in der Badlösung, ein verstärkter Einwärtsstrom bei LTRPC2-transfizierten HEK 293 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen erzielt werden.



**Abb. 18: Ganzzellmessung einer LTRPC2 transfizierten HEK 293 Zelle nach Stimulation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$**

Originale Aufzeichnung einer repräsentativen Zelle, Balken am oberen Rand deuten die Zusammensetzung der einzelnen Badlösungen an, in denen  $\text{Na}^+$  (schwarzer Balken), NMDG (150 mM, grüner Balken), NMDG und  $\text{Ca}^{2+}$  (125 mM NMDG und 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , blauer Balken) den Hauptbestandteil an Ionen ausmachen und denen  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM, roter Balken) oder kein  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugesetzt worden ist.

Ein vergrößerter Auszug zeigt den Stromverlauf zu einem Zeitpunkt, an dem ein NMDG-haltiger Badpuffer (150 mM) gegen einen Puffer ausgetauscht wird, der neben NMDG (125 mM) zusätzlich 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  enthält.

G.z. gibt den Zeitpunkt der Ganzzellkonfiguration an, das Haltepotential betrug  $-60$  mV.

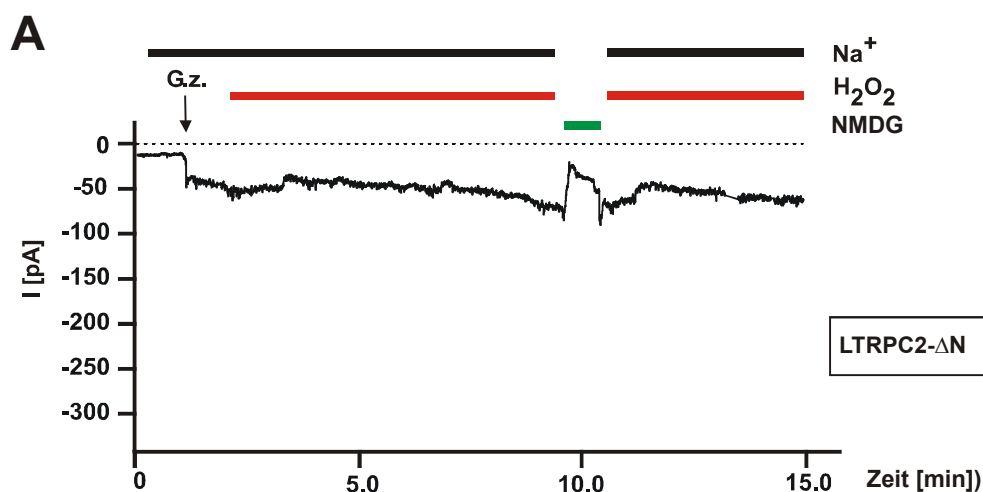
Abb. 18 zeigt eine repräsentative Aufzeichnung einer Ganzzellmessung einer LTRPC2 transfizierten Zelle ( $n = 10$  von 10 unabhängig voneinander transfizierten Zellen). Bei Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Badpuffer entwickelt sich nach Erreichen des Ganzzellmodus ein Strom mit einer Verzögerung von 4 min und mit negativen Vorzeichen von bis zu 120 pA, der nahezu vollständig mit NMDG in der Badlösung blockierbar ist. Bei gleichzeitiger Gabe von

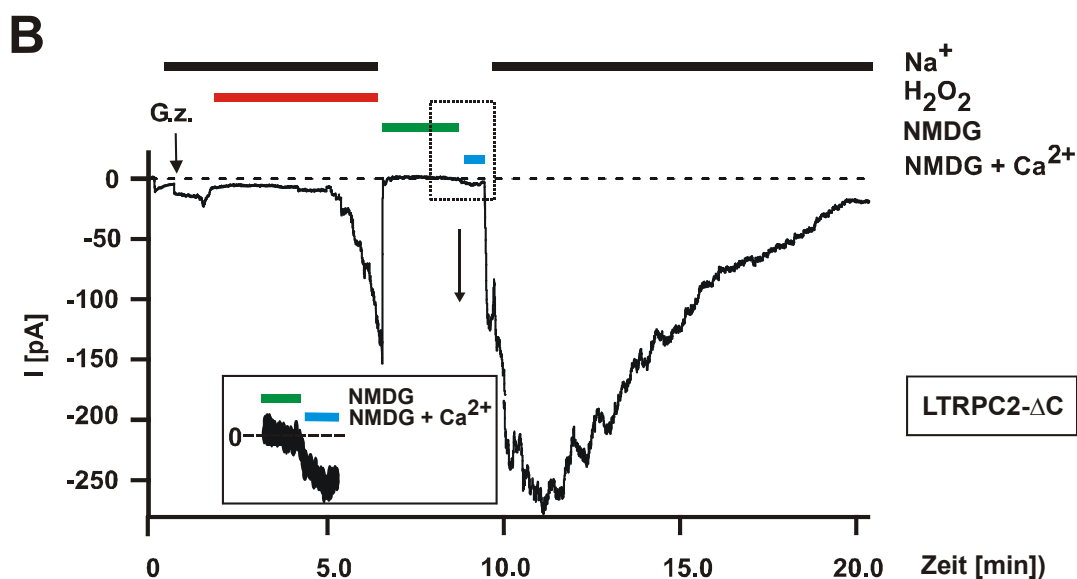
NMDG (125 mM) und  $\text{CaCl}_2$  (10 mM) in das extrazelluläre Medium ist ein Einwärtsstrom von -10 pA zu verzeichnen. Nach Wechsel der extrazellulären Lösung durch den Standardbadpuffer, setzt sich der Einwärtsstrom auch ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Puffer fort, und kehrt nach einem Zeitraum von 10 min auf Basalwerte zurück. Nach wiederholter Gabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in die Badlösung ist der Einwärtsstrom reversibel und wiederum durch NMDG blockierbar. Die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  erzielten Ströme sind, abgesehen von der geringeren Amplitude, gleich zu denen, die nach Induktion mit ADP-Ribose gemessen werden können.

Auch bei einer Erniedrigung der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration auf 1 mM ( $n = 2$ ) sind Einwärtsströme meßbar. Wird die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration auf 30 mM erhöht, sind die Einwärtsströme über die Versuchsdauer nahezu irreversibel, aber dennoch durch NMDG blockierbar (Daten nicht gezeigt).

Nur LTRPC2 transfizierte HEK Zellen reagieren mit einem verstärkten Strom auf ADP-Ribose. Wurden HEK Zellen dagegen mit einer der Spleißvarianten transfiziert, war kein erhöhter Strom durch ADP-Ribose auszulösen. Im Hinblick auf die Stimulation des ungespleißten LTRPC2 durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und im Hinblick auf eine funktionelle Charakterisierung der Spleißvarianten war es interessant, inwieweit eine Stimulation der Spleißvarianten mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  möglich ist.

Bei LTRPC2- $\Delta\text{N}$  oder bei LTRPC2- $\Delta\text{N}$ - $\Delta\text{C}$  transfizierten HEK 293 Zellen ist nach Erreichen des Ganzzellmodus ein hoher Basalstrom festzustellen, der zum Teil durch extrazelluläres NMDG blockiert werden kann (Abb. 19 A), aber auch bei Kontrollzellen vorhanden ist. Eine charakteristische Stromentwicklung wie nach Stimulation von LTRPC2 mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist nicht zu beobachten (Abb. 19 A; Abb. 20).





**Abb. 19: Originale Aufzeichnungen von Ganzzellmessungen einer repräsentativen HEK 293 Zelle, transfiziert mit LTRPC2- $\Delta$ N (A) und LTRPC2- $\Delta$ C (B) nach Stimulation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5mM)**

In A ist eine originale Aufzeichnung einer repräsentativen LTRPC2- $\Delta$ N transfizierten Zelle nach Stimulation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu sehen, in B eine entsprechende Aufzeichnung einer repräsentativen LTRPC2- $\Delta$ C transfizierten Zelle.

In A und B deuten Balken am oberen Rand die Zusammensetzung der einzelnen Badlösungen an, in denen  $\text{Na}^+$  (schwarzer Balken), NMDG (150 mM grüner Balken), NMDG (125 mM) plus  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mM, blauer Balken) den Hauptbestandteil an Ionen ausmachen und denen  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5mM roter Balken) oder kein  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugesetzt worden ist.

Ein vergrößerter Auszug in B zeigt den Stromverlauf zu einem Zeitpunkt, an dem ein NMDG-haltiger Puffer (150 mM, grüner Balken) durch einen Puffer ausgetauscht wird, der neben NMDG (125 mM) zusätzlich 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (blauer Balken) enthält.

G.z. gibt den Zeitpunkt der jeweiligen Ganzzellkonfiguration an, das Haltepotential betrug bei beiden Messungen -60 mV.

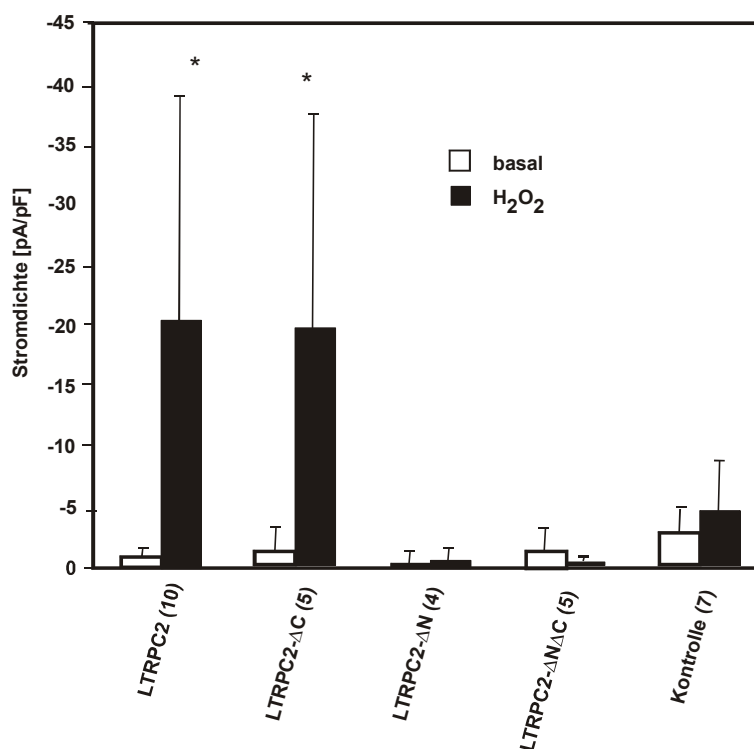
Dagegen lassen sich bei LTRPC2- $\Delta$ C transfizierten HEK Zellen Ströme durch eine Stimulation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  nachweisen (Abb. 19 B, Abb. 20). Bei der Ganzzellmessung entwickelt sich innerhalb von 4 min nach Zugabe von 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in die Badlösung allmählich ein negativer Strom, der durch NMDG vollständig blockierbar ist. Werden  $\text{H}_2\text{O}_2$  und NMDG, sowie NMDG und  $\text{Ca}^{2+}$  ausgewaschen, setzt sich der einwärtsgerichtete  $\text{Na}^+$ -Strom fort und steigt auf bis zu -260 pA an. Erst nach ca. 10 min kehrt der Strom allmählich auf basale Werte zurück. Auch bei LTRPC2- $\Delta$ C transfizierten HEK Zellen ist nach wiederholter Gabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein erneuter Einwärtsstrom meßbar (n = 4 Daten nicht gezeigt).

Bei gleichzeitiger Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  und NMDG ist ein geringer Einwärtsstrom von -8 bis -10 pA zu beobachten (siehe Abb. 19 B, vergrößerter Auszug). So kann durch die

Experimente mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  gezeigt werden, daß der LTRPC2- $\Delta\text{C}$ , der nicht auf ADP-Ribose reagiert, ein nicht selektiver Kationenkanal mit einer einwärts gerichteten Permeabilität für  $\text{Na}^+$ -Ionen sowie für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist.

Zu dem Zeitpunkt, an dem das nicht permeable Molekül NMDG,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sowie  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Badpuffer ausgewaschen werden, setzt sich zunächst in LTRPC2 sowie in LTRPC2- $\Delta$  transfizierten Zellen auch ohne Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  der  $\text{Na}^+$ -getragene Einwärtsstrom fort. Es kann davon ausgegangen werden, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht direkt eine Wirkung auf LTRPC2 sowie auf LTRPC2- $\Delta\text{C}$  ausübt, sondern daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  intrazelluläre Signalkaskaden induziert, die eine Aktivierung der Kanalproteine bewirken.

Die mittleren Stromdichten betragen bei LTRPC2 und bei LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten HEK Zellen  $-0,9 \pm 0,75$  bis  $-20,3 \pm 18,8$  pA/pF nach extrazellulärer Gabe von 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die sich signifikant ( $p = 0,05$ ) von den entsprechenden basalen Werten und im Vergleich zu den Kontrollzellen unterscheiden (Abb. 20).



**Abb. 20: Zusammenfassung der unterschiedlichen Stimulation der Spleißvarianten von LTRPC2 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Vergleich der basalen Stromdichten von HEK 293 Zellen, transfiziert mit einer der LTRPC2 Varianten, und von Kontrollzellen bei einem Haltepotential von  $-60$  mV, dividiert durch die Zellkapazität (offene Balken) zu den maximalen Stromdichten nach Applikation von 5 bis 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Badpuffer.

In Klammern angegeben ist die Anzahl der gemessenen Zellen, signifikante Unterschiede von  $p = 0,05$  sind mit einem Stern versehen.

#### 4.3.8 Fluorometrische Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration von transfizierten HEK 293 Zellen nach Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

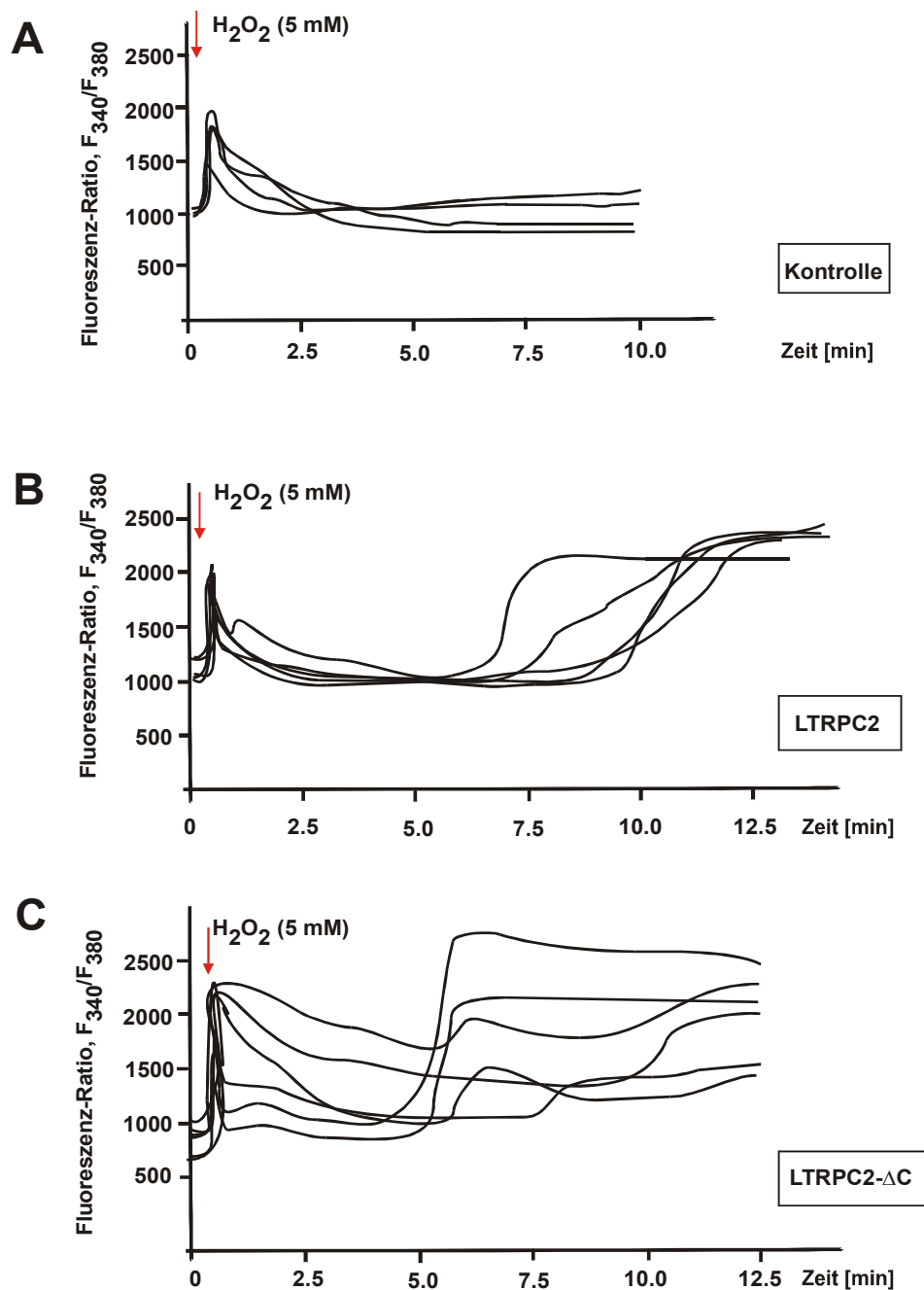
Zu einem geringen Teil werden die mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgelösten Ströme durch Ca<sup>2+</sup>-Ionen getragen, daher wurde ein Einfluß von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Änderung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> untersucht.

In Abb. 21 sind die Fluoreszenzquotienten aus fluorometrischen Messungen von fura2 beladene Kontrollzellen (A), von LTRPC2 (B) sowie von LTRPC2-ΔC (C) transfizierten HEK Zellen aufgezeichnet. Nach Zugabe von 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in die extrazelluläre Badlösung ist sowohl bei LTRPC2 und bei LTRPC2-ΔC transfizierten Zellen, als auch bei Kontrollzellen ein initialer Anstieg der Ratio durch eine Änderung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> zu sehen, der sich zwischen

den einzelnen Zellgruppen nicht voneinander unterscheidet. Ein zweiter Anstieg ist innerhalb von 5 bis 7,5 min nach Gabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nur bei den Zellen zu verzeichnen, die mit LTRPC2 (11 von 25 Zellen in vier voneinander unabhängigen Transfektionen), oder mit LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfiziert wurden ( $n = 17$  von 41 Zellen in fünf voneinander unabhängigen Experimenten). Dieser sekundäre Anstieg der Ratiowerte bei LTRPC2, sowie bei LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen nimmt bis zum Schluß der Messungen einen stabilen Plateauwert ein. Bei keiner der Kontrollzellen ( $n = 23$  in vier unabhängigen Experimenten) konnte ein sekundärer Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  ausgelöst werden. In Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bleibt auch bei LTRPC2 ( $n = 52$ ) bzw. LTRPC2- $\Delta\text{C}$  ( $n = 37$ ) transfizierten HEK Zellen ein  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Anstieg aus.

Um auszuschließen, daß durch die lange Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Zellmembranen zerstört wurden, wurden die Zellen am Schluß der Messungen nach einer Dauer von  $>13$  min selektiv für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch Zufuhr von  $10 \mu\text{M}$  Ionomycin in die Badlösung permeabilisiert. Wird gleichzeitig die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der extrazellulären Lösung auf  $10 \text{ mM}$  erhöht, kommt es nach dem sekundären Anstieg der Fluoreszenzwerte bei LTRPC2, sowie bei LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen zu einer weiteren Zunahme der Fluoreszenz bis in den sättigenden Bereich. Auch bei Kontrollzellen steigt nach deren Permeabilisierung mit Ionomycin und gleichzeitiger Zufuhr von  $10 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  in der Badlösung die Fluoreszenzintensität, ausgehend von basalen Werten, auf Werte im Sättigungsbereich an (Daten nicht gezeigt). Damit kann gezeigt werden, daß nach Stimulation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten zwischen LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, nicht auf eine Zerstörung der Zellmembran durch die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung zurückzuführen ist. Eine Kalibrierung konnte nicht durchgeführt werden, da sich die Zellen zum Teil am Ende der Messungen aufgrund der Dauer des Experiments von den Glasplättchen ablösten.

