

Aus der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. P. Eder-Negrin  
am Deutschen Zentrum für Herzinsuffizienz (DZHI)  
der Universität Würzburg

**Die Einflüsse des Ionenkanals**  
***Transient Receptor Potential Canonical 4 (TRPC4)***  
**auf die Kalzium-Homöostase in Kardiomyozyten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde  
an der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

**Viktor Heinrich von Ehrlich-Treuenstätt**

aus  
Bonn

Würzburg, März 2018



---

**Referent: Herr Professor Dr. C. Maack**

**Koreferent: Herr Professor Dr. K. Schuh**

**Berichterstatterin: Frau Professorin Dr. H. Rittner**

**Dekan: Herr Professor Dr. M. Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 20. Mai 2019**

**Der Promovend ist Arzt**

---

Gewidmet in großer Dankbarkeit  
meiner Mutter  
und in memoriam meinem Vater

# I Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Herzhypertrophie als Auslöser einer Herzinsuffizienz.....	1
1.2. Ca <sup>2+</sup> -Homöostase der Zelle .....	4
1.2.1. Regulation der Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung .....	4
1.2.2. Regulation von Ca <sup>2+</sup> in Kardiomyozyten.....	7
1.2.3. Ca <sup>2+</sup> als Aktivator von Signalwegen .....	8
1.3. Canonical Transient Receptor Potential Channels (TRPCs): Struktur und deren Rolle in der Ca <sup>2+</sup> -Regulation.....	9
1.3.1. Die Familie der TRP-Kanäle .....	9
1.3.2. Die funktionelle Bedeutung der TRPC-Ionenkanal-Familie im Herzen .....	11
1.3.2.1. Die Rolle von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 in Kardiomyozyten .....	11
1.3.2.2. Die Rolle von TRPC4 in Kardiomyozyten.....	15
1.3.2.3. Aktivierung von TRPC4-Kanälen.....	17
1.4. Arbeitshypothese und Zielsetzung.....	18
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1. Material .....	19
2.1.1. Versuchstiere.....	19
2.1.2. Adenoviren .....	19

2.1.3.	Kulturmedium .....	20
2.1.4.	Chemikalien .....	20
2.1.5.	Puffer und Lösungen .....	21
2.1.6.	Verbrauchsgüter.....	23
2.1.7.	Geräte.....	23
2.2.	Methoden .....	25
2.2.1.	Präparation und Isolierung neonataler Kardiomyozyten aus der Ratte .....	25
2.2.2.	Anlegen von Zellkulturen.....	25
2.2.3.	Adenovirale Infizierung und Vorbereitung der Kardiomyozyten .....	26
2.2.4.	Ca <sup>2+</sup> - Messungen.....	27
2.2.5.	Auswertung der Ca <sup>2+</sup> -Transienten.....	29
2.2.6.	Statistik .....	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1.	TRPC4 $\beta$ weist Spontanaktivität in Kardiomyozyten auf.....	34
3.2.	TRPC4 $\beta$ beeinflusst die zyklischen Ca <sup>2+</sup> -Veränderungen in schlagenden Kardiomyozyten .....	37
3.3.	TRPC4 $\beta$ wird als speicher-regulierter Ca <sup>2+</sup> -Kanal (SOC) in neonatalen Kardiomyozyten aktiviert.....	42
3.4.	TRPC4 $\beta$ reagiert sensitiver auf Angiotensin II-Stimulation als TRPC4 $\alpha$ .....	45
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>64</b>

7.1	Abbildungsverzeichnis .....	64
7.2	Tabellenverzeichnis .....	65

## II Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen der SI-Einheiten (Internationales Einheitensystem) werden als bekannt vorausgesetzt.

<b>Ad</b>	Adenovirus
<b>Ang II</b>	Angiotensin II
<b>ANP</b>	atrionatriuretisches Peptid (kardialer Marker)
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>βGal</b>	beta-Galaktosidase
<b>BNP</b>	B-natriuretisches Peptid (kardialer Marker)
<b>CaMKII</b>	<i>Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin dependent kinase II</i>
<b>CBFHH</b>	<i>Calcium and bicarbonate free Hanks with HEPES</i>
<b>CPA</b>	Cyclopiazonsäure
<b>DAG</b>	Diazylglyzerol
<b>DCM</b>	Dilatative Kardiomyopathie
<b>dn</b>	dominant negativ
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ECC</b>	Erregungs-Kontraktions-Kopplung
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ET-1</b>	Endothelin-1
<b>ETC</b>	Erregungs-Transkriptions-Kopplung

<b>FCS</b>	Foetales Kälberserum
<b>Gq</b>	<i>Guanine nucleotide-binding protein q</i> (G-protein)
<b>Gαq</b>	<i>Guanine nucleotide-binding protein q alpha</i> (G-protein)
<b>GPCR</b>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
<b>HCM</b>	Hypertrophe Kardiomyopathie
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
<b>LTCC</b>	L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal
<b>MEM</b>	<i>Minimal essential medium (Eagle)</i>
<b>MOI</b>	Multiplizität der Infektion
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>NCX</b>	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
<b>NFAT</b>	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
<b>NRC</b>	<i>Neonatal Rat Cardiomyocyte</i>
<b>ORAI</b>	<i>Ca<sup>2+</sup> release activated Ca<sup>2+</sup> channel protein 1</i>
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PE</b>	Phenylephrin
<b>PIP</b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>ROC</b>	<i>Receptor operated Ca<sup>2+</sup> channel</i>
<b>ROCE</b>	<i>ROC entry</i>
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>runs per minute</i> )
<b>RyR</b>	Ryanodin-Rezeptor



<b>SERCA</b>	<i>Sarco-/endoplasmatic reticulum Ca<sup>2+</sup>-transporting ATPase</i>
<b>SOC</b>	<i>Store-operated Ca<sup>2+</sup> channel</i>
<b>SOCE</b>	<i>SOC entry</i>
<b>SR</b>	Sarkoplasmatisches Retikulum
<b>STIM1</b>	<i>Stromal interaction molecule 1</i>
<b>TAC</b>	Transversale Aortenkonstriktion
<b>TRP</b>	<i>Transient Receptor Potential</i>
<b>TRPC</b>	TRP <i>Canonical</i> -Unterfamilie
<b>TRPC4<math>\alpha</math></b>	TRPC4- <i>Splice</i> -Variante C4alpha
<b>TRPC4<math>\beta</math></b>	TRPC4- <i>Splice</i> -Variante C4beta

# 1. Einleitung

## 1.1. Herzhypertrophie als Auslöser einer Herzinsuffizienz

Kardiomyopathien zeichnen sich durch strukturelle und funktionelle Veränderungen des Herzens aus. Man unterscheidet zwischen hypertrophen (HCM), dilatativen (DCM), arrhythmogenen und linksventrikulären (LV) Kardiomyopathien (McNally & Mestroni, 2017). HCM ist die häufigste Kardiomyopathie und weist weltweit eine Prävalenz von ca. 1/500 (0,2 %) auf. Die Prävalenz der DCM und arrhythmogenen Kardiomyopathien ist etwas geringer (1:2500 bzw. 1:5000) (Sabater-Molina et al., 2017). Bereits seit den 60er Jahren ist die hypertrophe Kardiomyopathie bekannt und weltweit eine der Haupttodesursachen beim Menschen (Schirone et al., 2017; Ueda & Stern, 2017). HCM ist zudem die häufigste erbliche Herzerkrankung überhaupt und für den plötzlichen Herztod bei unter 50-jährigen Patienten, insbesondere bei jungen Leistungssportlern, verantwortlich (Dadson, Hauck, & Billia, 2017).

Die Symptome der HCM sind variabel. Sie macht sich z. B. bemerkbar in Form von Erschöpfung, Kurzatmigkeit und Thoraxschmerzen und führt im schlimmsten Fall zum Herzversagen (Brito & Cepeda, 2017; Sabater-Molina et al., 2017). Allerdings kann sie auch klinisch inapparent verlaufen und wird zum Teil erst bei Routineuntersuchungen diagnostiziert (Ueda & Stern, 2017).

Die HCM kann als eine autosomal dominant vererbte Erkrankung entstehen, welcher hauptsächlich Mutationen in Genen für Myofilamente von Sarkomeren zugrunde liegen (Ueda & Stern, 2017). In 60 % der Fälle handelt es sich um eine Mutation in einem von acht Sarkomerproteinen (Sabater-Molina et al., 2017). Anatomisch betrachtet sind bei der HCM der linke Ventrikel sowie das Septum pathologisch verdickt (McNally & Mestroni, 2017). Bei etwa 70 % der

betroffenen Patienten liegen Mutationen im *beta-myosin heavy chain* (MHC- $\beta$ ) und *myosin binding protein C* (MYBPC) vor. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen an Tiermodellen haben hierbei einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Pathogenese der HCM geliefert (Ueda & Stern, 2017). Als Mechanismus der HCM wird eine reduzierte Kontraktilität des Herzens angesehen, was eine linksventrikuläre Hypertrophie als kompensatorischen Mechanismus zur Folge hat (Ueda & Stern, 2017). Der Umbau des Herzens wird durch Verlust an Kardiomyozyten und durch Proliferation von Fibroblasten in Gang gesetzt. Weiterhin ist eine gestörte myokardiale Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Ionen-Sensibilität als pathogenetischer Faktor der HCM anerkannt. Mutationen in Myofilamentproteinen erhöhen die Sensitivität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ , stören die Verarbeitung von  $\text{Ca}^{2+}$  und verändern die  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) (Ueda & Stern, 2017). Die Dysregulation der Erregungs-Kontraktions-Kopplung (ECC; *Excitation Contraction Coupling*) beeinträchtigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. Bei funktionsgestörten Kardiomyozyten ist zum einen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA)-2A des SR defekt und zum anderen besteht eine unkontrollierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über Ryanodin-Rezeptoren (RyR) (Dadson et al., 2017). Die erhöhte Belastung der Kardiomyozyten führt initial zu einer adaptiven Hypertrophie, bei der zusätzliche parallele Sarkomere gebildet werden. Gleichzeitig werden Umbauprozesse (*Remodeling*) in Gang gesetzt, die eine linksventrikuläre Hypertrophie und eine Störung der Anordnung der Kardiomyozyten zur Folge haben. Nach einiger Zeit setzt jedoch ein maladaptives *Remodeling* ein, was letztlich im Herzversagen mündet (Harvey & Leinwand, 2011; Schirone et al., 2017). Die Pathogenese der HCM beinhaltet vier Stufen: primär/initial, sekundär/molekular, tertiär/histologisch und quartär/klinisch. Der primäre Defekt ist die Mutation und ihre Auswirkung auf die Sarkomere ( $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität, Anteil an Sarkomerproteinen, ATPase-Aktivität). Dieser initiale Defekt bedingt molekulare/sekundäre Folgen (veränderte Transkriptomik und

Signalwege), welche ihrerseits tertiäre morphologische Veränderungen im Myokard auslösen (Hypertrophie, Fibrose). Molekulare und histologische Veränderungen bedingen wiederum quartäre klinische Befunde wie Arrhythmie und Herzversagen (Marian & Braunwald, 2017).

Neben den erblichen Formen des hypertrophen *Remodeling* sind auch die pathologischen Phänotypen der Aortenstenose (Rader et al., 2015) sowie der systemischen Hypertonie (Messerli, Rimoldi, & Bangalore, 2017) Hauptauslöser kardialer hypertropher Prozesse. Als Diät verabreichter Salzüberschuss verschlimmert zudem noch die Pathologie (Stamler, 1997). Die Gruppe um Frohlich und Mitarbeiter wies außerdem in Tiermodellen eine vergrößerte linksventrikuläre Herzmasse unter experimenteller Hypertonie durch Salzaufnahme nach (Frohlich et al., 1993; Leenen & Yuan, 1998). Ähnliches wurde in klinischen Studien am Patienten mit essentieller Hypertonie beobachtet (du Cailar et al., 1989).

Aufgrund der erhöhten Nachlast versucht das Herz mit einer Hypertrophierung des linken Ventrikels seine Funktion aufrecht zu erhalten. Bleibt der pathologische Stimulus bestehen, führt dies zur Versteifung des Muskels, zur Funktionsverminderung und schließlich zum Herzversagen (Weil & Schunkert, 2006; Schmid, Hirt & Scheld, 2009; Rickenbacher, 2001).

In den letzten Jahren haben viele Studien gezeigt, dass es einen engen Zusammenhang zwischen der pathologischen Hypertrophie und  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierenden Proteinen und Signalkaskaden gibt (Freichel et al., 2017). Es wird angenommen, dass eine gesteigerte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des beta-adrenergen Systems mit Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts in Kardiomyozten verbunden ist. Wie auch im gesamten Herz-Kreislaufsystem kommt es auf der Ebene der Kardiomyozyten zu einem *Circulus vitiosus*. So führt eine erhöhte Stimulierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) zur Aktivierung von Ionenkanälen, welche einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Kardiomyozyten erlauben.

Daraufhin werden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege, wie z. B. die Serin/Threonin Phosphatase (Calcineurin) oder die *Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin dependent kinase II* (CaMKII) aktiviert (s. Abschnitt 1.2.3). Diese wiederum greifen in die Transkriptionsmaschinerie ein, fördern hypertrophes Wachstum und die Expression von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in der Plasmamembran, wodurch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom weiter gesteigert wird. Die CaMKII erhöht zusätzlich die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ryanodin-Rezeptors (RyR). Dies ist mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherauffüllung (*load*) des SR verbunden, wodurch diastolisches  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht und systolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung erniedrigt wird (Goonasekera & Molkentin, 2012). Unter der Einwirkung der CaMKII erhöht sich auch die Öffnungswahrscheinlichkeit des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals (LTCC), was mit einer erhöhten Arrhythmie-Neigung verbunden ist (Y. Wu et al., 2002).

Eine zentrale Rolle in der pathologischen Hypertrophie nehmen auch weniger bekannte Ionenkanäle in der Plasmamembran ein. Diese sind als TRPC-Kanäle bekannt. Eine Vielzahl an Arbeiten in Tiermodellen hat gezeigt, dass bei chronisch-erhöhter Nachlast, durch das chirurgische Verfahren der Aortenkonstriktion (TAC) simuliert, ein erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nachzuweisen ist. Dieser stellt sich bei einer TRPC-Hemmung verringert dar, was mit einer geringeren Hypertrophie und gesteigerten Herzfunktion verbunden ist (Seth et al., 2009).

## **1.2. $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der Zelle**

### **1.2.1. Regulation der $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung**

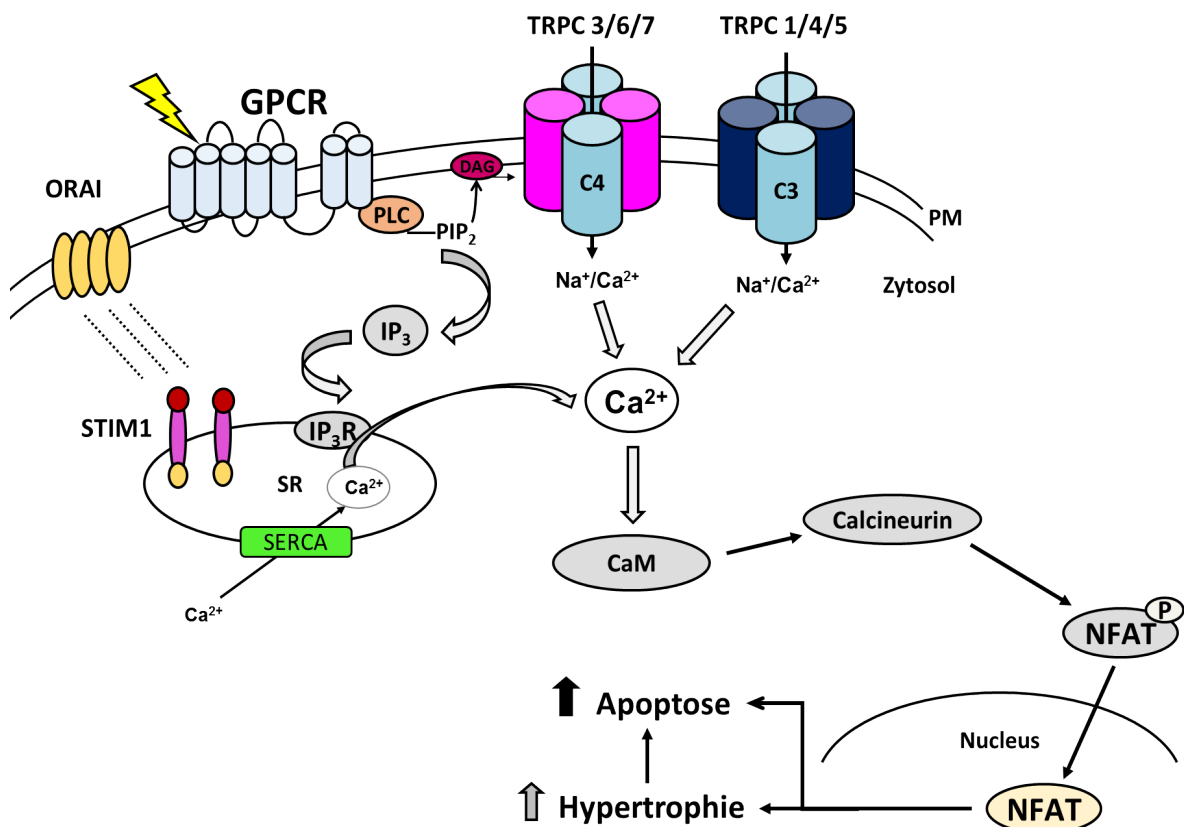
$\text{Ca}^{2+}$  ist ein Schlüssel-*second-messenger*, der verschiedene physiologische Prozesse, wie Sekretion, Gentranskription, Proliferation und Zelltod, reguliert (Carreras-Sureda, Pihan, & Hetz, 2017). Ein *second-messenger* ist definiert als

ein chemischer Botenstoff, der über ein Rezeptorsystem gebildet wird, als Antwort auf das Signal eines extrazellulären primären Botenstoffs (*first messenger*) (Krauss, 2008; Alberts et al. 2005). Meist entsteht das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal durch den Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dabei spielen sowohl die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern als auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum eine Rolle (de Souza & Ambudkar, 2014). Die Signaltransduktion von  $\text{Ca}^{2+}$  ist durch einen starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum schnell und effektiv (Carreras-Sureda et al., 2017).

In nicht erregbaren Zellen wird das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal durch eine rezeptorabhängige Aktivierung der Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>)-abhängigen Phospholipase C (PLC) generiert, was die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> und damit die Bildung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diazylglyzerol (DAG) zur Folge hat. IP<sub>3</sub> mediiert durch die Bindung an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor (IP<sub>3</sub>R) die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), was zur Entleerung (*depletion*) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher im ER und zu einem transienten Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt (Abb. 1). Für einen anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg im Zytoplasma muss  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem extrazellulären Raum in die Zelle aufgenommen werden. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wird ebenfalls durch Ionenkanäle ausgelöst, die durch rezeptorstimulierte PIP<sub>2</sub>-Hydrolyse aktiviert werden (de Souza & Ambudkar, 2014). Diese werden unterteilt in sogenannte speicherabhängige und speicherunabhängige Ionenkanäle. Ein speicherabhängiger Mechanismus, bezeichnet als speicher-regulierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (*store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry*, SOCE), ist in nicht erregbaren Zellen von hoher Relevanz, wurde aber auch in elektrisch erregbaren Zellen beobachtet (Eder & Molkentin, 2011). Der Stimulus für die Aktivierung des SOCE ist die Entleerung (*depletion*) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher im ER, bei welchem das Protein *stromal interaction molecule 1* (STIM1) eine Rolle spielt. (Carreras-Sureda et al.,

2017). STIM1 ist der Hauptkalziumsensor im ER, der bei Speicherentleerung zu oligomeren Strukturen in der Membran des SR aggregiert, in Junktionsdomänen der ER-Plasmamembran transloziert und dadurch Kanäle in der Plasmamembran aktiviert, die den SOCE medieren (de Souza & Ambudkar, 2014). Hauptkomponenten des SOCE sind *Ca<sup>2+</sup>-release activated channels* (CRACs), die hauptsächlich aus Orai-Proteinen aufgebaut sind.

