

## 6. Zusammenfassung

Es wird angenommen, dass Säugerhomologe des *Drosophila*-Proteins TRP (transient receptor potential), insbesondere TRPC1 – 7, den Rezeptor-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom vermitteln. Die Eigenschaften von TRPC1 – 7 wurden bislang ausführlich in heterologen Expressionssystemen charakterisiert. Über ihre Rolle in nativen Geweben ist jedoch wenig bekannt. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rolle von TRPC1 – 7 beim Vasokonstriktor-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in A7r5-Zellen, einer Zelllinie aus glatten Muskelzellen der Aorta embryonaler Ratten, zu untersuchen.

1. Die Applikation von  $[\text{Arg}^8]$ -Vasopressin (AVP) löste in A7r5-Zellen einen Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aus, der aus einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungs- und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromkomponente bestand. In Patch-Clamp-Experimenten führte die Applikation von AVP in A7r5-Zellen zur Aktivierung eines nichtselektiven Kationenstroms. Dieser Kationenstrom zeigte eine charakteristische, doppelt rektifizierende Strom-Spannungs-Beziehung, die den für einige rekombinant-exprimierte TRPC-Kanäle beschriebenen Kennlinien auffallend ähnelte. Der AVP-induzierte Kationenstrom wurde durch Lanthan ( $\text{La}^{3+}$ ) und Gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$ ) blockiert. Die Effekte von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  auf den Kationenstrom waren komplex und umfassten sowohl stimulierende als auch inhibierende Anteile. Die direkte Aktivierung von G-Proteinen durch Infusion von Aluminiumfluorid aktivierte einen Kationenstrom, der die gleichen Eigenschaften besaß wie der AVP-induzierte Strom. Desweiteren führte auch die Stimulation von Rezeptoren (z.B. durch PDGF = platelet-derived growth factor), die an an  $\text{PLC}\gamma$  koppeln, zur Aktivierung des beschriebenen Kationenstroms. Sowohl die Entleerung intrazellulärer Speicher als auch die Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration konnten als Aktivierungsmechanismus ausgeschlossen werden. Dagegen aktivierte 1-Oleoyl-2-acetyl-*sn*-Glycerol (OAG), ein membranpermeables DAG-Analog, den Kationenstrom. Diese Aktivierung war unabhängig von Proteinkinasen C (PKC). Die PKC-unabhängige Aktivierung durch DAG-Analoga ist eine charakteristische Eigenschaft der Kanäle der TRPC3/6/7-Gruppe. Ebenso wie die Ströme durch den heterolog exprimierten TRPC6-Kanal wurde der endogene Kationenstrom in A7r5-Zellen durch Applikation von Flufenamat vergrößert. Northern-Blot-

Hybridisierungsanalysen zeigten, dass A7r5-Zellen lediglich mRNA für TRPC1 und TRPC6 exprimieren. Die Übereinstimmung von elektrophysiologischen und molekular-biologischen Befunden legt nahe, dass TRPC6 eine wichtige Komponente des AVP-aktivierten Kationenkanals in A7r5-Zellen ist.

2. Um zu untersuchen, ob TRPC6 generell in der glatten Gefäßmuskulatur von Bedeutung ist, wurden zwei weitere Präparationen von glatten Gefäßmuskelzellen betrachtet. In glatten Muskelzellen der Vena cava der Ratte, löste AVP ebenfalls einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus. Allerdings konnte in diesen Zellen weder ein agonistinduzierter Kationenstrom noch mRNA für TRPC2 - 6 nachgewiesen werden. Vorläufige Untersuchungen an primärkultivierten glatten Muskelzellen der Aorta neonataler und adulter Ratten zeigten dagegen die Aktivierung eines Kationenstroms, der dem in A7r5-Zellen beobachteten Strom sehr ähnlich war.
3. Um die Eigenschaften der nativen Ströme in A7r5-Zellen mit denen von heterolog exprimiertem TRPC6 zu vergleichen, wurde das Rattenortholog von TRPC6 (rTRPC6) kloniert und nach rekombinanter Expression elektrophysiologisch charakterisiert. Außerdem wurde das Verhalten von rTRPC6 mit dem von mTRPC5 (aus Maus) verglichen. TRPC5 gehört zu der TRPC4/5-Untergruppe, die sich strukturell und funktionell von der TRPC3/6/7-Untergruppe unterscheidet. Extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  hatte eine hemmende Wirkung auf rTRPC6, während die Stromamplitude im Falle von mTRPC5 durch Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vergrößert wurde. Für rTRPC6 konnte eine Hemmung durch  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  gezeigt werden. mTRPC5-Kanäle wurden durch millimolare Konzentrationen von  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  ebenfalls blockiert, mikromolare Konzentrationen wirkten dagegen potenzierend. Der duale Effekt von  $\text{La}^{3+}$  auf mTRPC5 war auch auf der Einzelkanalebene zu beobachten. Die Einzelkanalleitfähigkeit nahm mit ansteigender  $\text{La}^{3+}$ -Konzentration ab, die Öffnungswahrscheinlichkeit hingegen nahm zu. TRPC5- und TRPC6-Kanäle werden also durch extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  sowie durch  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  unterschiedlich reguliert. Diese Eigenschaften sind deshalb ein wichtiges Hilfsmittel, um die Beteiligung von Kanälen der TRPC3/6/7- bzw. der TRPC4/5-Gruppe an Rezeptorvermittelten Kationenleitfähigkeiten in nativen Zellen nachzuweisen und zwischen beiden Kanalgruppen zu unterscheiden.

---

Der wichtigste Befund der vorliegenden Arbeit ist, dass TRPC6 eine molekulare Komponente des Rezeptor-stimulierten Kationenkanals in A7r5-Zellen darstellt. Insbesondere zeigt die vorliegende Studie eine klare Übereinstimmung zwischen endogenen Rezeptor-stimulierten Kationenströmen und solchen, die nach rekombinanter Überexpression einzelner TRPC-Isoformen beobachtet werden.