Die Daten, die durch die fluorometrischen Messungen gewonnen wurden, unterstützen die Ergebnisse aus den elektrophysiologischen Experimenten. Sowohl bei LTRPC2 als auch bei LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten HEK Zellen wird durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein verstärkter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran ausgelöst.



**Abb. 21: Effekt von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von LTRPC2, LTRPC2-ΔC transfizierten HEK 293 Zellen und Kontrollzellen**

A) Originaler Kurvenverlauf von sechs repräsentativen Kontrollzellen, aufgezeichnet ist der Ratiowert der Fluoreszenz bei 340 zu 380 nm. Wechsel des Standardbadlösung durch einen Puffer zusätzlich mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

B) Originale Aufzeichnungen von fünf repräsentativen Zellen, transfiziert mit LTRPC2

C) Originale Aufzeichnung von sechs repräsentativen Zellen, transfiziert mit LTRPC2-ΔC

#### 4.3.9 Stimulation von LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta$ C mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unabhängig von NAD<sup>+</sup> und ADP-Ribose

Während von verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet wurde, daß der LTRPC2 über NAD<sup>+</sup> stimulierbar ist, kann die Arbeitsgruppe um Perraud keine Stimulation von LTRPC2 durch weitere Dinukleosidphosphatderivate wie z.B. NAD<sup>+</sup> nachweisen [67, 141, 142]. In dieser Arbeit kann eine Stimulation mit NAD<sup>+</sup> von transfizierten HEK Zellen mit LTRPC2 bzw. mit einer seiner Varianten nicht bestätigt werden.

Abb. 22 A zeigt, daß nach Zufuhr von 0,1 mM NAD<sup>+</sup> über den Pipettenpuffer bei einem Haltepotential von -60 mV und Erreichen des Ganzzellstadiums sich der Einwärtsstrom von LTRPC2 transfizierten Zellen innerhalb eines Zeitraums von > 15 min nicht verändert (n = 7). Erhöhte Basalwerte sind sowohl bei LTRPC2 transfizierten Zellen (n = 2), als auch bei Kontrollzellen (n = 2 von 9) zu verzeichnen, und waren bereits bei transfizierten Zellen in früheren Experimenten zu beobachten (siehe Abschnitt 4.3.4). Auch bei HEK Zellen, die mit einer der anderen LTRPC2 Varianten transfiziert werden, sind keine erhöhten Einwärtsströme im Vergleich zu denen von Kontrollzellen durch NAD<sup>+</sup> auszulösen (n = 4 – 5).

Werden jedoch LTRPC2 transfizierte Zellen 10 min nach Gabe von NAD<sup>+</sup> anschließend mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Badlösung stimuliert (Abb. 22 B), ist nach einer Verzögerung von 3 min ein Einwärtsstrom von -400 pA meßbar, der vollständig durch NMDG blockierbar, sowie reversibel ist. Ein solcher Strom zeichnet sich jedoch nicht bei Kontrollzellen ab.

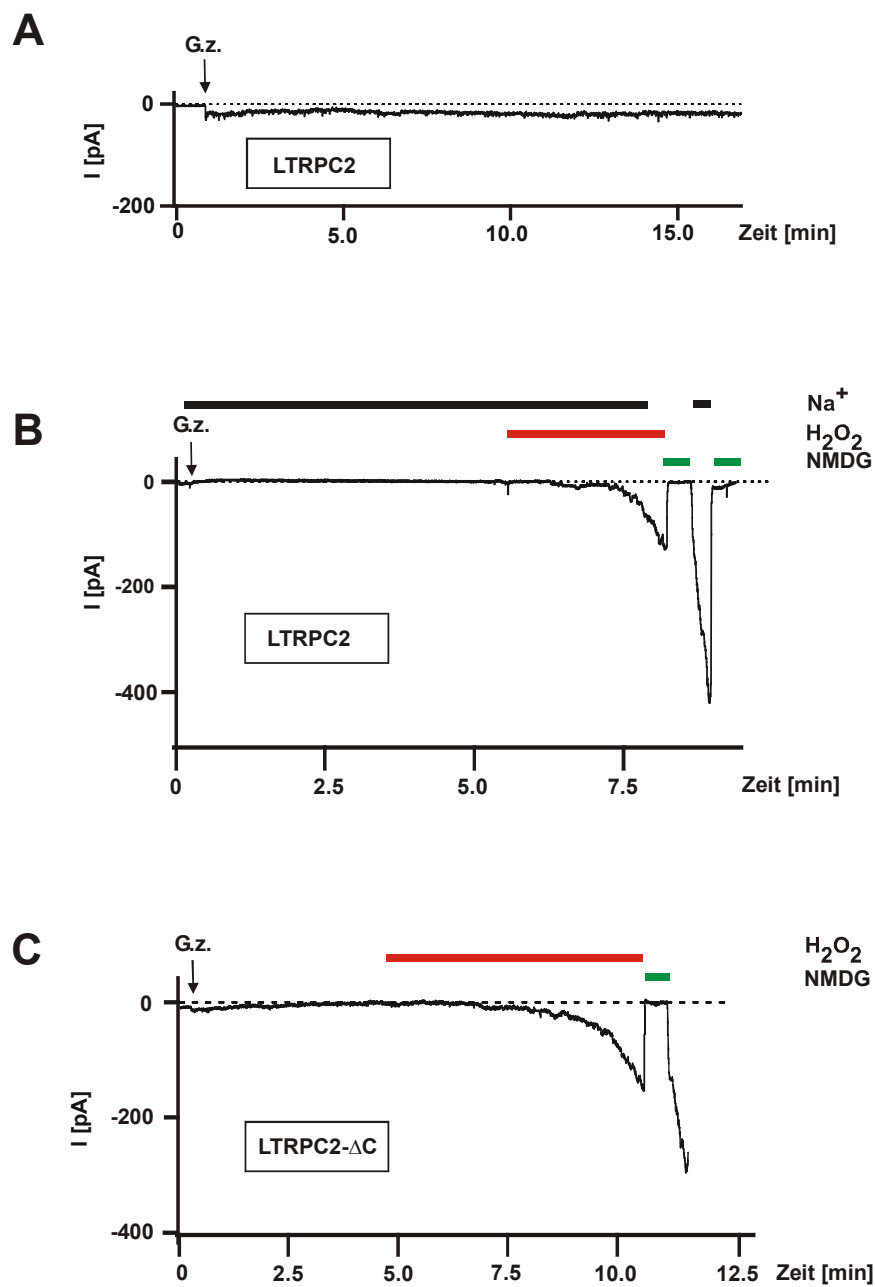
LTRPC2- $\Delta$ C transfizierte HEK Zellen reagieren in einem Zeitraum von 5 min auf keine intrazelluläre Stimulation mit NAD<sup>+</sup> (0,1 mM; n = 2) oder ADP-Ribose (0,3 mM; n = 3). Wird jedoch anschließenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dem Bad zugeführt (Abb. 22 C), entwickelt sich dagegen mit einer Verzögerung von 2,5 bis 5 min ein Einwärtsstrom mit einer Amplitude von -200 bis -320 pA, vergleichbar mit den Einwärtsströmen aus Experimenten in denen LTRPC2- $\Delta$ C transfizierte HEK Zellen nur mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert werden (siehe Abschnitt 4.3.7).

Anhand dieser Daten kann gezeigt werden, daß die ursprüngliche Überlegung, eine erhöhte NAD<sup>+</sup>-Konzentration, wie sie z.B. bei oxidativen Streß gegeben ist, führt zu einer erhöhten Syntheserate von ADP-Ribose und damit letztlich zur Stimulation von LTRPC2, nicht aufrechterhalten werden kann. Durch eine erhöhte NAD<sup>+</sup>-Konzentration kann kein erhöhter Einwärtsstrom bei Zellen, transfiziert mit einer der LTRPC2 Varianten hervorgerufen werden,



was jedoch nach extrazellulärer Gabe von  $H_2O_2$  bei LTRPC2 transfizierten sowie bei LTRPC2- $\Delta C$  transfizierten Zellen möglich ist.

Nach Stimulation mit  $H_2O_2$  ist kein Unterschied in den Einwärtsströmen von LTRPC2- $\Delta C$  transfizierten Zellen im Vergleich zu den Einwärtsströmen von LTRPC2 transfizierten Zellen zu erkennen. Im Gegensatz dazu führt die intrazelluläre Applikation von ADP-Ribose, anders als bei LTRPC2 transfizierten Zellen, bei LTRPC2- $\Delta C$  transfizierten Zellen zu keinen erhöhten Einwärtsströmen, obwohl sich die Deletion der Spleißvariante außerhalb der Nudix-Box befindet. Dies läßt darauf schließen, daß die Stimulation von LTRPC2 sowie LTRPC2- $\Delta C$  durch  $H_2O_2$  über den gleichen Regulationsmechanismus bewerkstelligt wird, während möglicherweise bei der der Aktivierung des LTRPC2 durch ADP-Ribose parallel ein zweiter, zu dem Regulationsweg über  $H_2O_2$  unabhängiger, Aktivierungsmechanismus existiert.



**Abb. 22: Ganzzellmessungen von HEK Zellen, transfiziert mit LTRPC2 oder LTRPC2-ΔC nach Stimulation mit NAD<sup>+</sup> (A), NAD<sup>+</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) oder mit ADP-Ribose und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C).**

In A ist eine originale Aufzeichnung einer repräsentativen Messung von einer LTRPC2 exprimierenden Zelle abgebildet. Bei der Messung wurde, anstelle des Standardpuffers, ein Pipettenpuffer mit einer NAD<sup>+</sup>-Konzentration von 1 mM verwendet.

B zeigt eine originale Aufzeichnung einer repräsentativen Messung von einer LTRPC2 exprimierenden Zelle. Während der Messung enthielt der Pipettenpuffer 1 mM NAD<sup>+</sup>. 5 min nach Erreichen des Ganzzellmodus wird dem Badpuffer 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugefügt (angedeutet durch einen roten Balken). Der Austausch des Standardbadpuffers (schwarzer Balken) gegen eine Na<sup>+</sup>-freie Lösung mit NMDG (150 mM) wird durch einen grünen Balken angedeutet.

In C ist eine originale Aufzeichnung einer repräsentativen Messung einer LTRPC2-ΔC exprimierenden Zelle zu sehen. Der Pipettenpuffer enthielt 0,3 mM ADP-Ribose, 5 min nach

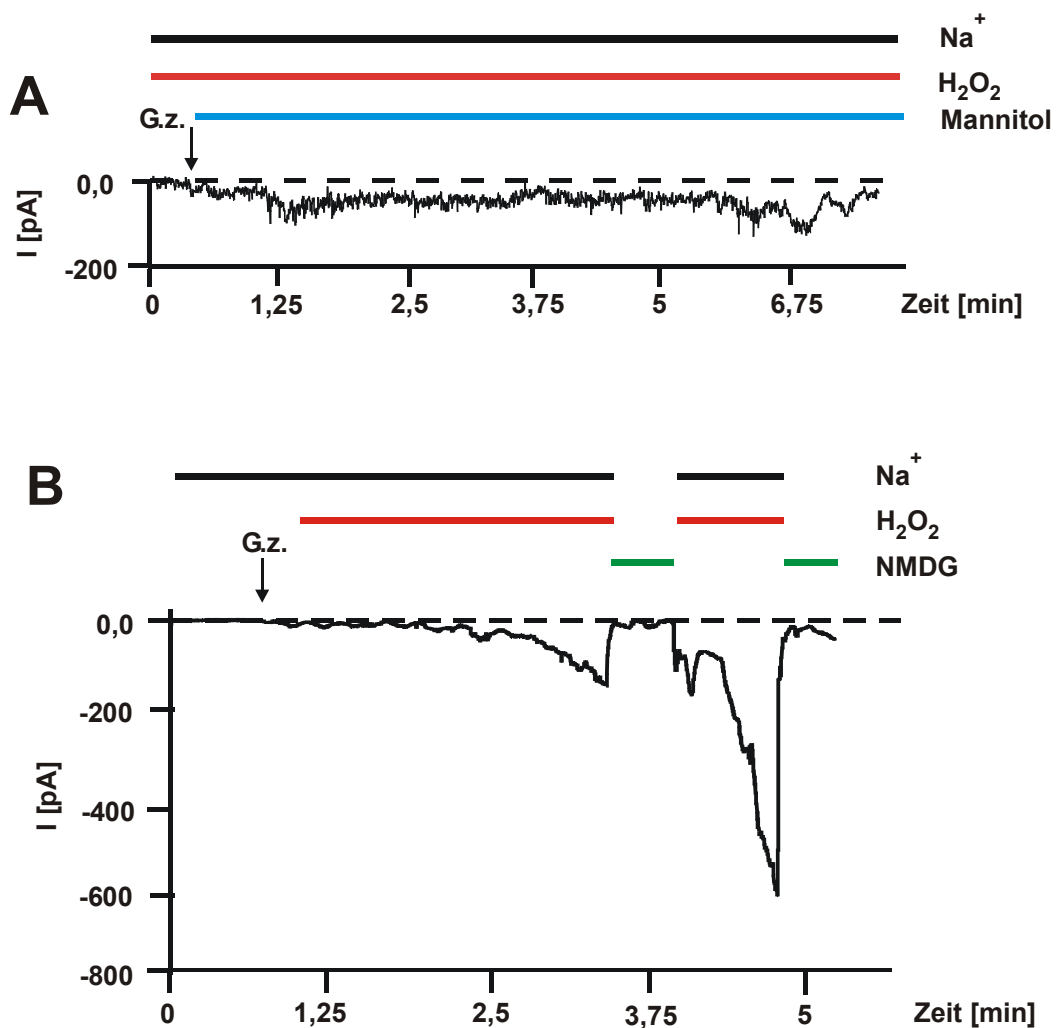
Erreichen der Ganzzellkonfiguration wird eine extrazelluläre Stimulation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM, roter Balken) durchgeführt. Der grüne Balken steht für den Wechsel des Standardbadpuffers gegen einen NMDG-haltigen Badpuffer.

G.Z. gibt den Zeitpunkt an, zu dem der jeweilige Ganzzellmodus erreicht wird, das Haltepotential betrug in allen Messungen  $-60$  mV.

#### **4.3.10 Elektrophysiologische Messungen nach extrazellulärer Stimulation von transfizierten HEK 293 Zellen mit $\text{H}_2\text{O}_2$ und intrazellulärer Zugabe des Antioxidans Mannitol**

Ein Ansatz zur Untersuchung des Stimulationsmechanismus des LTRPC2 und seiner Variante LTRPC2- $\Delta\text{C}$  durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  war eine Applikation von Antioxidantien, die, wenn  $\text{H}_2\text{O}_2$  über Oxidationsreaktionen wirkt, eine Stromentwicklung unterbinden müßte. In Abb. 23 A ist an einem Beispiel einer LTRPC2 transfizierten Zelle zu sehen, daß bei Verwendung eines Pipettenpuffers, der 10 mM Mannitol enthält, sich nach extrazellulärer Gabe von 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einem Zeitraum von  $> 7$  min kein erhöhter Einwärtsstrom bei LTRPC2 transfizierten Zellen entwickelt ( $n = 5$ ). Ist dagegen kein Mannitol im Pipettenpuffer vorhanden (Abb. 23 B), ist bei LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen ( $n = 2 - 3$ ) nach Gabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein verzögerter Einwärtsstrom mit einer Amplitude von bis zu  $-600$  pA zu beobachten, der sich durch den Austausch von  $\text{Na}^+$ -Ionen im Badpuffer gegen das nicht permeable NMDG blockieren läßt, wie er bereits in Abschnitt 4.3.7 beschrieben wurde.

Das läßt darauf schließen, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  über intrazelluläre Oxidationsmechanismen auf die Regulation des LTRPC2 und seiner Variante LTRPC2- $\Delta\text{C}$  wirkt. Der genaue Signaltransduktionsweg muß allerdings noch weiter entschlüsselt werden.



**Abb. 23: Repräsentative Ganzzellmessungen von LTRPC2 exprimierenden HEK 293 Zellen bei extrazellulärer Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und bei gleichzeitiger Anwesenheit des Antioxidans Mannitol im Pipettenpuffer(A), sowie ohne Mannitol im Pipettenpuffer (B)**

In A ist eine originale Aufzeichnung einer Messung abgebildet, bei der der Standardbadpuffer (schwarzer Balken) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM, roter Balken) und der Pipettenpuffer Mannitol (10 mM, blauer Balken) enthielt.

In B ist eine originale Aufzeichnung einer Messung zu sehen, bei der eine extrazelluläre Stimulation der LTRPC2 transfizierten Zelle mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM, roter Balken) erfolgte, bei der dem Pipettenpuffer jedoch kein Mannitol zugefügt wurde. Ein Austausch des Standardbadpuffers (schwarzer Balken) gegen eine NMDG-haltige Lösung (150 mM) ist durch einen grünen Balken angedeutet.

G.z. ist der Zeitpunkt zu dem die jeweilige Ganzzellkonfiguration erreicht wurde, das Haltepotential betrug bei beiden Messungen -60 mV.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte mittels RT-PCR-Analysen und durch Sequenzvergleiche der Amplifikate mit der ursprünglich von Nagamine und Mitarbeitern veröffentlichten Sequenz des LTRPC2 die Expression von zwei bisher unbekanntem Spleißvarianten des LTRPC2, sowohl in HL-60 Zellen, als auch in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden [140].

Entsprechend der Spleißvarianten wurden die Varianten, LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C, LTRPC2- $\Delta$ N, LTRPC2- $\Delta$ C sowie LTRPC2 konstruiert. Anschließend funktionelle Untersuchungen durch fluorometrische Messungen von Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$ , sowie durch Messungen der Ionenströme mittels der Patch-Clamp Technik von heterolog transfizierten Zellen ergaben, daß eine Aktivierung der einzelnen Varianten in Abhängigkeit des PLC-gesteuerten Signaltransduktionsweges nicht gegeben ist.

Dagegen konnte ein Stimulation von LTRPC2, sowie von LTRPC2- $\Delta$ C mit  $H_2O_2$ , einem Modell für oxidativen Streß, nachgewiesen werden. Die Spleißvariante LTRPC2- $\Delta$ C reagiert auf eine Stimulation mit  $H_2O_2$  unabhängig von ADP-Ribose, einem Aktivator des ungespleißten LTRPC2 [67]. So ist davon auszugehen, daß neben dem bislang unbekanntem Stimulationsmechanismus des LTRPC2 mit ADP-Ribose ein alternativer Regulationsmechanismus für eine Aktivierung der Varianten mit  $H_2O_2$  existiert. Die Stimulation von LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta$ C durch  $H_2O_2$  ist indes auf intrazelluläre Oxidationsprozesse zurückzuführen.

Ein Einfluß von  $NAD^+$ , wie es von zwei anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde [141, 142], konnte dagegen weder in Zellen die LTRPC2, noch in Zellen, die eine der gespleißten Varianten heterolog exprimieren, nachgewiesen werden.

### 5.1 Klonierung von LTRPC2 und seiner Spleißvarianten

Zur Klonierung des LTRPC2 über RT-PCR wurde auf ein Zellmodell für neutrophile Granulozyten, auf HL-60 Zellen, zurückgegriffen.

HL-60 Zellen nehmen im Verlauf von 2 – 3 Tagen nach Inkubation mit Agenzien wie db-cAMP oder DMSO den Phänotyp von neutrophilen Granulozyten ein [147]. Nach der Differenzierung stellen HL-60 Zellen ihre Proliferation und damit ihre mRNA Synthese ein wie es desgleichen bei neutrophilen Granulozyten der Fall ist. Der Zugang zu mRNA

undifferenzierter HL-60 Zellen gestaltet sich daher einfacher, so daß für die Klonierung des LTRPC2 mRNA aus undifferenzierten HL-60 Zellen isoliert wurde.