Speicherunabhängige *receptor-operated* (ROC)-Ionenkanäle werden durch die Stimulierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und die PLC-abhängige PIP<sub>2</sub>-Hydrolyse sowie durch die Entstehung des Hydrolyseprodukts DAG aktiviert. Vor allem Ionenkanäle der TRP-Familie (siehe Abschnitt 1.3.) wurden in verschiedenen Zellsystemen als ROC beschrieben (Albert et al., 2007; de Souza & Ambudkar, 2014).



**Abbildung 1: Intrazelluläres Ca<sup>2+</sup> als zentrales Element der Zellregulation**  
Schematische Darstellung der wichtigsten Komponenten bei der Aktivierung von

TRPC-Kanälen als nachgeschaltete Zielprodukte (*downstream targets*) im Ablauf der GPCR-PLC-Signalkaskade: Nach Aktivierung → Konformationsänderung des G-Proteingekoppelten Rezeptors (GPCR) in der Plasmamembran (PM) → Aktivierung des intrazellulären G-Proteins ( $G\alpha_q$ ) → Generierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>)-abhängiger Phospholipase C (PLC) → Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> zu Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diazylglyzerol (DAG) → IP<sub>3</sub> induziert durch Bindung am Rezeptor (IP<sub>3</sub>R) im Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem SR +  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum durch Aktivierung von TRPC1/ -4/ -5. TRPC3/ -6/ -7 werden durch DAG aktiviert; Das *Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel protein* (ORAI) steht in enger Lagebeziehung zum *stromal interaction molecule 1* (STIM1); Weitere Abkürzungen: die „Calciumpumpe“ des SR = SERCA; CaM = Calmodulin; NFAT = *nuclear factor of activated T-cells*; NFAT p = NFAT phosphoryliert;  $Ca^{2+}$  = Kalzium,  $Na^{+}$  = Natrium, TRPC = *Transient Receptor Potential Canonical Channel*. Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt

### 1.2.2. Regulation von $Ca^{2+}$ in Kardiomyozyten

Im Herzen nimmt  $Ca^{2+}$  eine Schlüsselrolle in der Kopplung von Erregung und Kontraktion (Erregungs-Kontraktions-Kopplung, ECC) ein und ist somit einer der wichtigsten Regulatoren des Herzschlags. Bei der Depolarisation werden L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle (LTCC) aktiviert, was den  $Ca^{2+}$ -Einstrom bewirkt. Dieser  $Ca^{2+}$ -Einstrom führt zur Aktivierung von *Ca<sup>2+</sup>-release channels* (Ryanodin-Rezeptoren, RyR) in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR), die sogenannte  $Ca^{2+}$ -induzierte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung (*Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release*). Der Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt durch Konformationsänderung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes zur Kontraktion. Zur Erschlaffung muss  $Ca^{2+}$  durch die SR  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) zurück in das SR transportiert und durch den  $Na^{+}/Ca^{2+}$ -Austauscher (NCX)



wieder in den extrazellulären Raum ausgeschleust werden (Bers, 2002; Bers & Guo, 2005; Dewenter et al., 2017).

Darüber hinaus ist  $\text{Ca}^{2+}$  auch ein wichtiger *second messenger* zur Regulation nachgeschalteter Effektoren der Signaltransduktion und sogar der Genexpression, welche als Erregungs-Transkriptions-Kopplung (ETC) bezeichnet wird (Bers, 2008). Es hat sich gezeigt, dass ETC vor allem eine essentielle Rolle bei chronischen Herzkrankheiten spielt, bei welchen ein verändertes  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Transkriptionsprofil auffallend ist.

Bei der kardialen Hypertrophie spielt  $\text{Ca}^{2+}$  ein zentrales Element, da durch die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalkaskaden (z. B. Calmodulin, CaMKII, Calcineurin) *Remodeling*-Prozesse beschleunigt werden (Dewenter et al., 2017; Frey, McKinsey, & Olson, 2000).

### 1.2.3. $\text{Ca}^{2+}$ als Aktivator von Signalwegen

Die Regulation  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Signalmechanismen wird häufig in Zusammenhang mit Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>)-Rezeptoren im SR, *Transient Receptor Potential* (TRP)-Kanälen (siehe 1.3) und STIM1-kontrolliertem *store-operated Ca<sup>2+</sup> entry* (SOCE) durch ORAI-Kanäle (siehe 1.2.1) beschrieben.

IP<sub>3</sub>-Rezeptoren sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die durch IP<sub>3</sub> aktiviert werden. IP<sub>3</sub> entsteht durch die PLC-abhängige Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> nach Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Berridge, 1993) (Abb. 1). Endothelin-1 (ET-1), Katecholamine und Angiotensin II (Ang II) aktivieren die IP<sub>3</sub>-Signalkaskade im Herzen (Dewenter et al., 2017; Nakayama et al., 2010). Im Laufe dieser GPCR-PLC gesteuerten Kaskade kommt es zur Aktivierung von SOC und ROC (wie oben in 1.2.1. beschrieben) und dadurch zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Zunahme im Zytosol, welches nachgeschaltete Signalwege und Transkriptionsfaktoren beeinflusst.

Zu den Signalwegen gehören die bereits angesprochenen Calmodulin, CaMKII und Calcineurin. Calmodulin ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor in eukaryoten Zellen. Es reguliert die Genexpression sowie die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Enzymen, wie CaMKII und Calcineurin. Calcineurin ist eine Serin/Threonin Phosphatase und wird wie CaMKII durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Bindung aktiviert. *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) wiederum steht unter der transkriptionellen Kontrolle von Calcineurin (Nakayama et al., 2010) und wird in den Zellkern transportiert. Es spielt eine besondere Rolle bei der Herzentwicklung und der Herzhypertrophie (Dewenter et al., 2017; Vennekens, 2011; Yue et al., 2015).

### **1.3. *Canonical Transient Receptor Potential Channels* (TRPCs): Struktur und deren Rolle in der $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation**

#### **1.3.1. Die Familie der TRP-Kanäle**

*Transient Receptor Potential* (TRP)-Kanäle stellen eine Superfamilie von Ionenkanälen dar, die für Kationen permeabel sind. TRP-Kanäle wurden zum ersten Mal bei *Drosophila* nachgewiesen (Nilius et al., 2007; Yue et al., 2015). Bei Säugetieren sind bislang 28 *Trp*-Gene identifiziert worden (Numaga-Tomita et al., 2017; Yue et al., 2015), die sechs Untergruppen bilden: *canonical*, *vanilloid*, *melastatin*, *ankyrin*, *polycystin* und *mucolipin* TRP (TRPC, -V, -M, -A, -P und TRPML) (Numaga-Tomita et al., 2017; Sukumaran et al., 2016). TRPC, TRPV und TRPM beinhalten sieben, sechs bzw. acht Kanalproteine. Die TRPA-Untergruppe besitzt nur ein Gen, die TRPML-Subfamilie hingegen beinhaltet drei Proteine, die sich vom Mucolipin-1 ableiten und die TRPP-Subgruppe beinhaltet drei Varianten: TRPP2, -3 und -5. Bei Nicht-Mammaliern gibt es eine weitere siebte Unterfamilie, TRPN1 (Yue et al., 2015).

Die meisten TRP-Kanäle sind  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable, nicht-selektive Kationenkanäle, lediglich TRPM4 und -5 sind nicht permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$ , TRPV5 und -6 sind stark selektiv permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und die Kinasen von TRPM6 und -7 sind für  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Zn}^{2+}$  sowie andere Ionen durchlässig (Vennekens, 2011).

TRP-Kanäle bilden homo- und heteromere Kanäle in unterschiedlichen Konstellationen, z. B. TRPC1 heteromere Kanäle mit TRPC4 und -5. TRPC3, -6 und -7 formen heterotetramere Kanäle untereinander (Abb. 1). Darüber hinaus erzeugen TRPC4 und -5 in Anwesenheit von TRPC1 heteromere Kanäle mit TRPC3 und TRPC6 (Freichel, Tsvilovskyy, & Camacho Londono, 2014; Yue et al., 2015).

TRP-Kanäle sind spannungsunabhängig, da sie im Gegensatz zu spannungsabhängigen Rezeptoren keinen Spannungssensor an der vierten Transmembrandomäne besitzen. Allgemein reagieren TRP auf verschiedene Stimuli wie thermische, chemische, nozizeptive, mechanische und lokale Reize (Clapham, 2003; Venkatachalam & Montell, 2007). Zu den z. B. speziell mechanosensitiven TRP gehören TRPC1, -3 und -6 (Yamaguchi et al., 2017).

Das Öffnen der TRP-Kanäle, deren Aktivierung durch unterschiedlich beschriebene Mechanismen erfolgt, ist auf eine unmittelbare Ligandenbindung begründet, die über eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade verläuft und in der Folge auch eine Membrandepolarisation auslösen kann (Vennekens, 2011). TRPC-Kanäle werden über den Phospholipase C (PLC)-Signalweg entweder als ROC über DAG (TRPC2, -3, -6 und TRPC7) oder als SOC (TRPC1, -4 und TRPC5) aktiviert, wobei es immer noch widersprüchliche Angaben zu einer SOC-Aktivierung gibt (siehe 1.3.2) (Janssen & Kwan, 2007; Hofmann et al., 1999; Shuttleworth, 2004). TRPM6 und -7 -Kanäle sind  $\text{Mg}^{2+}$ -permeabel und werden durch niedrige intrazelluläre  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen angeregt (Venkatachalam & Montell, 2007). Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert verschiedene andere TRP-Kanäle wie TRPM4, -5, -2 und TRPA1. *Vanilloid*

TRPV5 und -6 sind konstitutiv offen, die Aktivierungsmechanismen dieser TRPs sind noch unbekannt (Yue et al., 2015). Aufgrund ihrer Rolle als intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle (*Ca<sup>2+</sup> release channels*) steuern TRP-Kanäle verschiedene Zellfunktionen, von der rein sensorischen bis hin zur molekularen Regulation. Sie werden benötigt für Funktions- und wichtige regulatorische Schritte von intrazellulären Organellen, beispielsweise von Endosomen und Lysosomen (Nilius & Owsianik, 2011). Sie dienen insbesondere auch deswegen als Wegbereiter und Schleusenwärter (*gatekeepers*) für den transzellulären Transport von Kationen wie z. B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (Sukumaran et al., 2016).

### **1.3.2. Die funktionelle Bedeutung der TRPC-Ionenkanal-Familie im Herzen**

#### **1.3.2.1. Die Rolle von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 in Kardiomyozyten**

Es gibt 7 verschiedene TRPC-Untereinheiten (TRPC1-7), welche alle im Herzen exprimiert werden. Wie auch in anderen Zellsystemen werden TRPC-Ionenkanäle in Kardiomyozyten über Phospholipase C (PLC)-gekoppelte Rezeptoren aktiviert (Ahmad et al., 2017), was zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in den Zellen führt. Die Funktion von TRPCs im Herzen wurde mit verschiedenen Ansätzen untersucht. Vor allem gentechnisch veränderte Mausmodelle spielten bei der funktionellen Charakterisierung von TRPC-Ionenkanälen eine besondere Bedeutung. So wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Untereinheiten TRPC1, -3 und TRPC6 die Entwicklung des Herzversagens beschleunigt (Yamaguchi et al., 2017). Dies passiert indem intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  steigt, die Phosphatase Calcineurin aktiviert und die Transkription sowie die Aktivität von *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) gesteigert wird (Bush et

al., 2006; Nakayama et al., 2006). Calcineurin dephosphoryliert den NFAT-Transkriptionsfaktor und ermöglicht dadurch die Translokation von NFAT in den Kern, wo es an Gene bindet, die das Herzwachstum fördern und maladaptives *Remodeling* induzieren (Ahmad et al., 2017; Crabtree & Olson, 2002; Frey et al., 2000; Yamaguchi et al., 2017) (Abb.1). In anderen Studien wurde beobachtet, dass die Expression dominant-negativer (dn) TRPC3- und TRPC6 -Fragmente in transgenen Tiermodellen oder die selektive Hemmung des TRPC3-Kanals mit Pyrazol der Entstehung einer Herzhypertrophie entgegenwirken (Kiyonaka et al., 2009; Numaga-Tomita et al., 2017; X. Wu, Eder et al., 2010). Nach neurohumoraler Stimulation und transversaler Aortenkonstriktion (TAC) waren die Herzhypertrophie und die Expression der Hypertrophiemarker BNP und *beta-myosin heavy chain* (MHC- $\beta$ ) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant reduziert (X. Wu et al., 2010).

Die Überexpression von TRPC3 oder TRCP6 bei transgenen Mäusen hingegen induzierte einen verstärkten SOCE, eine gesteigerte Calcineurin/NFAT Aktivierung und eine Hypertrophieentwicklung nach neurohumoraler Stimulation oder mechanischer Überlastung nach TAC (Nakayama et al., 2006; Vennekens, 2011). TRPC3-transgene Mäuse zeigten im Alter von zwölf Monaten eine basale Herzhypertrophie, deren Ausmaß von der Höhe der Transgenexpression abhängig war. Bei hoher Transgenexpression entstand in diesem Alter bereits eine letale Kardiomyopathie (Nakayama et al., 2006; Numaga-Tomita et al., 2017). Nach TAC oder bei Behandlung mit den GPCR-Agonisten (Angiotensin II und Phenylephrin; AngII/PE) war die Herzhypertrophie gesteigert. TRPC3 und -6 werden über den Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-G $\alpha$ q-PLC-DAG-Signalweg reguliert (Yamaguchi et al., 2017). Phenylephrin (PE) und Ang II aktivieren die PLC, somit die Bildung von IP<sub>3</sub> und DAG und begünstigen damit eine verstärkte TRPC3 und -6 -Aktivität (Bush et

al., 2006; Kuwahara et al., 2006; Nakayama et al., 2006; Seth et al., 2009; Yamaguchi et al., 2017).

Bei TRPC3<sup>-/-</sup>- und dominant negativen (dn) TRPC3-transgenen Mäusen wurden unterschiedliche Auswirkungen bezüglich einer dehnungsassoziierten Veränderung des Ca<sup>2+</sup>-Transienten beschrieben. Die Gruppe von Seo und Mitarbeiter (Seo et al., 2014) fand keine Veränderung, Yamaguchi und Mitarbeiter hingegen konnten zeigen, dass die Ca<sup>2+</sup>-Transienten bei *Trpc3*<sup>-/-</sup>-Mäusen blockiert waren (Yamaguchi et al., 2017). Letztere Ergebnisse und Untersuchungen mit Pyrazol-3, einem spezifischen TRPC3-Blocker, belegen die Beteiligung von TRPC3 an der Initiierung einer Herzhypertrophie (Kiyonaka et al., 2009; Yamaguchi et al., 2017).

TRPC6 wird in hypertrophen Herzen von Calcineurin-transgenen Mäusen verstärkt exprimiert. Die Überexpression von TRPC6 unter der transkriptionellen Kontrolle des herzspezifischen *alpha-myosin heavy chain* (MHC- $\alpha$ )-Promotors in transgenen Mäusen erhöhte die Sensitivität für kardialen Stress schon bereits bei niedriger TRPC6-Expressionshöhe. Starke TRPC6-Überexpression führte zu einer hochgradigen Kardiomyopathie und Versagen des Herzens. Wie bei der TRPC3-Überexpression waren die NFAT-Aktivität und die Expression von MHC- $\beta$  sowie die kardialen Stressmarker BNP und ANP bei TRPC6-transgenen Mäusen erhöht (Dorn & Brown, 1999; Kuwahara et al., 2006; Vennekens, 2011).

Durch Membrandehnung der Myozyten entsteht ein nicht-selektiver Kationeneinstrom, der auch nach Drucküberladung über TRPC-Kanäle erzeugt wird (Merino et al., 2018). Bei *Trpc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen fehlt dieser TRPC-Strom nach Drucküberladung und die Mäuse sind vor der Entstehung einer maladaptiven Herzhypertrophie geschützt. Die physiologische Herzfunktion bei hämodynamischem Stress und übermäßiger neurohumoraler Stimulierung bleibt bei *Trpc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen erhalten. Die mechanosensitive Signalkaskade über

Calcineurin/NFAT, mTOR (*mamalian target of rapamycin*) und Akt (Proteinkinase B, PKB) ist bei *Trpc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen sowohl im basalen Zustand als auch nach Drucküberladung gehemmt. Bei *Trpc6*<sup>-/-</sup>-Mäusen ist die Expression der kardialen Marker ANP und BNP hier im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nach TAC nicht verändert (Kiyonaka et al., 2009; Numaga-Tomita et al., 2017).

TRPC1 spielt ebenso eine Rolle bei stressinduzierter Herzhypertrophie und steuert, ähnlich wie TRPC3 und TRPC6, einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, der für die Hypertrophie-Signalkaskade über den Calcineurin/NFAT-Signalweg notwendig ist (Ahmad et al., 2017). Die Induktion einer Herzhypertrophie durch abdominale bzw. transversale Aortenkonstriktion bei Ratten führte zu einer erhöhten Expression von TRPC1. Nach Behandlung mit Endothelin-1 (ET-1) war die Expression von TRPC1, BNP, ANP und der SOCE erhöht. Herunterregulierung von TRPC1 hingegen reduzierte den SOCE und schützte vor einer Endothelin-1 (ET-1)-, Angiotensin II (Ang II)- und Phenylephrin (PE)-induzierten Herzhypertrophie (Vennekens, 2011). Darüber hinaus entwickelten *Trpc1*<sup>-/-</sup>-Mäuse aufgrund von hämodynamischem Stress oder durch neurohumorale Stimulierung keine Herzhypertrophie (Seth et al., 2009).

Am Mausmodell gewährleisten demnach TRPC1, -3 und -6 den nicht-selektiven Kationeneinstrom nach Membrandehnung und werden bei Druckerhöhung im Herzen verstärkt exprimiert. Aufgrund dieser Befunde wird davon ausgegangen, dass diese TRPC-Varianten eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Herzhypertrophie spielen (Kuwahara et al., 2006; Nakayama et al., 2006; Seth et al., 2009; X. Wu et al., 2010; Yue et al., 2015).

Im Gegensatz zum Mausmodell, bei dem TRPC1, -3 und TRPC6-Überexpression an eine Herzhypertrophie gekoppelt ist, sind bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie selektiv die Expression und Abundanz von TRPC5 erhöht. TRPC3 ist hier generell nicht nachweisbar, alle weiteren TRPCs sind in

humanen Herzen mit terminaler idiopathischer Kardiomyopathie verglichen mit gesunden Herzen nicht unterschiedlich (Bush et al., 2006).