Über PCR Analysen konnte nachgewiesen werden, daß die Expression der einzelnen mRNA-Spleißvarianten des LTRPC2 sich bei undifferenzierten HL-60 Zellen nicht von dem natürlich vorkommenden Zellsystem, den neutrophilen Granulozyten, unterscheidet. Daraus kann geschlossen werden, daß undifferenzierte HL-60 Zellen für die Klonierung des LTRPC2 und seiner Varianten als ein geeignetes Zellmodell für neutrophile Granulozyten anzusehen ist.

Der Nachweis der einzelnen mRNA-Varianten des LTRPC2, war sowohl in PCR Analysen mit verschiedenen modifizierten *Primer*paaren, als auch in mehreren voneinander unabhängigen mRNA Isolierungen reproduzierbar und konnte über Sequenzanalysen verifiziert werden. Daher ist auszuschließen, daß es sich bei den LTRPC2-Varianten um PCR-Artefakte handelt.

## **5.2 Konstruktion der einzelnen Varianten des LTRPC2**

Für die funktionelle Charakterisierung des LTRPC2, ausgehend von der Variante LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C, wurde in mehreren Klonierungsschritten die cDNA, die für die gespleißte und ungespleißte Form des N-Terminus sowie des C-Terminus codiert, miteinander kombiniert. Damit lagen insgesamt vier verschiedene cDNA Konstrukte des LTRPC2 vor (LTRPC2 als ursprünglich ungespleißte Form, LTRPC2- $\Delta$ N, LTRPC2- $\Delta$ C und LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C; siehe Nomenklatur Abschnitt 4.2.2.1).

Die funktionellen Daten, die in dieser Arbeit in Experimenten von transient transfizierten Zellen mit dem ungespleißten LTRPC2 und mit der Spleißvariante LTRPC2- $\Delta$ C gewonnen wurden, belegen die Expression der jeweiligen cDNA in ein Protein mit Kanaleigenschaften. Für die Spleißvariante LTRPC2- $\Delta$ N, sowie LTRPC2- $\Delta$ N- $\Delta$ C, für deren Expressionsprodukte noch keine funktionellen Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, ist eine Aussage zur Translation in ein funktionelles Protein, bislang nicht möglich.

## **5.3 Expressionsnachweis der einzelnen Varianten des LTRPC2**

Um zu überprüfen, ob die einzelnen Spleißvarianten, wie sie in dieser Arbeit kombiniert und kloniert wurden, auch entsprechend endogen exprimiert werden, wäre als erster Schritt mittels

RT-PCR und spezifischen *Primern* die Existenz der mRNA für die einzelnen Varianten nachzuweisen. Dieses würde sich jedoch als schwierig gestalten.

Eine erfolgreiche Klonierung der cDNA, die den kompletten ORF des LTRPC2 umfaßt, war nur möglich, indem Teilamplifikate miteinander ligiert wurden. Das cDNA Fragment des 5' Bereich konnte, wahrscheinlich aufgrund von vorzeitigen Strangabbrüchen der Reversen Transkriptase, vorausgehend nur mit einem LTRPC2 genspezifischen Oligonukleotid als *Primer* synthetisiert werden (siehe Abschnitt 3.2.5 und Abschnitt 4.1.1). Bei einem Expressionsnachweis der Spleißvarianten über RT-PCR müßten zur Unterscheidung der Varianten die erforderlichen Amplifikate fast die gesamte Sequenz umfassen. Bei der RT-PCR erforderlichen cDNA Synthese würden wahrscheinlich die gleichen Probleme auftreten, wie sie bei der Klonierung des LTRPC2 vorhanden waren, so daß möglicherweise keine kompletten Amplifikate von den einzelnen Varianten zu erzielen wären.

Ein weiteres Hindernis beim Expressionsnachweis der LTRPC2 Varianten mittels RT-PCR sind die zu geringen Größenunterschiede der einzelnen Amplifikate, von ungefähr 100 Nukleotiden, welche bei einer Gesamtlänge von > 5000 bp auf einem Agarosegel nicht zu unterscheiden sind.

Eine positive Translation der Spleißvarianten in ein Protein könnte z.B. durch zusätzliche funktionelle Untersuchungen, oder mit Hilfe von Fusionskonstrukten überprüft werden (siehe Ausblick).

## **5.4 Überlegungen zur funktionellen Bedeutung der LTRPC2 Spleißvarianten**

### **5.4.1 Verkürzte Spleißvarianten von weiteren Mitgliedern der TRP-Familie mit regulatorischen Funktionen**

Spleißvarianten sind bereits von weiteren Mitgliedern der TRP-Familie identifiziert worden, die zum Teil Kanal- oder regulatorische Eigenschaften besitzen, andere sind jedoch funktionell noch uncharakterisiert (s.u.).

Denkbar ist, daß die Spleißvarianten des LTRPC2 nicht als vollständige Kanalproteine, sondern als Fragmente mit regulatorischen Eigenschaften exprimiert werden. Dies ist für eine gespleißte Form des TRPM1 (Melastatin, MLSN), einem weiteren Mitglied der TRPM-

Unterfamilie in humanen Melanoma Zellen [148], nachgewiesen worden. Die alternative Spleißform, MLSN-S, umfaßt den N-terminalen Bereich des TRPM1, besitzt aber keinerlei transmembranäre Domänen und stellt demnach kein Kanalprotein dar. Über *Glutathion S-Transferase Pull-Down Assays* konnte gezeigt werden, daß MLSN-S direkt mit dem ungespleißten TRPM1 interagiert. Desweiteren wurde nachgewiesen, daß bei einer Co-Expression beider Varianten die Lokalisation von TRPM1 aus der Nähe der Plasmamembran in das Zytosol verändert und ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, wie er ihn in TRPM1 überexprimierenden HEK 293 Zellen nach Einzeltransfektion zu beobachten ist, unterdrückt wird. Die Spleißvariante MLSN-S reguliert demnach die Lokalisation und die Aktivität des ungespleißten TRPM1 [149].

Da der LTRPC2 der gleichen Subfamilie des TRPM1 zugeordnet wird, könnte es demnach möglich sein, daß die Spleißvarianten des LTRPC2, für die bislang noch keine funktionalen Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, ähnliche dominant negative Funktionen wie die der Spleißvariante MLSN-S besitzen.

#### **5.4.2 Verkürzte Spleißvariante des TRP6 von *Rattus norvegicus* mit fehlenden Informationen zur Glykosylierung**

Für ein Homolog des TRP6 der Ratte (*Rattus norvegicus*) konnten von Zhang und Mitarbeitern drei Varianten identifiziert werden (rTRP6A; rTRP6B; rTRP6C). rTRP6A kann über Charbachol und das DAG-Analogon OAG stimuliert werden, während rTRP6B, mit einer Deletion im N-terminalen Bereich, zwar über Charbachol, aber nicht über OAG reguliert werden kann. Die Variante rTRP6C, die neben der Deletion im N-terminalen Bereich eine weitere Deletion im C-terminalen Bereich aufweist, reagiert dagegen auf keines der beiden Stimuli. Während rTRP6A und rTRP6B glykosylierte Proteine sind, fehlt die Glykosylierung bei der Variante rTRP6C, so daß angenommen wird, daß die Deletion im C-terminalen Bereich für die Glykosylierung und damit für funktionelle Eigenschaften Informationen beinhaltet [150]. Wie bei den Spleißvarianten des TRP6 konnte in dieser Arbeit für die ungespleißte Form des LTRPC2 zwei Stimulatoren nachgewiesen werden. Die Spleißvariante mit einer Deletion im C-Terminus reagiert nur auf einen der beiden Stimuli, während dagegen für die Spleißvarianten mit einer Deletion im N-Terminus keine Reaktion auf einen der beiden Stimuli zu beobachten ist. Wahrscheinlich besteht auch bei den Deletionen der LTRPC2 Varianten ein Zusammenhang zu Informationen über regulatorische



und/oder funktionelle Eigenschaften wie eine Glykosylierung, was jedoch noch zu untersuchen ist.

### **5.4.3 Funktion der LTRPC2 Spleißvarianten möglicherweise als Untereinheiten eines heteromultimeren Kanals**

Neben der Überlegung einer regulatorischen Funktion der Spleißvarianten, ist es denkbar, daß die Spleißvarianten Untereinheiten eines heteromultimeren Kanals darstellen. Für einige Mitglieder der TRP-Familie konnte eine Homo- bzw. Heteromultimerisierung bereits nachgewiesen werden. Co-Immunopräzipitationsansätze nach Co-Transfektionen zeigen eine Interaktion von TRP/TRPL und TRP $\gamma$ /TRPL aus *Drosophila* sowie von den humanen TRPC1/TRPC5 als auch TRPC1/TRPC3 [34, 40, 151, 152]. Desweiteren konnte mit Hilfe der FRET-Technik gezeigt werden, daß die humanen klassischen TRPCs in der Lage sind, sowohl Homomultimere als auch Heteromultimere zu bilden. Dabei ist nach Co-Expression von den stark homologen Mitglieder TRPC4/5 sowie den TRPC3/6/7 ein FRET-Ereignis zu sehen, nicht aber bei Co-Expression von TRPC1/3 [153]. Ferner werden in funktionellen Untersuchungen nach Co-Transfektion der kodierenden cDNA veränderte biophysikalischen Eigenschaften resultierender Ströme gemessen. Während z.B. TRP $\gamma$  wie auch TRPL in Einzeltransfektionen konstitutiv aktiv sind, werden nach einer Co-Transfektion dieser *Drosophila* TRP-Varianten Ströme gemessen, die über den PLC-Signalweg oder durch Ca<sup>2+</sup>-Speicherentleerung reguliert werden [34] (siehe Abschnitt 1.2.2). Diese Resultate weisen auf eine Interaktion der Proteine bei einer Co-Expression hin, und es wird vermutet, daß an der Bildung von Heteromultimeren sog. *coiled-coil* Strukturen beteiligt sind, wie es bei der Oligomerisierung von GABA-B-Kanälen nachgewiesen werden konnte [154].

Die funktionellen Daten, die von LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta$ C in dieser Arbeit gewonnen wurden, bestätigen, daß beide Varianten aktive Kanäle darstellen. Die angewandte heterologe Transfektion führt zu einer Überexpression der transfizierten cDNA. Kommt es bei LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta$ C, wie für weitere Mitglieder der TRP-Familie beschrieben, zur Bildung von Multimeren, ist bei einer heterologen Transfektion die Tendenz der Kanalproteine zur Bildung von Homomultimeren wesentlich höher als eine mögliche Interaktion von LTRPC2 Varianten mit anderen Mitgliedern der TRP-Familie, die nativ von HEK 293 Zellen exprimiert werden.

In anderen Zellsystemen, in denen eine Expression von LTRPC2 nachgewiesen werden konnte, werden zugleich eine Reihe an anderen Mitgliedern der TRP-Familie exprimiert. Desweiteren wird im Strukturmodell von LTRPC2 eine *coiled-coil* Region nachgewiesen, von der bislang noch keine Funktion bekannt ist. Es besteht daher die Möglichkeit, daß sich die einzelnen Spleißvarianten zur Bildung eines funktionalen Kanals nativ zu Homomultimeren bzw. untereinander zu Heteromultimeren zusammensetzen. Desweiteren ist eine Heteromultimerisierung der LTRPC2 Varianten mit anderen TRP-Proteinen denkbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die bislang nicht aktiven Spleißvarianten mehrere funktionelle Eigenschaften besitzen können. Es besteht die Möglichkeit, daß sie als Fragmente durch Proteininteraktion die Expression und Lokalisation der sensitiven Varianten, sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen können. Desweiteren könnten die Deletionen im Zusammenhang mit Strukturinformationen stehen, die einen hemmenden Einfluß auf die Aktivität der sensitiven Kanäle besitzen. Eine weitere Überlegung ist, daß die Spleißvarianten Untereinheiten eines heteromultimeren Kanals darstellen.

## **5.5 Funktionelle Charakterisierung des LTRPC2 und seiner Spleißvarianten**

### **5.5.1 Stimulation der LTRPC2 Varianten über den PLC-abhängigen Signaltransduktionsweg**

Verschiedene Mitglieder der TRP-Familie, vor allem die *Drosophila* TRPs und die klassischen humanen TRPCs sind funktionell ursprünglich durch den rezeptorstimulierten, PLC-abhängigen Signaltransduktionsweg charakterisiert worden. Bei der Aktivierung von TRPC1, TRPC4 und TRPC5 nach Rezeptorbindung konnte ein unmittelbarer Zusammenhang mit einer IP<sub>3</sub>-vermittelten Speicherentleerung nachgewiesen werden, während TRPC3 möglicherweise über IP<sub>3</sub> durch direkte Koppelung mit dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor reguliert wird [50, 52, 54, 96]. Andere Ergebnisse sprechen dagegen für eine Aktivierung von TRPC3, TRPC6 und TRPC7 durch DAG [155, 156].

Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit zur funktionellen Charakterisierung des LTRPC2 daher anfänglich Protokolle gewählt, die über Rezeptorstimulation den PLC-

abhängigen Signalweg aktivieren, Metabolite des PLC-Weges berücksichtigen, oder direkt eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung bewirken.

Unter diesen Bedingungen konnte in dieser Arbeit in HEK Zellen, die mit einer der LTRPC2 Varianten transfiziert wurden, weder ein erhöhter Einwärtsstrom, noch ein verstärkter  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden.

Bei den fluorometrischen Messungen nach Stimulation transfizierter HEK Zellen mit Charbachol sind während der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung Schwankungen in den Ratiowerten innerhalb der Meßreihen zwischen Kontrollzellen und den mit einer der LTRPC2 Varianten transfizierten Zellen beobachtbar (Abb. 13 B). Dies könnte möglicherweise auf die unterschiedliche Kapazitäten der Zellen zurückzuführen sein, die, trotz Subtraktion der Fluoreszenzwerte bei basalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , nicht ganz auszuschließen sind.

Zu diesem Zeitpunkt weichen die Ratiowerte sowohl der LTRPC2- $\Delta\text{N}$ - $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen als auch die der dazugehörige Kontrollzellen im Vergleich zu den Ratiowerten der anderen Meßreihen stark ab. Dies ist wahrscheinlich auf tagesabhängige Schwankungen zurückzuführen (z.B. Alter der Zellen, sowie Höhe der Zellpassage).

Der Unterschied, der zwischen Kontrollzellen und LTRPC- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach Speicherentleerung zu sehen ist (Abb. 13 C), ist möglicherweise auf einen Artefakt wie unzureichende Kalibrierung einzelner Messungen zurückzuführen, da die Werte der Kontrollzellen nicht nur von den LTRPC- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen stark abweichen, sondern auch von den Werten, die sich für die Kontrollzellen aus den anderen Meßreihen ergeben. Unterstützt wird diese Annahme durch die hohe Standardabweichung dieser Gruppe von Kontrollzellen, die auf eine große Streuung innerhalb dieser Zellgruppe hinweist.

Daraus kann zusammenfassend geschlossen werden, daß die später gezeigte Stimulation des LTRPC2 durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und durch ADP-Ribose, bzw. der Variante LTRPC2- $\Delta\text{C}$  durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  (siehe Abschnitt. 4.3.6 bis 4.3.8) unabhängig ist von einer Aktivierung des PLC-abhängigen Signaltransduktionsweges. Auch kann eine Regulation einer der LTRPC2 Varianten durch eine  $\text{IP}_3$ -gesteuerte, intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung ausgeschlossen werden. Die Befunde zur Stimulation des LTRPC2 werden durch bislang veröffentlichte Arbeiten bestätigt [67, 141, 142]. Über die gewonnenen Daten ist allerdings nicht auszuschließen, daß möglicherweise eine Interaktion besteht zwischen den LTRPC2 aktivierenden Signalen und den Metaboliten des PLC-abhängigen Signalwegs.

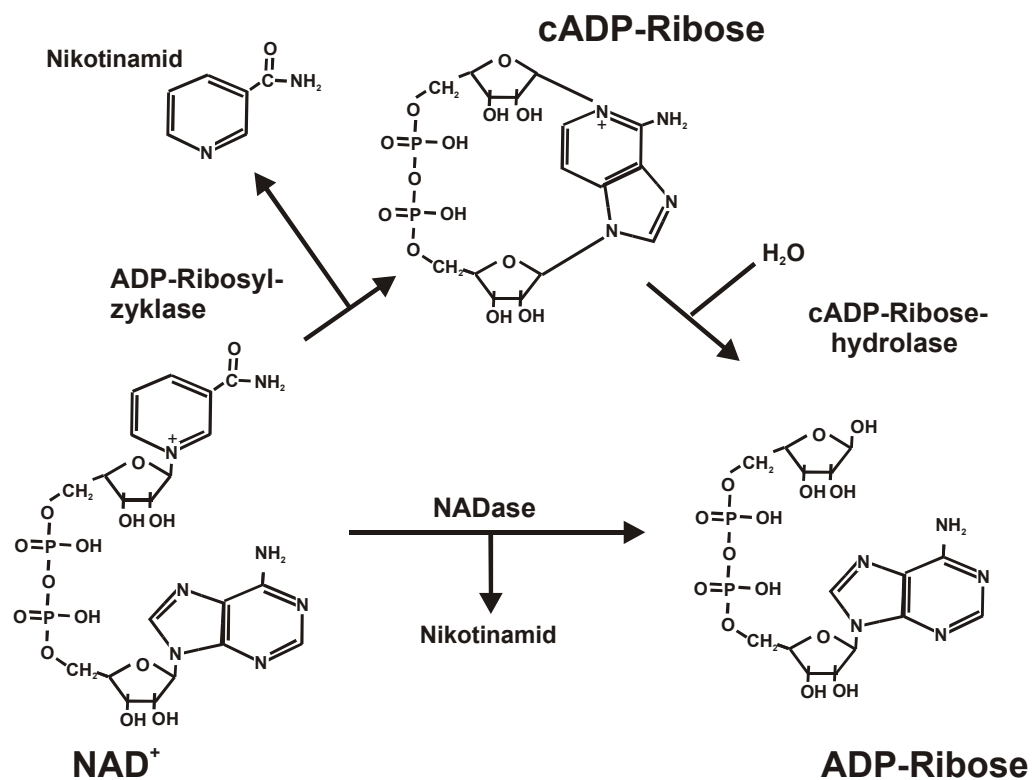
### 5.5.2 Stimulation des LTRPC2 durch hypo- oder hyperosmotische Badlösungen

Viele TRP-Proteine, vor allem die entfernt verwandten Mitglieder, werden unabhängig von einer Speicherentleerung durch alternative Mechanismen reguliert [71, 157]. Bei Zellen, die mit einem entfernt verwandten Mitglied der TRP-Familie, dem TRPV4 (VR-OAC) transfiziert wurden, konnte z.B. bei hypotonischen nicht aber in hypertonen Badlösungen ein verstärkter  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, sowie ein erhöhter Kationeneinwärtsstrom gemessen werden [158]. Diese Befunde gaben Anlaß, eine Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  über die Zeit unter Verwendung von hypo- bzw. von hyperosmotischen Badlösungen zu verfolgen. Wie in Abschnitt 4.3.5 beschrieben, ließ sich unter diesen Versuchsbedingungen kein verstärkter  $Ca^{2+}$ -Influx bei LTRPC2 transfizierten HEK Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nachweisen. Eine Regulation des LTRPC2 durch osmotische Veränderungen in einem Bereich von 270 bis 330 mOsm, wie sie in dieser Arbeit getestet wurden, kann daher ausgeschlossen werden.

### 5.5.3 Stimulation des LTRPC2 durch ADP-Ribose und $NAD^+$

Freie ADP-Ribose und  $NAD^+$  wurden als Agonisten des LTRPC2 beschrieben [67, 141]. Das Nukleosidderivat ADP-Ribose kann sowohl aus  $NAD^+$  als auch aus zyklischer ADP-Ribose (cADP-Ribose) synthetisiert werden (siehe Abb. 24) und wird über eine Pyrophosphatase zu AMP und Ribose-5-Phosphat hydrolysiert [144, 145, 159]. Ein Syntheseweg der freien ADP-Ribose ist über das lymphozytäre Antigen CD 38, einem bifunktionalem Enzym, das sowohl die Synthese von cADP-Ribose als auch die Hydrolyse von cADP-Ribose zu freier ADP-Ribose katalysiert [160 - 162]. Alternativ dazu kann ADP-Ribose direkt aus  $NAD^+$  durch  $NAD^+$ -Glykohydrolasen (NADasen) gebildet werden. Das  $NAD^+$  Metabolit, cADP-Ribose, wirkt als „*second messenger*“ bei der  $Ca^{2+}$ -Freisetzung durch ryanodinsensitive Rezeptoren aus intrazellulären Speichern [163, 164]. ADP-Ribose dagegen spielt eine Rolle bei der posttranslationalen Modifikation spezifischer Proteine. Unter Verwendung von  $NAD^+$  wird ein ADP-Riboserest kovalent durch ADP-Ribosyltransferasen auf spezielle Zielproteine übertragen (ADP-Ribosylierung) [165 - 168]. Erstmals wurde die Modifikation von Proteinen durch ADP-Riboseresten für nukleäre Proteine beschrieben [169, 170]. Inzwischen wird die ADP-Ribosylierung mit zahlreichen

Prozessen wie DNA-Reparatur, Zelldifferenzierung und Apoptose in Verbindung gebracht [171]. Sie spielt aber auch eine Rolle bei der Wirkung des Cholera- sowie des Pertussistoxin, bei der über eine ADP-Ribosylierung  $\alpha$ -Untereinheiten von G-Proteinen modifiziert werden [172, 173]. Eine funktionelle Eigenschaft der freien ADP-Ribose als „second messenger“ in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signaltransduktionswegen war bislang jedoch nicht bekannt.



**Abb. 24: Syntheseweg der ADP-Ribose**

ADP-Ribose kann entweder direkt aus NAD<sup>+</sup> über NAD<sup>+</sup>-Glykohydrolasen (NADasen) gebildet werden, oder über das NAD<sup>+</sup> Metabolit cADP-Ribose.

cADP-Ribose = zyklische ADP-Ribose

Die Arbeitsgruppe um Perraud stellte durch Strukturvergleiche von LTRPC2 mit einer ADP-Ribose spezifischen Pyrophosphatase, dem Protein NUDT9, eine 50 %- Homologie des MutT-Motivs, einer sog. katalytischen „Nudix-Box“, beider Proteine fest und konnte eine enzymatische Aktivität der „Nudix-Box“ von LTRPC2 nachweisen. Daher lag die Vermutung einer möglichen ADP-Ribose abhängigen Stimulation des LTRPC2 durch das MutT-Motiv

nahe. Durch intrazelluläre Stimulation von LTRPC2 transfizierten HEK 293 Zellen mit einer ADP-Ribose Konzentration, deren  $EC_{50}$  90  $\mu$ M beträgt, konnte die Arbeitsgruppe um Perraud den LTRPC2 als  $Ca^{2+}$ -permeablen, nicht selektiven Kationenkanal mit einer Leitfähigkeit von 60 pS charakterisieren [67].

Während die Arbeitsgruppe um Perraud keine Stimulation des LTRPC2 mit weiteren Nukleosidphosphatderivaten wie  $NAD^+$ , cADP-Ribose, ATP, ADP, Zuckerderivaten von ADP, GDP und UDP sowie von den Abbauprodukten der ADP-Ribose (AMP und Ribose-5-Phosphat) nachweisen kann, wird von der Gruppe um Sano, die ebenfalls eine Stimulation mit ADP-Ribose erzielt, dagegen von einem verzögerten Einwärtsstrom nach intrazellulärer Applikation von  $NAD^+$  bei LTRPC2 exprimierenden Zellen berichtet [67, 141].

Diese Arbeiten gaben Anlaß, eine Stimulation der klonierten LTRPC2 Varianten mit ADP-Ribose und  $NAD^+$  zu überprüfen. Bei Verwendung des Standardbadpuffers, einem Haltepotential von  $-60$  mV und einer intrazellulären Gabe von 0,3 mM ADP-Ribose entwickelt sich nur bei HEK 293 Zellen ein Strom, die mit dem ungespleißten LTRPC2 transfiziert worden waren. Über die Strom-Spannungsbeziehung, dem Umkehrpotential und durch Blockierung des meßbaren Stroms mit dem unspezifischen Kanalblocker NMDG, konnte LTRPC2 als unselektiver Kationenkanal mit einer Permeabilität hauptsächlich für  $Na^+$  - aber auch für  $Cs^+$  - und  $Ca^{2+}$  -Ionen charakterisiert werden.

Nach Erreichen des Ganzzellmodus treten nach Applikation von ADP-Ribose unterschiedliche Aktivierungszeiten der Ströme von 0,5 bis 8 min auf. Dies ist möglicherweise auf unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten der ADP-Ribose in Abhängigkeit des Zellvolumens zurückzuführen. Bei einer geringer Geschwindigkeit kann ein Teil der ADP-Ribose zu inaktiven Metaboliten verstoffwechselt werden.

In Abschnitt 4.1.3 erwähnt, kommt es bei der in dieser Arbeit klonierten LTRPC2 Sequenz, zu zwei Aminosäureaustauschern (S1088N und D1291E). Aufgrund der funktionellen Ergebnisse, die in dieser Arbeit für den LTRPC2 erzielt wurden und die denen der Arbeitsgruppe um Perraud und Mitarbeitern gleichen, scheinen die Aminosäureveränderungen des LTRPC2 keine Auswirkung auf die Kanaleigenschaften zu besitzen. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse aus Versuchen, in denen durch TRPV5 (ECaC1), sowie durch TRPV6 (ECaC2; CaT1) ausgelöste Ströme schneller inaktiviert werden, wenn den Proteinen gezielt Mutationen von nur einer Aminosäure zugefügt worden waren [174].

Die Deletionen der LTRPC2 Varianten dagegen verhindern eine Stimulation mit ADP-Ribose, obwohl sie stromaufwärts dem MutT-Motiv liegen. Die Nudix-Box scheint nicht nur alleine Voraussetzung für die Regulation über ADP-Ribose zu sein, sondern auch andere Informationen, die möglicherweise in den Bereichen der Deletionen gespeichert sind, müssen vorhanden sein. Denkbar ist, daß die Bindung von ADP-Ribose an LTRPC2, wie sie von Perraud und Mitarbeitern, sowie von der Arbeitsgruppe um Sano postuliert wird [67, 141], eine für die Kanalregulierung notwendige Konformationsänderung des Proteins auslöst. Durch das Fehlen der gespleißten Bereiche ist diese Änderung möglicherweise unvollständig und eine Öffnung des Kanals wird unterbunden.

Eine Aktivierung des LTRPC2 durch  $\text{NAD}^+$ , wie sie von Sano und Mitarbeitern beschrieben wird, oder eine Aktivierung einer der Varianten durch  $\text{NAD}^+$ , konnte dagegen in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Die Regulation des LTRPC2 durch  $\text{NAD}^+$  ist wahrscheinlich von vielen weiteren Faktoren wie die Zusammensetzung intrazellulärer Enzyme abhängig und höchst sensibel.

Die Arbeitsgruppe um Sano kann eine Stimulation des LTRPC2 mit  $\text{NAD}^+$  sowohl in einem Ganzzellmodus als auch in einer „*inside-out*“ Konfiguration bei Patch-Clamp Versuchen nachweisen. Bei der „*inside-out*“ Anordnung sind intrazelluläre Faktoren jedoch nicht auszuschließen, etwa bei unzureichenden Waschschritten, was nur schwer zu überprüfen ist.

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß eine Aktivierung des ungespleißten LTRPC2 durch ADP-Ribose in dieser Arbeit reproduziert werden konnte. Die Aminosäureveränderungen, wie sie in der Proteinsequenz des vorliegenden klonierten LTRPC2 auftreten, scheinen keine biophysikalischen Veränderungen hervorzurufen. Anders verhält es sich bei den Spleißvarianten, bei denen die, sich stromaufwärts zur katalytischen Domäne befindenden, Deletionen eine Aktivierung durch ADP-Ribose unterbinden.

Experimentelle Bedingungen, unter denen ein Strom über  $\text{NAD}^+$  bei Zellen, die mit einer der Varianten transfiziert wurden, nachzuweisen ist, konnten in dieser Arbeit nicht geschaffen werden. Der Widerspruch zur Stimulation von LTRPC2 mit  $\text{NAD}^+$  bleibt damit vorerst bestehen.

#### 5.5.4 Stimulation des LTRPC2 und LTRPC- $\Delta$ C durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als ein Modell für oxidativen Streß

Um die Hypothese zu überprüfen, daß NAD<sup>+</sup> indirekt zur Stimulierung des LTRPC2 führt, z.B. bei einer gesteigerten NAD<sup>+</sup> Konzentration, über eine erhöhte Synthese von ADP-Ribose, wurde versucht, ein Modell zu etablieren, bei dem es in der Zelle zu einer erhöhten NAD<sup>+</sup> Konzentration kommt. Dies ist z.B. bei oxidativem Streß der Fall. Um eine Situation mit oxidativen Streß hervorzurufen, wurde transfizierten Zellen 1 – 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ins extrazelluläre Bad verabreicht. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ins extrazelluläre Medium wurde in Patch-Clamp Untersuchungen die Ströme in transfizierten HEK 293 Zellen gemessen, und durch Messungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mit fura2 Änderungen in der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration verfolgt.

Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte gezeigt werden, daß in einer Badlösungen unterschiedlicher Ionenzusammensetzung nach Erreichen des Ganzzellmodus Na<sup>+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>- und Cs<sup>+</sup>- Ionen durch LTRPC2 permeieren. Die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgelösten Ströme lassen sich wiederholt mit NMDG blockieren, sind reversibel (außer bei einer Konzentration von 30 mM) und gleichen, abgesehen von einer geringeren Amplitude, biophysikalisch den Strömen, die durch Stimulation mit ADP-Ribose hervorgerufen werden. Eine erneute Applikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zu einem wiederkehrenden Kationeneinwärtsstrom. So kann davon ausgegangen werden, daß trotz der Behandlung mit den, auf den ersten Blick hoch erscheinenden molaren Konzentrationen an reaktiven Molekülen, die Zellmembran während der Dauer des Experiments intakt ist. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte demnach als ein geeignetes Modell für oxidativen Streß etabliert werden.

Nach Stimulation der verschiedenen Varianten des LTRPC2 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, konnte bei Zellen, die mit dem LTRPC2- $\Delta$ C transfiziert worden waren, ebenfalls ein Strom gemessen werden. Unter diesen experimentellen Bedingungen unterschied sich der Stromverlauf bei LTRPC2- $\Delta$ C transfizierten Zellen nicht von denjenigen, die von LTRPC2 transfizierten HEK Zellen nach Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oder nach Stimulation mit ADP-Ribose gemessen werden. Dieses Ergebnisse waren insofern überraschend, da der LTRPC2- $\Delta$ C nicht auf ADP-Ribose reagiert. Die mit Hilfe der Patch-Clamp Technik erzielten Ergebnisse nach Stimulation der Variante LTRPC2- $\Delta$ C mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigen, daß LTRPC2- $\Delta$ C wie LTRPC2 ein nicht selektiver Kationenkanal mit einer Permeabilität hauptsächlich für Na<sup>+</sup>-Ionen aber auch zu einem



geringen Teil für  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Cs}^+$ -Ionen ist. Die Stimulation von LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta\text{C}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann durch fluorometrische Messungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mittels fura2 bestätigt werden.

### **5.5.5 Stimulation des LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta\text{C}$ durch $\text{H}_2\text{O}_2$ unabhängig von $\text{NAD}^+$ und ADP-Ribose**

Die Ionenpermeabilität, die Kinetik mit einer Verzögerung von 0,5 – 8 min sowie die durchschnittliche Stromdichte von – 20 pA/pF, die bei einer Stimulation von LTRPC2 sowie LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  gemessen werden, gleichen den Ergebnissen, wie sie von Sano und Mitarbeitern nach einer Stimulation von LTRPC2 mit  $\text{NAD}^+$  beschrieben werden [141]. Die ursprüngliche Überlegung, oxidativer Streß führe, über eine erhöhte  $\text{NAD}^+$ -Konzentration, zu einer gesteigerten Syntheserate von ADP-Ribose und dieses wiederum zur Aktivierung des LTRPC2, kann jedoch nicht aufrechterhalten werden. Die Versuche, in denen transfizierte Zellen zunächst mit  $\text{NAD}^+$  stimuliert wurden, bevor extrazellulär  $\text{H}_2\text{O}_2$  appliziert wurde, zeigen, daß erst nach Gabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein charakteristischer Einwärtsstrom sowohl bei LTRPC2 als auch bei LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen zu beobachten ist (Abb. 22). Das gleiche Phänomen trat auf, wenn LTRPC2- $\Delta\text{C}$  exprimierenden Zellen vorausgehend intrazellulär ADP-Ribose verabreicht wurde, ein typischer Strom entwickelt sich erst nach Gabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Diese Resultate zeigen zu einem, daß eine fehlende Stimulation in vorangegangenen Experimenten von LTRPC2 nach Applikation von  $\text{NAD}^+$ , bzw. von LTRPC2- $\Delta\text{C}$  nach Applikation von ADP-Ribose, nicht durch eine fehlende Expression der Proteine begründet sein kann, zum anderen führen diese Experimente zur Vermutung, daß parallel zur Aktivierung von LTRPC2 mit ADP-Ribose ein eigenständiger Stimulationsweg für  $\text{H}_2\text{O}_2$  existiert.

Über die funktionellen Experimente einer Stimulation des LTRPC2 durch ADP-Ribose im Zusammenhang mit einer Veränderung des Redox-Potential einer Zelle konnte gezeigt werden, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$ , als ein Modell für oxidativen Streß, in der Lage ist, sowohl LTRPC2 in seiner ungespleißten Form, als auch die Deletionsvariante LTRPC2- $\Delta\text{C}$  zu stimulieren. Die Variante LTRPC2- $\Delta\text{C}$  konnte so ebenfalls als unselektiver,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kationenkanal charakterisiert werden. Die Stimulation von LTRPC2 sowie von LTRPC2- $\Delta\text{C}$  durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  scheint dabei, anders als zunächst angenommen, unabhängig von ADP-Ribose oder von einer

erhöhten  $\text{NAD}^+$ -Konzentration zu sein, sondern durch einen alternativen Regulationsweg bewerkstelligt zu werden.

### **5.5.6 Stimulation des LTRPC2 durch $\text{H}_2\text{O}_2$ über intrazelluläre oxidative Prozesse**

Ein möglicher Wirkungsmechanismus von  $\text{H}_2\text{O}_2$  könnte durch die Bildung von Radikalen wie  $\text{OH}^\bullet$  und/oder durch eine Oxidation von intrazellulären Molekülen sein, welches möglicherweise eine Signalkaskade mit Regulation des Kanals zur Folge hat.

Nach Stimulation von LTRPC2 oder LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten HEK 293 Zellen durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  tritt ein Einwärtsstrom bzw. die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , erst nach einer Verzögerung von mehreren Minuten auf. Wird nach Blockade dieses Stroms der NMDG-haltige Badpuffer durch den Standardpuffer ausgewechselt, ist unmittelbar wieder ein erhöhter Einwärtsstrom zu messen, obwohl kein  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der extrazellulären Lösung vorhanden ist (siehe Abb. 18; Abb. 19 A). Diese Phänomene deuten darauf hin, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  wahrscheinlich über Sekundärprozesse wie Induktion anhaltender, intrazellulärer Signalkaskaden wirkt und nicht direkt, in Form eines Liganden, am Kanal eine Wirkung ausübt. Bei einer direkten Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf das Kanalprotein würde man von einem unmittelbaren Effekt ausgehen, der sofort nach Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu beobachten wäre und nach Entfernen des Agonisten keine Auswirkung mehr auf die Kanalaktivität besäße.

Um diese ersten Vermutungen zu überprüfen, wurden Patch-Clamp Experimente durchgeführt in denen transfizierten Zellen über den Pipettenpuffer Mannitol verabreicht wurde, dessen Wirkung als Antioxidans bekannt ist [175]. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte nach Gabe von extrazellulärem  $\text{H}_2\text{O}_2$  kein Strom über die Plasmamembran gemessen werden, während mit dem Standardpipettenpuffer bei LTRPC2 oder LTRPC2- $\Delta\text{C}$  transfizierten Zellen nach Gabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein Strom auszulösen war.

So scheint  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Tat indirekt, über intrazelluläre Oxidationsmechanismen, einen regulatorischen Einfluß auf LTRPC2 und seiner Variante LTRPC2- $\Delta\text{C}$  auszuüben. In welcher Form  $\text{H}_2\text{O}_2$  agiert, über Bildung von Radikalen und/oder über Oxidationsmechanismen, und welche Moleküle von einer Oxidation betroffen sind, ist noch zu überprüfen.

### 5.5.7 Vergleiche zu Arbeiten anderer Gruppen zur Stimulation von LTRPC2 mit $H_2O_2$

Die hier beschriebenen Befunde einer Regulierung von LTRPC2 mit  $H_2O_2$ , wurden im Laufe dieser Arbeit gleichzeitig von der Arbeitsgruppe um Hara dokumentiert [142].

Hara und Mitarbeiter beobachten die gleichen Effekte von  $H_2O_2$  auf LTRPC2 transfizierten HEK Zellen. Sie sehen bei Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  mit fura2 einen verzögerten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Gabe von  $H_2O_2$ , der dosisabhängig ist und bei Verwendung eines  $Ca^{2+}$ -freien Badpuffers ausbleibt. Desweiteren messen sie in „perforated“-Patch Experimenten einen Kationeneinwärtsstrom, wenn 100  $\mu M$   $H_2O_2$  ins extrazelluläre Medium gegeben wird.

Unterschiede bei den elektrophysiologischen Messungen mit einer geringeren  $H_2O_2$  Konzentration, sowie einer erhöhten Amplitude des Kationeneinwärtsstroms, wie sie von der Arbeitsgruppe um Hara beschrieben werden, sind möglicherweise auf deren Verwendung eines „perforaten“ Patches zurückzuführen, bei dem das intrazelluläre Milieu und damit u.a. die nativen enzymatischen Verhältnisse nahezu erhalten bleiben. Verwendet die Arbeitsgruppe um Hara z.B. einen Ganzzellmodus, wie er in dieser vorliegenden Arbeit angewandt wurde, so sieht sie bei einer Konzentration von 100  $\mu M$   $H_2O_2$  keinen Einwärtsstrom bei LTRPC2 transfizierten Zellen. Desweiteren setzt die Arbeitsgruppe von Hara bei Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  über fura2  $H_2O_2$  Konzentrationen von bis zu 10 mM ein, vergleichbar mit den Konzentrationen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden.

Hara und Mitarbeiter bestätigen, daß die Wirkung von  $H_2O_2$  ein intrazellulärer oxidativer Prozeß ist. Sie weisen nach, daß die Stimulation des LTRPC2 jedoch nicht auf eine Aminosäureoxidation hervorgerufen wird, so daß eine direkte Wirkung von  $H_2O_2$  an dem Kanal unwahrscheinlich ist. Wie die Signalkaskade jedoch genauer aussieht, welche Moleküle durch Oxidation involviert sind, wird nicht beschrieben.

Neben einer Stimulation des LTRPC2 durch  $H_2O_2$  sehen die Mitarbeiter um Hara ebenfalls, wie die Arbeitsgruppe um Sano, einen Kationeneinwärtsstrom nach intrazellulärer Stimulation von LTRPC2 transfizierten HEK Zellen mit  $NAD^+$ . Zusätzlich konnten sie eine Stimulation des LTRPC2 mit weiteren sog. ROS (*reactive oxygen species*), NOS (*nitrogen oxidative species*) und Arachidonsäure nachweisen. Hara und Mitarbeiter beschreiben, daß die Stimulation des LTRPC2 über diese Agenzien von dem MutT-Motiv abhängig ist, sowie von einer Region im N-terminalen Bereich (AS 307 – 316), die als *Achrachidonic acid-responsive*

*sequence* (ARS) bereits bei dem TREK-1 Kaliumkanal als regulatorische Einheit identifiziert wurde [141, 142].