### 1.3.2.2. Die Rolle von TRPC4 in Kardiomyozyten

Im Herzen wurde TRPC4 speziell im linken Ventrikel, dem Sinusknoten und in Fibrozyten auf RNA-Ebene detektiert. Im Sinusknoten, linkem Ventrikel, Schrittmacherzellen und ventrikulären Myozyten wurde TRPC4 auch auf Proteinebene nachgewiesen (Westernblot, Immunzytochemie) (Freichel et al., 2014; McKay et al., 2000).

Es sind elf verschiedene *Splice*-Varianten von TRPC4 bekannt, darunter fallen die beiden am besten erforschten *Splice*-Varianten TRPC4 $\alpha$  und TRPC4 $\beta$ . TRPC4-Kanäle bestehen aus sechs Transmembran-Domänen (TM), bei denen die Öffnungspore zwischen der fünften und sechsten TM liegt. Das Carboxy- und Amino-terminale Ende ist intrazellulär gelegen (Freichel et al., 2014; McKay et al., 2000). TRPC4-Proteine stellen nicht-selektive Kationenkanäle dar, welche auch durch Signalwege der nachgeschalteten Kaskade („*downstream*“) der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert werden (Freichel et al., 2014).

Im Gegensatz zu TRPC4 $\alpha$  fehlt bei TRPC4 $\beta$  eine Sequenz von 84 Aminosäuren in der C-terminalen Region, welche eine mögliche Bindestelle von Calmodulin (CaM) und IP3 enthält. Diese Region ist bei Veränderungen in der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration maßgeblich an der Regulation der TRPC-Kanalaktivität beteiligt (Freichel et al., 2014).

TRPC4 $\alpha$  kann mit den Proteinen Phospholipase C beta 1 (PLCB1) und *SH3 and ankyrin repeat protein 3* (Shank 3), die in vielzähligen Interaktionen mit Membran- und zytoplasmatischen Proteinen stehen, Komplexe bilden, nicht jedoch TRPC4 $\beta$ . Ebenso erscheint TRPC4 $\alpha$  im Gegensatz zu TRPC4 $\beta$  in der Lage



-in Abhängigkeit des Expressionsniveaus- eine Hypertrophie von Kardiomyozyten auszulösen. Darüber hinaus wird durch TRPC4 $\alpha$  die Expression des kardialen Hypertrophiemarkers ANP induziert, und zwar dies zusammen mit dem *modulatory calcineurin inhibitory protein 1* (MCIP1), einem Indikator der Calcineurinaktivierung (Cooley et al., 2014). Im Gesamtkontext ist TRPC4 an einer Hypertrophie-Signalkaskade beteiligt, die durch die Aktivierung von G-Protein (Gq)-Signalwegen und der PLC *Splice*-Variante PLCB1, insbesondere PLCB1beta, ausgelöst wird. Diese Signalkaskaden sind spezifisch für eine pathologische Hypertrophie (Cooley et al., 2014; Filtz et al., 2009). Agonisten von Gq-gekoppelten Rezeptoren wie Angiotensin II (Ang II) und Endothelin-1 (ET-1) können aus mechanisch deformierten Kardiomyozyten freigesetzt werden und so eine Herzhypertrophie hervorrufen (Dorn & Brown, 1999)

Untersuchungen an genetisch veränderten Mausmodellen und isolierten Kardiomyozyten liefern hierzu wichtige Informationen über die Funktion von TRPC4. Die Expression eines dnTRPC4-Fragments in Mauskardiomyozyten, welches die Funktion heterolog exprimierter TRPC4 homo- und TRPC1, -4, -5 heteromerer Kanäle stört, führt zur Reduktion des speicher-regulierten (*store-operated*) Ca<sup>2+</sup>-Einstroms (*store-operated Ca<sup>2+</sup> entry*, SOCE) und hemmt dadurch die Entwicklung einer experimentell-induzierten Herzhypertrophie nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC). Des Weiteren wurde auch die Induktion der Hypertrophie-Markergene MHC- $\beta$ , BNP und ANP gehemmt (Freichel et al., 2014; X. Wu et al., 2010). DnTRPC4 verstärkte zudem die basale Kontraktilität der Kardiomyozyten, reduzierte die Entwicklung einer Hypertrophie, hemmte den strukturellen und funktionellen Umbau nach experimentellem Myokardinfarkt und führte zu einer verlängerten Überlebenszeit von transgenen- vs. Wildtyp-Tieren (Makarewich et al., 2014). Wie dnTRPC3 und -6 hemmt dnTRPC4 sowohl die Calcineurin-NFAT-Aktivität bei NFAT-transgenen Mäusen als auch nach Phenylephrin (PE)-Stimulation (X.

Wu et al., 2010). Die Calcineurin-NFAT-Signalkaskade wird durch den Eintritt von  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert und setzt ihrerseits eine Hypertrophie-Signalkaskade in Gang (Bush et al., 2006; Kuwahara et al., 2006; Nakayama et al., 2006; Seth et al., 2009).

Das Ausschalten von TRPC1/4 im Sinne eines Doppel-*Knockout* schützt vor einer maladaptiven Herzhypertrophie nach neurohumoraler Stimulation oder TAC, nicht jedoch der Einfach-*Knockout* (Camacho Londono et al., 2015). Die Überexpression von TRPC4 in adulten feline Myozyten hingegen löste die Calcineurin-induzierte NFAT-medierte Hypertrophie-Signalkaskade aus. TRPC4, wie auch andere TRPC, werden bei chronischen Herzkrankheiten vermehrt exprimiert und reduzieren die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung im SR durch eine verstärkte Durchlässigkeit der Membran, was wiederum zu einer niedrigeren Kontraktilitätsreserve bei Herzkrankheiten führt (Makarewich et al., 2014).

#### **1.3.2.3. Aktivierung von TRPC4-Kanälen**

Die Aktivierung von TRPC4-Kanälen ist hochkomplex und es sind diverse Mechanismen in unterschiedlichen Zelltypen mit verschiedenen Untersuchungsmethoden beschrieben (Plant & Schaefer, 2003; Schaefer et al., 2000; Schaefer et al., 2002; Walker, Koh et al., 2002; Akhter et al., 1998; Dorn & Brown, 1999; Cooley et al., 2014). Nahezu alle diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivierung von TRPC4 von der Aktivierung von G-Proteinen abhängig ist (Freichel et al., 2014). Die Ligandenbindung am GPCR bringt den Phospholipase C (PLC)-Signalweg in Gang, was zur Bildung von IP<sub>3</sub> und DAG führt (Akhter et al., 1998; Cooley et al., 2014; Dorn & Brown, 1999). IP<sub>3</sub> induziert die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR und führt zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum. Die Aktivierung von TRPC4 wird, wie auch bei TRPC1 und -5, durch IP<sub>3</sub> initiiert. TRPC3, -6 und -7 werden durch DAG

aktiviert (Abramowitz & Birnbaumer, 2009; Huang et al., 2006; Zhu et al., 1995).

Die Gruppe um Schaefer und Mitarbeiter konnte zudem zeigen, dass TRPC4 nicht nur klassisch als SOC, sondern auch unabhängig von einer Speicherentleerung (*store-depletion*) über G<sub>i</sub>-gekoppelte Signalwege aktiviert werden kann (Schaefer et al., 2002; Thakur et al., 2016). Ob die beiden *Splice*-Varianten  $\alpha$  und  $\beta$  hierbei eine funktionelle Rolle einnehmen, bleibt bisher nicht geklärt (Freichel et al., 2014).

#### **1.4. Arbeitshypothese und Zielsetzung**

Die vorliegende Arbeit soll aufzeigen, dass TRPC4-vermittelte Effekte auf die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase in Kardiomyozyten von der Expression von unterschiedlichen TRPC4-*Splice*-Varianten abhängig sind.

Hauptziel soll insbesondere die Charakterisierung der TRPC4-*Splice*-Variante C4 $\beta$  sein und ihre Auswirkungen auf zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Signale, zum weiteren Verständnis der zugeschriebenen Rolle der TRPC-Kanäle in der Pathogenese der ventrikulären Kardiomyozyten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Versuchstiere

Sämtliche Untersuchungen wurden unter Einhaltung der geltenden Tierschutzgesetze und mit Bewilligung der ethischen Konventionen durchgeführt. Es wurden 1-3 Tage alte Wistar Ratten (*Rattus Norvegicus*, Charles River, Deutschland) für die Herstellung von Primärkulturen aus Kardiomyozyten (*neonatal rat cardiomyocytes*, NRCs) (s. 2.2.1.) verwendet. Die Arbeit an den Tieren fand unter Aufsicht und nach vorheriger Qualifizierungsmaßnahme des Promovenden zur Tierschutz- und Versuchstierkunde statt (s. Lebenslauf).

#### 2.1.2. Adenoviren

Die hier erwähnten Virusstämme sind uns freundlicherweise aus den Laboren von J.D. Molkentin, Cincinnati, USA sowie A. Woodcock, Melbourne, Australien zur Verfügung gestellt worden. Sie sind selbst hergestellt und nicht kommerziell verfügbar.

Tabelle 1: Adenoviren

Beschreibung	Bereitgestellt von
βgal (Ad-βgal)	J.D. Molkentin (Cincinnati, USA)
TRPC4β (Ad-C4β)	A.Woodcock (Melbourne, AUS)
TRPC4α (Ad-C4α)	A.Woodcock (Melbourne, AUS)

### 2.1.3. Kulturmedium

Tabelle 2: Kulturmediumzusätze

<p><i>Minimal Essential Medium Eagle</i> – (D)MEM; pH 7.4</p>	<p>(D)MEM in 1 Liter Ampuwa lösen</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 ml FCS (MEM-5) oder 10 ml FCS (MEM-1)</li> <li>• 292 mg L-Glutamin</li> <li>• 350 mg <math>\text{NHCO}_3</math></li> </ul> <p>rühren, sterilfiltrieren, dabei Zugabe von:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 ml Vitamin-B12</li> <li>• 1 ml Penicillin</li> <li>• 1 ml Streptomycin</li> <li>• 5 ml BrdU</li> </ul>
-------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 2.1.4. Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Merck
Ampuwa Wasser	Lonza, Fresenius Kabi
Angiotensin II (Ang II)	Sigma-Aldrich
Bromodesoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich
CBFHH (Pen/Strept)	PAN-BIOTECH
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNase	Life Technologies
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Fisher Scientific, Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich

Foetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
FURA-2	Life Technologies
Glukose	Sigma-Aldrich
HEPES	Roth
Kaliumchlorid (KCL)	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Koffein	Sigma-Aldrich
Laminin	BD Sciences
L-Glutamin	Lonza
Magnesiumchlorid (MgCl)	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat (NHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich
Nifedipin	Sigma-Aldrich
Penicillin G	PAN-BIOTECH
Phenylephrin	Santa-Cruz Biotechnology
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Lonza
Propenacid	Life Technologies
Salzsäure (HCL)	Merck
Streptomycin	PAN-BIOTECH
Trypsin	GE Healthcare
Vitamin-B12	Sigma-Aldrich

### 2.1.5. Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit destilliertem, deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) hergestellt.

Tabelle 4: Rezepte der verwendeten Puffer und Lösungen

Normale Tyrodelösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 140 mmol/l NaCl</li> <li>• 4 mmol/l KCL</li> <li>• 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 5 mmol/l Hepes</li> <li>• 10 mmol/l Glukose</li> </ul> <p>der pH von 7.4 wurde mit NaOH bei 23 °C eingestellt</p>
CBFHH; pH 7.4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HEPES; pH 7.4</li> <li>• NaCl</li> <li>• KCL</li> <li>• MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O</li> <li>• Dextrose</li> <li>• KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>• Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> <li>• Penicillin G</li> <li>• Streptomycin</li> </ul>
PBS; pH 7.4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NaCl 137 mmol</li> <li>• KCL 2.7 mmol</li> <li>• Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3 mmol</li> <li>• KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.4 mmol</li> </ul>
FURA-2	50 ug FURA-2 in 50 ul DMSO
Koffein-Tyrode	0.038 g Koffein in 2 ml normale Tyrode-Lösung mit 1 mM Ca <sup>2+</sup> lösen
Enzymverdauung	Pro Herz <ul style="list-style-type: none"> <li>• 12.5 mg Trypsin</li> <li>• 2 ml DNase (4 mg)</li> <li>• 250 ml CBFHH, steril filtriert</li> </ul>
Stimulation mit Ang II / PE	Tyrode mit 2 mM CaCl <sub>2</sub> 10 uM Nifedipin +/- 5 uM DMSO Angiotensin II 100 nM Phenylephrin 50 uM

### 2.1.6. Verbrauchsgüter

Tabelle 5: Verbrauchsgüter und Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Reagenzgefäße	Sarstedt, Eppendorf
6-Napf-Platten	Nunc, Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Deckplättchen	Fisherbrand, Hartenstein
Einmal-Pasteur-Pipetten	Braun
Handschuhe	Semper-Care, Hartmann
<i>Hydrophobic Barrier Pen</i> ‚ImmEdge‘	Linaris
Kulturflasche	Sarstedt
Kulturschalen	Hartenstein
Küvetten	Eppendorf
Objektträger	Thermo Scientific
Petrischalen	Hartenstein
Pipettenspitzen	Biosphere, Sarstedt
Skalpell-Klingen	Braun
Spritzen	Terumo

### 2.1.7. Geräte

Tabelle 6: Benutzte Gerätschaften

Bezeichnung	Hersteller
4 °C Kühlschrank	Gram
-20 °C Tiefkühler	Gram
-80 °C Tiefkühler	Gram



Abzugshaube / Sterilarbeitsplatz	LaminAir Heraeus
Analysenwaage	ABS Kern
Autoklav	Systec VE-75
Zellsieb	Falcon
Fluoreszenzmikroskop	Ion Optix
Glaskolben	Eppendorf
Glasküvetten	Eppendorf
Inkubator	Hera Cell Heraeus
Kühlraum	Viessmann
Lichtmikroskop	Zeiss, Axiovert 135
Magnetrührplatte	Heidolph
<i>MyoPacer</i> Zellen Stimulator	Ion Optix
<i>MyoCam-S Power</i>	Ion Optix
Perfusionsapparat ( <i>Constant Flow Syringe – DN series</i> )	Warner Instruments
pH-Meter	PH530 WtW
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe <i>Pipetboy Acu Classic</i>	VWR
Reaktionsgefäßständer	Micro Test Tube Rack Brand
TC20 Zählkammer ( <i>Auto. Cell Counter</i> )	BIORAD
Vortexer/Mixer	Vortexer Heidolph
Zentrifuge	Heraeus

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Präparation und Isolierung neonataler Kardiomyozyten aus der Ratte**

Die Präparation und Isolierung neonataler Rattenkardiomyozyten (NRC) wurde an 30-50 Wistar-Ratten (1-3 Tage alt, Charles River, Deutschland) und in Anlehnung an die Methode von Wu und Mitarbeiter durchgeführt (X. Wu et al., 2010). Nach Dekapitierung wurde den Tieren der Brustkorb geöffnet, das Herz entnommen und in eisgekühlter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Es erfolgte die manuelle Entfernung der Vorhöfe, sowie die Zerkleinerung der Ventrikel zu einer homogenen Masse mit einem Skalpell. Der erste enzymatische Verdauschritt erfolgte in einem Glaskolben mit 250 ml Enzymlösung (12.5 mg Trypsin/Herz, 2 ml DNase (4 mg), 250 ml CBFHH, steril filtriert) für 5 min im Wasserbad (37 °C) bei konstanter Durchmischung mit zwei Magnetrührern (600 U/min). Nach kurzer Sedimentation wurde der Überstand verworfen und ein weiterer Verdauschritt mit 15 ml Enzymlösung durchgeführt, bis diese aufgebraucht war. Der Überstand wurde zu 2.5 ml FCS gegeben und zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, 4 °C). Das sichtbare Pellet wurde in MEM/ 5 % FCS Medium aufgenommen und anschließend die absolute Zellzahl mittels automatisiertem Zellzähler (BIO-RAD) ermittelt.

### **2.2.2. Anlegen von Zellkulturen**

Gewonnene Kardiomyozyten wurden auf Deckgläsern ausplattiert, die zuvor mit verdünntem Laminin (BD Sciences) und einem *Hydrophobic Barrier Pen* (Linaris) beschichtet wurden, um die Zellhaftung zu optimieren. Pro Deckglas wurde eine Dichte von 160.000 Zellen (160/mm<sup>2</sup>) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte für 24 Stunden (h) in einem Medium (DMEM) mit hoher Glukose-

Konzentration (Sigma-Aldrich), angereichert mit 5 % FCS (Biochrom) im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Im Anschluss wurden die Zellen drei Mal mit sterilem PBS gewaschen, um die Anzahl von Fibroblasten zu dezimieren. Für die Ca<sup>2+</sup>-Messungen erfolgte eine weitere Kultivierung für 24 h in MEM/1 % FCS unter gleichen Bedingungen.

### **2.2.3. Adenovirale Infizierung und Vorbereitung der Kardiomyozyten**

Präparierte Zellen wurden jeweils mit Adenoviren infiziert, die für beta-Galactosidase (Ad-βgal), humanes TRPC4alpha (Ad-TRPC4α) oder murines TRPC4beta (Ad-TRPC4β) codieren (Cooley et al., 2014; Liu et al., 2006; Nakayama et al., 2006).

Die Adenoviren wurden mit dem *Adenovirus purification Kit, Vivapure AdenoPack* (Sartorius) gereinigt und anschließend der Titer mit *Quick Titer Adenovirus Titer ELISA Kit* (Cell Biolabs) bestimmt. Sie wurden im Verhältnis von 10:1 zu den Zielzellen (MOI) appliziert und in Kulturmedium (MEM) ohne FCS-Zusatz für vier Stunden hinzugegeben. Die Expression erfolgte unter der transkriptionellen Kontrolle des *Cytomegalovirus* (CMV) Promotors. Das Medium wurde gegen MEM/1 % FCS ausgetauscht und für weitere 24 h kultiviert. Für die Bestimmung der Agonist-induzierten Signalkaskade wurde den Zellen 24 h das Serum entzogen und mit einer Kombination aus Angiotensin II (Ang II; 100 nM) und Phenylephrin (PE; 50 uM; AngII/PE) oder Vehikel stimuliert.

Die Viren wurden von J.D. Molkentin (Department of Pediatrics, Division of Cardiovascular Biology, Cincinnati, USA) und A. Woodcock (Baker IDI Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.4. Ca<sup>2+</sup>- Messungen

Der Aufbau des Messarbeitsplatzes ist in Abbildung 2 dargestellt. Die vorbereiteten Zellen wurden innerhalb von vier Tagen nach Präparation für die Messungen verwendet.