Da die Deletionen der LTRPC2 Varianten stromabwärts von ARS, sowie stromaufwärts des MutT-Motivs liegen, wäre eine Aktivierung der LTRPC2 Varianten durch weitere ROS, NOS zudem durch Arachidonsäure denkbar. Letzteres konnte ferner für die Drosophila TRP und TRPL sowie vom TRPC4 nachgewiesen werden [42, 176] und ist im Zusammenhang mit der Aktivierung der LTRPC2 Varianten durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein interessanter Aspekt. Da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Phospholipase A<sub>2</sub> positiv stimuliert [177], könnte ein möglicher Wirkungsweg von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über eine gesteigerte Synthese der Arachidonsäure sein.

Die Diskrepanzen zur Stimulation der verschiedenen LTRPC2 Varianten mit NAD<sup>+</sup> können bislang nicht gelöst werden. Die Verwendung eines *perforated* Patch von der Arbeitsgruppe von Hara und Mitarbeitern kann nicht allein zur Erklärung herangezogen werden, da die Arbeitsgruppe um Sano vergleichbare Einwärtsströme mit NAD<sup>+</sup> bei einem Ganzzellmodus erzielen kann, so daß die Unterschiede bei den einzelnen Arbeitsgruppen zur Stimulation von LTRPC2 mit NAD<sup>+</sup> ungeklärt bleiben [141, 142].

## **5.6 Überlegungen zu den funktionellen Eigenschaften der LTRPC2 Varianten im Vergleich zu den Eigenschaften anderer entfernt verwandter TRP-Proteine**

### **5.6.1 Entfernt verwandte TRP-Proteine mit bifunktionalen Eigenschaften**

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen zu den biophysikalischen Eigenschaften des TRPM7 (Chak1; TRP-PLIK; LTRPC7) sowie dem Nachweis einer katalytischen Domäne des TRPM6 (Chak2), neben dem LTRPC2 zwei weitere Mitglieder der TRPM-Subfamilie, führen die funktionellen Daten des LTRPC2 zur Überlegung, daß möglicherweise die TRPM-Familie innerhalb der TRP Proteine eine eigene Klasse bifunktionaler Proteine darstellt.

TRPM6/7, die zueinander eine hohe Homologie aufweisen, besitzen ebenfalls, wie der LTRPC2, am C-terminalen Ende lokalisiert, eine katalytische Domäne. Diese Domäne von TRPM6/7 besitzt Homologie zu einer neuen Klasse von Kinasen, den atypischen  $\alpha$ -Kinasen [68, 178, 179]. Die  $\alpha$ -Kinasen stellt eine Familie von Enzymen dar, die Aminosäuren innerhalb von  $\alpha$ -Helices phosphorylieren. Vertreten sind die  $\alpha$ -Kinasen bislang durch eEf-2

Kinase (eukaryotic elongation factor-2 kinase) und MHCKs (*Dictyostelium* myosin heavy chain kinases) [180].

Von TRPM6 sind noch keine funktionellen Eigenschaften nachgewiesen worden [178]. Dagegen ist TRPM7 sowohl ein Protein mit Kinaseeigenschaften als auch ein unselektiver,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kationenkanal mit einer Leitfähigkeit von 105 pS, der durch hohe freie Magnesiumkonzentrationen (2 – 3 mM) blockierbar ist [181]. Ähnlich wie für den LTRPC2 ist nicht eindeutig geklärt, inwieweit die enzymatische Aktivität des TRPM7 die Regulation der Kanaleigenschaften, z.B. durch Autophosphorylierung, beeinflusst. Dagegen konnte eine direkte Proteininteraktion in der katalytischen Domäne des TRPM7 mit der C2 Domäne von PLC $\beta$  und PLC $\gamma$  nachgewiesen werden. Desweiteren konnte in nativ und in heterolog exprimierenden Zellen gezeigt werden, daß, im Gegensatz zu den klassischen TRPC Proteinen, eine Aktivierung der PLC über Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren oder über Stimulation von Tyrosinkinase-Rezeptoren, den Kanal TRPM7 inaktiviert, dabei scheint vor allem die Hydrolyse des PIP<sub>2</sub> durch PLC ausschlaggebend zu sein [182].

Wie für den TRPM7 so konnte auch für den LTRPC2 sowohl eine katalytische Aktivität als auch Eigenschaften eines Kationenkanals nachgewiesen werden. Aufgrund seiner Struktur ist nicht auszuschließen, daß TRPM6 ebenfalls bifunktionale Eigenschaften aufweist.

Wie am Beispiel des TRPM7 beschrieben, ist ferner nicht auszuschließen, daß zur Steuerung des LTRPC2, und möglicherweise zur Steuerung des TRPM6, sowohl Proteininteraktionen notwendig sind, als auch eine enzymatische Aktivität der Proteine gegeben sein muß.

### **5.6.2 Aktivierung entfernt verwandter TRP-Proteine bei sensorischen Prozessen**

Eine physiologische Bedeutung konnte für einige Mitglieder der entfernt verwandten TRP-Proteine, vorwiegend für Proteine der TRPV-Subfamilie, bei sensorischen Prozessen nachgewiesen werden [183].

Der TRPV1 (Vanilloid Rezeptor 1, VR1), der u.a. im Trigeminus Nerven sowie in den dorsalen Wurzelganglien aber auch in anderen Geweben exprimiert wird, reagiert auf eine Reihe von Agonisten wie z.B. Capsaicin und andere Vanilloide, einem niedrigem pH-Wert sowie Temperaturen > 42°C. Der unselektive Kationenkanal wird unabhängig von einer IP<sub>3</sub>-gesteuerten Speicherentleerung aktiviert, die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht geklärt [61]. Eine Heteromerisierung von TRPV1 und dem erst kürzlich klonierten,

hoch homologen TRPV3, der durch Temperaturen um 33°C und durch Temperaturen im schmerzhaften Bereich aktiviert werden kann, scheint bei der temperaturabhängigen Regulation von TRPV1 von Bedeutung zu sein [184 - 186].

Ein drittes Mitglied der TRPV-Subfamilie, der TRPV2, der ähnlich in sensorischen Neuronen wie der TRPV1 exprimiert wird, ist ein unselektiver Kationenkanal mit einer hohen Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, der auf Temperaturen mit einem Schwellenwert von 52°C reagiert [63]. Ein anderes, bereits erwähntes Mitglied, der TRPV4 ist osmo- sowie mechanosensitiv und ist möglicherweise während der Reizweiterleitung bei Druckempfindungen beteiligt [187].

Die Mitglieder TRPV5 und 6 werden mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase von Epithelzellen in Verbindung gebracht und werden, anhand ihrer biophysikalischen Eigenschaften, als Kandidaten gehandelt, die den  $I_{\text{CRAC}}$  vermitteln [188 - 190]. Auch wenn die biophysikalischen Eigenschaften dieser Kanäle im Vergleich zu dem  $I_{\text{CRAC}}$  umstritten sind [191].

Neben den TRPV-Proteinen, konnte für ein Maushomolog eines Mitglieds der TRPM-Subfamilie, dem TRPM8, eine Bedeutung bei somatosensorischen Prozessen nachgewiesen werden. TRPM8 transfizierte CHO-Zellen reagieren mit einem verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx sowie mit einem unselektiven Kationenstrom auf Temperaturen mit einem Schwellenwert von 23-25°C und einem Maximalwert bei 15°C. Menthol, welches Kälteempfindungen hervorruft, bewirkt in einer Konzentration von 10 – 100  $\mu\text{M}$  in der extrazellulären Lösung eine gleiche Aktivität des TRPM8, wie sie durch die Erniedrigung der Temperatur zu verfolgen ist. Über die genauen Regulationsmechanismen ist für den TRPM8 jedoch noch nichts bekannt, möglicherweise spielen aber auch hier Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle, da der TRPM8 sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus *coiled-coil* Regionen aufweist [69].

Da der LTRPC2 stark im ZNS exprimiert wird und hoch homolog zum TRPM8 ist, ist es denkbar, daß der LTRPC2 ebenfalls bei neuronalen Prozessen von Bedeutung ist. Dabei können unterschiedliche Regulationsmechanismen über ADP-Ribose und über  $\text{H}_2\text{O}_2$  relevant sein, es ist aber auch möglich, daß, wie bei dem TRPV1, weitere Agonisten, oder Proteininteraktionen für die Aktivierung des LTRPC2 eine Rolle spielen. Es kann aber auch sein, daß eher die Spleißvarianten mit alternativen Stimuli von Bedeutung sind. Eine C-terminale Spleißvariante des TRPV1 z.B., läßt sich nicht durch die charakteristischen Stimuli des ungespleißten TRPV1, Capsaicin und Temperaturen im schmerzhaften Bereich,

aktivieren, sondern wird durch mechanosensitive Bedingungen stimuliert, die während einer Schrumpfung von Zellen auftreten [192].

Wie der TRPV1 so wird auch der LTRPC2 nahezu ubiquitär exprimiert. Es ist denkbar, daß neben sensorischer Stimuli, sowohl für den TRPV1, als auch für den LTRPC2 zusätzliche Aktivierungsmöglichkeiten bei weiteren physiologischen Prozessen existieren. Gegebenenfalls sind dabei Spleißvarianten involviert, über die ein alternatives Regulationsmuster organisiert wird.

Für eine Reihe an Mitgliedern der entfernt verwandten TRP-Proteine wurde eine Aktivierung durch sensorische Stimuli nachgewiesen. Die genaue Bedeutung dieser Mitglieder für die einzelnen sensorischen Prozesse konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

Die TRP-Subfamilien der entfernt verwandten TRP-Proteine werden mit speziellen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht [58, 193 - 196]. Möglicherweise lassen sich über diesen Weg Regulationsprinzipien, sowie genauere physiologische Bedeutungen dieser TRP-Proteine aufdecken.

## **5.7 Überlegungen zur physiologischen Relevanz der LTRPC2 Varianten**

### **5.7.1 Mögliche Beteiligung der LTRPC2 Varianten bei der Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten**

Nach der Frage zur Relevanz der LTRPC2 Varianten für die Funktion neutrophiler Granulozyten, ist die Regulation des LTRPC2 durch ADP-Ribose, sowie durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein interessanter Aspekt, gerade im Hinblick auf die Chemotaxis und im Hinblick auf den oxidativen Burst von neutrophilen Granulozyten.

Die Regulation von LTRPC2 über ADP-Ribose als potentieller „*second messenger*“ in Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Signalwegen ist möglicherweise bei der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten von Bedeutung.

In neutrophilen Granulozyten von CD38<sup>-/-</sup> knock out Mäusen fehlt nach Stimulation mit dem chemotaktisch wirksamen Peptid, f-MLP, ein sekundärer [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg, der jedoch in Neutrophilen von Wildtyp Mäusen beobachtbar und durch extrazelluläres EGTA blockierbar ist. Zugleich ist die Chemotaxis der CD38<sup>-/-</sup> Neutrophile, im Gegensatz zu denen von

Wildtyp Mäusen auf f-MLP gestört [197]. CD38 ist bislang die einzig identifizierte ADP-Ribosylzyklase, die die Bildung von cADP-Ribose aus  $\text{NAD}^+$ , aber vor allem die Bildung von ADP-Ribose katalysiert [144].

Die Arbeitsgruppe um Partida-Sanchez postuliert, daß die durch f-MLP ausgelöste Chemotaxis in Wildtyp Mäusen von einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über die Plasmamembran abhängig sei, der durch cADP-Ribose ausgelöst werde. Das erkläre auch die gestörte Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten von CD38<sup>-/-</sup> Mäusen, denen keine Synthesemöglichkeit von cADP-Ribose gegeben ist. In der Arbeit wurde aber das Hauptprodukt der CD38, die ADP-Ribose [198], nicht berücksichtigt. Es ist vorstellbar, daß nicht cADP-Ribose, sondern ADP-Ribose für einen Kationen- sowie für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und der damit verbundenen Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist, möglicherweise durch Stimulation des LTRPC2.

Bei dem oxidativen Burst Neutrophiler wiederum könnte die Stimulation von LTRPC2 durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  von Bedeutung sein. Die Freisetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Neutrophile während des oxidativen Bursts löst eine Aktivierung zusätzlicher Neutrophiler aus und erhöht die Abwehrreaktion. Möglicherweise spielt die Stimulierung des LTRPC2 und seiner Variante durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei diesem Prozeß eine positiv verstärkende Rolle. Während des anfänglichen Burst könnte freigesetztes  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine Öffnung des LTRPC2 noch nicht aktivierter Neutrophiler bewirken und dadurch in diesen Zellen einen, für den Burst erforderlichen,  $\text{Ca}^{2+}$ - und Kationeneinstrom auslösen.

Während nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten durch Zytokine und Chemokine das *Priming* ein zum Teil reversibles Ereignis ist, ist der oxidative Burst ein weitläufig irreversibler Prozeß nach dem „Alles oder Nichts“ Prinzip, der mit der Apoptose der neutrophilen Granulozyten endet [199 - 201].

Spielt die Aktivierung des LTRPC2 sowohl bei der Chemotaxis als auch beim oxidativen Burst der neutrophilen Granulozyten eine Rolle, so scheinen unterschiedliche Stimulationswege für den Kanal durchaus sinnvoll zu sein.

Eine Überlegung ist, daß möglicherweise über eine ADP-Ribosylierung bedingte Konformationsänderungen des LTRPC2 zu einer Öffnung des Kanals führen und eine zeitlich begrenzte Aktivierung des Kanals während der Chemotaxis erreicht wird, indem der LTRPC2 als potentielle Pyrophosphatase seinen Aktivator hydrolysiert. Während dagegen beim Burst hohe  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen, wie in Abschnitt 4.3.7 erwähnt, zu einer dauerhaften



Aktivierung der LTRPC2 Varianten führen und damit einen steten Kationeneinstrom und letztlich die Apoptose der neutrophilen Granulozyten auslösen. Inwiefern die Vermutungen einer Beteiligung des LTRPC2 im Zusammenspiel mit weiteren Molekülen, sowohl bei der Chemotaxis, als auch beim oxidativen Burst von neutrophilen Granulozyten zutreffen, sowie unterschiedliche Regulationsmechanismen dabei eine Rolle spielen, ist allerdings noch zu untersuchen.

### **5.7.2 Bedeutung einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Stimulation der LTRPC2 Varianten für kalziumabhängige, degenerative Zellprozesse**

ROS, und besonders H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, werden vor allem mit vielen degenerativen Zellprozessen wie u.a. dem Zellaltern, neurodegenerative Prozesse wie Parkinson, Chorea Huntington und Alzheimer in Verbindung gebracht [202 - 206]. Eine der am stärksten vertretenden Hypothese ist, daß bei zelldegenerativen Prozessen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> DNA-Schädigungen über Strangbrüche auftreten. Anschließende Reparaturprozesse über Aktivierung der poly(ADP-Ribose) Polymerase führt zu einer NAD<sup>+</sup> und ATP Depletion der Zelle was den Zelltod zur Folge hat [207, 208]. Daneben wird die Meinung vertreten, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Zellmembran in unspezifischer Weise durch Lipidperoxidation dauerhaft schädigt und damit die Zelle zerstört [209]. Die genauen Mechanismen jedoch, die durch ROS zum Zelltod führen, sind noch nicht näher entschlüsselt.

Einen direkten Einfluß von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Regulation von Kationenkanälen bei degenerativen Zellprozessen, konnte *in vivo* in mehreren Zelltypen nachgewiesen werden. Die Substanz Alloxan ruft im Tiermodell *Diabetes Mellitus* hervor, durch die Schädigung der pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Man nimmt an, daß die Wirkung von Alloxan auf die Bildung von ROS zurückzuführen ist. Bei einer Insulin sezernierenden Zelllinie, CRI-G1, die aus  $\beta$ -Zellen des Pankreas von Ratten gewonnen wurde, tritt nach Gabe von Alloxan eine Aktivierung membranärer Kanäle, sog. NS<sub>NAD</sub> Kanäle, ein. Die Folge ist ein irreversibler Kationeneinstrom und damit eine Zerstörung des Membranpotentials. Die gleichen Kanäle werden aktiviert, wenn den CRI-G1 Zellen extrazellulär H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> appliziert wird. So konnte gezeigt werden, daß die destruktive Wirkung von Alloxan über ROS, wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, speziell auf eine Öffnung spezifischer Kanäle zurückzuführen ist [210, 211].

Betrachtet man die biophysikalischen Eigenschaften des, bisher auf molekularer Ebene noch nicht identifizierten, NS<sub>NAD</sub> Kanals, so sieht man, daß es sich um einen unselektiven

Kationenkanal handelt, mit einer Permeabilität hauptsächlich für  $\text{Na}^+$ - aber auch für  $\text{Cs}^+$ - und zu einem geringen Anteil für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die Leitfähigkeit liegt um die 70 pS, das Umkehrpotential bei 0 mV. Die Öffnung des Kanals erfolgt nach Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit einer Verzögerung von mehreren Minuten, die dosisabhängig ist und desweiteren der Anwesenheit intrazellulärem  $\text{NAD}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  unterliegt. Werden die Eigenschaften dieser Ströme des  $\text{NS}_{\text{NAD}}$  Kanals, mit denen der LTRPC2 Varianten verglichen, so werden LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta\text{C}$  mit den gleichen biophysikalischen Eigenschaften durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  stimuliert, wie Herson und Mitarbeiter bei CRI-G1 Zellen es für den  $\text{NS}_{\text{NAD}}$  beschreiben [210, 211]. Eine mögliche Schlußfolgerung ist, daß der  $\text{NS}_{\text{NAD}}$  durch LTRPC2 oder LTRPC2- $\Delta\text{C}$  repräsentiert sein könnte.

Aus den vorangegangenen Daten läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß unter Beteiligung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sowohl bei der Immunabwehr, als auch bei zellschädigenden Prozessen Kationenkanäle aktiviert werden, die möglicherweise durch eine der LTRPC2 Varianten vertreten sind.

## 6 Ausblick

### 6.1 Funktionelle Bedeutung der bisher inaktiven Spleißvarianten

Ein erster Schritt sollte sein, in Patch-Clamp Experimenten und in fluorometrischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen eine Stimulation der LTRPC2 Varianten an heterolog transfizierten Zellen mit weiteren ROS, NOS, sowie mit Arachidonsäure zu überprüfen, wie es von der Arbeitsgruppe um Hara für den LTRPC2 beschrieben wurde [142]. Möglicherweise ist, neben dem ungespleißten LTRPC2, auch eine der Varianten, für die bislang noch keine Aktivierung nachgewiesen werden konnte, auf eines dieser, von Hara und Mitarbeitern erwähnten, Stimulanzien sensitiv.

Ein weiterer Ansatz, die funktionelle Bedeutung der bisher inaktiven Spleißvarianten LTRPC2- $\Delta\text{N}$  und LTRPC2- $\Delta\text{N}$ - $\Delta\text{C}$  zu untersuchen, wären Co-Transfektionen von einer dieser Varianten mit LTRPC2 oder LTRPC2- $\Delta\text{C}$  durchzuführen. Da die biophysikalischen Eigenschaften der Ströme nach Stimulation von LTRPC2 oder LTRPC2- $\Delta\text{C}$  bekannt sind, könnten durch Vergleiche nach Stimulation von co-transfizierten Zellen mittels Patch-Clamp Experimenten sowie  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen erste Aussagen zu möglichen regulatorischen Funktionen getroffen werden. Unterbindet z.B. eine Co-Transfektion von einer der inaktiven Spleißvarianten mit LTRPC2 eine Stromentwicklung durch ADP-Ribose oder  $\text{H}_2\text{O}_2$ , könnte das ein Hinweis auf eine dominant negative Wirkung der Spleißvariante mit einer Deletion im N-Terminus sein.

### 6.2 Überprüfung der Expression der inaktiven LTRPC2 Varianten

Führen die ersten Ansätze zur funktionellen Untersuchung der inaktiven Spleißvarianten zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen, sollte in Form von Fusionsproteinen die Expression und die Zellokalisation überprüft werden.