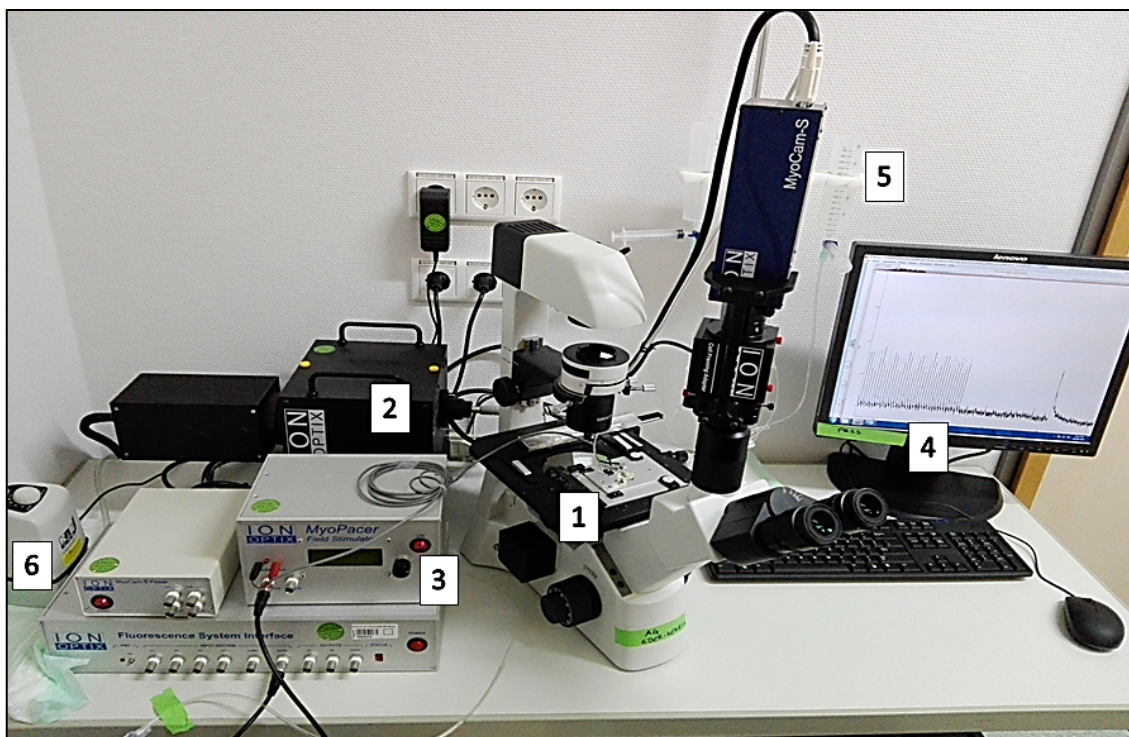
NRCs wurden auf Deckplättchen kultiviert und mit Fura-2 (2  $\mu$ M, 300  $\mu$ l; Life Technologies) in Ca<sup>2+</sup>-freier normaler Tyrode-Lösung (140 mmol/l NaCl, 4 mmol/l KCL, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/l Hepes, 10 mmol/l Glukose; pH 7.4) 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Transiente Ca<sup>2+</sup>-Ströme wurden in normaler Tyrode-Lösung mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> mit und ohne 1 mM Ang II bei einer Frequenz von 1 Hz gemessen. Vorbereitete Deckplättchen wurden in das Mikroskop platziert und einer Feldstimulation (*square waves, stimulation voltage 25 % above threshold*) bei einer basalen Frequenz von 1 Hz für jeweils 3-5 Min ausgesetzt, bis ein stabiler Stimulationszustand (*steady state, SS*) erreicht wurde.

Zur Bestimmung der basalen TRPC4-Ionenkanalaktivität wurden ruhende Zellen mit nominal Ca<sup>2+</sup>-freier und anschließend 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>-haltiger Tyrode perfundiert, um die Ionenkanalaktivität zu stimulieren. Die Puffer enthielten Nifedipin (10  $\mu$ M; Sigma Aldrich), um die L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanalaktivität (LTCC) zu blockieren.

Der Effekt von Angiotensin II (Ang II) auf die zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Spiegel in ruhenden Kardiomyozyten wurde nach Zugabe von Ang II bestimmt. Die Zellen verblieben in Tyrode mit 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M Nifedipin (Sigma-Aldrich) +/- 5  $\mu$ M DMSO (Sigma-Aldrich). Zu Beginn jedes Experiments wurde die Viabilität der Zellen durch Auslösen eines transienten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms bei einer Schrittmacherfrequenz von 0.5 Hz und 1 Hz in einer Tyrode-Lösung mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> überprüft.

Alle  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen erfolgten mit dem sogenannten *Myocyte and Contractility* System von Ionoptix. Die gemessene Hintergrundfluoreszenz im Wellenlängenverhältnis 340/380 nm wurde von den gemessenen Daten abgezogen und mit der *IonWizard 6.3 Software* (Ionoptix) analysiert.

Für *Store Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry* (SOCE) Messungen wurden die Zellen mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien normalen Tyrode-Lösung mit 5  $\mu\text{M}$  Cyclopiazonsäure (CPA) für 100 Sekunden jeweils perfundiert, um intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher zu entleeren. Danach wurde rasch die Perfusion auf eine normale Tyrode-Lösung mit 2.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und 5  $\mu\text{M}$  CPA umgestellt und der stattgefundene  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom als kontinuierlicher Anstieg der Fura-2-Fluoreszenz (gemessen bei einem Erregungs-Wellenlängenverhältnis von 340/380 nm) wenige Sekunden nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe gemessen.



**Abbildung 2: Aufbau des Messarbeitsplatzes in der Dunkelkammer**

In einer Dunkelkammer wurden die vorbereiteten Zellen auf Objektträgern in das Fluoreszenzmikroskop (1) eingespannt und hier unter UV-Licht (2) zur Messung

begutachtet. Die Frequenz der entsprechenden Feldstimulation wurde mit einem Zellen-Stimulator (*MyoPacer*) manuell eingestellt **(3)**. Die Erhebung der Daten war direkt auf dem Auswertungscomputer mittels *Software* Programm (*IonWizard*) möglich **(4)**. Für etwaige Untersuchungen wurde eine Perfusionsapparatur (*Constant Flow Syringe*) **(5)** mit kontinuierlichem Flüssigkeitssaugsystem **(6)** etabliert.

Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt

### 2.2.5. Auswertung der $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten

Die Erhebung und Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Software Programm *IonWizard* 6.3. Ein Transient wird hier definiert als ein aufgenommenes Signal, das von einem basalen Niveau ausgeht und dorthin wieder zurückverläuft. Daten von Zell-Funktions-Experimenten werden oft als Transienten dargestellt und spezifische Charakteristiken dieser Kurven können als Marker von physiologischen Funktionen als Vergleich zwischen Zellpopulationen dienen. In dieser Arbeit wird mit Fluoreszenz-Transienten gearbeitet, die Fluoreszenz-Erregungsintensität, Fluoreszenz-Verhältnis (*Ratio*) und intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationskurven beinhalten. Mehrere Parameter werden herangezogen, um die Charakteristik der Kurven zu bewerten und die Auswirkung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Veränderungen zu beurteilen (Tabelle 7). Um dies durchzuführen, wird der Transient in fünf Zeitphasen klassifiziert, die aus Basalwert (*baseline*), Ausschlag (*deflection*), Spitzenwert (*peak*), Wiederherstellung (*recovery*) und der Ausgangsphase (*baseline*) bestehen (Abb. 3 A). Danach werden die spezifischen Parameter innerhalb dieser Phasen untersucht (Abb. 3 B).

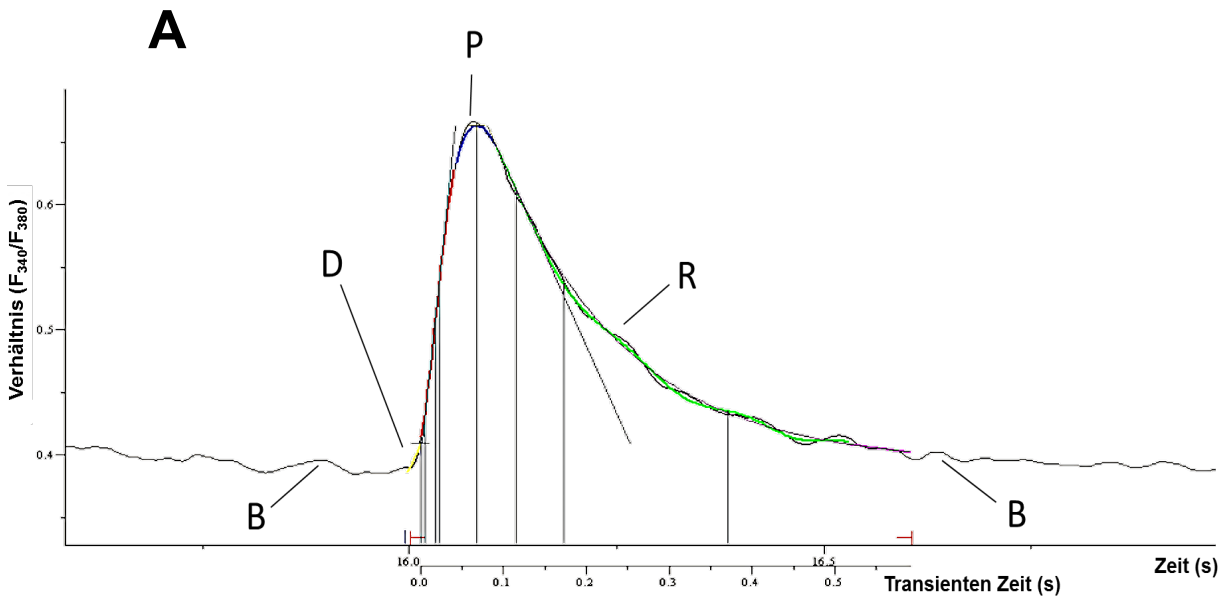
Tabelle 7: Parameter und Definition einer Transientenanalyse

Parameter	Definition
<b>Transienten-Zeit t0</b> ( <i>transient time</i> )	Zeitpunkt ab Einsetzen des Transienten
<b>Baseline (B)</b>	Basalwert des aufgezeichneten Signals vor der Stimulation
<b>Peak (P)</b>	Wert des Transienten zum Zeitpunkt der maximalen Abweichung vom Basalwert
<b>Time to Peak</b> (Zeit bis zum Maximalspitzenwert)	Zeit bis zum Maximalspitzenwert ( <i>peak</i> ) im Verhältnis zur Dauer des Transienten
<b>Peak h</b> ( <i>peak height</i> )	Maximalwert ( <i>peak</i> ) zum Basalwert
<b>% Peak</b>	100 x <i>peak</i> zum Basalwert
<b>% Peak height</b>	100 x <i>peak height</i> zum Basalwert
<b>Times (t) to % Peak</b>	Zeit des Transienten, bis ein vom Benutzer definierter % des Maximalspitzenwerts ( <i>peak</i> ) während des Anstiegs des Transienten erreicht ist
<b>Bl % Peak h</b>	Die prozentuale Veränderung der Baseline (B) im Verhältnis zu <i>peak height</i> . Ein Parameter zur Charakterisierung der Transientengröße
<b>Peak t</b> ( <i>time to peak</i> )	Zeit von t0 (0.0) der Transienten-Zeit (s) bis zum Maximalspitzenwert (P). Parameter zur Charakterisierung der Kontraktionsgeschwindigkeit bzw. Ca <sup>2+</sup> -Elevation

<b>Dep v</b>	Ebenfalls ein Parameter zur Charakterisierung der Kontraktionsgeschwindigkeit bzw. Ca <sup>2+</sup> -Elevation
<b>Dep v t</b>	Ein weiterer Parameter zur Charakterisierung der Kontraktionsgeschwindigkeit bzw. Ca <sup>2+</sup> -Elevation
<b>Ret v</b> ( <i>return velocity</i> )	Entsprechend Dep v mit der zusätzlichen Beschreibung der <i>recovery</i> Phase (R). Ein Parameter zur Charakterisierung der Ca <sup>2+</sup> -Wiederaufnahme oder Kardiomyozyten-Relaxation
<b>Ret v t</b> ( <i>time to maximal return velocity</i> )	Zeitperiode von t <sub>0</sub> der Transienten-Zeit bis ret v. Parameter zur Charakterisierung der Relaxationsgeschwindigkeit in R
<b>t to B %</b> ( <i>time to xx % of Baseline</i> )	Zeit zur prozentualen Baseline t <sub>0</sub> in der R-Phase. Parameter zur Charakterisierung von Zellrelaxation und Ca <sup>2+</sup> -Wiederaufnahme
<b>Sin exp amp</b> ( <i>single exponential amplitude</i> )	Die R-Phase wird im Analyse-Programm durch eine Exponentialfunktion beschrieben. Die Amplitude kann hierbei ignoriert werden
<b>Sin exp tau</b> ( <i>single exponential tau</i> )	Parameter zur Beschreibung der Schnelligkeit von R ( <i>recovery phase</i> )= <i>Exponential decay time</i>
<b>Sin exp off</b> ( <i>single exponential offset</i> )	Beschrieben als der vertikale Ausgleich der Exponentialgleichung unter der Funktionskurve des Transienten. Sie sollte annähernd mit dem Wert der <i>Baseline</i> t <sub>0</sub> vergleichbar sein.

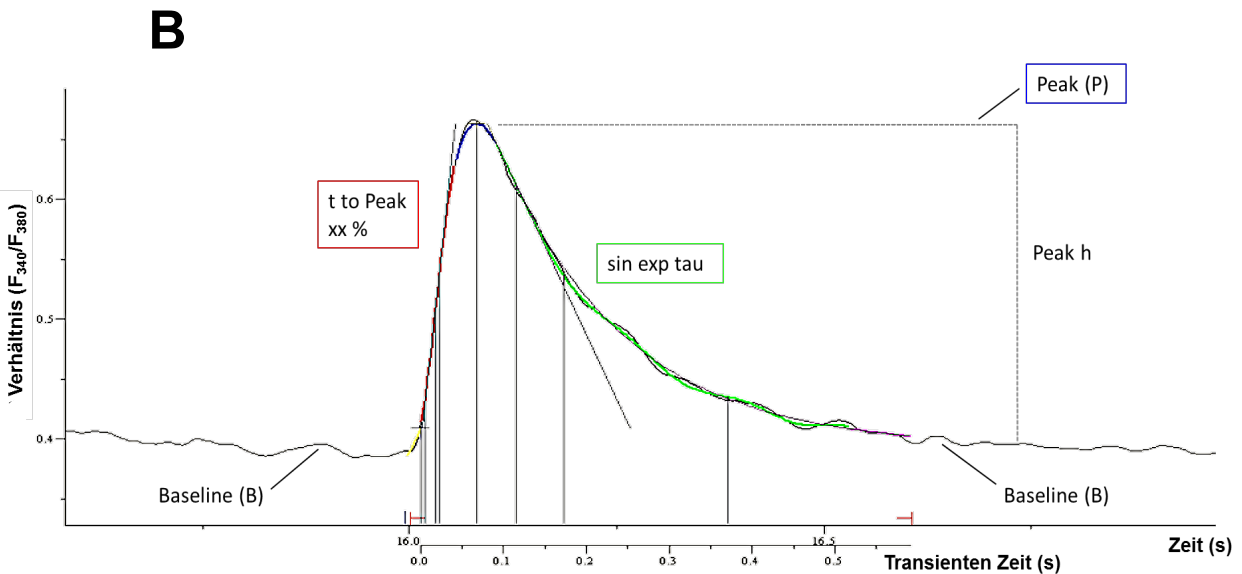
Quelle: <http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Monotonic-Transient-Analysis-Defined.pdf> [Stand: 09.03.2018, 17:15 h]





Transient #1	t0	b1	dep v	dep v t	peak	peak h	b1%peak h	peak t	ret v	ret v t	t to peak 10.0%	t to peak 50.0%	t to b1 50.0%	t to b1 90.0%	sin exp amp	sin exp tau	sin exp off
16.013	16.013	0.409	6.471	0.017	0.664	0.254	62.133	0.067	-1.478	0.115	0.005	0.022	0.172	0.370	0.220	0.151	0.393

**Abbildung 3 A: Schritt 1 einer Fluoreszenz-Transientenanalyse:** Identifizierung der einzelnen Zeitphasen: *baseline* (B), *deflection* (D), *peak* (P) und *recovery* (R) Phase des Transienten. Das Verhältnis der Fluoreszenz-Intensität (*Ratio*) wurde zwischen 340 nm und 380 nm angeregt. Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt



Transient #1	t0	b1	dep v	dep v t	peak	peak h	b1%peak h	peak t	ret v	ret v t	t to peak 10.0%	t to peak 50.0%	t to b1 50.0%	t to b1 90.0%	sin exp amp	sin exp tau	sin exp off
16.013	16.013	0.409	6.471	0.017	0.664	0.254	62.133	0.067	-1.478	0.115	0.005	0.022	0.172	0.370	0.220	0.151	0.393

**Abbildung 3 B: Schritt 2 einer Fluoreszenz-Transientenanalyse:** Charakterisierung der spezifischen Parameter anhand der Transientenkurve zur Messung intrazellulärer

Ca<sup>2+</sup>-Veränderungen. **t to Peak xx %** = Time to peak = Bestimmung der Geschwindigkeit einer Ca<sup>2+</sup>-Elevation bei Kontraktion vom Ausgangswert (B); **Peak h** = *peak height*: Dieser Wert entspricht der gemessenen Ca<sup>2+</sup>-Amplitude; **sin exp tau** = *velocity/ speed of recovery*: Charakterisierung der Geschwindigkeit der Wiederherstellungsphase (Ca<sup>2+</sup>-Wiederaufnahme) bis Erreichen des Basalwerts (B).  
Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt

### 2.2.6. Statistik

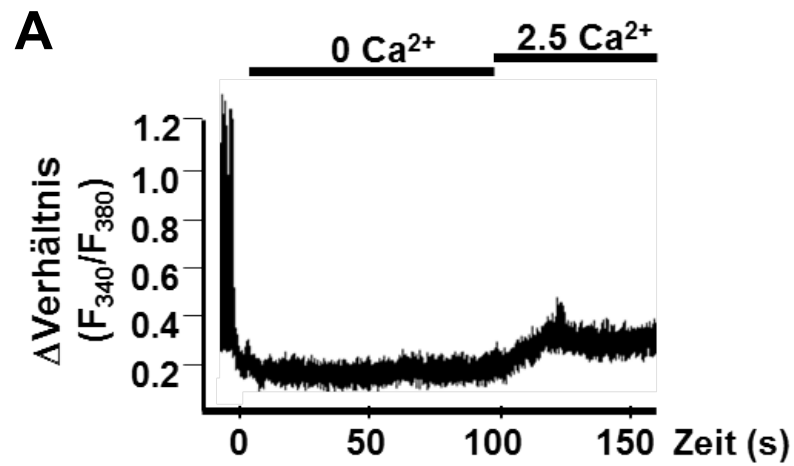
Die Daten zeigen den Mittelwert und den *Standard Error of Means* (SEM). Ein zweiseitiger *Student's T-Test* für unabhängige Stichproben wurde für den Vergleich zwischen zwei Gruppen herangezogen. Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mit *Oneway Analysis of Variance* (ANOVA) mit Bonferroni Posthoc Test untersucht. *Two-way* ANOVA mit Bonferroni Posthoc Test wurde dann verwendet, wenn die Variablen von zwei Faktoren abhängig waren. Die statistische Analyse erfolgte mit *SigmaPlot 13*. P-Werte unter 0.05 wurden als signifikant betrachtet. P-Werte: p>0.05 = ns (nicht signifikant); \*p<0.05

Diagramme wurden mit dem Programm *Graph Pad Prism 5.0* erstellt. Alle Versuche wurden zur Validierung der erhobenen Daten mindestens zehn Mal hintereinander durchgeführt.