In dieser Arbeit wurden die einzelnen LTRPC2 Varianten in das Vektorkonstrukt pcDNA3-EGFP inkloniert, bei dem Kanal- und Markerprotein getrennt voneinander unter der Kontrolle eigener Promotoren stehen. Man geht davon aus, daß bei einer Synthese des Markerproteins, auch das Kanalprotein, das unter der Kontrolle des stärkeren Promotor steht, exprimiert wird. Zwar ist das Markerprotein in diesem Falle nur ein indirekter Nachweis einer

Expression, der Vorteil dieser Methode ist aber, daß das Kanalprotein durch eine Fusion mit einem weiteren Protein nicht in seiner Eigenschaft verändert wird. Ein Gedanke war, daß gerade die Fusionierung die Expression oder das *Trafficking* des gewünschten Proteins behindern könnte.

Der Vergleich der funktionellen Daten, wie sie in dieser Arbeit mit dem LTRPC2 als „freies“ Protein gewonnen wurden, mit den Daten der Arbeitsgruppen von Perraud, Sano und Hara, die LTRPC2 als Fusionsprotein verwenden, zeigt, daß die Fusionierung des LTRPC2 mit einem Markerprotein keinen Einfluß auf die Funktion des Proteins ausübt.

Da ein konfokales Laser Scanning Mikroskop zur Verfügung steht, könnten über molekularbiologischen Techniken die unterschiedlichen Spleißvarianten mit Fluoreszenzproteinen fusioniert und eine Expression sowie Lokalisation der einzelnen Varianten festgestellt werden. Um einen möglichen Einfluß einer Fusionierung eines Markerproteins mit einer Spleißvariante zu überprüfen, könnte die Spleißvariante LTRPC2- $\Delta$ C als Beispiel dienen, deren funktionalen Eigenschaften als „freies“ Protein mit denen als Fusionsprotein verglichen werden könnten. Gleiches wäre entsprechend im Anschluß an einen Nachweis der Expression und Entdeckung funktionaler Eigenschaften für die bisher inaktiven Spleißvarianten durchzuführen.

### **6.3 Überprüfung von Homo- und Heteromultimerisierungen der LTRPC2 Varianten**

Nach Klonierung der einzelnen Fusionsproteine und nach dem Etablieren der Aufnahmetechnik, könnten durch Co-Expression von unterschiedlich fluoreszierenden Fusionsproteinen einer einzelnen, oder von verschiedenen Spleißvarianten die Hypothese einer Homomultimerisierung bzw. Heteromultimerisierung überprüft werden. Dabei ist an die FRET-Technik zu denken. Während der Anregung eines Fluorophors mit seiner spezifischen Wellenlänge kann die Energie auf das Energieniveau eines anderen fluoreszierenden Proteins übertragen werden, wenn es zu einer engen Koppelung dieser Proteine kommt. Daraufhin ändert sich das Emissionsspektrum der einzelnen Fluorophore und kann mit Hilfe der geeigneten Softwaretechnik aufgezeichnet werden.

Zudem könnte ein großer Vorteil der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie ausgenutzt werden, daß an lebenden Zellen mögliche Translokationen der Fusionsproteine, z.B. nach

Zugabe von Stimulanzen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, beobachtet werden könnte, wie es für die Funktion des TRPM1 und des TRPV2 Maushomolog, dem GRC (*growth-factor-regulated channel*) beschrieben worden ist [149, 212].

Alternativ zur Laser Scanning Mikroskopie stehen immunologische Verfahren. Durch Fusionsproteine der Spleißvarianten mit Polypeptiden, die sich durch kommerziell erhältliche Antikörper detektieren lassen, wie z.B. Antikörper gegen kurze Peptide der Gluthathion S-transferase (GST) oder gegen das grippale Hemagglutinin (HA), kann nach Transfektion eine Protein-Protein-Interaktion der einzelnen Spleißvarianten durch Immunopräzipitationen festgestellt werden. Die zelluläre Lokalisation der Spleißvarianten könnte über histochemische Verfahren bzw. nach einer Membranfraktionierung mit Hilfe des Immunoblotting (Western Blot) überprüft werden. Außerdem ließen sich mögliche Interaktionen von den LTRPC2 Varianten mit weiteren TRP-Proteinen untersuchen, gegen die bereits spezifische Antikörper vorhanden sind.

Längerfristig sollten auch gegen die LTRPC2 Varianten spezifische Antikörper entwickelt werden, um einen Nachweis der Proteinexpression ebenfalls in nativen Zellen gewährleisten zu können.

Eine dritte Möglichkeit zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen zwischen den einzelnen LTRPC2 Varianten untereinander, wie auch von den LTRPC2 Varianten mit anderen TRP-Kanälen, wären sog. „yeast two hybrid“ Systeme.

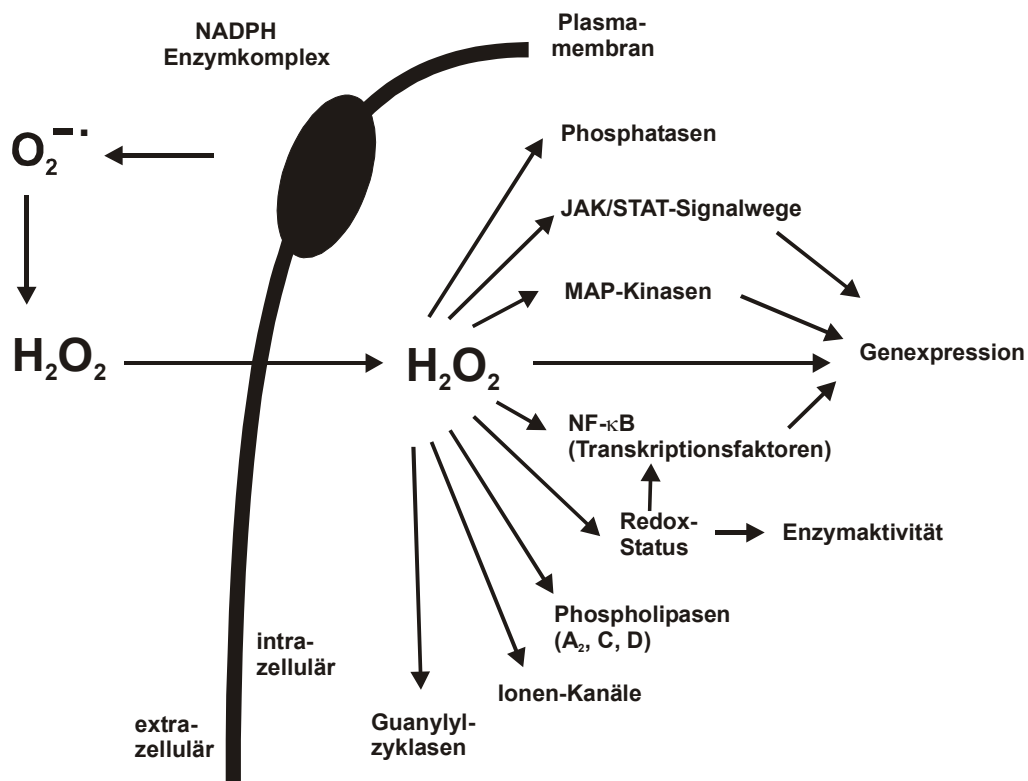
Wenn die erwähnten Untersuchungsansätze zu keinen positiven Ergebnissen führen, könnten sowohl die genannten funktionellen Untersuchungen, als auch die Expressionsstudien mit Deletionsmutanten, die sich von den Spleißvarianten ableiten, wiederholt werden. Wie bereits erwähnt, sind die in dieser Arbeit beschriebenen Spleißvarianten zusammengesetzte Konstrukte. Es besteht die Möglichkeit, daß die Spleißvarianten endogen nur als Fragmente existieren und inhibierende Funktionen besitzen. Eine dominant negative Wirkung konnte sowohl von dem endogenen N-terminalen Fragment des TRPM1, dem MLSN-S, als auch von einem künstlichen N-terminalen Fragment des TRPC3 nachgewiesen werden, die die membranäre Lokalisation bzw. die Expression des Proteins mit voller Länge inhibieren [40, 149, 213] (siehe Abschnitt 5.4).

Als mögliche Konstrukte kämen Fragmente in Betracht, deren transmembranäre Regionen eliminiert werden, oder die nur noch den N-terminalen Bereich bzw. den C-terminalen Bereich umfassen.

## 6.4 Überlegungen zum Regulationsmechanismus der LTRPC2 Varianten durch ADP-Ribose und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ein weiterer Aspekt im Hinblick auf die funktionellen Eigenschaften der LTRPC2 Varianten ist, die genaueren molekularen Mechanismen der Aktivierung durch ADP-Ribose bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aufzudecken.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und weitere reaktive Sauerstoffmetabolite, die als ROS bezeichnet werden, entstehen, wenn bei zellulären Elektronentransfersystemen wie z.B. in der Atmungskette, molekularer Sauerstoff (O<sub>2</sub>) nur partiell reduziert wird. Entweder wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direkt durch Flavoprotein Oxidasen über einen Zweielektronentransfer aus O<sub>2</sub> gebildet oder, bei einem Einelektronentransfer, durch membranäre NADPH-Oxidasen katalysiert, aus dem entstehenden Superoxidradikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Spontan oder mit Hilfe der Enzymfamilie der Superoxiddismutasen wird O<sub>2</sub><sup>•-</sup> weiter zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziert. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das im Gegensatz zu O<sub>2</sub><sup>•-</sup> membranpermeabel ist, kann intrazellulär entweder durch Katalasen oder Gluthathionperoxidasen zu H<sub>2</sub>O reduziert, oder in Anwesenheit von Metallen wie Eisen oder Kupfer über die Fenton-Reaktion zu dem reaktiveren Hydroxylradikal (OH<sup>•</sup>) umgewandelt werden. OH<sup>•</sup> besitzt im Gegensatz zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine sehr geringe Halbwertszeit und reagiert unmittelbar mit anderen Molekülen [214, 215]. ROS wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> werden, wie bereits erwähnt, durch ihre reaktiven Eigenschaften mit vielen degenerativen Prozessen in Verbindung gebracht, es scheint jedoch auch, daß sie geregelt eine Reihe an Signalwegen induzieren können, bei denen Proteine wie kleine GTP bindende Proteine oder Proteine des Zytoskeletts beeinflusst werden. Aber auch Enzyme wie Proteinkinasen- und phosphatasen, Metalloproteinasen sowie Transkriptionsfaktoren und genregulatorische Prozesse werden unter einem Einfluß von ROS gesteuert (siehe Abb. 25) [215, 216].



**Abb. 25: Potentielle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Signalwege**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scheint nicht nur bei degenerativen Prozessen eine Rolle zu spielen, sondern auch einen geregelten Einfluß auf diverse Signaltransduktionswege auszuüben.

Um mögliche Proteine und Signalwege der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten Aktivierung von LTRPC2-Strömen zu identifizieren, sollten entsprechende Inhibitoren ausgetestet werden.

Die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten nach Aktivierung, sowie die Granulaeauschüttung ist an einer Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, sowie an eine daraus folgende Umstrukturierung zytoskelettärer Elemente gebunden. Die Verzögerung des Kationeneinstroms, sowie die des sekundären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg nach Stimulierung von LTRPC2 sowie LTRPC2-ΔC transfizierter Zellen (siehe Abb. 18, Abb. 19 und Abb. 21) könnte ein Hinweis darauf sein, daß bei der Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Umorganisation des Zytoskeletts bei der Aktivierung des LTRPC2 Varianten involviert ist. Vor bzw. während einer Stimulation von transfizierten Zellen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> könnte die Applikation von zellpermeablen Toxinen wie Cytochalasin D oder Latrunkulin A, die die Polymerisation der Aktin-Filamente unterbinden, oder durch Gabe von Substanzen die eine Aktinpolymerisation fördern und stabilisieren, wie

das Peptid Jasplakinolid oder wie Phosphatase Inhibitoren, einen Aufschluß über eine Beteiligung zytoskelettärer Strukturen bei der Aktivierung von LTRPC2 Varianten geben.

Außerdem könnte zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von Aktin während der LTRPC2 Aktivierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation mit  $H_2O_2$  der Gehalt an F-Aktin in LTRPC2 sowie LTRPC2- $\Delta C$  transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ermittelt werden. Die Konzentration an F-Aktin läßt sich fluorospektrometisch mit FITC-markierten Phalloidin bestimmen.

Alternativ zu zytoskelettären Strukturen könnten kleine GTP-bindende Proteine durch  $H_2O_2$  beeinflußt und damit weitere Signalkaskaden ausgelöst werden.

Durch Dialyse transfizierter Zellen mit dem nicht hydrolysierbaren Analogon des GTP, dem  $GTP\gamma S$ , oder durch Verhinderung einer Methylierung des GTP-bindenden Proteins Ras durch Farnesylcystein, sind möglicherweise Rückschlüsse auf eine Beteiligung dieser Proteinklasse an der Aktivierung der LTRPC2 Varianten möglich. Über kleine GTP-bindende Proteine werden u. a. Kaskaden der MAP-Kinasen induziert. Eine zentrale Rolle könnte dabei die  $IP_3$ -Kinase spielen, die sich über Wortmannin hemmen ließe.

Als weitere Möglichkeit sind bei der Aktivierung von LTRPC2 durch  $H_2O_2$  induzierte phosphorylierende Prozesse in Betracht zu ziehen. Durch entsprechende Assays könnte ein Vergleich von phosphorylierten Proteinen in Kanal transfizierten zu Kontrollzellen nach Stimulierung mit  $H_2O_2$  angestellt werden. Durch Identifikation der modifizierten Proteine könnte ein möglicher Signalweg zur Aktivierung der LTRPC2 Varianten durch  $H_2O_2$  präzisiert werden. Ein alternativer Schritt wäre mit Genistein ein breites Feld an Kinasen unspezifisch zu hemmen. Ein nächster Schritt könnte sein, die Rolle der PKC zu untersuchen, inwieweit eine direkte Aktivierung der PKC durch Phorbolster wie Phorbol-12-myristat-13-acetat oder durch Hemmung der PKC z.B. durch Ro-31-8220 die Aktivierung der LTRPC2 Varianten beeinflussen.

Aber auch eine Reihe an Streßkinasen wie p 38; Erk1/2; SAPK und c-Jun-terminale Kinasen (JNK) könnten an einer Aktivierung des LTRPC2 durch  $H_2O_2$  beteiligt sein. Eine relativ unspezifische Hemmung eines breiten Spektrums an Streßkinasen ließe sich durch Forskolin erreichen, ein spezifischer Inhibitor z.B. der p 38 MAP-Kinase wäre dagegen SB 203580.

Die gleichen Substanzen könnten während Aktivierung des LTRPC2 durch ADP-Ribose ausgetestet werden, auch wenn erste Resultate darauf hinweisen, daß LTRPC2 direkt durch Bindung von ADP-Ribose und möglicherweise durch dessen Hydrolyse aktiviert wird, so sind



die genauen Mechanismen jedoch nicht bekannt. Es ist denkbar, daß im Zusammenhang mit den genannten Signalwegen die Synthese von ADP-Ribose und damit deren Wirkung induziert wird.

Versuche mit dem Antioxidans Mannitol deuten auf eine intrazelluläre Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei der Aktivierung der LTRPC2 Varianten hin wie es bei der ADP-Ribose der Fall ist. Mögliche Inhibitoren des Regulationsweges über  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die nicht Membranpermeabel sind, ließen sich in Patch-Clamp Experimenten über den Pipettenpuffer verabreichen. Um jedoch den Einfluß dieser Substanzen sowohl auf die Kationenströme, als auch auf einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in LTRPC2 Varianten exprimierenden Zellen untersuchen zu können, könnten Patch-Clamp Experimenten mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Photometriesystem kombiniert werden, wie es in absehbarer Zeit am Institut etabliert sein wird.

Wie bereits in Abschnitt 5.5.6 erwähnt, wird zwar eine direkte oxidative Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  am Kanalprotein als eher unwahrscheinlich angesehen, dennoch sind sie nicht ganz auszuschließen. Durch die *inside-out* Patch Technik könnte gezielt die Wirkung einzelner Substanzen unmittelbar auf den Kanal ausgetestet werden. Neben oxidierenden Substanzen, durch die eine mögliche Oxidation der LTRPC2 Varianten überprüft werden könnte, ließen sich aber auch Substanzen austesten, die den Kanal möglicherweise direkt hemmen, wie z.B. Lanthanide.

Vielleicht lassen sich zukünftig durch eines, oder durch mehrere der hier vorgeschlagenen Ansätze weitere Erkenntnisse zur Regulation und zu den funktionalen Eigenschaften der LTRPC2 Varianten erzielen.

## 7 Zusammenfassung:

Diese Arbeit stand im Zusammenhang mit der Frage nach der funktionellen Relevanz von LTRPC2, einem Mitglied  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler TRP-Kationenkanäle, bei einem rezeptorstimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in neutrophile Granulozyten, als Modell für elektrisch nicht erregbare Zellen. Diesbezüglich wurde in dieser Arbeit der LTRPC2 kloniert und funktionell charakterisiert.

Anhand von RT-PCR Analysen und durch Sequenzvergleiche mit der ursprünglichen veröffentlichten Sequenz des LTRPC2 konnte gezeigt werden, daß zwei bisher unbekannte Spleißvarianten sowohl in HL-60 Zellen, einem Zellmodell für neutrophile Granulozyten, als auch in neutrophilen Granulozyten exprimiert werden.

Durch geeignete Klonierungsstrategien konnten die Spleißvarianten zu vier verschiedenen Varianten des LTRPC2 (LTRPC2; LTRPC2- $\Delta\text{C}$ ; LTRPC2- $\Delta\text{N}$ ; LTRPC2- $\Delta\text{N}$ - $\Delta\text{C}$ ) miteinander kombiniert werden. Funktionelle Untersuchungen an heterolog transfizierten Zellen mit Hilfe von fluorometrischen Messungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , sowie über Messung von Ionenströmen mittels der Patch-Clamp Technik ergaben, daß, im Gegensatz zu den klassischen TRP-Proteinen, keine der LTRPC2 Varianten in Abhängigkeit mit dem PLC-gesteuerten Signaltransduktionsweg stimuliert werden. Protokolle, die eine, vergleichbar mit einer  $\text{IP}_3$ -gesteuerten, intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung bewirken, oder die den gesamten PLC-abhängigen Signaltransduktionsweg aktivieren, führen bei keiner, der mit den einzelnen LTRPC2 Varianten transfizierten Zellen, im Vergleich zu Kontrollzellen zu einem erhöhten Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oder zu einem verstärkten Einwärtsstrom.

ADP-Ribose, einem Metabolit des  $\text{NAD}^+$ , sowie  $\text{NAD}^+$  wurden im Laufe dieser Arbeit als Agonisten des LTRPC2 identifiziert. Eine Stimulation durch ADP-Ribose ist nur beim LTRPC2 in seiner ungespleißten Form zu sehen. Eine Stimulation des LTRPC2 durch  $\text{NAD}^+$  konnte dagegen nicht reproduziert werden. Auch werden keine der weiteren LTRPC2 Varianten durch  $\text{NAD}^+$  reguliert.

Eine Überlegung zum Stimulierungsmechanismus des LTRPC2 durch ADP-Ribose war, eine Veränderung des Redox-Potentials der Zelle in Betracht zu ziehen, mit dem ADP-Ribose in Verbindung gebracht wird. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß es durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ , als Modell für oxidativen Streß, zu einer Aktivierung des LTRPC2, sowie zu einer Aktivierung der Spleißvariante LTRPC2- $\Delta\text{C}$  kommt.

Dabei steht die Aktivierung durch  $H_2O_2$  scheinbar nicht, wie zunächst angenommen, im Zusammenhang mit einer Wirkung von ADP-Ribose. Die Spleißvariante LTRPC2- $\Delta C$  wird durch  $H_2O_2$ , nicht aber durch ADP-Ribose stimuliert. Das gleiche ist zu sehen, wenn LTRPC2 transfizierte Zellen vorab intrazellulär mit  $NAD^+$ , dem ADP-Ribose Donor, stimuliert werden, ein charakteristischer Strom entwickelt sich erst nach Gabe von  $H_2O_2$ .

Die Wirkung von  $H_2O_2$  ist indes auf intrazelluläre, oxidative Prozesse zurückzuführen, da die Applikation des Antioxidans Mannitol eine Stimulation von LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta C$  durch  $H_2O_2$  verhindert.

Im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung der LTRPC2 Varianten für den neutrophilen Granulozyten ist die Stimulation von LTRPC2 und LTRPC2- $\Delta C$  mit  $H_2O_2$  ein interessanter Aspekt. Das im Verlauf des oxidativen Bursts von neutrophilen Granulozyten freigesetzte  $H_2O_2$  kann auf parakrinem Weg zusätzliche Neutrophile stimulieren. Eine Aktivierung Neutrophiler ist von einer Depolarisation und einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  begleitet. Es ist denkbar, daß die, von Neutrophilen endogen exprimierten, Spleißvarianten bei der  $H_2O_2$  stimulierten Aktivierung der Granulozyten während des Entzündungsgeschehens eine Rolle spielen. Die Aktivierung von LTRPC2 durch ADP-Ribose, über einen bislang unbekanntem Mechanismus, ist möglicherweise für die Chemotaxis von Neutrophilen relevant.

Außerdem ist es denkbar, daß der LTRPC2 bei rezeptorgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Prozessen nicht nur bei dem neutrophilen Granulozyten, sondern bei einer Reihe an elektrisch nicht erregbaren Zellen involviert ist. Es könnte sein, daß dabei sowohl Wechselwirkungen zwischen den Regulationsmechanismen des LTRPC2 über ADP-Ribose mit denen über  $H_2O_2$ , als auch eine Proteininteraktion von LTRPC2 mit anderen Mitgliedern der TRP-Familie zum Tragen kommen.

Sowohl die Frage nach der genaueren physiologischen Bedeutung von TRP-Kanälen wie die des LTRPC2, als auch die Ermittlung der detaillierten Regulationswege dürfte weiterhin Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **1**: 11-21.
2. Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998). Calcium-a life and death signal. *Nature* **395**: 645-648.
3. Bootman, M. D. and Berridge, M. J. (1995). The elemental principles of calcium signaling. *Cell* **83**: 675-678.
4. Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.
5. Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268.
6. Petersen, O. H., Petersen, C. C., and Kasai, H. (1994). Calcium and hormone action. *Annu.Rev.Physiol* **56**: 297-319.
7. Barritt, G. J. (1999). Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling requirements. *Biochem.J.* **337 ( Pt 2)**: 153-169.
8. Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J.Physiol* **499 ( Pt 2)**: 291-306.
9. Thomas, A. P., Bird, G. S., Hajnoczky, G., Robb-Gaspers, L. D., and Putney, J. W., Jr. (1996). Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J.* **10**: 1505-1517.
10. Berridge, M. J. (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem.J.* **312 ( Pt 1)**: 1-11.
11. Putney, J. W., Jr. (1993). Excitement about calcium signaling in inexcitable cells. *Science* **262**: 676-678.
12. Berridge, M. J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**: 13-26.

13. Catterall, W. A. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu.Rev.Biochem.* **64**: 493-531.
14. Dunlap, K., Luebke, J. I., and Turner, T. J. (1995). Exocytotic  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* **18**: 89-98.
15. Berridge, M. J. and Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**: 315-321.
16. Putney, J. W., Jr. and Bird, G. S. (1993). The signal for capacitative calcium entry. *Cell* **75**: 199-201.
17. Parekh, A. B. and Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* **77**: 901-930.
18. Montell, C. (1997). New light on TRP and TRPL. *Mol.Pharmacol.* **52**: 755-763.
19. Birnbaumer, L., Zhu, X., Jiang, M., Boulay, G., Peyton, M., Vannier, B., Brown, D., Platano, D., Sadeghi, H., Stefani, E., and Birnbaumer, M. (1996). On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**: 15195-15202.
20. Putney, J. W., Jr. and McKay, R. R. (1999). Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* **21**: 38-46.
21. Hoth, M. and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**: 353-356.
22. Lewis, R. S. and Cahalan, M. D. (1989). Mitogen-induced oscillations of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and transmembrane  $\text{Ca}^{2+}$  current in human leukemic T cells. *Cell Regul.* **1**: 99-112.
23. Zweifach, A. and Lewis, R. S. (1993). Mitogen-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 6295-6299.

24. Hardie, R. C. and Raghu, P. (2001). Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* **413**: 186-193.
25. Hardie, R. C. and Minke, B. (1995). Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of  $\text{Ca}^{2+}$  and *trp*. *Cell Calcium* **18**: 256-274.
26. Ranganathan, R., Malicki, D. M., and Zuker, C. S. (1995). Signal transduction in *Drosophila* photoreceptors. *Annu.Rev.Neurosci.* **18**: 283-317.
27. Hardie, R. C. and Minke, B. (1993). Novel  $\text{Ca}^{2+}$  channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. *Trends Neurosci.* **16**: 371-376.
28. Minke, B., Wu, C., and Pak, W. L. (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* **258**: 84-87.
29. Montell, C. and Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**: 1313-1323.
30. Wong, F., Schaefer, E. L., Roop, B. C., LaMendola, J. N., Johnson-Seaton, D., and Shao, D. (1989). Proper function of the *Drosophila trp* gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult. *Neuron* **3**: 81-94.
31. Peretz, A., Sandler, C., Kirschfeld, K., Hardie, R. C., and Minke, B. (1994). Genetic dissection of light-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx into *Drosophila* photoreceptors. *J.Gen.Physiol* **104**: 1057-1077.
32. Hardie, R. C. and Minke, B. (1992). The *trp* gene is essential for a light-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* **8**: 643-651.
33. Phillips, A. M., Bull, A., and Kelly, L. E. (1992). Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* **8**: 631-642.

34. 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.
35. Vaca, L., Sinkins, W. G., Hu, Y., Kunze, D. L., and Schilling, W. P. (1994). Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am.J.Physiol* **267**: C1501-C1505.
36. Hu, Y., Vaca, L., Zhu, X., Birnbaumer, L., Kunze, D. L., and Schilling, W. P. (1994). Appearance of a novel Ca<sup>2+</sup> influx pathway in Sf9 insect cells following expression of the transient receptor potential-like (trpl) protein of Drosophila. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **201**: 1050-1056.
37. Harteneck, C., Obukhov, A. G., Zobel, A., Kalkbrenner, F., and Schultz, G. (1995). The Drosophila cation channel trpl expressed in insect Sf9 cells is stimulated by agonists of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* **358**: 297-300.
38. Raghu, P., Usher, K., Jonas, S., Chyb, S., Polyanovsky, A., and Hardie, R. C. (2000). Constitutive activity of the light-sensitive channels TRP and TRPL in the Drosophila diacylglycerol kinase mutant, rdgA. *Neuron* **26**: 169-179.
39. Reuss, H., Mojet, M. H., Chyb, S., and Hardie, R. C. (1997). In vivo analysis of the drosophila light-sensitive channels, TRP and TRPL. *Neuron* **19**: 1249-1259.
40. Xu, X. Z., Li, H. S., Guggino, W. B., and Montell, C. (1997). Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell* **89**: 1155-1164.
41. Raghu, P., Colley, N. J., Webel, R., James, T., Hasan, G., Danin, M., Selinger, Z., and Hardie, R. C. (2000). Normal phototransduction in Drosophila photoreceptors lacking an InsP<sub>3</sub> receptor gene. *Mol.Cell Neurosci.* **15**: 429-445.
42. Chyb, S., Raghu, P., and Hardie, R. C. (1999). Polyunsaturated fatty acids activate the Drosophila light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* **397**: 255-259.
43. Cook, B. and Minke, B. (1999). TRP and calcium stores in Drosophila phototransduction. *Cell Calcium* **25**: 161-171.

44. Hardie, R. C. and Raghu, P. (1998). Activation of heterologously expressed Drosophila TRPL channels:  $\text{Ca}^{2+}$  is not required and  $\text{InsP}_3$  is not sufficient. *Cell Calcium* **24**: 153-163.
45. Acharya, J. K., Jalink, K., Hardy, R. W., Hartenstein, V., and Zuker, C. S. (1997).  $\text{InsP}_3$  receptor is essential for growth and differentiation but not for vision in Drosophila. *Neuron* **18**: 881-887.
46. Hardie, R. C. (1996). A quantitative estimate of the maximum amount of light-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in Drosophila photoreceptors. *J.Photochem.Photobiol.B* **35**: 83-89.
47. 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 9652-9656.
48. Zhu, X., Chu, P. B., Peyton, M., and Birnbaumer, L. (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the Drosophila trp gene. *FEBS Lett.* **373**: 193-198.
49. Funayama, M., Goto, K., and Kondo, H. (1996). Cloning and expression localization of cDNA for rat homolog of TRP protein, a possible store-operated calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channel. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **43**: 259-266.
50. Philipp, S., Cavalie, A., Freichel, M., Wissenbach, U., Zimmer, S., Trost, C., Marquart, A., Murakami, M., and Flockerzi, V. (1996). A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to Drosophila TRP and TRPL. *EMBO J.* **15**: 6166-6171.
51. 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  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Cell* **85**: 661-671.
52. Zitt, C., Zobel, A., Obukhov, A. G., Harteneck, C., Kalkbrenner, F., Luckhoff, A., and Schultz, G. (1996). Cloning and functional expression of a human  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* **16**: 1189-1196.



53. Boulay, G., Zhu, X., Peyton, M., Jiang, M., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1997). Cloning and expression of a novel mammalian homolog 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.
54. Philipp, S., Hambrecht, J., Braslavski, L., Schroth, G., Freichel, M., Murakami, M., Cavalie, A., and Flockerzi, V. (1998). A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J.* **17**: 4274-4282.
55. Okada, T., Shimizu, S., Wakamori, M., Maeda, A., Kurosaki, T., Takada, N., Imoto, K., and Mori, Y. (1998). Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor- activated TRP Ca<sup>2+</sup> channel from mouse brain. *J.Biol.Chem.* **273**: 10279-10287.
56. Sedgwick, S. G. and Smerdon, S. J. (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem.Sci.* **24**: 311-316.
57. Harteneck, C., Plant, T. D., and Schultz, G. (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* **23**: 159-166.
58. Montell, C. (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci.STKE.* **2001**: RE1.
59. Montell, C., Birnbaumer, L., and Flockerzi, V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**: 595-598.
60. Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R. J., Bruford, E. A., Caterina, M. J., Clapham, D. E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., Kojima, I., Mori, Y., Penner, R., Prawitt, D., Scharenberg, A. M., Schultz, G., Shimizu, N., and Zhu, M. X. (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol.Cell* **9**: 229-231.
61. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-824.

62. Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., and Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**: 531-543.
63. Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., and Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**: 436-441.
64. 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.
65. Duncan, L. M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L. M., Woolf, E. A., Tepper, R. I., and Shyjan, A. W. (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.* **58**: 1515-1520.
66. Duncan, L. M., Deeds, J., Cronin, F. E., Donovan, M., Sober, A. J., Kauffman, M., and McCarthy, J. J. (2001). Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J.Clin.Oncol.* **19**: 568-576.
67. Perraud, A. L., Fleig, A., Dunn, C. A., Bagley, L. A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A. J., Zhu, Q., Bessman, M. J., Penner, R., Kinet, J. P., and Scharenberg, A. M. (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* **411**: 595-599.
68. Runnels, L. W., Yue, L., and Clapham, D. E. (2001). TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* **291**: 1043-1047.
69. Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., and Patapoutian, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**: 705-715.
70. Zitt, C., Halaszovich, C. R., and Luckhoff, A. (2002). The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry. *Prog.Neurobiol.* **66**: 243-264.

71. Minke, B. and Cook, B. (2002). TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev.* **82**: 429-472.
72. Fasolato, C., Innocenti, B., and Pozzan, T. (1994). Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol.Sci.* **15**: 77-83.
73. Bootman, M., Berridge, M., and Roderick, H. (2002). Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr.Biol.* **12**: R563.
74. Thomas, D., Kim, H. Y., and Hanley, M. R. (1998). Capacitative calcium influx. *Vitam.Horm.* **54**: 97-119.
75. Putney, J. W., Jr. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* **11**: 611-624.
76. Petersen, C. C. and Berridge, M. J. (1996). Capacitative calcium entry is colocalised with calcium release in *Xenopus* oocytes: evidence against a highly diffusible calcium influx factor. *Pflugers Arch.* **432**: 286-292.
77. Randriamampita, C. and Tsien, R. Y. (1993). Emptying of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores releases a novel small messenger that stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Nature* **364**: 809-814.
78. Gilon, P., Bird, G. J., Bian, X., Yakel, J. L., and Putney, J. W., Jr. (1995). The  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing actions of a Jurkat cell extract on mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes. *J.Biol.Chem.* **270**: 8050-8055.
79. Csutora, P., Su, Z., Kim, H. Y., Bugrim, A., Cunningham, K. W., Nuccitelli, R., Keizer, J. E., Hanley, M. R., Blalock, J. E., and Marchase, R. B. (1999). Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 121-126.
80. Xie, Q., Zhang, Y., Zhai, C., and Bonanno, J. A. (2002). Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion- like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **277**: 16559-16566.

81. Rosado, J. A. and Sage, S. O. (2000). Farnesylcysteine analogues inhibit store-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human platelets: evidence for involvement of small GTP-binding proteins and actin cytoskeleton. *Biochem.J.* **347 Pt 1**: 183-192.
82. Rosado, J. A., Porras, T., Conde, M., and Sage, S. O. (2001). Cyclic nucleotides modulate store-mediated calcium entry through the activation of protein-tyrosine phosphatases and altered actin polymerization in human platelets. *J.Biol.Chem.* **276**: 15666-15675.
83. Nakamura, K., Kimura, M., and Aviv, A. (1995). Role of cyclic nucleotides in store-mediated external  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human platelets. *Biochem.J.* **310 ( Pt 1)**: 263-269.
84. Yau, K. W. and Baylor, D. A. (1989). Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu.Rev.Neurosci.* **12**: 289-327.
85. Fasolato, C., Hoth, M., and Penner, R. (1993). A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J.Biol.Chem.* **268**: 20737-20740.
86. Somasundaram, B., Norman, J. C., and Mahaut-Smith, M. P. (1995). Primaquine, an inhibitor of vesicular transport, blocks the calcium- release-activated current in rat megakaryocytes. *Biochem.J.* **309 ( Pt 3)**: 725-729.
87. Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H., and Rothman, J. E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**: 759-772.
88. Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**: 318-324.
89. Yao, Y., Ferrer-Montiel, A. V., Montal, M., and Tsien, R. Y. (1999). Activation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* **98**: 475-485.
90. Putney, J. W., Jr. (1999). "Kissin' cousins": intimate plasma membrane-ER interactions underlie capacitative calcium entry. *Cell* **99**: 5-8.

91. Kerschbaum, H. H. and Cahalan, M. D. (1999). Single-channel recording of a store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel in Jurkat T lymphocytes. *Science* **283**: 836-839.
92. Krause, E., Schmid, A., Gonzalez, A., and Schulz, I. (1999). Low cytoplasmic  $[\text{Ca}^{2+}]$  activates  $I_{\text{CRAC}}$  independently of global  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion in RBL-1 cells. *J.Biol.Chem.* **274**: 36957-36962.
93. Zubov, A. I., Kaznacheeva, E. V., Nikolaev, A. V., Alexeenko, V. A., Kiselyov, K., Muallem, S., and Mozhayeva, G. N. (1999). Regulation of the miniature plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $I_{\text{min}}$  by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J.Biol.Chem.* **274**: 25983-25985.
94. Braun, F. J., Broad, L. M., Armstrong, D. L., and Putney, J. W., Jr. (2001). Stable activation of single  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in divalent cation-free solutions. *J.Biol.Chem.* **276**: 1063-1070.
95. Irvine, R. F. (1990). 'Quantal'  $\text{Ca}^{2+}$  release and the control of  $\text{Ca}^{2+}$  entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett.* **263**: 5-9.
96. Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L., and Muallem, S. (1998). Functional interaction between  $\text{InsP}_3$  receptors and store-operated  $\text{Htrp3}$  channels. *Nature* **396**: 478-482.
97. Kiselyov, K., Mignery, G. A., Zhu, M. X., and Muallem, S. (1999). The N-terminal domain of the  $\text{IP}_3$  receptor gates store-operated  $\text{hTrp3}$  channels. *Mol.Cell* **4**: 423-429.
98. Boulay, G., Brown, D. M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M. X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K., and Birnbaumer, L. (1999). Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  entry by polypeptides of the inositol 1,4,5- trisphosphate receptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and  $\text{IP}_3\text{R}$  in store depletion-activated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 14955-14960.
99. Rosado, J. A. and Sage, S. O. (2000). Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores are depleted. *Biochem.J.* **350 Pt 3**: 631-635.

100. Rosado, J. A. and Sage, S. O. (2001). Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II and human transient receptor potential (hTrp1) channels in human platelets. *Biochem.J.* **356**: 191-198.
101. Mery, L., Magnino, F., Schmidt, K., Krause, K. H., and Dufour, J. F. (2001). Alternative splice variants of hTrp4 differentially interact with the C- terminal portion of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *FEBS Lett.* **487**: 377-383.
102. Kiselyov, K. I., Shin, D. M., Wang, Y., Pessah, I. N., Allen, P. D., and Muallem, S. (2000). Gating of store-operated channels by conformational coupling to ryanodine receptors. *Mol.Cell* **6**: 421-431.
103. Patterson, R. L., van Rossum, D. B., and Gill, D. L. (1999). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* **98**: 487-499.
104. Premack, B. A. and Schall, T. J. (1996). Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat.Med.* **2**: 1174-1178.
105. Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y., and Shimizu, T. (1997). A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis. *Nature* **387**: 620-624.
106. Pittet, D., Krause, K. H., and Lew, D. P. (1992). Inositol phosphates. Metabolism and site of action in neutrophil granulocytes. *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* **26**: 369-398.
107. Farago, A. and Nishizuka, Y. (1990). Protein kinase C in transmembrane signalling. *FEBS Lett.* **268**: 350-354.
108. Lambeth, J. D. (1988). Activation of the respiratory burst oxidase in neutrophils: on the role of membrane-derived second messengers, Ca<sup>++</sup>, and protein kinase C. *J.Bioenerg.Biomembr.* **20**: 709-733.

- 
109. Lad, P. M., Olson, C. V., Grewal, I. S., and Scott, S. J. (1985). A pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein in the human neutrophil regulates multiple receptors, calcium mobilization, and lectin-induced capping. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**: 8643-8647.
110. Bradford, P. G. and Rubin, R. P. (1986). Quantitative changes in inositol 1,4,5-trisphosphate in chemoattractant-stimulated neutrophils. *J.Biol.Chem.* **261**: 15644-15647.
111. Wong, K., Li, X. B., and Hunchuk, N. (1995). N-acetylsphingosine (C2-ceramide) inhibited neutrophil superoxide formation and calcium influx. *J.Biol.Chem.* **270**: 3056-3062.
112. Wong, K., Parente, J., Prasad, K. V., and Ng, D. (1990). Auranofin modulated cytoplasmic free calcium in neutrophils by mobilizing intracellular calcium and inhibiting protein kinase. *J.Biol.Chem.* **265**: 21454-21461.
113. Bokoch, G. M. (1995). Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* **86**: 1649-1660.
114. Thompson, H. L., Shiroo, M., and Saklatvala, J. (1993). The chemotactic factor N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine activates microtubule-associated protein 2 (MAP) kinase and a MAP kinase kinase in polymorphonuclear leucocytes. *Biochem.J.* **290 ( Pt 2)**: 483-488.
115. Worthen, G. S., Avdi, N., Buhl, A. M., Suzuki, N., and Johnson, G. L. (1994). FMLP activates Ras and Raf in human neutrophils. Potential role in activation of MAP kinase. *J.Clin.Invest* **94**: 815-823.
116. Cockcroft, S. (1992). G-protein-regulated phospholipases C, D and A2-mediated signalling in neutrophils. *Biochim.Biophys.Acta* **1113**: 135-160.