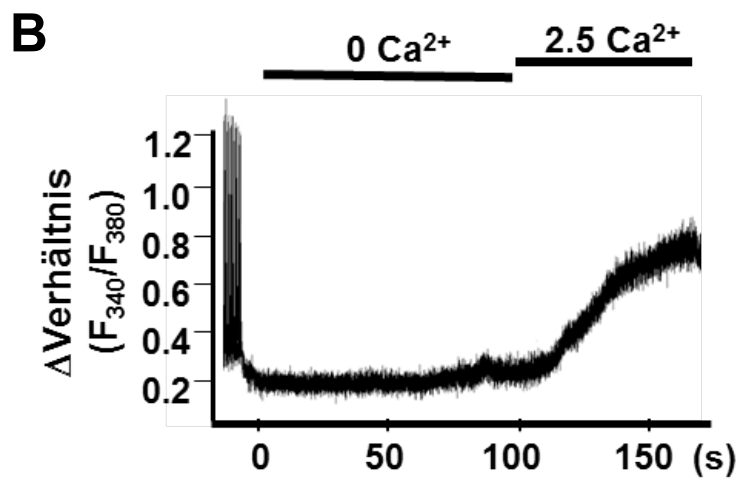
## 3. Ergebnisse

### 3.1. TRPC4 $\beta$ weist Spontanaktivität in Kardiomyozyten auf

Die spontane Aktivität ist ein gemeinsames Merkmal von TRPC-Kanälen (Dietrich et al., 2003; McKay et al., 2000; Yamada et al., 2000). Zunächst wurde der Einfluss der Überexpression von TRPC4 $\alpha$  (nicht gezeigt) und TRPC4 $\beta$  auf die zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Signale in NRCs untersucht. Die basale Aktivität wurde ermittelt, indem die Zellen zunächst für 80 bis 100 Sekunden mit Ca<sup>2+</sup>-freiem Tyrode-Puffer perfundiert wurden mit anschließender Zugabe von 2.5 mM Ca<sup>2+</sup> (Abb. 4 A). Der Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nach erneuter Zugabe von Ca<sup>2+</sup> war in TRPC4 $\beta$ -überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe Ad- $\beta$ gal signifikant erhöht (Abb.4 A+B). Nach Erreichen einer Plateauphase sanken die zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Spiegel nach einer Zeit von 50-150 Sekunden nach Ca<sup>2+</sup>-Zugabe. Die Möglichkeit, dass ein anderer Kanal, insbesondere der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal (LTCC), an diesem zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg beteiligt war, wurde untersucht. In Kardiomyozyten ist der LTCC für die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem SR über Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors (RyR) verantwortlich und somit entscheidend an der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Rahmen physiologischer Prozesse beteiligt. Die LTCC-abhängigen Effekte auf die Ca<sup>2+</sup>-Signale wurden durch Nifedipin während der Messungen inhibiert (10  $\mu$ M) (Abb. 5). Nifedipin ist ein spezifischer Ca<sup>2+</sup>-Antagonist, der durch Bindung an vor allem spannungsabhängige L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle den Durchtritt von Ca<sup>2+</sup>-Ionen dort verhindert. Dies zeigt, dass der TRPC4 $\beta$  basal, auch ohne vorherige Stimulation, einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom induziert.



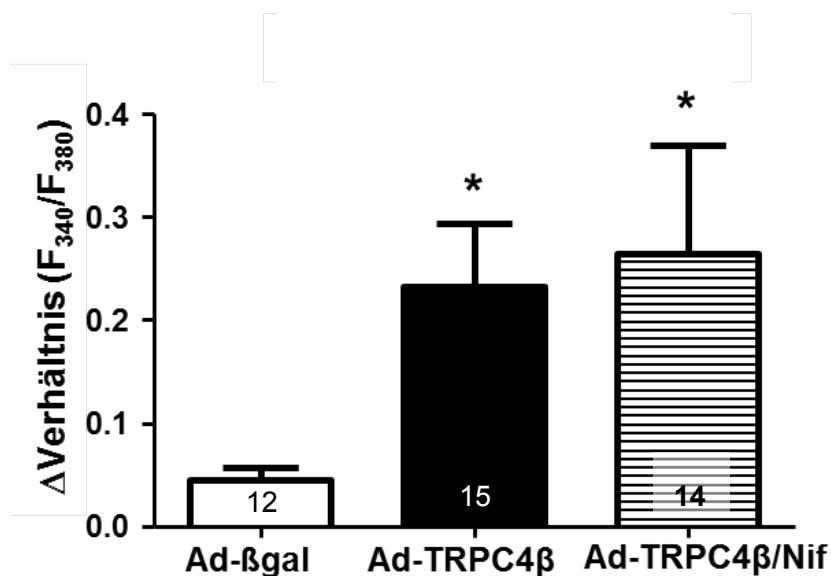
Ad- $\beta$ gal



Ad-TRPC4 $\beta$

Abbildung 4: Spontaner  $Ca^{2+}$ -Einstrom in ruhenden (A) Ad- $\beta$ gal- und (B) Ad-TRPC4 $\beta$  - infizierten NRCs nach Zugabe von 2.5 mM  $Ca^{2+}$  (s. Erläuterung Abb. 4 A+B)

**Abb. 4 A+B:** Die Fura-2  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufzeichnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschlagskurve erfolgte während der Perfusion der Zellen mit nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Tyrode-Lösung. Nach 80-100 s wurde hier der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch Perfusion mit einer Lösung mit 2.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz angeregt. Zur Bestimmung der mittleren Differenz wurde der Maximalspitzenwert (*peak*) bei 2.5 mM vom Basalwert bei 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  abgezogen. Zu Beginn der Untersuchung wurden die Zellen jeweils bei 0.5 und 1 Hz stimuliert bis ein *steady state* im Transientenmuster erreicht wurde. Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt



**Abbildung 5: Ausschluss LTCC-abhängiger Effekte auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale**

Basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom-Messungen von Ad-βgal, Ad-TRPC4β und Ad-TRPC4β +/- Nifedipin-Zusatz (Nif, 10  $\mu\text{M}$ ), zur Hemmung der LTCC. Der basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in TRPC4β NRCs ist unabhängig von der Aktivität des LTCC. \* $p < 0.05$  zu Ad-βgal-exprimierenden Zellen; die Nummern in den Balken entsprechen der gemessenen Zellanzahl. Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt

### 3.2. TRPC4 $\beta$ beeinflusst die zyklischen Ca<sup>2+</sup>-Veränderungen in schlagenden Kardiomyozyten

Ergebnisse aktueller Studien lassen vermuten, dass TRPC-Kanäle nicht nur lokal beschränkte Ca<sup>2+</sup>-Signale in Kardiomyozyten beeinflussen, sondern auch auf die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase der ECC-Maschinerie und auf die Kontraktilität der Zelle Einfluss nehmen (Camacho Londono et al., 2015; Makarewich et al., 2014). Um zu untersuchen, ob sich die Basalaktivität von TRPC4 $\beta$  auf die Ca<sup>2+</sup>-Transienten in NRCs auswirkt, wurden Veränderungen der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in TRPC4 $\beta$ , Ad-TRPC4 $\alpha$  und Ad- $\beta$ gal-Kardiomyozyten mit Fura-2 dargestellt. Die Messung von zytosolischem Ca<sup>2+</sup> erfolgte während elektrischer Stimulierung (*Myopacer*) von 1 Hz (Abb. 6 A+B).

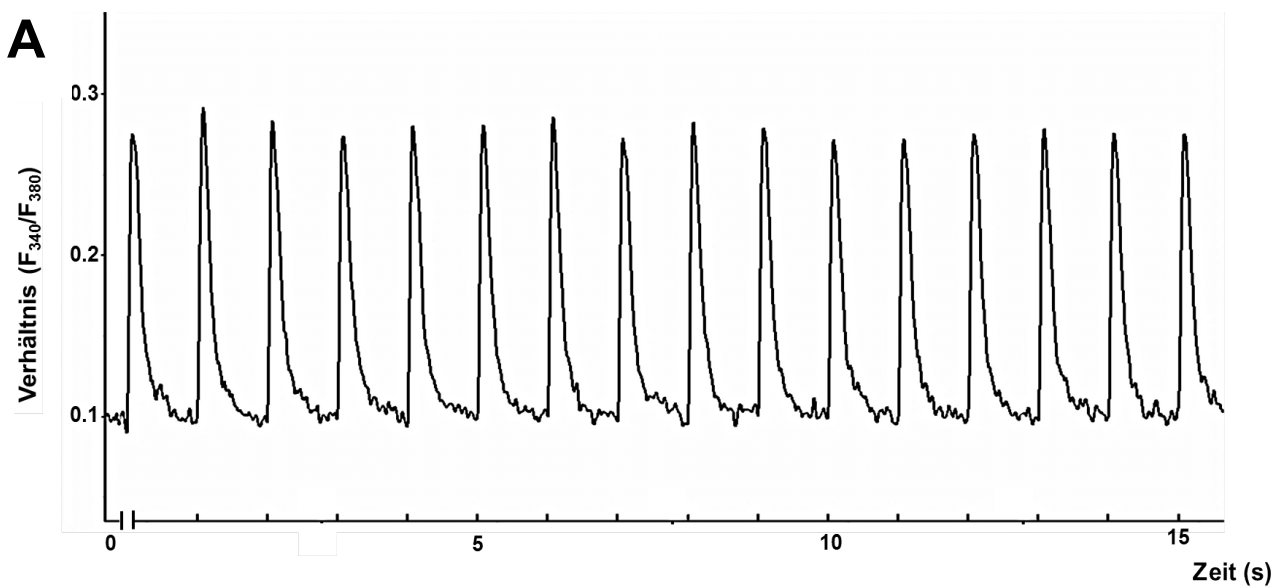
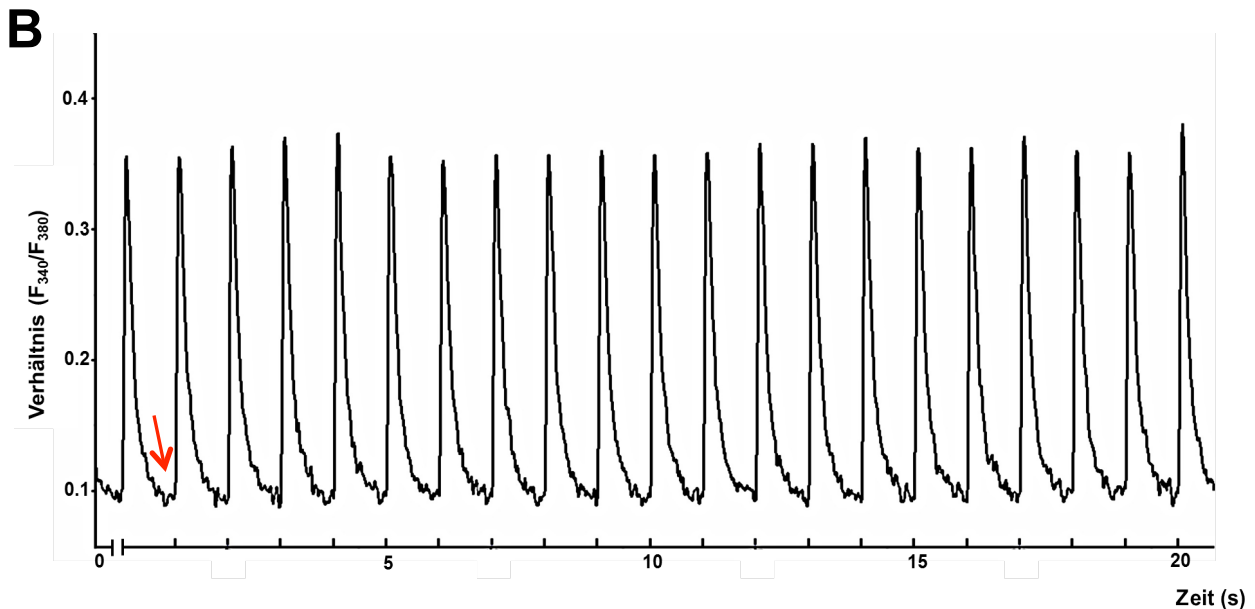


Abbildung 6 A: Ca<sup>2+</sup>-Transienten in Ad- $\beta$ gal -infizierten NRCs bei 1 Hz Stimulierung (s. Erläuterung Abb. 6 A+B)



**Abb. 6 A+B:  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in (A) Ad- $\beta$ gal- und (B) Ad-TRPC4 $\beta$  -infizierten NRCs**

Die Messungen wurden mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fura-2 in 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Tyrode-Lösung bei 1 Hz Feldstimulierung durchgeführt. Der Maximalwert (peak) entspricht dem systolischen  $\text{Ca}^{2+}$ , die *Baseline* (roter Pfeil), dem diastolischen.

Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt

Die Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zeigte, dass TRPC4 $\beta$  maßgeblich zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsveränderungen während der Kontraktion beiträgt (Abb. 7 A). Dies wird vor allem durch die Steigerung der Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei Überexpression von Ad-TRPC4 $\beta$  im Vergleich zur Ad- $\beta$ gal-Kontrolle deutlich. Eine interessante Veränderung war zudem das schnellere Absinken der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei TRPC4 $\beta$ -exprimierenden Zellen (Abb. 7 B). Dies lässt einen kompensatorischen Mechanismus vermuten, der einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zelle durch den TRPC4 $\beta$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom entgegenwirkt.

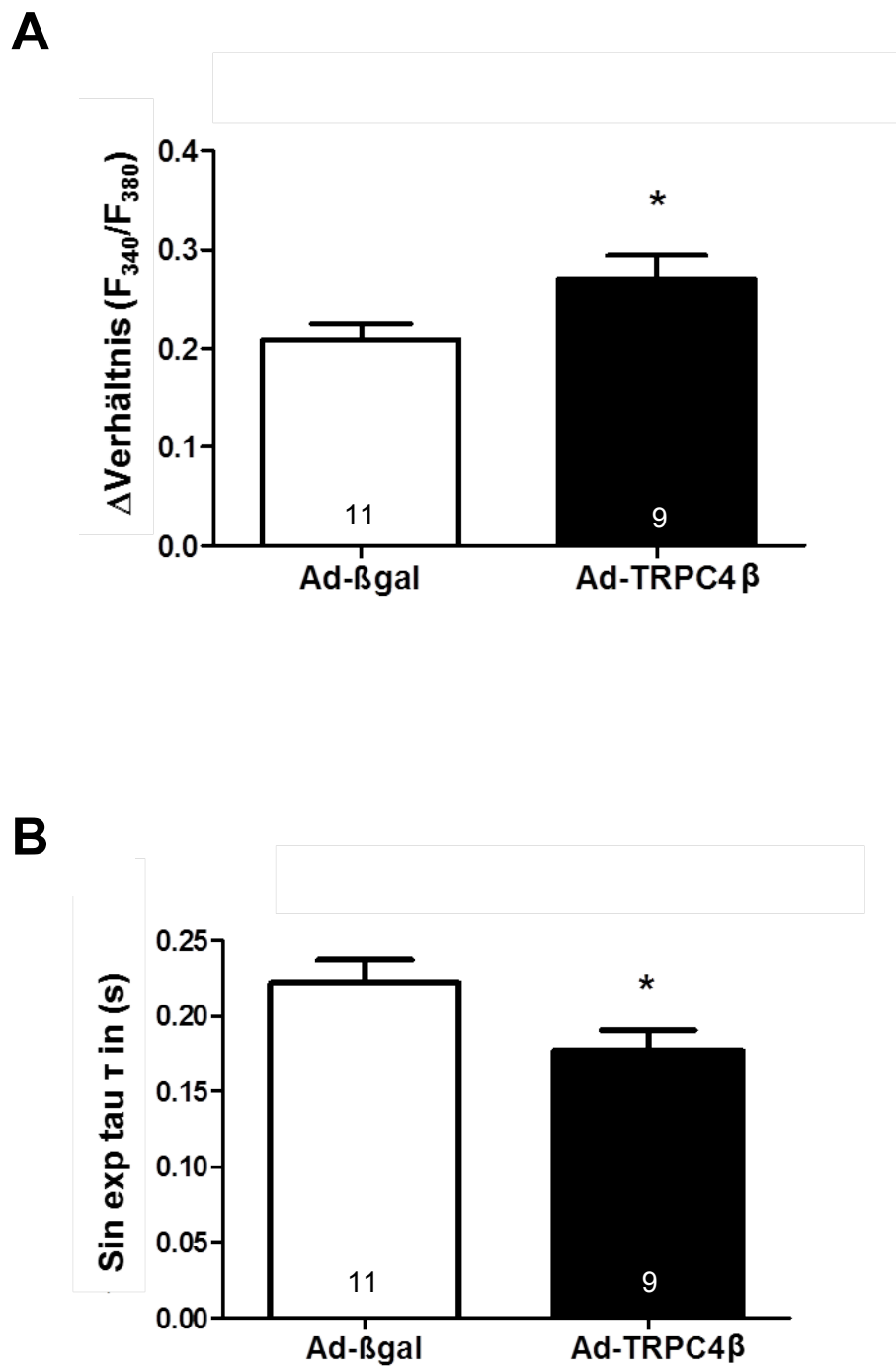


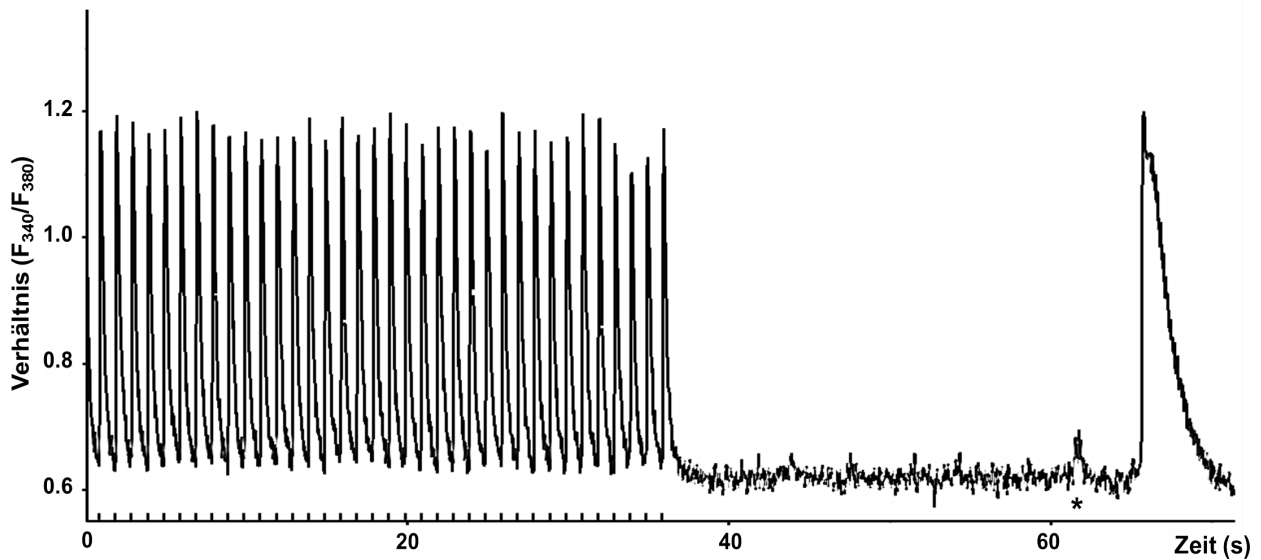
Abbildung 7:  $Ca^{2+}$ -Amplituden (A) und Geschwindigkeit des  $Ca^{2+}$ -Abfalls (B) der Transienten in Ad-βgal vs. Ad-TRPC4β -infizierten NRCs (s. Erläuterung Abb. 7 A+B)



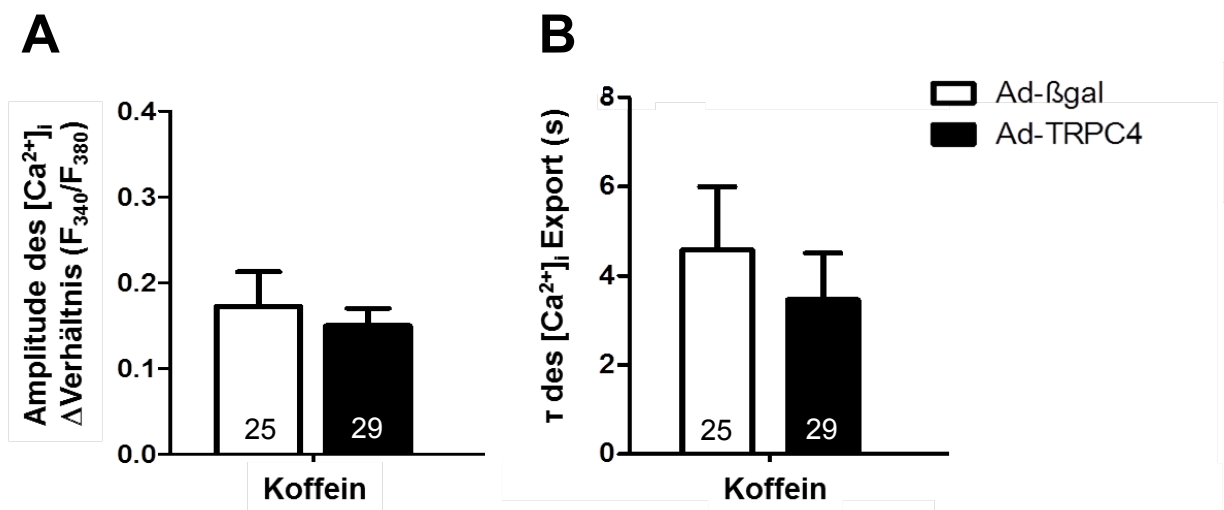
**Abb. 7 A+B: Die basale TRPC4 $\beta$ -Aktivität in NRCs ist durch eine höhere Amplitude und einen schnelleren Abfall der Ca<sup>2+</sup>-Transienten gekennzeichnet**

Ca<sup>2+</sup>-Transienten von Ad- $\beta$ gal und Ad-TRPC4 $\beta$  NRCs in normaler Tyrode-Lösung mit 1 mM Ca<sup>2+</sup>-Zusatz bei einer Stimulations-Frequenz von 1 Hz. **A)** Die Ca<sup>2+</sup>-Amplitude ist bei TRPC4 $\beta$ -exprimierenden NRCs vs. Ad- $\beta$ gal signifikant erhöht. **B)** Die Geschwindigkeit des Abfalls der Ca<sup>2+</sup>-Kurve gemessen als exponentielle Zeitkonstante der Funktionskurve des Ca<sup>2+</sup>-Transienten ( $\sin \exp \tau$ ) ist bei Ad-TRPC4 $\beta$  NRCs gegenüber Ad- $\beta$ gal NRCs signifikant beschleunigt. \* $p < 0.05$ ; die Nummern in den Balken entsprechen der gemessenen Zellanzahl. Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt

Die Aktivität der SERCA bestimmt maßgeblich die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration des SR. Eine gesteigerte Aktivität könnte daher die zuvor gezeigte erhöhte Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Transienten erklären. Um den Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des SR zu bestimmen, wurden koffeininduzierte Ca<sup>2+</sup>-Transienten gemessen (Abb. 8). Die Amplitude des koffeininduzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten spiegelt die Ca<sup>2+</sup>-Ladung des SR wieder. Der Abfall des Transienten entspricht dem Ca<sup>2+</sup>-Export durch den Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX), der intrazelluläres Ca<sup>2+</sup> im Antiport gegen drei extrazelluläre Na<sup>+</sup>-Ionen austauscht (*forward mode*). Das experimentelle Protokoll begann mit einer 1 Hz Stimulationsperiode (*spacing*), gefolgt von einer 30 Sekunden Ruhephase ohne Pacing, nach welcher Koffein (10 mM) akut hinzugegeben wurde. Wie in der Abbildung 9 A und B gezeigt, waren die koffeininduzierte Amplitude und die Geschwindigkeit des Ca<sup>2+</sup>-Exports aus der Zelle heraus nicht signifikant verschieden zwischen Ad- $\beta$ gal- und Ad-TRPC4 $\beta$ -infizierten Kardiomyozyten.



**Abbildung 8: Repräsentatives Beispiel eines TRPC4 $\beta$  koffeininduzierten(\*) Transienten in NRCs** Nach elektrischem Pacing bei 1 Hz für 50 s in normaler Tyrode-Lösung mit 1 mM Ca<sup>2+</sup>-Zusatz wurden NRCs ohne Stimulation in einem Ca<sup>2+</sup>-Puffer gehalten und mit Koffein (10 mM) akut stimuliert, um die SR-Ca<sup>2+</sup>-Speicher zu entleeren. Die auf der x-Achse eingezeichneten Ausschläge zeigen die Aktivität des *MyoPacers* als Stimulus (1 Hz) an. (\*) **Zugabe von Koffein.** Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt



**Abbildung 9: Einfluss der Calciumpumpe SERCA auf intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Transienten (s. Erläuterung Abb. 9 A+B)**

**Abbildung 9 A+B:** In Ad- $\beta$ gal- und Ad-TRPC4 $\beta$ -NRCs wurden der Gehalt der SR-Ca<sup>2+</sup>-Speicher über den Ca<sup>2+</sup>-Maximalspitzenwert (*peak*) eines koffeininduzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten bestimmt (**A**), die Geschwindigkeit der Ca<sup>2+</sup>-Ausschleusung aus der Zelle wurde über die Geschwindigkeitskonstante tau bestimmt (**B**; tau [t]). \*p<0.05; die Nummern in den Balken entsprechen der gemessenen Zellanzahl.

Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt

### 3.3. TRPC4 $\beta$ wird als speicher-regulierter Ca<sup>2+</sup>-Kanal (SOC) in neonatalen Kardiomyozyten aktiviert

TRPC-Kanäle wurden bereits mehrmals als speicher-regulierte (*store-operated*) Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (SOC) in Kardiomyozyten beschrieben (Makarewich et al., 2014; X. Wu et al., 2010). Der SOC ist unter anderem für Genexpressionsprogramme, die den Prozess des kardialen Umbaus bei der Herzinsuffizienz in Gang bringen, notwendig. Neonatale Kardiomyozyten wurden hier als experimentelles Modell genutzt, um Ca<sup>2+</sup>-Veränderungen -wie bereits zuvor beschrieben- mittels Fura-2 zu bestimmen. Die Kardiomyozyten wurden mit Hilfe einer Perfusionsapparatur zunächst mit einer Ca<sup>2+</sup>-freien Tyrode-Pufferlösung perfundiert, die Cyclopiazonsäure (CPA) als SERCA-Blocker enthielt. SERCA ist die Ca<sup>2+</sup>-ATPase, die während einer Muskelkontraktion Ca<sup>2+</sup> vom Zytosol zurück ins Lumen des SR pumpt. Die durch das Ausbleiben des Rücktransports entstandene passive Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung im Zytosol durch CPA war ausreichend, um eine Aktivierung der TRPC-Kanäle in der Plasmamembran zu induzieren. Dies wurde im Experiment durch Perfusion der Zellen in einer Ca<sup>2+</sup>-freien normalen Tyrode-Lösung mit anschließendem Austauschen der Pufferlösung mit einem Überschuss an Ca<sup>2+</sup> (2.5 mM) gezeigt (Abb. 10 A+B+C). Wie in Abbildung 10 A und B zu sehen, führt die Behandlung mit CPA zu einem geringen, aber deutlichen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg, was auf die passive Ca<sup>2+</sup>-Entleerung aus

dem SR zurückzuführen ist. Dieses führte unter Kontrollbedingungen (Ad- $\beta$ gal) auch zu einem konstant erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle, welcher bei einer Überexpression von TRPC4 $\beta$  zusätzlich verstärkt war.

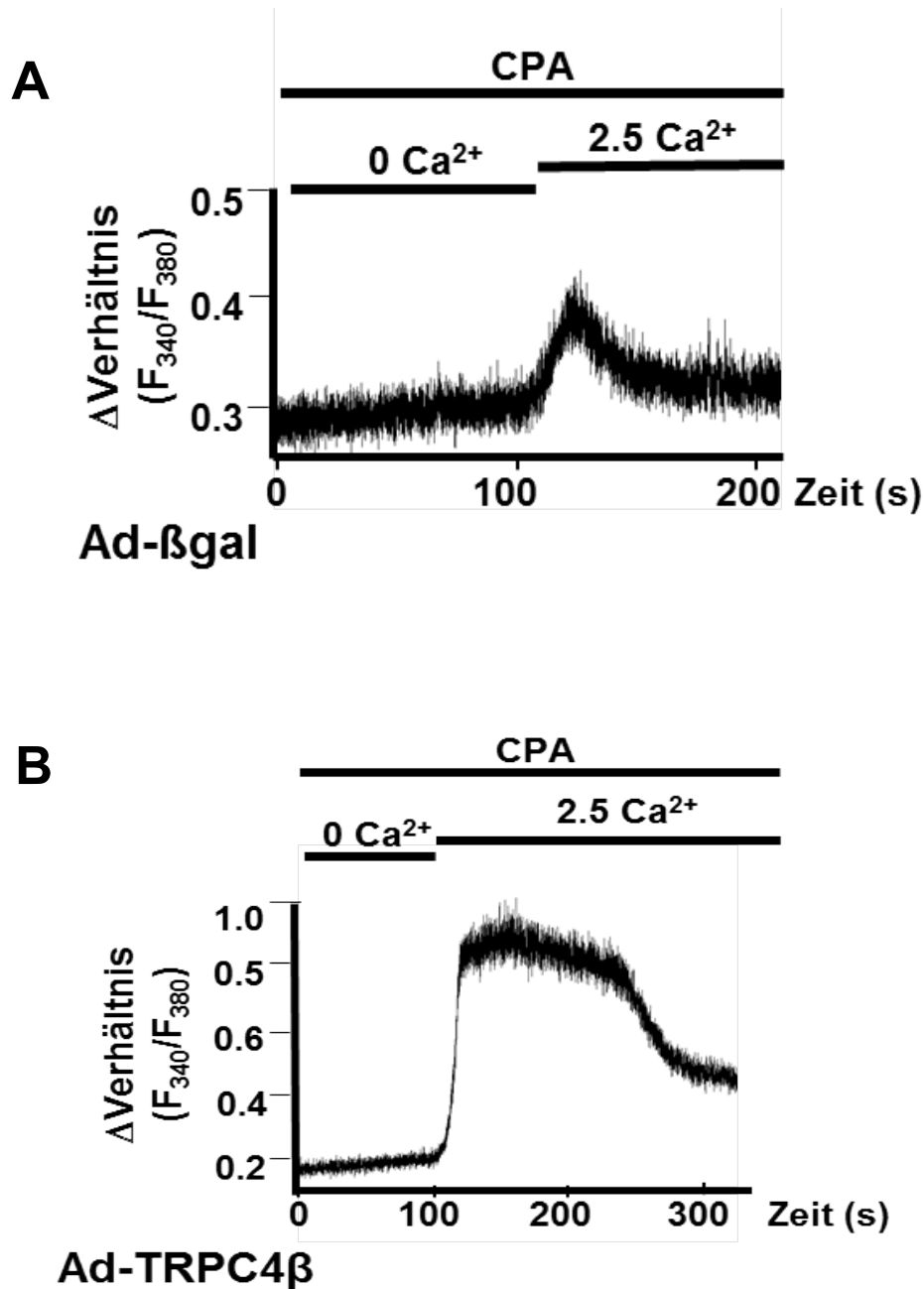
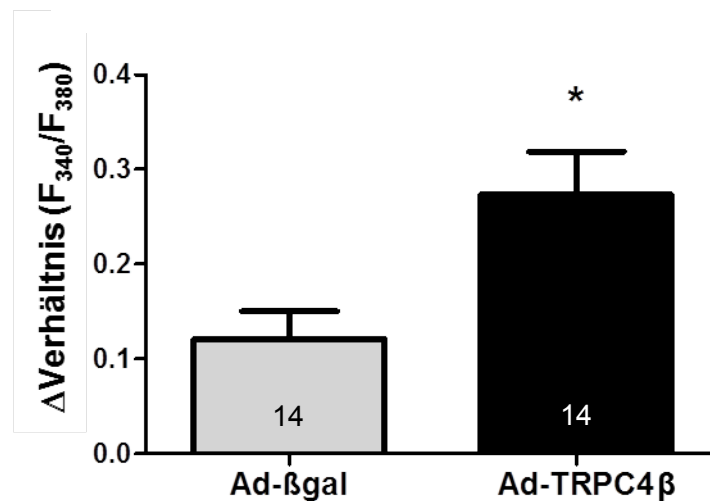


Abbildung 10 A+B: Repräsentative Aufzeichnungen von Fura-2  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen mit 2.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Akutperfusion in CPA-Puffer in (A) Ad- $\beta$ gal oder (B) Ad-TRPC4 $\beta$  NRCs

Die Zellen wurden 100 Sekunden lang in einer nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Tyrode-Lösung mit Cyclopiazonsäure (CPA; 5  $\mu\text{M}$ ; 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) gehalten und danach mit einem Puffer mit 2.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  perfundiert, um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über das Sarkolemm zu induzieren.

Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt

**C**

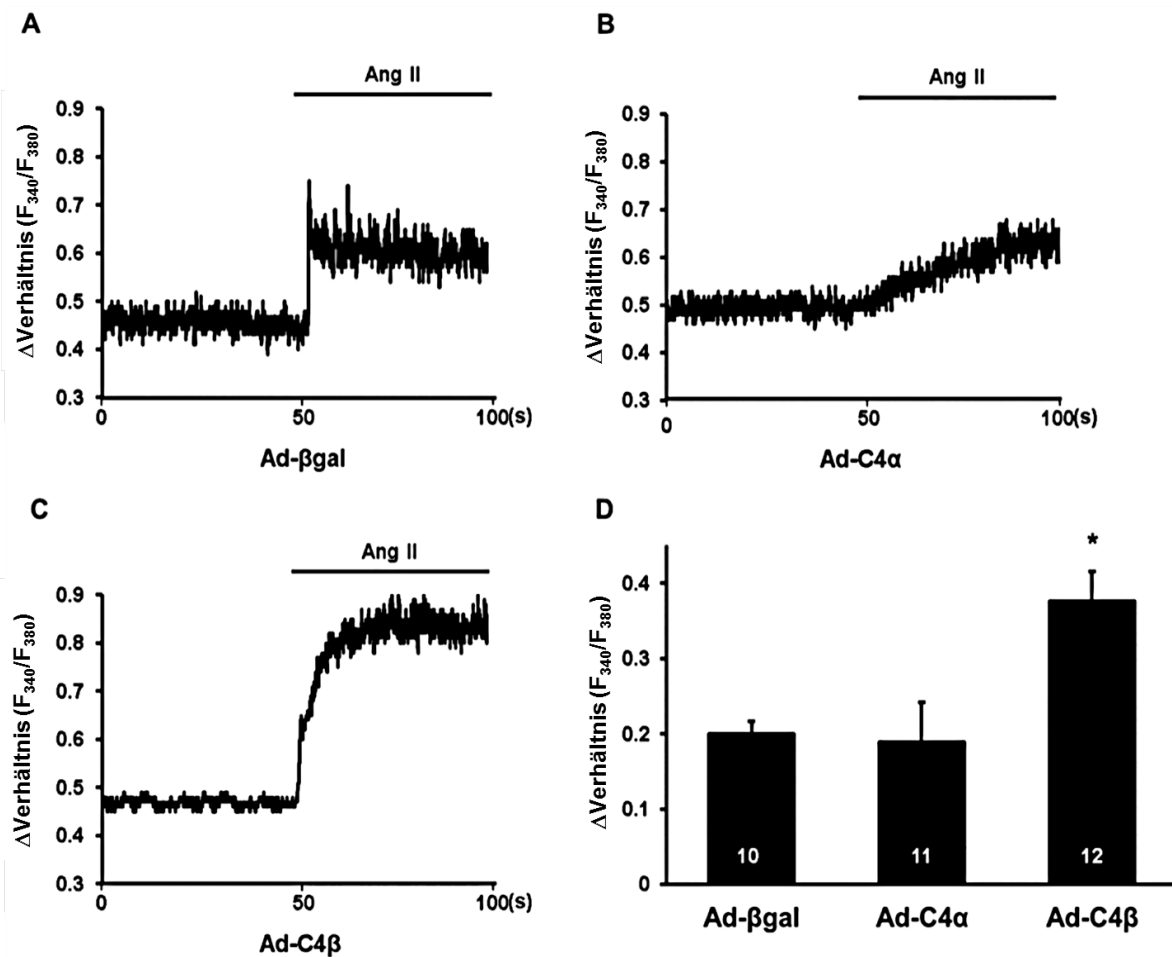
**Abbildung 10 C: Der speicher-regulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (SOCE) ist bei Ad-TRPC4 $\beta$ -exprimierenden NRCs erhöht**

Durch Subtraktion des Maximalspitzenwerts (*peak*) bei 2.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  vom Basalwert bei 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  wurde die mittlere Differenz berechnet. Hier zeigt sich ein erhöhter SOCE in die Zelle bei TRPC4 $\beta$  NRCs. \* $p < 0.05$  zu Ad- $\beta$ gal-infizierten Zellen; die Nummern in den Balken entsprechen der gemessenen Zellanzahl.

Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt

### **3.4. TRPC4 $\beta$ reagiert sensitiver auf Angiotensin II-Stimulation als TRPC4 $\alpha$**

TRPC-Kanäle sind bekannte nachgeschaltete Zielprodukte (*downstream targets*) der G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR)- Phospholipase C (PLC)- Signalkaskade (Eder & Molkentin, 2011). Als nächstes untersuchten wir, ob auch eine Stimulierung von GPCR mit einem gesteigerten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über TRPC4 $\beta$  verbunden ist. Dabei analysierten wir Ca<sup>2+</sup>-Signale in NRCs, welche mit Ad- $\beta$ gal-, Ad-TRPC4 $\alpha$ - oder Ad-TRPC4 $\beta$  infiziert wurden. Die Zellen wurden für 50 Sekunden in 1 mM Ca<sup>2+</sup>-Tyrode perfundiert und anschließend mit Angiotensin II (1  $\mu$ M) und Nifedipin (10  $\mu$ M) behandelt. In kontrollinfizierten Zellen führte die Ang II-Stimulation zu einem leichten Ca<sup>2+</sup>-Anstieg. Die Amplitude des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in TRPC4 $\alpha$ -infizierten Zellen entsprach den Kontrollen. Dieser Ca<sup>2+</sup>-Einstrom erfolgte jedoch bei TRPC4 $\alpha$ -infizierten Zellen langsamer als bei den Kontrollen, obwohl zum Ende hin das gleiche Ca<sup>2+</sup>-Plateau erreicht wurde. Bei TRPC4 $\beta$ -überexprimierenden Zellen war der Ca<sup>2+</sup>-Anstieg verglichen mit den Kontrollen sehr deutlich gesteigert. Der TRPC4 $\beta$ -Kanal reagiert demnach sensitiver auf Ang II-Stimulation als TRPC4 $\alpha$  (Abb. 11 A+B+C+D) (Kirschmer et al., 2016).



### Abbildung 11: TPCR4 $\beta$ -Überexpression in Kardiomyozyten führt zu einem gesteigerten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom während Angiotensin II-Stimulation

Repräsentative Fura-2 Ca<sup>2+</sup>-Messungen in NRCs, die Ad- $\beta$ gal (A), Ad-TRPC4 $\alpha$  (B) und Ad-TRPC4 $\beta$  (C) exprimieren. Ruhende NRCs wurden in normaler Tyrode-Lösung mit 1 mM Ca<sup>2+</sup> und Nifedipin (10  $\mu$ M) perfundiert. Nach 50 Sekunden wurde Angiotensin II (Ang II; 1  $\mu$ M) hinzugegeben. D: Durch Subtraktion des Maximalspitzenwerts (*peak*) nach Ang II-Zugabe von den Basalwerten wurde die mittlere Differenz berechnet. \*  $p < 0.05$  zu Ad- $\beta$ gal und Ad-TRPC4 $\alpha$ -infizierten Zellen; Referenz: Ad- $\beta$ gal; Die Anzahl der untersuchten Zellen ist in den Balken von Abbildung D angegeben. C4 $\alpha$  = TRPC4 $\alpha$ ; C4 $\beta$  = TRPC4 $\beta$ . Quelle: Viktor v. Ehrlich-Treuenstätt & (Kirschmer et al., 2016).

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit zeigten wir, dass TRPC4-Ionenkanäle für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase eine wesentliche Rolle spielen und dass es funktionelle Unterschiede zwischen den TRPC4-*Splice*-Varianten TRPC4 $\alpha$  und TRPC4 $\beta$  gibt.

Als erstes konnten wir zeigen, dass TRPC4, wenn in NRCs überexprimiert, eine erhöhte Basalaktivität aufweist. Die spontane Aktivität der Ionenkanäle ist ein gemeinsames Merkmal von TRPC-Kanälen (Dietrich et al., 2003; McKay et al., 2000; Yamada et al., 2000). Interessanterweise waren dadurch auch die Amplituden der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den Zellen erhöht. Nachdem der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (*load*) nicht wesentlich unterschiedlich zu den Kontrollbedingungen war, ist anzunehmen, dass TRPC4 und in unserem Fall TRPC4beta (TRPC4 $\beta$ ) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten direkt beeinflusst. Die Daten zeigen damit auch, dass TRPC4 ebenso zyklisches  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst, was wiederum auf die Kontraktilität des Herzens einen Einfluss haben könnte. Ähnliches wurde auch in anderen Studien beobachtet, wie z. B. in Modellen, in welchen TRPC4 und TRPC1 funktionell ausgeschaltet waren (Camacho Londono et al., 2015). Hier zeigte sich, dass das Fehlen von TRPC1 und TRPC4 sowohl mit einer verringerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude als auch mit einem reduzierten diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$  verbunden war (Freichel et al., 2017). TRPC-Kanäle beeinflussen daher wahrscheinlich nicht nur lokal beschränkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Kardiomyozyten, sondern auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der Erregungs-Kontraktions-Kopplungs (ECC)-Maschinerie und dementsprechend auch die Kontraktilität der Zellen (Makarewich et al., 2014). Neben der erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude beobachteten wir ebenfalls einen rascheren Abfall der Transienten in TRPC4 $\beta$ -exprimierenden Zellen. Dieser schnellere Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration lässt einen kompensatorischen



Mechanismus vermuten, um einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zelle durch den TRPC4 $\beta$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom entgegenzuwirken. Die SERCA ist hauptverantwortlich für den Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR und bestimmt maßgeblich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des SR. Der NCX hingegen ist verantwortlich für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Export aus der Zelle. Wir untersuchten daher, ob die gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude und der rasche  $\text{Ca}^{2+}$ -Abfall in TRPC4 $\beta$ -NRCs mit einer veränderten Aktivität dieser beiden Proteine in Zusammenhang steht. Versuche mit Koffein-angefassten Transienten zeigten jedoch keine Unterschiede zwischen Kontroll- und TRPC4 $\beta$ -infizierten Kardiomyozyten.

TRPCs wurden bereits mehrfach als speicher-regulierte (*store-operated*)  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (SOC) in Kardiomyozyten beschrieben (Makarewich et al., 2014; X. Wu et al., 2010). Der SOC ist unter anderem für Genexpressionsprogramme, die den Prozess des kardialen Umbaus bei der Herzinsuffizienz in Gang bringen, notwendig. In adulten Kardiomyozyten ist der SOC nicht mehr aktiv, wird aber während eines hypertrophen *Remodeling* wieder aktiviert (X. Wu et al., 2010). In neonatalen Kardiomyozyten ist dieses prominente Merkmal aber noch physiologisch vorhanden (J. Huang et al., 2006; Hunton et al., 2002), auch aufgrund der Tatsache, dass hier noch physiologisches kardiales Wachstum auftritt. Auch unsere Daten zeigen, dass ein speicher-regulierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in NRCs relevant sein könnte. Unter Kontrollbedingungen war ein leichter  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg bei Speicherentleerung sichtbar mit anschließendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle. Die zusätzliche Expression von TRPC4 $\beta$  resultierte in einem deutlich höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss, was darauf hindeutet, dass TRPC4 $\beta$  am SOCE (*store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry*) in NRCs beteiligt ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Komponenten eine ähnliche Rolle einnehmen. Neben TRPC-Proteinen wurden in NRCs auch Stim1 und Orai1 nachgewiesen, welche als bedeutende Regulatoren des SOC in Kardiomyozyten diskutiert werden (Sabourin et al., 2016; Salido, Jardin, & Rosado, 2011).

Orai 1 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiver Ionenkanal in der Plasmamembran, welcher aller Evidenz nach womöglich als speicher-abhängiger Einstromkanal (*Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel*, CRAC) agiert. In engem Bezug wird das *stromal interaction molecule 1* (STIM1) als dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor im endoplasmatischen/sarkoplasmatischen Retikulum (ER/SR) gesehen, welches bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerungen Orai 1 (G. N. Huang et al., 2006), aber auch TRPCs speicherabhängig (*store-dependent*) zu aktivieren scheint (Lee et al., 2014). Somit reguliert es auf bestimmte Art und Weise CRAC- als auch SOC-Einflussströme (*currents*). Wie STIM1 diese Aktivierung vornimmt, bleibt weiterhin Gegenstand von aktuellen Untersuchungen. Möglicherweise interagieren STIM1, Orai 1 und TRPC-Proteine dynamisch untereinander. Diese Dynamik eines ternären Komplexes scheint eine plausible Erklärung zu geben für die verschiedenen kapazitiven Einflussströme (*currents*) des SOCE (Berna-Erro, Redondo, & Rosado, 2012).

Studien zur TRPC-Aktivierung und -Funktion bleiben aufgrund eines polymodalen Aktivierungsapparates und *Splice*-Varianten, die hierbei ebenfalls unterschiedliche Mechanismen untereinander zeigen, weiterhin schwierig. Sie werden subklassifiziert in ROCs (*receptor-operated channels*), basierend auf der Aktivierung durch z. B. DAG und Aminosäuren und weiter in SOCs (*store-operated channels*), basierend auf ihrer Sensitivität auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherentleerung (Ramsey, Delling, & Clapham, 2006; Martinac, Saimi, & Kung, 2008). Unabhängig davon, ob TRPC4 $\beta$  ein SOC oder ROC ist, verdeutlichen unsere Daten, dass TRPC4-Kanäle nachgeschaltete Effektoren (*downstream targets*) der GPCR-PLC Signalkaskade sind (Eder & Molkentin, 2011). Akute Angiotensin II-Stimulation führte bei Ad-TRPC4 $\alpha$ - und Ad- $\beta$ gal -infizierten Zellen zu einem leichten Anstieg der Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, bei Ad-TRPC4 $\alpha$  war der Anstieg langsamer, erreichte dann aber auch das gleiche Plateau wie bei Ad- $\beta$ gal-exprimierenden Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu war die  $\text{Ca}^{2+}$ -

Amplitude bei Ad-TRPC4 $\beta$ -infizierten Zellen nach Ang II-Stimulation deutlich gesteigert. Der TRPC4 $\beta$ -Kanal reagierte demnach sensitiver auf Ang II-Stimulation als TRPC4 $\alpha$ . Das legt den Schluss nahe, dass die Stimulierung mit Ang II den TRPC4 $\beta$ -medierten Ca<sup>2+</sup>-Strom induziert, der zur Erhöhung des systolischen Ca<sup>2+</sup>-Maximalspitzenwerts (*peak*) beiträgt. Die Sensitivität von TRPC4 $\beta$  gegenüber GPCR-Stimulation konnte auch als deutlicher Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in ruhenden Ad-TRPC4 $\beta$ -infizierten NRCs gesehen werden. Die GPCR-abhängige Regulation ist ein Charakteristikum von TRPC4 $\beta$  in verschiedenen Spezies (Schaefer et al., 2002) und die in dieser Studie erhobenen Daten zeigen, dass dies auch bei neonatalen Rattenkardiomyozyten der Fall ist.

Die TRPC4 $\alpha$ -*Splice*-Variante war gegenüber der Stimulation von GPCR jedoch weniger sensitiv. In menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) wurde dieses Phänomen bereits beschrieben (McKay et al., 2000; Schaefer et al., 2002). In neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigte sich ähnliches Phänomen. Hier geht die PDZ-Domäne (Proteininteraktionsdomäne) des zellulären Gerüstproteins Shank 3, gekoppelt mit der Plasmamembran-ansässigen Phospholipase C beta 1 (PLCB1), lediglich eine Komplexbildung mit der *Splice*-Variante TRPC4 $\alpha$  ein, nicht mit C4 $\beta$ . Es ist wahrscheinlich, jedoch noch nicht belegt, dass dieses Zusammenspiel die funktionellen Eigenschaften von TRPC4 $\alpha$  beeinflusst, was sich als niedrigere Sensitivität und Aktivierungskinetik nach GPCR-Stimulation manifestiert. Obwohl TRPC4 $\beta$  ein Bindungsmotiv am C-terminalen Ende zeigt, war keine Komplexbildung mit Shank 3 nachweisbar. Dieses Ausbleiben der Interaktion könnte am fehlenden 84 Aminosäuren-Teil im C-terminalen Ende von TRPC4 $\beta$  liegen, da dieser eine wichtige Protein-/Lipid-bindende und regulatorische Domäne darstellt (Otsuguro et al., 2008; Schaefer et al., 2002). Regulatorische Eigenschaften der verschiedenen TRPC4-Isoformen könnten auch speziesspezifisch sein.

Humanes TRPC4 $\alpha$  ist insensitiv gegenüber GPCR-Stimulation (McKay et al., 2000; Schaefer et al., 2002), TRPC4 $\alpha$ -Kanäle aus Nagern wiederum sensitiv (Schaefer et al., 2002). Die Speziesunterschiede könnten somit die Resistenz der humanen TRPC4 $\alpha$  gegenüber GPCR-Stimulation erklären.

Es ist bekannt, dass TRPC-Ionenkanäle eine Schlüsselrolle im pathologischen hypertrophen Wachstum des Herzens spielen (Eder & Molkentin, 2011).

Aufgrund der Ca<sup>2+</sup>-Charakteristika von TRPC4 $\beta$ -überexprimierenden Zellen war daher auch ein deutliches Größenwachstum von NRCs unter basalen sowie unter stimulatorischen Bedingungen zu erwarten. *In vitro* kann ein hypertropher Reiz in Kardiomyozyten mit einem Agonisten-getriebenen Ansatz durch chronische Stimulation mit GPCR-Agonisten, beispielsweise Angiotensin II und Phenylephrin, erreicht werden (Correll et al., 2014; X. Wu et al., 2010). Das Maß der Hypertrophie wird durch die Oberflächenveränderung der Zellen im *Cell-imaging* beurteilt sowie dessen Proteinsyntheserate als Protein/ DNA Verhältnis (ratio) gemessen. Wie weiterführende Experimente in dieser Studie zeigten (Kirschmer et al., 2016), beeinflusste TRPC4 $\beta$  die Kardiomyozyten-Hypertrophie jedoch nicht, sondern führte unter stimulatorischen Bedingungen zu einer gesteigerten Apoptose. Die Mechanismen dahinter konnten hierzu noch nicht entschlüsselt werden, vermutlich spielt die Aktivierung von Calcineurin aber eine tragende Rolle. Es scheint, dass TRPC4 $\beta$  Ca<sup>2+</sup>-Signale nach GPCR-Stimulation erhöht und Calcineurin aktiviert wird, welches anschließend anstatt pro-hypertrophe pro-apoptotische Prozesse fördert. Die Annahme, dass eine solche Verschaltung stattfindet, konnte auch in Versuchen mit anderen TRPC-Isoformen bestärkt werden. So zeigte sich in weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an TRPC3, einer der am besten untersuchten TRPC-Kanäle (Nakayama et al., 2006; Poteser et al., 2011; X. Wu et al., 2010), dass der starke hypertrophe Effekt dieser TRP-Untereinheit durch eine Co-Expression mit TRPC4 $\beta$  vollständig

aufgehoben wurde. TRPC4 $\beta$  induzierte somit keine Hypertrophie und limitierte den prohypertrophen Effekt von TRPC3 in Kardiomyozyten (unveröffentlichte Daten).

In übergeordnetem Zusammenhang kann mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass die verstärkte Expression von TRPC4 $\beta$  eine kritische Veränderung der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase in Kardiomyozyten darstellt, die zur Progression von Herzkrankheiten beitragen könnte.

## 5. Zusammenfassung

Kationenkanäle der *Canonical Transient Receptor* (TRPC)-Familie spielen eine wichtige Rolle in der pathologischen Herzhypertrophie. Neben anderen Isoformen besitzt TRPC4 die Potenz, den strukturellen und funktionellen Umbau des Herzens im Rahmen der pathologischen Hypertrophie über  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zu bestärken. TRPC4-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, die für  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  durchlässig sind. Sie setzen sich in der Plasmamembran zu Homo- oder Heterotetrameren zusammen. Die TRPC4-Kanalaktivität wird durch die Stimulation von Gq-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) reguliert und führt zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der für die Aktivierung von Calcineurin und des *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) notwendig ist. Eine weitere Aktivierungsform lässt sich über die Entleerung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern (SOCE) aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) nachweisen. Die funktionelle Wirkung des TRPC4 ist von der Expression der beiden *Splice*-Varianten TRPC4 $\alpha$  und TRPC4 $\beta$  abhängig.

Um diese funktionelle Abhängigkeit der *Splice*-Variante C4 $\beta$  genauer zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Studie zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale und deren Aktivierungsmechanismen analysiert. Für die Untersuchungen wurden neonatale Rattenkardiomyozyten (NRC) verwendet, die mit adenoviralen Vektoren infiziert wurden und TRPC4beta (Ad-TRPC4 $\beta$ ), TRPC4alpha (Ad-TRPC4 $\alpha$ ) und beta-Galaktosidase (Ad- $\beta$ gal) als Kontrolle exprimierten. Es erfolgte eine Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, in der gezeigt werden konnte, dass TRPC4 $\beta$  den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in schlagenden Kardiomyozyten beeinflusst. Dies machte sich in einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude unter basalen Bedingungen bemerkbar. Ebenfalls konnte deutlich

gemacht werden, dass eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Entleerung des SR TRPC4 $\beta$  als sogenannten SOC (speicher-regulierten Kanal, *store-operated channel*) aktiviert. Außerdem reagierten TRPC4 $\beta$ -infizierte NRCs mit einem gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Maximalspitzenwert (*peak*) unter Stimulation mit dem GPCR-Agonisten Angiotensin II. Die Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei Überexpression von Ad-TRPC4 $\beta$  war im Vergleich zur Ad- $\beta$ gal-Kontrollgruppe deutlich gesteigert. Darüber hinaus war der Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten der TRPC4 $\beta$ -exprimierenden Zellen beschleunigt. Dies lässt einen kompensatorischen Mechanismus vermuten, mit dem Ziel, einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zelle durch den TRPC4 $\beta$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom entgegenzuwirken. In zusätzlichen Experimenten zeigte sich TRPC4 $\beta$  ebenfalls deutlich sensitiver gegenüber der Angiotensin II-Stimulation als TRPC4 $\alpha$ .

Weiterführende Untersuchungen ließen auch erkennen, dass TRPC4 $\beta$ , im Gegensatz zu anderen TRPC-Isoformen, keinen pro-hypertrophen, sondern vielmehr einen pro-apoptischen Einfluss auf Kardiomyozyten ausübt.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass eine erhöhte Aktivität der *Splice*-Variante TRPC4 $\beta$  mit kritischen Veränderungen zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale verbunden ist und somit ein entscheidender Faktor für die Entstehung und Progression kardialer Pathologien sein könnte.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abramowitz, J., & Birnbaumer, L. (2009). Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *Faseb j*, 23(2), 297-328. doi:10.1096/fj.08-119495
2. Ahmad, A. A., Streiff, M., Hunter, C., Hu, Q., & Sachse, F. B. (2017). Physiological and pathophysiological role of transient receptor potential canonical channels in cardiac myocytes. *Prog Biophys Mol Biol*. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2017.06.005
3. Akhter, S. A., Luttrell, L. M., Rockman, H. A., Iaccarino, G., Lefkowitz, R. J., & Koch, W. J. (1998). Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science*, 280(5363), 574-577.
4. Albert, A. P., Saleh, S. N., Peppiatt-Wildman, C. M., & Large, W. A. (2007). Multiple activation mechanisms of store-operated TRPC channels in smooth muscle cells. *J Physiol*, 583(Pt 1), 25-36. doi:10.1113/jphysiol.2007.137802
5. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Nover L. (Hrsg.) und von Koskull-Döring P. (Hrsg.): *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Wiley-VCH; 3. vollständig überarbeitete Auflage 2005; ISBN 978-3-527-31160-6
6. Berna-Erro, A., Redondo, P. C., & Rosado, J. A. (2012). Store-operated Ca(2+) entry. *Adv Exp Med Biol*, 740, 349-382. doi:10.1007/978-94-007-2888-2\_15
7. Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361(6410), 315-325. doi:10.1038/361315a0
8. Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198-205. doi:10.1038/415198a



9. Bers, D. M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*, 70, 23-49. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455
10. Bers, D. M., & Guo, T. (2005). Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann NY Acad Sci*, 1047, 86-98. doi:10.1196/annals.1341.008
11. Brito, D., & Cepeda, B. (2017). Cardiomyopathy, HypertrophicStatPearls [Internet]. Treasure Island, Florida: StatPearls Publishing.
12. Bush, E. W., Hood, D. B., Papst, P. J., Chapo, J. A., Minobe, W., Bristow, M. R., . . . McKinsey, T. A. (2006). Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. *J Biol Chem*, 281(44), 33487-33496. doi:10.1074/jbc.M605536200
13. Camacho Londono, J. E., Tian, Q., Hammer, K., Schroder, L., Camacho Londono, J., Reil, J. C., . . . Lipp, P. (2015). A background Ca<sup>2+</sup> entry pathway mediated by TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling. *Eur Heart J*, 36(33), 2257-2266. doi:10.1093/eurheartj/ehv250
14. Carreras-Sureda, A., Pihan, P., & Hetz, C. (2017). Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. *Cell Calcium*. doi:10.1016/j.ceca.2017.08.004
15. Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), 517-524. doi:10.1038/nature02196
16. Cooley, N., Grubb, D. R., Luo, J., & Woodcock, E. A. (2014). The phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate-binding sequence of transient receptor potential channel canonical 4alpha is critical for its contribution to cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Pharmacol*, 86(4), 399-405. doi:10.1124/mol.114.093690
17. Correll, R. N., Eder, P., Burr, A. R., Despa, S., Davis, J., Bers, D. M., & Molkentin, J. D. (2014). Overexpression of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase alpha2 but not alpha1 isoform attenuates pathological cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ Res*, 114(2), 249-256. doi:10.1161/circresaha.114.302293
18. Crabtree, G. R., & Olson, E. N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*, 109 Suppl, S67-79.

19. Dadson, K., Hauck, L., & Billia, F. (2017). Molecular mechanisms in cardiomyopathy. *Clin Sci (Lond)*, *131*(13), 1375-1392. doi:10.1042/CS20160170
20. de Souza, L. B., & Ambudkar, I. S. (2014). Trafficking mechanisms and regulation of TRPC channels. *Cell Calcium*, *56*(2), 43-50. doi:10.1016/j.ceca.2014.05.001
21. Dewenter, M., von der Lieth, A., Katus, H. A., & Backs, J. (2017). Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circ Res*, *121*(8), 1000-1020. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310355
22. Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T., & Gudermann, T. (2003). N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem*, *278*(48), 47842-47852. doi:10.1074/jbc.M302983200
23. Dorn, G. W., 2nd, & Brown, J. H. (1999). Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation. *Trends Cardiovasc Med*, *9*(1-2), 26-34.
24. du Cailar, G., Ribstein, J., Grolleau, R., & Mimran, A. (1989). Influence of sodium intake on left ventricular structure in untreated essential hypertensives. *J Hypertens Suppl*, *7*(6), S258-259.
25. Eder, P., & Molkentin, J. D. (2011). TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ Res*, *108*(2), 265-272. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.225888
26. Filtz, T. M., Grubb, D. R., McLeod-Dryden, T. J., Luo, J., & Woodcock, E. A. (2009). Gq-initiated cardiomyocyte hypertrophy is mediated by phospholipase Cbeta1b. *Faseb j*, *23*(10), 3564-3570. doi:10.1096/fj.09-133983
27. Freichel, M., Berlin, M., Schurger, A., Mathar, I., Bacmeister, L., Medert, R., . . . Londono, J. E. C. (2017). TRP Channels in the Heart. In nd & T. L. R. Emir (Eds.), *Neurobiology of TRP Channels* (pp. 149-185). Boca Raton (FL).
28. Freichel, M., Tsvilovskyy, V., & Camacho Londono, J. (2014). TRPC4 and TRPC4-Containing Channels In B. Nilius & V. Flockerzi (Eds.), *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels* (Vol. 1, pp. 86-128). Berlin: Springer.

29. Frey, N., McKinsey, T. A., & Olson, E. N. (2000). Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med*, *6*(11), 1221-1227. doi:10.1038/81321
30. Frohlich, E. D., Chien, Y., Sesoko, S., & Pegram, B. L. (1993). Relationship between dietary sodium intake, hemodynamics, and cardiac mass in SHR and WKY rats. *Am J Physiol*, *264*(1 Pt 2), R30-34. doi:10.1152/ajpregu.1993.264.1.R30
31. Goonasekera, S. A., & Molkentin, J. D. (2012). Unraveling the secrets of a double life: contractile versus signaling Ca<sup>2+</sup> in a cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol*, *52*(2), 317-322. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.05.001
32. Harvey, P. A., & Leinwand, L. A. (2011). The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol*, *194*(3), 355-365. doi:10.1083/jcb.201101100
33. Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., & Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, *397*(6716), 259-263. doi:10.1038/16711
34. Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S., & Worley, P. F. (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol*, *8*(9), 1003-1010. doi:10.1038/ncb1454
35. Huang, J., van Breemen, C., Kuo, K. H., Hove-Madsen, L., & Tibbits, G. F. (2006). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry modulates sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> loading in neonatal rabbit cardiac ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, *290*(6), C1572-1582. doi:10.1152/ajpcell.00226.2005
36. Hunton, D. L., Lucchesi, P. A., Pang, Y., Cheng, X., Dell'Italia, L. J., & Marchase, R. B. (2002). Capacitative calcium entry contributes to nuclear factor of activated T-cells nuclear translocation and hypertrophy in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, *277*(16), 14266-14273. doi:10.1074/jbc.M107167200
37. Janssen, L. J., & Kwan, C. Y. (2007). ROCs and SOCs: what's in a name? *Cell Calcium*, *41*(3), 245-247. doi:10.1016/j.ceca.2006.07.001
38. Kirschmer, N., Bandleon, S., von Ehrlich-Treuenstatt, V., Hartmann, S., Schaaf, A., Lamprecht, A. K., . . . Eder, P. (2016). TRPC4alpha and TRPC4beta Similarly Affect Neonatal Cardiomyocyte Survival during

- Chronic GPCR Stimulation. *PLoS One*, 11(12), e0168446. doi:10.1371/journal.pone.0168446
39. Kiyonaka, S., Kato, K., Nishida, M., Mio, K., Numaga, T., Sawaguchi, Y., . . . Mori, Y. (2009). Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(13), 5400-5405. doi:10.1073/pnas.0808793106
40. Krauss, G. (2008): *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 4. erweiterte und verbesserte Auflage; ISBN 978-3-527-31397-6, S. 327ff.
41. Kuwahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Hill, J. A., & Olson, E. N. (2006). TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest*, 116(12), 3114-3126. doi:10.1172/JCI27702
42. Lee, K. P., Choi, S., Hong, J. H., Ahuja, M., Graham, S., Ma, R., . . . Yuan, J. P. (2014). Molecular determinants mediating gating of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *J Biol Chem*, 289(10), 6372-6382. doi:10.1074/jbc.M113.546556
43. Leenen, F. H., & Yuan, B. (1998). Dietary-sodium-induced cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rat versus Wistar-Kyoto rat. *J Hypertens*, 16(6), 885-892.
44. Liu, Q., Wilkins, B. J., Lee, Y. J., Ichijo, H., & Molkenin, J. D. (2006). Direct interaction and reciprocal regulation between ASK1 and calcineurin-NFAT control cardiomyocyte death and growth. *Mol Cell Biol*, 26(10), 3785-3797. doi:10.1128/MCB.26.10.3785-3797.2006
45. Makarewich, C. A., Zhang, H., Davis, J., Correll, R. N., Trapanese, D. M., Hoffman, N. E., . . . Houser, S. R. (2014). Transient receptor potential channels contribute to pathological structural and functional remodeling after myocardial infarction. *Circ Res*, 115(6), 567-580. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303831
46. Marian, A. J., & Braunwald, E. (2017). Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Res*, 121(7), 749-770. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311059
47. Martinac, B., Saimi, Y., & Kung, C. (2008). Ion channels in microbes. *Physiol Rev*, 88(4), 1449-1490. doi:10.1152/physrev.00005.2008

48. McKay, R. R., Szymeczek-Seay, C. L., Lievremont, J. P., Bird, G. S., Zitt, C., Jungling, E., . . . Putney, J. W., Jr. (2000). Cloning and expression of the human transient receptor potential 4 (TRP4) gene: localization and functional expression of human TRP4 and TRP3. *Biochem J*, 351 Pt 3, 735-746.
49. McNally, E. M., & Mestroni, L. (2017). Dilated Cardiomyopathy: Genetic Determinants and Mechanisms. *Circ Res*, 121(7), 731-748. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309396
50. Merino, D., et al. (2018). "Experimental modelling of cardiac pressure overload hypertrophy: Modified technique for precise, reproducible, safe and easy aortic arch banding-debanding in mice." *Sci Rep* 8(1): 3167.
51. Messerli, F. H., Rimoldi, S. F., & Bangalore, S. (2017). The Transition From Hypertension to Heart Failure: Contemporary Update. *JACC Heart Fail*, 5(8), 543-551. doi:10.1016/j.jchf.2017.04.012
52. Nakayama, H., Bodi, I., Maillet, M., DeSantiago, J., Domeier, T. L., Mikoshiba, K., . . . Molkenin, J. D. (2010). The IP3 receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ Res*, 107(5), 659-666. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.220038
53. Nakayama, H., Wilkin, B. J., Bodi, I., & Molkenin, J. D. (2006). Calcineurin-Dependent Cardiac Hypertrophy Is Activated by TRPC in the Adult Mouse Heart. *Faseb j*, 20(10), 1660-1670. doi:10.1096/fj.05-5560com
54. Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*, 12(3), 218. doi:10.1186/gb-2011-12-3-218
55. Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., & Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev*, 87(1), 165-217. doi:10.1152/physrev.00021.2006
56. Numaga-Tomita, T., Oda, S., Shimauchi, T., Nishimura, A., Mangmool, S., & Nishida, M. (2017). TRPC3 Channels in Cardiac Fibrosis. *Front Cardiovasc Med*, 4, 56. doi:10.3389/fcvm.2017.00056
57. Otsuguro, K., Tang, J., Tang, Y., Xiao, R., Freichel, M., Tsvilovskyy, V., . . . Zholos, A. V. (2008). Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem*, 283(15), 10026-10036. doi:10.1074/jbc.M707306200

58. Plant, T. D., & Schaefer, M. (2003). TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channels. *Cell Calcium*, 33(5-6), 441-450.
59. Poteser, M., Schleifer, H., Lichtenegger, M., Schernthaner, M., Stockner, T., Kappe, C. O., . . . Groschner, K. (2011). PKC-dependent coupling of calcium permeation through transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) to calcineurin signaling in HL-1 myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(26), 10556-10561. doi:10.1073/pnas.1106183108
60. Rader, F., Sachdev, E., Arsanjani, R., & Siegel, R. J. (2015). Left ventricular hypertrophy in valvular aortic stenosis: mechanisms and clinical implications. *Am J Med*, 128(4), 344-352. doi:10.1016/j.amjmed.2014.10.054
61. Ramsey, I. S., Delling, M., & Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, 68, 619-647. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431
62. Rickenbacher, P. (2001). Swiss Medical Forum Nr. 1/2 10. Januar 2001 Herzinsuffizienz: Epidemiologie, Pathophysiologie.
63. Sabater-Molina, M., Perez-Sanchez, I., Hernandez Del Rincon, J. P., & Gimeno, J. R. (2017). Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: A review of current state. *Clin Genet*. doi:10.1111/cge.13027
64. Sabourin, J., Bartoli, F., Antigny, F., Gomez, A. M., & Benitah, J. P. (2016). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)/Orai1-dependent Store-operated Ca<sup>2+</sup> Channels: NEW TARGETS OF ALDOSTERONE IN CARDIOMYOCYTES. *J Biol Chem*, 291(25), 13394-13409. doi:10.1074/jbc.M115.693911
65. Salido, G. M., Jardin, I., & Rosado, J. A. (2011). The TRPC ion channels: association with Orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry. *Adv Exp Med Biol*, 704, 413-433. doi:10.1007/978-94-007-0265-3\_23
66. Schaefer, M., Plant, T. D., Obukhov, A. G., Hofmann, T., Gudermann, T., & Schultz, G. (2000). Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem*, 275(23), 17517-17526.

67. Schaefer, M., Plant, T. D., Stresow, N., Albrecht, N., & Schultz, G. (2002). Functional differences between TRPC4 splice variants. *J Biol Chem*, *277*(5), 3752-3759. doi:10.1074/jbc.M109850200
68. Schirone, L., Forte, M., Palmerio, S., Yee, D., Nocella, C., Angelini, F., . . . Frati, G. (2017). A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid Med Cell Longev*, *2017*, 3920195. doi:10.1155/2017/3920195
69. Schmid, C.; Hirt, S.; Scheld, H.H. (2009) , Leitfaden Herztransplantation XI, 208 S., Softcover ISBN: 978-3-7985-1872-8
70. Seo, K., Rainer, P. P., Shalkey Hahn, V., Lee, D. I., Jo, S. H., Andersen, A., . . . Kass, D. A. (2014). Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(4), 1551-1556. doi:10.1073/pnas.1308963111
71. Seth, M., Zhang, Z. S., Mao, L., Graham, V., Burch, J., Stiber, J., . . . Rosenberg, P. (2009). TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. *Circ Res*, *105*(10), 1023-1030. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.206581
72. Shuttleworth, T. J. (2004). Receptor-activated calcium entry channels--who does what, and when? *Sci STKE*, *2004*(243), pe40. doi:10.1126/stke.2432004pe40
73. Stamler, J. (1997). The INTERSALT Study: background, methods, findings, and implications. *Am J Clin Nutr*, *65*(2 Suppl), 626S-642S.
74. Sukumaran, P., Schaar, A., Sun, Y., & Singh, B. B. (2016). Functional role of TRP channels in modulating ER stress and Autophagy. *Cell Calcium*, *60*(2), 123-132. doi:10.1016/j.ceca.2016.02.012
75. Thakur, D. P., Tian, J. B., Jeon, J., Xiong, J., Huang, Y., Flockerzi, V., & Zhu, M. X. (2016). Critical roles of Gi/o proteins and phospholipase C-delta1 in the activation of receptor-operated TRPC4 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(4), 1092-1097. doi:10.1073/pnas.1522294113
76. Ueda, Y., & Stern, J. A. (2017). A One Health Approach to Hypertrophic Cardiomyopathy. *Yale J Biol Med*, *90*(3), 433-448.
77. Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem*, *76*, 387-417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819

78. Vennekens, R. (2011). Emerging concepts for the role of TRP channels in the cardiovascular system. *J Physiol*, 589(Pt 7), 1527-1534. doi:10.1113/jphysiol.2010.202077
79. Walker, R. L., Koh, S. D., Sergeant, G. P., Sanders, K. M., & Horowitz, B. (2002). TRPC4 currents have properties similar to the pacemaker current in interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283(6), C1637-1645. doi:10.1152/ajpcell.00266.2002
80. Weil, J., & Schunkert, H. (2006). [Pathophysiology of chronic heart failure]. *Clin Res Cardiol*, 95 Suppl 4, 1-15; quiz 16-17. doi:10.1007/s00392-006-2005-z
81. Wu, X., Eder, P., Chang, B., & Molkentin, J. D. (2010). TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(15), 7000-7005. doi:10.1073/pnas.1001825107
82. Wu, Y., Temple, J., Zhang, R., Dzhura, I., Zhang, W., Trimble, R., . . . Anderson, M. E. (2002). Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation*, 106(10), 1288-1293.
83. Yamada, H., Wakamori, M., Hara, Y., Takahashi, Y., Konishi, K., Imoto, K., & Mori, Y. (2000). Spontaneous single-channel activity of neuronal TRP5 channel recombinantly expressed in HEK293 cells. *Neurosci Lett*, 285(2), 111-114.
84. Yamaguchi, Y., Iribe, G., Nishida, M., & Naruse, K. (2017). Role of TRPC3 and TRPC6 channels in the myocardial response to stretch: Linking physiology and pathophysiology. *Prog Biophys Mol Biol*, 130(Pt B), 264-272. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2017.06.010
85. Yue, Z., Xie, J., Yu, A. S., Stock, J., Du, J., & Yue, L. (2015). Role of TRP channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 308(3), H157-182. doi:10.1152/ajpheart.00457.2014
86. Zhu, X., Chu, P. B., Peyton, M., & Birnbaumer, L. (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the Drosophila trp gene. *FEBS Lett*, 373(3), 193-198.



## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Intrazelluläres Ca <sup>2+</sup> als zentrales Element der Zellregulation .....	6
Abbildung 2: Aufbau des Messarbeitsplatzes in der Dunkelkammer.....	28
Abbildung 3: Schritte einer Fluoreszenz-Transientenanalyse (A+B) .....	32
Abbildung 4: Spontaner Ca <sup>2+</sup> Einstrom in ruhenden (A) Ad-βgal und (B) Ad-TRPC4β -infizierten NRCs nach Zugabe von 2.5 mM Ca <sup>2+</sup> .....	35
Abbildung 5: Ausschluss LTCC-abhängiger Effekte auf die Ca <sup>2+</sup> -Signale.....	36
Abbildung 6: Ca <sup>2+</sup> -Transienten in (A) Ad-βgal- und (B) Ad-TRPC4β -infizierten NRCs bei 1 Hz Stimulierung.....	37
Abbildung 7: Ca <sup>2+</sup> -Amplitude (A) und Geschwindigkeit des Ca <sup>2+</sup> -Abfalls (B) der Ca <sup>2+</sup> -Transienten in Ad-βgal vs. Ad-TRPC4β -infizierten NRCs .....	39
Abbildung 8: Repräsentatives Beispiel eines C4β Koffein-induzierten Transienten in NRCs .....	41
Abbildung 9: Einfluss der Calciumpumpe SERCA auf intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> - Transienten (A+B). .....	41
Abbildung 10: Repräsentative Aufzeichnungen von FURA-2 Ca <sup>2+</sup> -Messungen und 2.5 mM Ca <sup>2+</sup> -Akutperfusion mit (A) Ad-βgal oder (B) Ad-TRPC4β infizierten NRCs sowie Auswirkung auf den SOCE (C) .....	43
Abbildung 11: Gesteigerter Ca <sup>2+</sup> -Einstrom während Ang II-Stimulation bei TRPC4β-Überexpression in Kardiomyozyten .....	46

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Adenoviren.....	19
Tabelle 2: Kulturmediumzusätze.....	20
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	20
Tabelle 4: Rezepte der verwendeten Puffer und Lösungen.....	21
Tabelle 5: Verbrauchsgüter und Hersteller.....	23
Tabelle 6: Benutzte Gerätschaften.....	23
Tabelle 7: Parameter und Definition einer Transientenanalyse.....	30

---

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich zuerst bei meiner Doktormutter, Frau Priv.-Doz. Dr. Petra Eder-Negrin, bedanken für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, das Überlassen dieser interessanten Projektarbeit, die hervorragende Betreuung sowie für die wertvollen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die stets freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, insbesondere möchte ich Frau Nadine Kirschmer, Frau Alice Schaaf und Frau Sandra Bandleon danken für ihre freundliche Unterstützung und viele hilfreiche Anregungen, die wesentlich zum Gelingen der experimentellen Versuche dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenfalls herzlichen Dank allen beteiligten Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die freundliche Kooperation.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Mutter Frau Dr. Sabine von Ehrlich-Treuenstätt ganz herzlich bedanken, die mich auf meinem Weg durch das Studium und in das Berufsleben begleitet hat und mir stets mit gutem Rat zur Seite stand.