- 
117. Mullmann, T. J., Cheewatrakoolpong, B., Anthes, J. C., Siegel, M. I., Egan, R. W., and Billah, M. M. (1993). Phospholipase C and phospholipase D are activated independently of each other in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* **53**: 630-635.
118. El Benna, J., Han, J., Park, J. W., Schmid, E., Ulevitch, R. J., and Babior, B. M. (1996). Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch.Biochem.Biophys.* **334**: 395-400.
119. Krump, E., Sanghera, J. S., Pelech, S. L., Furuya, W., and Grinstein, S. (1997). Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen- activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *J.Biol.Chem.* **272**: 937-944.
120. Nick, J. A., Avdi, N. J., Young, S. K., Knall, C., Gerwins, P., Johnson, G. L., and Worthen, G. S. (1997). Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J.Clin.Invest* **99**: 975-986.
121. Pillinger, M. H., Feoktistov, A. S., Capodici, C., Solitar, B., Levy, J., Oei, T. T., and Philips, M. R. (1996). Mitogen-activated protein kinase in neutrophils and enucleate neutrophil cytoplasts: evidence for regulation of cell-cell adhesion. *J.Biol.Chem.* **271**: 12049-12056.
122. Snyder, F. (1995). Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochim.Biophys.Acta* **1254**: 231-249.
123. Ley, K. (1996). Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc.Res.* **32**: 733-742.
124. Jutila, M. A. (1992). Leukocyte traffic to sites of inflammation. *APMIS* **100**: 191-201.
125. Dejana, E., Breviario, F., and Caveda, L. (1994). Leukocyte-endothelial cell adhesive receptors. *Clin.Exp.Rheumatol.* **12 Suppl 10**: S25-S28.



- 
126. Nussler, A. K., Wittel, U. A., Nussler, N. C., and Beger, H. G. (1999). Leukocytes, the Janus cells in inflammatory disease. *Langenbecks Arch.Surg.* **384**: 222-232.
  127. Hampton, M. B., Kettle, A. J., and Winterbourn, C. C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92**: 3007-3017.
  128. Owen, C. A. and Campbell, E. J. (1999). The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J.Leukoc.Biol.* **65**: 137-150.
  129. Lehrer, R. I. and Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr.Opin.Immunol.* **11**: 23-27.
  130. Levy, O. (1996). Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur.J.Haematol.* **56**: 263-277.
  131. Babior, B. M. (1994). Activation of the respiratory burst oxidase. *Environ.Health Perspect.* **102 Suppl 10**: 53-56.
  132. Boxer, L. A., Axtell, R., and Suchard, S. (1990). The role of the neutrophil in inflammatory diseases of the lung. *Blood Cells* **16**: 25-40.
  133. Till, G. O., Beauchamp, C., Menapace, D., Tourtellotte, W., Jr., Kunkel, R., Johnson, K. J., and Ward, P. A. (1983). Oxygen radical dependent lung damage following thermal injury of rat skin. *J.Trauma* **23**: 269-277.
  134. Till, G. O., Johnson, K. J., Kunkel, R., and Ward, P. A. (1982). Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J.Clin.Invest* **69**: 1126-1135.
  135. Henson, P. M. and Johnston, R. B., Jr. (1987). Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J.Clin.Invest* **79**: 669-674.
  136. Sacks, T., Moldow, C. F., Craddock, P. R., Bowers, T. K., and Jacob, H. S. (1978). Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement- stimulated granulocytes. An in vitro model of immune vascular damage. *J.Clin.Invest* **61**: 1161-1167.

137. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80**: 617-653.
138. Itagaki, K., Kannan, K. B., Livingston, D. H., Deitch, E. A., Fekete, Z., and Hauser, C. J. (2002). Store-operated calcium entry in human neutrophils reflects multiple contributions from independently regulated pathways. *J.Immunol.* **168**: 4063-4069.
139. Schorr, W., Swandulla, D., and Zeilhofer, H. U. (1999). Mechanisms of IL-8-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in human neutrophil granulocytes. *Eur.J.Immunol.* **29**: 897-904.
140. Nagamine, K., Kudoh, J., Minoshima, S., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito, F., and Shimizu, N. (1998). Molecular cloning of a novel putative  $\text{Ca}^{2+}$  channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* **54**: 124-131.
141. Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Yokoi, H., Matsushime, H., and Furuichi, K. (2001). Immunocyte  $\text{Ca}^{2+}$  influx system mediated by LTRPC2. *Science* **293**: 1327-1330.
142. Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K., and Mori, Y. (2002). LTRPC2  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeable Channel Activated by Changes in Redox Status Confers Susceptibility to Cell Death. *Mol.Cell* **9**: 163-173.
143. Bessman, M. J., Frick, D. N., and O'Handley, S. F. (1996). The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J.Biol.Chem.* **271**: 25059-25062.
144. Berthelie, V., Tixier, J. M., Muller-Steffner, H., Schuber, F., and Deterre, P. (1998). Human CD38 is an authentic  $\text{NAD(P)}^+$  glycohydrolase. *Biochem.J.* **330 ( Pt 3)**: 1383-1390.
145. Ziegler, M. (2000). New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur.J.Biochem.* **267**: 1550-1564.

146. Wilson, H. L., Dipp, M., Thomas, J. M., Lad, C., Galione, A., and Evans, A. M. (2001). Adp-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as a redox sensor. a primary role for cyclic ADP-ribose in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J.Biol.Chem.* **276**: 11180-11188.
147. Collins, S. J. (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **70**: 1233-1244.
148. Fang, D. and Setaluri, V. (2000). Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **279**: 53-61.
149. Xu, X. Z., Moebius, F., Gill, D. L., and Montell, C. (2001). Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 10692-10697.
150. Zhang, L. and Saffen, D. (2001). Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca<sup>2+</sup> channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. *J.Biol.Chem.* **276**: 13331-13339.
151. Strubing, 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.
152. Lintschinger, B., Balzer-Geldsetzer, M., Baskaran, T., Graier, W. F., Romanin, C., Zhu, M. X., and Groschner, K. (2000). Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglyc. *J.Biol.Chem.* **275**: 27799-27805.
153. 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.
154. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* **27**: 97-106.

- 
155. Zitt, C., Obukhov, A. G., Strubing, C., Zobel, A., Kalkbrenner, F., Luckhoff, A., and Schultz, G. (1997). Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium- activated cation currents not related to store depletion. *J.Cell Biol.* **138**: 1333-1341.
156. 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.
157. Putney, J. W., Jr. (2001). Cell biology. Channelling calcium. *Nature* **410**: 648-649.
158. 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.
159. Lee, H. C. and Aarhus, R. (1993). Wide distribution of an enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic ADP-ribose. *Biochim.Biophys.Acta* **1164**: 68-74.
160. Howard, M., Grimaldi, J. C., Bazan, J. F., Lund, F. E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R. M., Walseth, T. F., and Lee, H. C. (1993). Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* **262**: 1056-1059.
161. Takasawa, S., Tohgo, A., Noguchi, N., Koguma, T., Nata, K., Sugimoto, T., Yonekura, H., and Okamoto, H. (1993). Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38 and inhibition of the hydrolysis by ATP. *J.Biol.Chem.* **268**: 26052-26054.
162. Zocchi, E., Franco, L., Guida, L., Benatti, U., Bargellesi, A., Malavasi, F., Lee, H. C., and De Flora, A. (1993). A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD<sup>+</sup> glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **196**: 1459-1465.

163. Lee, H. C., Walseth, T. F., Bratt, G. T., Hayes, R. N., and Clapper, D. L. (1989). Structural determination of a cyclic metabolite of NAD<sup>+</sup> with intracellular Ca<sup>2+</sup>-mobilizing activity. *J.Biol.Chem.* **264**: 1608-1615.
164. Guse, A. H. (2000). Cyclic ADP-ribose. *J.Mol.Med.* **78**: 26-35.
165. Tanuma, S., Kawashima, K., and Endo, H. (1988). Eukaryotic mono(ADP-ribosyl)transferase that ADP-ribosylates GTP- binding regulatory Gi protein. *J.Biol.Chem.* **263**: 5485-5489.
166. Peterson, J. E., Larew, J. S., and Graves, D. J. (1990). Purification and partial characterization of arginine-specific ADP- ribosyltransferase from skeletal muscle microsomal membranes. *J.Biol.Chem.* **265**: 17062-17069.
167. Zolkiewska, A. and Moss, J. (1993). Integrin alpha 7 as substrate for a glycosylphosphatidylinositol- anchored ADP-ribosyltransferase on the surface of skeletal muscle cells. *J.Biol.Chem.* **268**: 25273-25276.
168. Ueda, K. and Hayaishi, O. (1985). ADP-ribosylation. *Annu.Rev.Biochem.* **54**: 73-100.
169. Klemperer, H. G. (1964). The incorporation of AMP into oligoribonucleotides by an enzyme from rat liver. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **15**: 269-272.
170. Nishizuka, Y., Ueda, K., Nakazawa, K., and Hayaishi, O. (1967). Studies on the polymer of adenosine diphosphate ribose. I. Enzymic formation from nicotinamide adenine dinucleotide in mammalian nuclei. *J Biol Chem.* **242**: 3164-3171.
171. Burkle, A. (2001). Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays* **23**: 795-806.
172. Klinz, F. J. and Costa, T. (1990). Cholera toxin differentially decreases membrane levels of alpha and beta subunits of G proteins in NG108-15 cells. *Eur.J.Biochem.* **188**: 567-576.

- 
173. Roerig, S. C., Loh, H. H., and Law, P. Y. (1991). Requirement of ADP-ribosylation for the pertussis toxin-induced alteration in electrophoretic mobility of G-proteins. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **180**: 1227-1232.
174. Suzuki, M., Ohki, G., Ishibashi, K., and Imai, M. (2002). A single amino acid mutation results in a rapid inactivation of epithelial calcium channels. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **291**: 278-285.
175. Suzuki, J., Imaizumi, S., Kayama, T., and Yoshimoto, T. (1985). Chemiluminescence in hypoxic brain- the second report: cerebral protective effect of mannitol, vitamin E and glucocorticoid. *Stroke* **16**: 695-700.
176. Swain, S. D., Rohn, T. T., and Quinn, M. T. (2002). Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid.Redox.Signal.* **4**: 69-83.
177. Goldman, R., Moshonov, S., Chen, X., Berchansky, A., Furstenberger, G., and Zor, U. (1997). Crosstalk between elevation of  $[Ca^{2+}]_i$ , reactive oxygen species generation and phospholipase A2 stimulation in a human keratinocyte cell line. *Adv.Exp.Med.Biol.* **433**: 41-45.
178. Schlingmann, K. P., Weber, S., Peters, M., Niemann, N. L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H. W., and Konrad, M. (2002). Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat.Genet.* **31**: 166-170.
179. Ryazanov, A. G., Pavur, K. S., and Dorovkov, M. V. (1999). Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr.Biol.* **9**: R43-R45.
180. Ryazanov, A. G. (2002). Elongation factor-2 kinase and its newly discovered relatives. *FEBS Lett.* **514**: 26-29.

- 
181. Nadler, M. J., Hermosura, M. C., Inabe, K., Perraud, A. L., Zhu, Q., Stokes, A. J., Kurosaki, T., Kinet, J. P., Penner, R., Scharenberg, A. M., and Fleig, A. (2001). LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* **411**: 590-595.
182. Runnels, L. W., Yue, L., and Clapham, D. E. (2002). The TRPM7 channel is inactivated by PIP<sub>2</sub> hydrolysis. *Nat.Cell Biol.* **4**: 329-336.
183. Gunthorpe, M. J., Benham, C. D., Randall, A., and Davis, J. B. (2002). The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol.Sci.* **23**: 183-191.
184. Peier, A. M., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Moqrich, A., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Story, G. M., Colley, S., Hogenesch, J. B., McIntyre, P., Bevan, S., and Patapoutian, A. (2002). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* **296**: 2046-2049.
185. Xu, H., Ramsey, I. S., Kotecha, S. A., Moran, M. M., Chong, J. A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., DiStefano, P. S., Curtis, R., and Clapham, D. E. (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418**: 181-186.
186. Smith, G. D., Gunthorpe, M. J., Kelsell, R. E., Hayes, P. D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J. E., Jerman, J. C., Walhin, J. P., Ooi, L., Egerton, J., Charles, K. J., Smart, D., Randall, A. D., Anand, P., and Davis, J. B. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* **418**: 186-190.
187. 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.
188. Suzuki, M., Ishibashi, K., Ooki, G., Tsuruoka, S., and Imai, M. (2000). Electrophysiologic characteristics of the Ca-permeable channels, ECaC and CaT, in the kidney. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **274**: 344-349.

189. Van Abel, M., Hoenderop, J. G., Dardenne, O., St Arnaud, R., Van Os, C. H., Van Leeuwen, H. J., and Bindels, R. J. (2002). 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Independent Stimulatory Effect of Estrogen on the Expression of ECaC1 in the Kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.* **13**: 2102-2109.
190. Yue, L., Peng, J. B., Hediger, M. A., and Clapham, D. E. (2001). CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* **410**: 705-709.
191. Voets, T., Prenen, J., Fleig, A., Vennekens, R., Watanabe, H., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J., Droogmans, G., Penner, R., and Nilius, B. (2001). CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J.Biol.Chem.* **276**: 47767-47770.
192. Suzuki, M., Sato, J., Kutsuwada, K., Ooki, G., and Imai, M. (1999). Cloning of a stretch-inhibitable nonselective cation channel. *J.Biol.Chem.* **274**: 6330-6335.
193. Prawitt, D., Enklaar, T., Klemm, G., Gartner, B., Spangenberg, C., Winterpacht, A., Higgins, M., Pelletier, J., and Zabel, B. (2000). Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum.Mol.Genet.* **9**: 203-216.
194. Lin, X., Antalffy, B., Kang, D., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (2000). Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nat.Neurosci.* **3**: 157-163.
195. Koulen, P., Cai, Y., Geng, L., Maeda, Y., Nishimura, S., Witzgall, R., Ehrlich, B. E., and Somlo, S. (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat.Cell Biol.* **4**: 191-197.
196. Missiaen, L., Robberecht, W., van den, B. L., Callewaert, G., Parys, J. B., Wuytack, F., Raeymaekers, L., Nilius, B., Eggermont, J., and De Smedt, H. (2000). Abnormal intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and disease. *Cell Calcium* **28**: 1-21.



197. Partida-Sanchez, S., Cockayne, D. A., Monard, S., Jacobson, E. L., Oppenheimer, N., Garvy, B., Kusser, K., Goodrich, S., Howard, M., Harmsen, A., Randall, T. D., and Lund, F. E. (2001). Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat.Med.* **7**: 1209-1216.
198. Cakir-Kiefer, C., Muller-Steffner, H., Oppenheimer, N., and Schuber, F. (2001). Kinetic competence of the cADP-ribose-CD38 complex as an intermediate in the CD38/NAD<sup>+</sup> glycohydrolase-catalysed reactions: implication for CD38 signalling. *Biochem.J.* **358**: 399-406.
199. Kitchen, E., Rossi, A. G., Condliffe, A. M., Haslett, C., and Chilvers, E. R. (1996). Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor. *Blood* **88**: 4330-4337.
200. Kasahara, Y., Iwai, K., Yachie, A., Ohta, K., Konno, A., Seki, H., Miyawaki, T., and Taniguchi, N. (1997). Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood* **89**: 1748-1753.
201. Kettritz, R., Falk, R. J., Jennette, J. C., and Gaido, M. L. (1997). Neutrophil superoxide release is required for spontaneous and FMLP-mediated but not for TNF alpha-mediated apoptosis. *J.Am.Soc.Nephrol.* **8**: 1091-1100.
202. Wei, Y. H. and Lee, H. C. (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* **227**: 671-682.
203. Jellinger, K. A. (1999). The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging* **14**: 115-140.
204. Markesbery, W. R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic.Biol.Med.* **23**: 134-147.
205. Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J.Neurochem.* **59**: 1609-1623.

- 
206. Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* **18**: 685-716.
207. Cole, K. K. and Perez-Polo, J. R. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury. *J.Neurochem.* **82**: 19-29.
208. Ha, H. C. and Snyder, S. H. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 13978-13982.
209. Mylonas, C. and Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* **13**: 295-309.
210. Herson, P. S. and Ashford, M. L. (1997). Activation of a novel non-selective cation channel by alloxan and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the rat insulin-secreting cell line CRI-G1. *J.Physiol* **501 ( Pt 1)**: 59-66.
211. Herson, P. S., Dulock, K. A., and Ashford, M. L. (1997). Characterization of a nicotinamide-adenine dinucleotide-dependent cation channel in the CRI-G1 rat insulinoma cell line. *J.Physiol* **505 ( Pt 1)**: 65-76.
212. Kanzaki, M., Zhang, Y. Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H., and Kojima, I. (1999). Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat.Cell Biol.* **1**: 165-170.
213. Balzer, M., Lintschinger, B., and Groschner, K. (1999). Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells. *Cardiovasc.Res.* **42**: 543-549.
214. Gutteridge, J. M. and Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **899**: 136-147.
215. Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **279**: L1005-L1028.

216. Griendling, K. K., Sorescu, D., Lassegue, B., and Ushio-Fukai, M. (2000). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **20**: 2175-2183.

## **Danksagung**

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 542: „Molekulare Mechanismen Zytokin-gesteuerter Entzündungsprozesse: Signaltransduktion und pathophysiologische Konsequenzen“.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. A. Lückhoff für die interessante Themenstellung und für die Bereitstellung des großzügig ausgestatteten Arbeitsplatzes. Ferner trugen seine Diskussionsbereitschaft und der Freiraum, den er mir bei der Entwicklung und Durchführung der Thematik ließ, sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. H. Wagner danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie bedanke ich mich für die produktive Zusammenarbeit und für die nette Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanke ich mich bei Ilinca Ionescu, die als „gute Seele des Labors“ stets mit ihrer Hilfsbereitschaft zur Seite stand. Desweiteren bedanke ich mich herzlich bei Eberhard Jüngling. Die mit ihm geführten, konstruktiven Gespräche ermöglichten mir, nicht nur einen besseren Einblick in die Elektrophysiologie zu bekommen, sondern auch gute Ideen in die Tat umzusetzen. Hans-Jürgen Förster danke ich für die Hilfe bei Problemen mit dem Computer, sowie Philip Düwel hinsichtlich der Problemlösung statistischer Auswertungen.

Inka Heiner gilt ein besonderer Dank. Sie war mir weit mehr als eine gute Arbeitskollegin, so daß die gemeinsam erlebte Zeit zu einer schönen Zeit wurde.

Petra Dirks danke ich ganz herzlich für ihre enge Verbundenheit. Wie in Zeiten des Studiums war auch während der Promotion ihre Freundschaft, trotz der inzwischen großen, räumlichen Distanz, ein hilfreicher Wegbegleiter.

Zum Schluß möchte ich mich von ganzen Herzen bei meinen Eltern Elisabeth und Heinrich Wehage bedanken und bei meinem Lebensgefährten Meik Langmack:

Danke



## Lebenslauf

Edith Maria Wehage

01. 05. 1968	geboren in Lohne/Oldenburg
1974 – 1978	Besuch der Grundschule Brockdorf/Lohne
1978 – 1980	Besuch der Orientierungsstufe I/Lohne
1980 – 1984	Besuch der Realschule Lohne
1984 - 1985	Besuch des Allgemeinen Gymnasiums Lohne
1985 - 1988	Ausbildung zur Technischen Zeichnerin bei der Bramlage GmbH Lohne
Juni 1988	Abschluß zur Technischen Zeichnerin
Juni 1988 – Juli 1988	Anstellung als Technische Zeichnerin bei der Bramlage GmbH Lohne
1988 - 1991	Besuch des Oldenburg Kollegs/Oldenburg
Juni 1991	Abitur
1991 - 1999	Biologiestudium an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

1998 - 1999	Diplomarbeit an der AG Neurobiologie der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg; Thema: „Der Einfluß von Retinsäure auf die Proteinexpression in der Karpfenretina“
September 1999	Diplom
Oktober 1999 – Oktober 2002	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Physiologie des Universitätsklinikum der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
seit November 2002	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Biologie II der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen