

# Kalsiyumun Çok Yönlü İşlevselliğinde TRPC İyon Kanallarının Rolü

Received : 25.12.2008  
Revised : 17.04.2009  
Accepted : 27.04.2009

**Yasemin Eraç\*, Çiğdem Selli\*, Metiner Tosun\***

## Giriş

Damar düz kasının kasılması / gevşemesi, hücre bölünmesi, hücre motilite, hormon sekresyonu, metabolizma, sinir sisteminin işleyişi, protein döngüsü, gen ekspresyonu, gelişim ve programlı hücre ölümü (apoptoz) gibi süreçlerde kalsiyumun işlevsel önemi bilinmektedir. Bu nedenle çalışmalar uzun bir süre boyunca hücre içi kalsiyum iyon derişimindeki ( $[Ca^{+2}]_i$ ) değişimlere odaklanmıştır. Hücre içinde kalsiyuma bağlandığı zaman spektral özellikleri değişerek gerçek zamanlı  $[Ca^{+2}]_i$  değişimlerini izlemeye olanak veren fluoroforların geliştirilmesi derişimden çok yer ve zamana bağlı  $[Ca^{+2}]_i$  değişim kalıbının önemli olduğunu göstermiştir. Değişim kalıbının yanı sıra sinyallerin yerel ya da küresel oluşu da hücre işlevi belirlemektedir.

Farmakolojik araştırmalarda damar düz kası sık çalışılan bir doku tipi olmuştur. Fura-2 ile yüklenmiş izole bir damarda kasılmalar eş zamanlı ölçüldüğünde membran depolarizasyonuna bağlı olarak artan  $[Ca^{+2}]_i$  ile ilişkili stabil kasılmalar izlenebilir. Ancak Indo-1 yüklü bir düz kas preparatı çift-foton lazer taramalı konfokal mikroskopta incelendiğinde sabit potasyum klorür derişiminde her bir düz kas hücresinin bir ucundan diğerine 1 saniye aralıklarla göç ediyormuş gibi görülen küresel ritmik kalsiyum sinyalleri oluşur. Bu aslında ölçme tekniğinin niteliği ve duyarlığı ile ilgili bir algılamadır. Özetle, hücreler

---

\* Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı 35100 Bornova, İzmir  
° Corresponding Author: Tel: +90(232) 388 52 66 email: metiner.tosun@ege.edu.tr

fura-2 ile yüklenir ve yüzeyel spektrofotometri yöntemi kullanılırsa boyanın kompartimentalize olması nedeni ile olasılıkla yüzeyel bölgelerdeki değişimler izlenebilir. Eğer tüm hücre içinde dağılım gösteren bir boya kullanıp lazer tarayıcı bir konfokal mikroskop kullanılırsa  $Ca^{+2}$  kıvılcımları (*sparks*) veya küresel dalga hareketleri görülebilir. Ancak, 100 nm'lik bir alanda  $[Ca^{+2}]_i$  gradiyentini belirlemek henüz olası gözükmemektedir. Bu ölçünün gizemi hücre membranı ile onu alttan sınırlayan yüzeyel sarkoplazmik retikulumlar (SR) arasındaki yaklaşık uzaklık oluşudur. Bu “dar” alanda taşıdıkları sinyal molekülleri ile “paslaşan” ise 50-100 nm çapındaki membran girintileri olan kaveolalardır.

Damar düz kas hücrelerinde G-proteini aracılığı ile yanıt oluşturan agonistler hücre içi  $Ca^{+2}$  derişimini artırarak kasılmaya neden olmaktadır. Derişimdeki bu artış SR gibi hücre içi depolardan  $Ca^{+2}$  saliverilmesi ve ekstraselüler alandan hücre içine  $Ca^{+2}$  girişi ile gerçekleşmektedir<sup>1</sup>. Ekstraselüler  $Ca^{+2}$  girişi voltaja-duyarlı ve -duyarlı olmayan  $Ca^{+2}$  kanalları ile gerçekleşmektedir. Derişim artışında voltaja-duyarlı olmayan kanalların katkısı daha fazladır ve bu katkı düz kasın tipine bağlı olarak değişmektedir<sup>2</sup>. Bu yollar hipertansiyon ve astım gibi düz kasın aşırı kasılması gibi önemli hastalıkların tedavisinde daha somut hedefler göstermesi nedeni ile düz kastaki voltaja-duyarlı olmayan reseptör-aracılı  $Ca^{+2}$  kanalları (*receptor-operated calcium channel*, ROCC) ve depo-kontrollü  $Ca^{+2}$  kanalları (*store-operated calcium channel*, SOCC) hakkında daha fazla çalışma gerçekleştirilmektedir. Membran depolarizasyonundan bağımsız mekanizmalar ile reseptör aktivasyonunun nedeni olduğu hücre içerisine  $Ca^{+2}$  girişi ROCC aracılığı ile gerçekleşmektedir<sup>3</sup>. Ligandın bağlanması kanal proteininin yapısında konformasyonel bir değişikliğe neden olarak kanal kapısının açılmasına ve hücre içerisine iyonun girmesine neden olmaktadır. Birçok G-proteinine kenetli reseptör fosfolipaz C- $\beta$  (PLC-  $\beta$ ) ile kenetlenmektedir. Böylece agonistler bu reseptörlerle etkileşerek PLC aracılığı ile membran lipidlerinden inositol-1,4,5- fosfat ( $IP_3$ ) oluşumuna ve daha sonra SR'den  $Ca^{+2}$  saliverilmesine neden olmaktadır. Reseptör aktivasyonu bu nedenle SOCC'lerin uyarılmasına da neden olmaktadır.

SOCC kavramı ilk olarak 1986 yılında Dr. Putney tarafından ileri sürülmüştür<sup>4</sup>. Depolardaki  $Ca^{+2}$  doluluk oranının, uyarılamayan hücrelerde, “kapasitatif kalsiyum girişi” (*capacitative calcium entry*) ya

da daha yaygın olarak “*store-operated calcium entry*” (SOCE) olarak adlandırılan hücre içine  $Ca^{+2}$  girişinin büyüklüğünü kontrol ettiği önerilmiştir. Depoların dolu olduğu koşullarda,  $Ca^{+2}$  girişi meydana gelmezken, depolar boşaldığında  $Ca^{+2}$  girişi olmaktadır. Depoların boşalması sonucunda uyarılan  $Ca^{+2}$  girişi agonist ile uzun süreli etkileşim  $Ca^{+2}$  derişiminde yeterli artışın devam ettirilmesine ve boşalan depoların agonist uzaklaştıktan sonra yeniden doldurulmasını sağlamaktadır<sup>5</sup>.

SOCE  $Ca^{+2}$  osilasyonlarının genliğinin korunmasında, sitokinlerin saliverilmesinde<sup>6</sup>, gen transkripsiyonunda<sup>7</sup> ve enzimatik aktivitenin<sup>8</sup> devam etmesinde işlev görmektedir. Hücre içi  $Ca^{+2}$  depolarını boşaltan herhangi bir süreç SOCE’yi uyarabilmektedir<sup>9, 10</sup>. Fizyolojik olarak deponun boşalması  $IP_3$  düzeylerindeki artışla ya da depolardan  $Ca^{+2}$  saliverilmesine neden olan diğer  $Ca^{+2}$  -saliverici sinyaller aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bunların yanında sarkoplazmik-endoplazmik retikulum  $Ca^{+2}$ -ATPaz (*sarcoplasmic-endoplasmic reticulum  $Ca^{+2}$ -ATPase*, SERCA) inhibitörleri olan tapsigargin (TG)<sup>11</sup>, siklopiazonik asit (CPA)<sup>12</sup> ve di-ter-bütillhidrokinon (BHQ)<sup>13</sup> uygulanması, kalsiyumun aktif olarak SR içine pompalanmasını inhibe ederek SR’nin pasif olarak boşalması sonucunda SOCE’yi reseptörden bağımsız olarak uyarmaktadır.

Çeşitli önerilerin varlığına karşın SOCC’lerin deponun boşalması ile nasıl aktive olduğu bilinmemektedir. Deponun boşalması, boşalma mekanizmasından bağımsız olarak SOCE’yi uyarmaktadır. PLC aktivasyonunu,  $IP_3$  aktivitesini ve  $IP_3$  reseptörü ( $IP_3R$ )  $Ca^{+2}$  kanallarının açılmasını etkilemediği için, TG veya CPA gibi SERCA inhibitörleri SOCE ile ilgili çalışmalar için en uygun ajanlardır. Birçok hücrede bulunmasına karşın SOCE bugüne kadar daha çok uyarılmayan hücrelerde çalışılmıştır. Giriş fazını ayırmak için özel bir deney protokolü kullanılır. Hücreler  $Ca^{+2}$  bulunmayan ortamda SERCA inhibitörü ile etkileştirildiğinde, depolar pasif  $Ca^{+2}$  sızmasına bağlı geçici  $[Ca^{+2}]_i$  artışı sonrasında boşalır. Sitolik  $[Ca^{+2}]$  denge konumunda iken ortama  $Ca^{+2}$  eklenmesi sonrasında izlenen belirgin  $Ca^{+2}$  girişi temel olarak SOCE aracılığı ile gerçekleşir<sup>14</sup>.

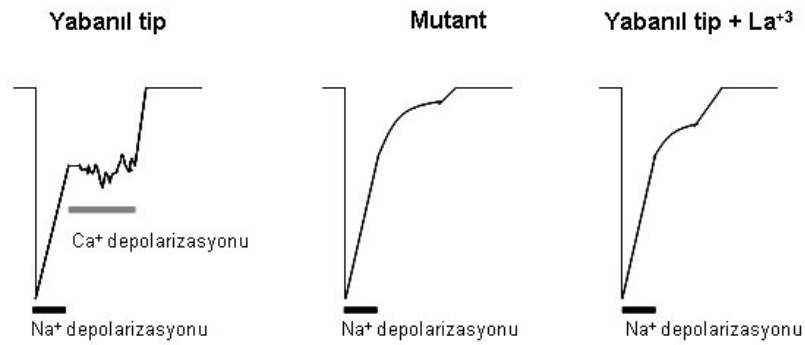
SOCE ile ilgili çözülmemiş iki temel sorun SOCC’lerin moleküler yapıları ve deponun boşalması ile SOCC’lerin açılışı arasındaki mekanistik ilişkidir. SOCC’lerin uyarılmasına ilişkin çeşitli

mekanizmalar önerilmiştir. Bunlar arasında 1) depo boşalmasının depodan salıverilen kalsiyum giriş faktörü denilen (*calcium influx factor*, CIF) bir mesajcı aracılığı ile kanalların açılması<sup>15, 16</sup>, 2) SOC kanalları dinlenim durumunda hücre membranında bulunmazken, depo boşaldığında vezikül füzyonu ile SOC kanallarının hücre membranının yapısına katılması<sup>17, 18</sup> ve 3) SOCC'lerin SR membranındaki IP<sub>3</sub>R'ler ile doğrudan etkileşerek açılmaları sayılabilir<sup>19, 20</sup>. Son zamanlarda ise “stromal interaction molecule” (STIM) proteinlerinden STIM1'in SOCE'de önemli işlevi olduğu bildirilmiştir. SR membranında eksprese olan STIM1'in Ca<sup>+2</sup> bağlayıcı bölge (*EF-hand*) taşıması nedeniyle deponun Ca<sup>+2</sup> doluluk oranını algıladığı düşünülmektedir<sup>21-23</sup>.

#### *SOC Kanallarının Moleküler Yapısı*

Meyve sineği *Drosophila melanogaster*'deki fotoreseptör protein rodopsinin ışık ile aktivasyonu PLC stimülasyonuna (G- proteini aracılığı ile), IP<sub>3</sub> oluşumuna ve sonuçta sürekli bir membran depolarizasyonuna neden olmaktadır. Depolarizasyon, biri kalsiyuma diğeri sodyum ve kalsiyumun ikisine birden geçiren iki farklı kondüktanstan kaynaklanmaktadır<sup>2</sup>. Bu yolaklar aracılığı ile özellikle de Ca<sup>+2</sup> -selektif olan yolakla fotoreseptör hücreye Ca<sup>+2</sup> girişi Ca<sup>+2</sup> -bağımlı ışık adaptasyonu açısından önemlidir. 1969 yılında Dr. Cosens ve Dr. Manning izole ettikleri kendiliğinden oluşan mutant sinekte uzun süre ışık maruziyeti sonrasında kısa süreli anormal bir elektoretinogram (ERG) gözlemişlerdir<sup>24</sup>. Bu mutantlarda ışık maruziyeti, sürekli yanıt yerine sadece geçici bir membran depolarizasyonu oluşturmaktadır (Şekil 1). Yabanıl sineklerin fotoreseptörlerinde ölçülen reseptör potansiyelinin plato fazı mutant sineklerde görülmemektedir. Mutant sineklere benzer şekilde, 10 µM lantan (La<sup>+3</sup>) uygulanmış yabanıl tip sineklerde de ışık sadece geçici bir membran depolarizasyonu oluşturmuştur. Ayrıca La<sup>+3</sup> uygulaması mutant sineklerde herhangi bir etki oluşturmamıştır. Seçici olmayan Ca<sup>+2</sup> kanal blokörü La<sup>+3</sup> ile yapılan deneyler gözlenen fenomenin bir iyon kanalındaki bozukluktan kaynaklandığını düşündürmüştür. Sonuç olarak bu mutasyon “*transient receptor potential, trp*” olarak isimlendirilmiştir.

*Drosophila* TRP proteininin fosfoinosit-aracılı  $Ca^{+2}$  geçirgen kanal olarak tanımlanması<sup>25, 26</sup> ve memeli homologunun keşfi<sup>27</sup> TRP kanallarındaki  $Ca^{+2}$  sinyali üzerine olan araştırmaların artmasına neden olmuştur<sup>28, 29</sup>. Sonuç olarak biyolojik mekanizmalara ilişkin birbirinden bağımsız yapılan çok sayıdaki çalışma TRP süperailisinin varlığını ortaya çıkarmıştır.



**Şekil 1: *Drosophila melanogaster*'de TRP kanallarının keşfi.** Yabanıl-tip, trp mutant ve  $La^{+3}$  uygulanmış yabanıl-tip sineklerden alınan elektrotretinogram (ERG) kayıtları. *Drosophila* retinasındaki ışık yanıtına PLC- $\beta$  ve ışıkla aktive olan kanallar aracılık etmektedir. Kanalların aktive olması ile sodyumun neden olduğu kısa süreli bir depolarizasyon ve kalsiyumun neden olduğu daha uzun bir depolarizasyon (adaptasyon) meydana gelir. Mutant ve  $La^{+3}$  uygulanmış yabanıl-tip sinekler sadece geçici bir reseptör potansiyeli göstermiştir<sup>30</sup>.

TRP kanallarının çevresel uyarılardaki değişiklikleri ayrımsal olarak belirleyen evrensel biyolojik sensörler oldukları düşünülmektedir. TRP kanalları sıcak/soğuk, doğal kimyasal bileşikler (mentol, kafur, acı biber), mekanik uyarın, lipid tabakanın içeriğindeki değişiklikler gibi birçok uyarın ile açılmaktadır. TRP kanalları kan basıncı ve düz kas tonusunun düzenlenmesi, renal  $Ca^{+2}$  /  $Mg^{+2}$  kontrolü, keskin tad ve kokulu bileşiklerin (hardal, sarımsak gibi), mekanik değişikliklerin, ağrının, ısının, tadın, kokunun, sesin, feromonların, ışığın algılanması gibi önemli birçok süreçte işlev görmektedir (Tablo 1)<sup>31</sup>.

Amino asid benzerliklerine göre TRP süperailisi 7 alt gruba ayrılmaktadır: TRPC (klasik ya da canonical, TRPC1-7), TRPM (melastatin, TRPM1-8), TRPV (vanilloid reseptör, TRPV1-6), TRPA

(ankyrin zengin protein, TRPA1), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPN (NOMPC, “no mechanoreceptor potential” C)<sup>31-36</sup>.

Hidropati analizlerine göre neredeyse tüm iyon kanal proteinlerinin iki boyutlu topolojik yapısında varolan membranı 6 kez geçen bölgelerin (transmembran, TM1-6) varlığı TRP kanalları için de önerilmektedir. Çok hücreli organizmalarda görülen geleneksel bir Ca<sup>+2</sup> ve Na<sup>+</sup> kanalı tek bir gen tarafından kodlanan 4 adet 6-TM peptid bölgesi içerirken TRP'ler tek tek kanal özelliği gösterebilmelerinin yanı sıra birden fazla üyesinin multimerik bileşimleri de kanal özelliklerini ve iyon seçiciliklerini değiştirebilmektedir. TM5 ve 6 segmentleri arasındaki hidrofobik halkanın iyon kanalı oluşturan por olduğu ve -NH<sub>2</sub> ve -COOH uçlarının sitoplazmada bulunduğu düşünülmektedir. TRP alttipleri homo- ya da heterotetramerik yapılar oluşturarak işlev göstermektedirler<sup>32, 37-39</sup>. İşlevsel TRP kanallarının *in vivo* ortamda bir araya gelişi homo/heteromultimerleşme ve yapısal proteinlerle etkileşerek yönetildikleri düşünülmektedir<sup>40</sup>. Farklı dokularda önerilen fizyolojik işlevler ile TRP kanallarının heterolog ekspresyon sistemlerinde gözlenen özellikleri arasındaki farklılıklar bu oluşumlar ile açıklanabilir.

**Tablo I:** TRPC kanalları için önerilen aktivasyon mekanizmaları, işlevleri ve ilişkili olduğu olası hastalıklar. SOC: Store-operated Ca<sup>2+</sup>; DAG: Diaçil gliserol.

Gen	Aktivasyon mekanizması	İşlevi	İlişkili olduğu hastalıklar	Kaynaklar
<b>TRPC1</b>	SOC?	Pürkinye hücrelerinde eksitatör postsinaptik akımın oluşumu, mekanosensör, büyüme konisinin yönlendirilmesi	Astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, B hücrelerinde bağışık yanıt yetersizliği, kalp hipertrofisi, nörodejeneratif bozukluklar, Duchenne kas distrofisi	(41-47)
<b>TRPC2</b>	SOC?, DAG	Feromon algılama	Hayvanlarda karşı cinsi tanımda bozukluk, davranış bozukluğu	(48, 49)
<b>TRPC3</b>	SOC, DAG, ekzositoz	BDNF-aracılı nöronal farklılaşma, vazomotor işlev, solunum yolunun düzenlenmesi, büyüme konisinin yönlendirilmesi	İdiyopatik pulmoner arteryal hipertansiyon, kalp hipertrofisi, esansiyel hipertansiyon	(50-52)
<b>TRPC4</b>	SOC?	vazomotor işlev, mikrovasküler geçirgenlik	Endotelyum-bağımlı gevşeme ve endotelyal bariyer işlevinde bozukluk	(53, 54)
<b>TRPC5</b>	SOC?, ekzositoz	Büyüme konisinin yönlendirilmesi, beyin gelişimi		(55)
<b>TRPC6</b>	DAG	Vazomotor işlev, düz kas kasılması, trombosit agregasyonu, mekanosensör	İdiyopatik pulmoner arteryal hipertansiyon, kalp hipertrofisi, Duchenne kas distrofisi, glomerüloskleroz, Alzheimer hastalığı	(46, 47, 50, 56-58).
<b>TRPC7</b>	SOC?, DAG	Bağışık yanıt	-	(59)

?: SOCC bileşiminde olup olmadığı kesinlik kazanmamıştır.

Memeli hücrelerinde depo boşalmasının ardından aktive olan SOCC ile *Drosophila*'da (ve *trp*-yoksun mutant) ışık ile aktive olan  $Ca^{+2}$  giriş yolağı arasındaki işlevsel benzerlik, SOCE'yi sağlayan proteinin, *trp* geni tarafından kodlanan protein ile benzerlik gösterebileceğini düşündürmektedir<sup>26</sup>. TRP kanalları voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının (*voltage-operated calcium channels*, VOCC)  $\alpha_1$ -alt biriminin membranı geçen bölümlerine yapısal olarak benzemesine karşın VOCC'lerde voltaja duyarlılığı oluşturduğu düşünülen çok sayıda pozitif yük taşıyan S4 bölgesi TRP proteininde bulunmamaktadır<sup>2</sup>. Ayrıca VOCC'lerin  $\alpha_1$ -alt birimi tek gen tarafından kodlanırken TRP kanallarının her biri farklı genler tarafından ifade edilmektedir.

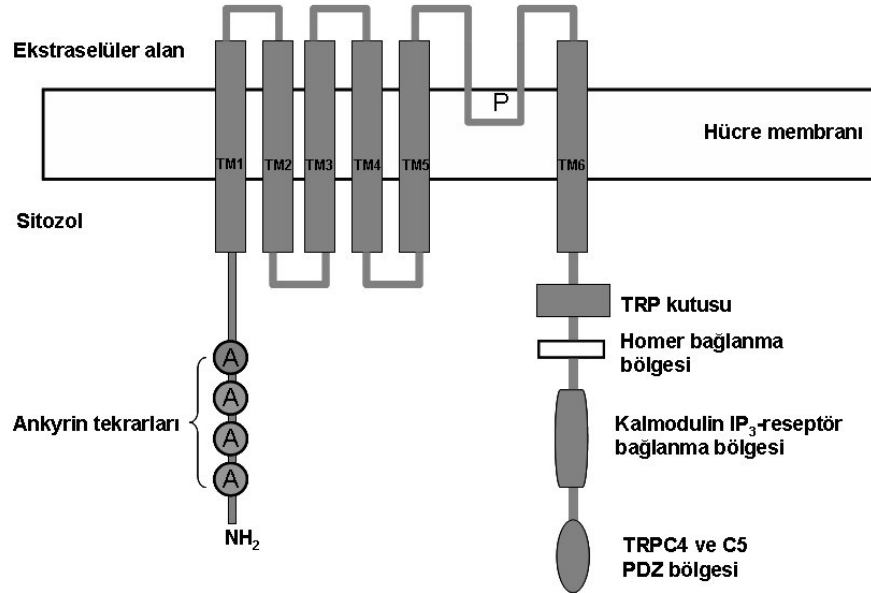
Hücre kültüründeki uyarılmış-ekspresyon çalışmaları ile hemen hemen tüm TRPC kanal proteinlerinin SERCA inhibitörleri ile aktive olabildiğinin gösterilmesi sonucunda TRPC kanallarının SOCC olarak tanımlanabileceği önerilmiştir<sup>60</sup>. SOC kanallarının temelini oluşturan TRPC'lerin moleküler kompozisyonu düşünüldüğünde en önemli konu bu proteinlerin hücrenin dinlenme/uyarılmış hali, bulunduğu dokunun/hücrenin tipi, endojen/heterojen ekspresyonu gibi özelliklere bağlı olarak homo/heteromultimer alt birimlerinin ve işlevlerinin farklı oluşudur.

Memelilerde toplam yedi adet TRPC proteini (TRPC1-7) belirlenmiştir<sup>29</sup>. TRPC ailesi dizi ve işlevsel benzerliklerine göre 3 alt gruba ayrılmaktadır: TRPC1/4/5, TRPC3/6/7 ve TRPC2<sup>37</sup>. Fare ve sıçanların aksine insanlarda sadece altı TRPC proteini eksprese edilmektedir, çünkü fare ve sıçanda vomeronazal organda feromon-duyargası olarak işlev gören TRPC2 proteinini kodlayan gen insan genomunda prematüre sonlanma bölgesi içerdiğinden yalancı gen (*pseudogene*) olarak tanımlanır<sup>61</sup>.

Yedi adet memeli TRPC alt tipinin sitoplazmik C-ucunda TRP kutusu (*TRP box*) olarak isimlendirilen değişmeyen bir amino asit dizisi bulunmaktadır. C-ucunda ayrıca evrim süresince korunmuş prolince zengin bir motif, kalmodulin/ $IP_3R$  bağlanma (*Calmodulin/ $IP_3R$  Binding*, CIRB) bölgesi ve çift bükülmüş sarmal (*coiled-coil*, CC) bölgesi olduğu önerilmektedir. Ayrıca TRPC4 ve TRPC5 proteinlerinin uzamış C-uçlarında bir PDZ (*Post-synaptic density protein*, *Disc-large tumour suppressor*, *Zonula occludens protein*)-bağlanma bölgesi bulunmaktadır.



N-ucunda 3 ya da 4 adet ankirin (ankyrin) tekrarları taşımaktadır<sup>37, 62</sup>. Ankirin tekrarlarının 33 aminoasitten oluştuğu ve protein-protein etkileşimlerine aracılık ettiği düşünülmektedir<sup>63</sup>. Diğer protein-protein etkileşim bölgelerinin aksine ankirin tekrarları korunmuş bir yapı ya da diziyi tanımamalarına karşın bağlanma ortakları ile bağlanma yüzeylerini birbirine uygun hale getirir. Bu nedenle TRPC ankirin tekrarları ile etkileşen bileşenlerin öngörülmesi zordur. Eğer TRP heteromerik kanalların bir alt birimi ise ankirin tekrarı TRP yerleşiminde ve alt birim etkileşimlerinde işlevsel olabilir (Şekil 2).



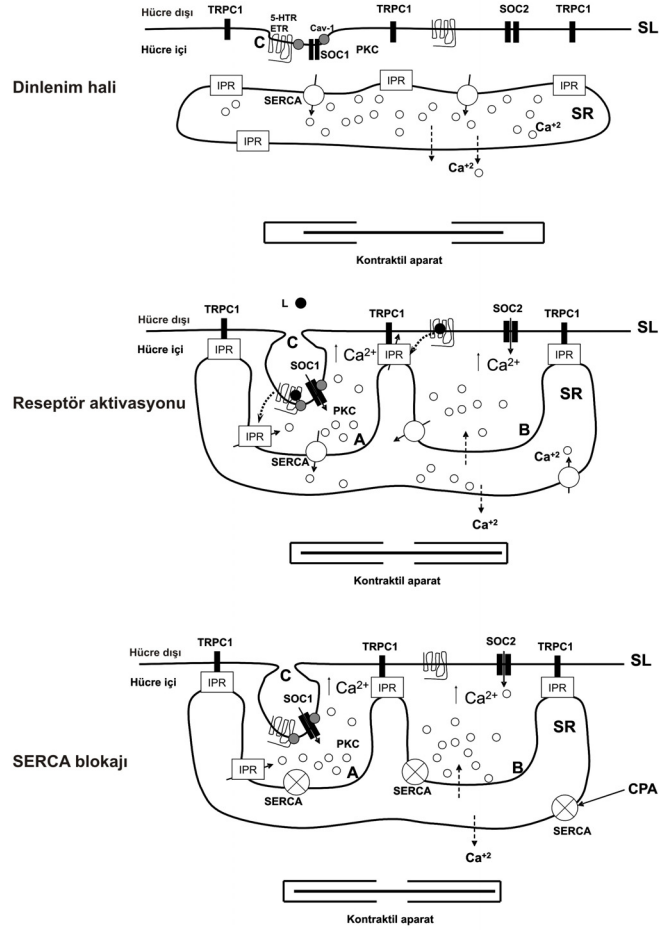
**Şekil 2:** TRPC ailesi için önerilen membran topolojisi. Kanalın düzenlenmesinde önerilen ve protein-protein etkileşimlerine aracılık eden önemli bölgeler belirtilmiştir. TM: transmembran, membranı geçen bölgeler; P: pore, iyon kanalı oluşturan bölge.

**TRPC1** yaygın doku dağılımı gösteren bir proteindir ve bu kanal için birçok aktivasyon mekanizması ve fizyolojik rol önerilmiştir. TRPC1 yüksek miktarlarda düz kas, beyin, kalp, testis, over, endotel hücreleri ve salgı bezlerinde eksprese edilmektedir<sup>63</sup>. TRPC1 proteinindeki E576K

(E, glutamik asit; K, lizin) ya da D581K (D, aspartik asit) mutasyonların SOCE'yi azaltırken  $\text{Na}^+$  akımını değiştirmemesi bu bölgenin  $\text{Ca}^{+2}$  selektivitesi için önemli olduğunu göstermektedir<sup>64</sup>. Geleneksel olarak bu tür mutasyonların selektif olmayan bir kanalın özellikle  $\text{Ca}^{+2}$  geçirgenliğini etkileyebileceği düşünülemez. TRPC1 kanalı genellikle SOCC'ler için bir aday olarak önerilmektedir<sup>65</sup>. Fakat bazı araştırmacılar tek başına eksprese olduğunda TRPC1 kanalının TG ya da  $\text{IP}_3$ 'ün neden olduğu depo-boşalmasına duyarlı olmadığını göstermişlerdir. TRPC1 kanalının sadece diğer TRPC izoformları ile heterotetramer yapılar oluşturarak kanal işlevi kazandığına ilişkin kanıtlar artmaktadır<sup>66</sup>.

TRPC1 damar düz kas hücresinde kasılma ve proliferasyonda önemli rol oynamaktadır. Sıçan kuyruk arterinde TRPC1 proteininin antikor ile blokajı endotelinin neden olduğu kasılmayı inhibe etmiştir<sup>67</sup>. TRPC1 protein ekspresyonu düz kas adaptasyonu ve proliferasyonunu başlatan koşullarda artmaktadır<sup>68</sup>.

TRPC1 proteininin subselüler lokalizasyonu ile ilgili olarak TRPC1'in hücre membranında kompartmantalize olduğuna ilişkin genel bir algılama vardır. Sıçan torasik aortunda  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  artışı ve kasılmanın eşzamanlı izlendiği bir çalışmamızda, 10  $\mu\text{M}$  CPA'nın neden olduğu  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  artışının kasılma oluşturmaması SOC'nin kasılabilir aparat içermeyen bir hücre içi kompartmanda hapsedildiğini düşündürmüştür<sup>14</sup>. Yine bu kompartmanda artan SOC'nin protein kinaz C ile kasılmaya kenetlenebileceği gösterilmiştir. Protein kinaz C aktivatörü forbol dibütirat varlığında oluşan kasılmayı 0,1 mM  $\text{Ni}^{+2}$  tamamen inhibe ederken SOC aracılı  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  artışını kısmen inhibe etmiştir. Bu bulgu kasılmaya kenetlenmeyen arta kalan SOCE'nin kontraktil aparat içermeyen farklı bir kompartmanda hapsedildiğini düşündürmüştür. Geri kalan bu  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  artışı nikelin artan derişimleri ile tamamen inhibe edilmiştir<sup>14</sup>. Güncel bilgilerimiz doğrultusunda elde edilen bu sonuçlar bize 0,1 mM nikelin selektif etkisinin farklı TRPC bileşimlerinin oluşturduğu farklı SOC kanallarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (Şekil 3). Ayrıca TRPC1'in aracılık ettiği SOCE'nin non-kontraktil subsarkolemmal bir kompartmanda gerçekteştiğinin gösterilmesi de TRPC1'in kısıtlı yerleşimini desteklemektedir<sup>69, 70</sup>.



**Şekil 3: Damar düz kası hücreleri için önerilen kaveolar yapı ve subsarkolemmal kompartmanları (A ve B) gösteren model.** Hücre dinlenim durumunda iken sarkoplazmik retikulum (SR) Ca<sup>2+</sup> ile doludur. Kaveolar membranda endotelin reseptörü (ETR), serotonin reseptörü (5-HTR) ve depo-kontrollü kanallar (SOC) gösterilmektedir. Kaveolada (caveola, C) yerleşik SOC bileşiminde TRPC1, C3 ve C4 proteinlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Kompartman A'da SOC1, B'de ise nikelin yüksek derişimleri ile inhibe olabilen SOC2'nin varlığı önerilmiştir (Ayrıntı için metne bakınız)<sup>14</sup>. SR membranında bulunan sarkoplazmik retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPaz (SERCA) sitozolden SR içerisine Ca<sup>2+</sup> alımını sağlar. Bu koşulda hücre eğer endotel hücreleri ise kontraktil aparat içermez ve endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) (şekilde gösterilmemiştir) kaveolin-1 (Cav-1) proteininin etkisiyle inaktif konumdadır. Ligand (L) reseptör etkileşimi sonucunda IP<sub>3</sub> reseptörü (IPR) aracılığı ile SR'den Ca<sup>2+</sup> salıverilir. Depoların kısmen boşalması SOC'lerin aktive olmasına neden olur. TRPC1 proteini IPR ile fiziksel olarak etkileşerek SOC aracılı Ca<sup>2+</sup> girişine aracılık eder. Endotel hücrelerinde [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> artışı eNOS'un Cav-1'den ayrılmasına neden olarak enzimin aktive olmasına yol açar. 10 µM CPA varlığında depolar tamamen boşalır ve tüm SOC'ler aktive olur. SOC: "Store-operated Channels", SL: hücre membranı, "sarcolemma".

Hücre membranında kaveola olarak tanımlanan bölgeler benzersiz bir kaplama proteini olan kaveoline (*caveolin*, Cav-1) zengindir. Kolesterol ve protein içeriği de yüksek olan bu membran alanları özellikle düz kas, endotel hücreleri ve fibroblastlarda yoğun olarak bulunmakta ve endositoz, transitoz, kalsiyum sinyali, kolesterol taşınımı gibi birçok sinyal iletim yolağında rol oynamaktadır<sup>71</sup>. Düz kas hücrelerinin kasılma /gevşeme döngüsü süresince kalsiyumun ekstraselüler alandan sitoplazmaya translokasyonunda kaveolanın rol oynadığı bildirilmiştir<sup>72</sup>. Birbirinden bağımsız birçok çalışmada TRPC (TRPC1, TRPC3 ve TRPC4), endotelin reseptörü (ETR), serotonin reseptörü (5-HTR), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve bu proteinlerle ilişkili sinyal yollarında görev alan çeşitli proteinlerin (IP<sub>3</sub>R, G<sub>αq/11</sub>, PLC-β proteini gibi) Cav-1 proteini ile birlikte bulunduğu gösterilmiştir<sup>67, 73-78</sup>. Cav-1 bağlanması genellikle aromatik amino asitlerce zengin bölgelerde meydana gelmektedir. TRPC ailesinin tüm üyelerinin sitozolik N-ucunun TM1'e yakın bölgesinde böyle bir korunmuş bölge bulunmaktadır. Bu bölgenin yokluğu TRPC1'in hücre membranına hedeflenmesini önler ve böylece SOCE'yi etkiler<sup>79</sup>.

Depo boşalmasına yanıt olarak ekstraselüler alandan gerçekleşen Ca<sup>+2</sup> girişi için kaveolar bölgeler tercih edilir. Siklodekstrin ile kolesterolün tüketilmesi sonucunda kaveolar yapının bozulduğu bir çalışmada kaveolada lokalize TRPC1 proteini aracılı SOCE'nin<sup>74</sup> ve endotelial-1 (ET-1)'in neden olduğu TRPC1-bağımlı kasılmaların inhibe olduğu gösterilmiştir<sup>67</sup>. Aynı yöntemin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise α<sub>1</sub>-adrenerjik reseptör ve membran depolarizasyonu aracılı kasılma yanıtları inhibe olmazken 5-HT, vazopresin ve ET-1 yanıtlarının %50'den fazla azaldığı gösterilmiştir<sup>80</sup>. Bu bulgular ET-1 ve 5-HT gibi ajanların yanıtlarının oluşumunda kaveolar yapının gerekliliğini göstermiştir. Sıçan torasik aortunda ise ETR blokörü BQ123 ET-1 yanıtlarını tamamen bloke ederken SERCA inhibisyonu varlığında ET-1 kasılmalarını kısmen bloke edebilmiştir. Bu durum SOCE'nin ETR'nin kaveola ile birlikte internalizasyonunu artırarak ETR aracılı kasılmaların uzamasına neden olacağını düşündürmüştür<sup>81</sup>. Reseptör internalizasyonunun artışı istenmeyen düzeydeki vazospastik olguların tedaviye yanıtını azaltması açısından klinik önem taşıyabilir.

**TRPC3** esas olarak beyin, düz kas ve kalp kası hücrelerinde eksprese olmaktadır. TRPC3 diaçil gliserol (DAG) ile aktive olan

reseptör-kontrollü kanallar olan TRPC3/6/7 alt ailesine dahildir. ROCC'ler agonistin kanal proteininden farklı yerde bulunan PLC-kenetli membran reseptörüne bağlanması ile aktive olmaktadır. Kanal DAG ile uyarılabilir de TRPC3 TRPC6'nın aksine yüksek bir yapısal aktiviteye sahiptir<sup>40</sup>. TRPC6 geninin susturulması sonucunda yapısal olarak aktif TRPC3 kanalları TRPC6'nın yerini almış ve düz kasa bazal ya da agonist-aracılı  $Ca^{+2}$  girişi artmıştır. Sonuç olarak, TRPC6 yoksun düz kas hücrelerinin yabancı tip hücrelere göre daha fazla depolarize olması, VOCC'lerin de aktivasyonuna neden olarak düz kasın tonusunu artırır<sup>82</sup>.

TRPC3 kanalının kalp kası, nöron ve endokrin hücrelerinde aktif olan  $Na^+-Ca^{+2}$  değiş-tokuşucusu 1 ( $Na^+-Ca^{+2}$  *exchanger*, NCX1) ile kenetli olduğu gösterilmiştir. NCX1 iyon değişiminin yönü membran potansiyeli ve  $Na^+/Ca^{+2}$  derişim farkı ile belirlenmektedir. PLC'nin reseptör-aracılı uyarılması hücre içi  $Ca^{+2}$  derişimindeki artış ile sonuçlanır ve bu artış NCX'in ileri (*forward*) modunu aktive ederek, TRPC3 kanalı aracılığı ile  $Na^+$  girişine neden olur.  $Na^+$  girişi ile VOCC'ler aktive olur ve yüksek  $[Ca^{+2}]_i$  derişimi ile baskılanan bu kanalların inhibisyonu gecikir. NCX hücrel  $Ca^{+2}$  sinyalinin iki yönlü olarak yönetebildiği için TRPC3 kanalları ile böyle bir  $Na^+$  girişindeki artış sonuç olarak hücre içi  $Ca^{+2}$  derişimini artıran,  $Na^+$  derişimini azaltan, VOCC'leri inhibe eden ve  $Ca^{+2}$  depolarını yeniden dolduran NCX'in ters (*reverse*) modda çalışmasına neden olur<sup>83, 84</sup>. Bu durum her iki proteinin de eksprese edildiği düz kas hücreleri için önemli olabilir.

HEK-293 hücrelerinde TRPC3 kanal aktivitesi ve yerleşiminde hücre iskeletinin işlevini araştıran bir çalışmada, TRPC3'ün Cav-1 ve yine Cav-1 ile ilişkili temel  $Ca^{+2}$  sinyal proteinlerini (IP<sub>3</sub>R, SERCA, Gα<sub>q/11</sub>, PLC-β) içeren multimerik kompleksler ile birlikte kaveolada lokalize olduğu gösterilmiştir. Bu kompleksin kaveola ile birlikte internalizasyonu TRPC3 kanal aktivitesinin kaybolmasına neden olmuştur<sup>73</sup>.

**TRPC4** proteini düz kas ve endotelyumda yoğun olarak eksprese edilmektedir<sup>85</sup>. TRPC4- yoksun mutant farelerle gerçekleştirilen çalışmada fare vasküler endotel hücrelerinde SOCE'nin tamamen kaybolduğu ve endotelyuma-bağlı asetilkolinin neden olduğu gevşeme yanıtlarının<sup>53</sup> ve endotelial geçirgenliğin azaldığı gösterilmiştir<sup>(54)</sup>.

TRPC4 geninin ekspresyonunun transkripsiyonel düzeyde siRNA aracılığı ile baskılandığı bir başka çalışmada da SOCE'nin azaldığı bildirilmiştir<sup>86</sup>. Bir diğer TRPC4 knock-out çalışmasında Dr. Lee ve arkadaşları TRPC4 proteininin muskarinik reseptörlerin aktive ettiği nonselektif katyon kanallarının önemli bir komponenti olduğunu göstermişlerdir<sup>87</sup>. İmmunohistokimya ve elektron mikroskopisi çalışmalarında TRPC4 proteininin daha çok kaveolada lokalize olduğu ve Cav-1 proteini ile birlikte eksprese olduğu gösterilmiştir<sup>75</sup>.

Birçok sinyal molekülünce zengin bölgeler olan kaveolada eNOS aktivitesini düzenleyen Ca<sup>+2</sup>-bağlayan protein kalmodulin de bol miktarda bulunmaktadır<sup>88</sup>. Nitrik oksit (NO) üretimi için eNOS'un kalmoduline bağlanması gerekmektedir. eNOS Cav-1'e bağlı iken inaktif durumdadır. Endotel hücresinin uyarılmasına yanıt olarak kalsiyumun kalmoduline bağlanması kaveolinin eNOS'tan ayrılmasına neden olur<sup>89</sup>. Cav-1'in eNOS ile negatif yönde etkileşerek asetilkolinin neden olduğu endotelyuma bağımlı gevşeme yanıtlarını azalttığı gösterilmiştir<sup>77</sup>. SOCC'ler aracılığı ile kaveolar membrandan giren Ca<sup>+2</sup> Cav-1'in eNOS üzerindeki inhibitör etkisini kaldırarak NO üretimini uyarır<sup>72, 78</sup>. Birbirinden bağımsız gerçekleştirilen bu çalışmalar TRPC4, eNOS, Cav-1 proteinlerinin, SOCE ve kaveolanın normal damar işlevlerinin sürdürülmesinde kritik rol oynayan endotelyum için ortak bir sinyal yolağının bileşenleri olduğunu düşündürmektedir.

Depo-aracılı sinyal yolağının işlevsel üyelerinin ekspresyon düzeylerinin karşılıklı kontrol edildiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Seth ve arkadaşları kalp hücrelerinde SERCA2 genini siRNA ile susturmuşlardır<sup>90</sup>. Bu çalışmanın sonunda SERCA2 ekspresyonundaki azalmaya paralel olarak TRPC4 ve TRPC5 ekspresyonlarında belirgin bir artış gözlenmiştir. SERCA pompası sitozoldeki Ca<sup>+2</sup> derişimini dengelemek üzere SR içerisine aktif şekilde Ca<sup>+2</sup> alımına neden olmaktadır. Deponun içeriğinin azalmasına neden olan bu işlev kaybı depoların dolmasına aracılık eden SOCC'lerden TRPC4 ve TRPC5 proteinlerinin ekspresyonundaki artış ile kompanse ediliyor olabilir. Yaşlanmanın TRPC ekspresyonları üzerine etkilerini araştırdığımız çalışmamızda yaşlı sıçanlarda TRPC1 proteininin ekspresyonu azalırken TRPC6 ekspresyonu artmıştır<sup>91</sup>. Yaşlanma çalışmamızdaki koşulları oluşturmak amacıyla vasküler hücre kültüründe siRNA ile TRPC1 genini baskıladığımız bir diğer çalışmamızda da benzer sonuçlar elde

edilmiştir<sup>92</sup>. TRPC ve diğer  $Ca^{+2}$  sinyal yolağı proteinleri arasında ekspresyon düzeyindeki bu etkileşimin nedensel ya da kompanse edici olup olmadığının belirlenmesi tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır.

**TRPC6** en fazla akciğer dokusunda dağılım gösteren ve depodan bağımsız bir şekilde reseptör aracılı aktive olan DAG-duyarlı bir katyon kanalıdır<sup>93</sup>. Bu kanallar hücre membranının altındaki veziküllerde tutulur ve reseptör aktivasyonuna yanıt olarak hızla hücre membranına taşınır<sup>94</sup>. TRPC6 kanalının damar ve pulmoner düz kas hücrelerinde önemli işlevi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Antisens oligonükleotidler kullanılarak TRPC6 geninin susturulduğu bir çalışmada TRPC6'nın vasküler  $\alpha_1$ -adrenerjik reseptörlerin aktive ettiği  $Ca^{+2}$  kanallarının önemli bir bileşeni olduğu gösterilmiştir<sup>95</sup>. TRPC6, A7r5 vasküler düz kas hücre hatlarında vazopresin, serotonin ve trombosit-kaynaklı büyüme faktörü (*platelet-derived growth factor*, PDGF) ile uyarılan  $Ca^{+2}$  kanallarını oluşturmaktadır<sup>96</sup>. TRPC6-yoksun mutant farelerde damar düz kas kontraktilesinde azalma ve hipotansiyon oluşturması beklenirken, agonist-aracılı yanıtlar belirgin olarak yükselmiştir<sup>82</sup>. Söz konusu durum TRPC3 artışıyla ilişkilendirilmekle beraber TRPC6 yokluğunun işlevsel olarak kompanse edilememesi vasküler tonusun düzenlenmesinde TRPC6'nın temel protein olduğunu düşündürmektedir<sup>82</sup>.

#### *Sonuç ve geleceğe dönük uygulamalar*

TRP kanallarının birçok fizyolojik olayda hücrel algılayıcılar olarak önemli işlevleri olduğu önerilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular TRPC ailesinin SOCC ve ROCC'ler ile moleküler ve işlevsel ilişkisi olduğunu göstermiştir. Bu kanallar ile çalışmanın en büyük zorluğu ise farmakolojik modülatörlerinin bulunmamasıdır. Spesifik antagonistlerinin yokluğunun yanı sıra multimerik iyon kanalını oluşturan üyelerinin dokuya veya strese bağlı olarak değişim göstermesi TRP araştırmalarını daha da karmaşık duruma getirmektedir. Günümüzde TRPC proteinlerinin aktivasyon mekanizması ve fizyolojik işlevi tam olarak bilinmemektedir. Astım, pulmoner hipertansiyon gibi çeşitli vasküler hastalıkların yanı sıra bazı kanser tiplerinin tedavisinde yeni ilaç hedefleri olabilecek TRPC kanallarının işlevsel bileşimi ve hücre içi sinyal mekanizmaları, RNA

interferans-aracılı post-transkripsiyonel gen susturma ile oluşturulabilecek işlev kaybı olan fenotipin (*loss of function fenotype*) ve transgenik “knock-out” fare modellerinin geliştirilmesi ile netlik kazanabilecektir.

### Özet

#### **Kalsiyumun çok yönlü işlevselliğinde TRPC iyon kanallarının rolü**

İlk defa 1986 yılında meyve sineği *D. melanogaster* görme sisteminde varlığı gösterilen “*Transient receptor potential, trp*” iyon kanal proteinlerinin memeli homologlarının bulunması yeni bir kalsiyum homeostaz mekanizmasını gündeme getirmiştir. Başlangıçta sadece uyarılamayan hücrelerin kalsiyum homeostazında işlevsel olduğu düşünülen bazı TRP kanal proteinlerinin aracılık ettiği depo-kontrollü  $Ca^{+2}$  girişi “*store-operated calcium entry, SOCE*”nin uyarılabilen hücreler için de kritik olduğu bulunmuştur. SOCE’de işlev gören TRP’ler hücre içi  $Ca^{+2}$  depolarının boşalması ile uyarılmaktadır. Bu da hücrenin geleneksel olarak dış uyarıların yanı sıra içsel gereksinimler doğrultusunda da membran iyon geçirgenliğini değiştirebileceği olgusunu ortaya koymuştur. SOCE’ye katılan  $Ca^{+2}$  kanalları diğer katyon kanallarından farklı olarak altbirim bileşimini yer ve zamana bağlı olarak değiştirme yeteneğine sahiptir. SOCE’yi farklı kılan bu özellik bize fizyolojik ve patofizyolojik sinyal yollarının araştırılmasında önemli bir fırsat vermiştir. Proliferatif ve antiapoptotik süreçlerle ilişkili olduğu gösterilen TRP üyeleri ise klinikte yeni hedeflerin belirlenmesine aracılık etmektedir. Çeşitli duyuşsal algılama, proliferasyon ve apoptotik süreçlerdeki önemlerine ilişkin artan kanıtların varlığına karşın bu derlemenin kapsamı içinde sadece klasik TRP iyon kanal proteinleri olan TRPC’lerin vasküler düz kas ve endotel hücre membranlarının özelleşmiş bölgelerindeki işlevsellikleri tartışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** depo kontrollü kalsiyum, L-NAME, siklopiazonik asit, torasik aort.



*Summary***Role of Endothelium on Cyclopiazonic Acid-induced Vascular Contractions in Rat Aorta**

This study investigates the mechanism of action of store-operated calcium entry (SOCE) on vascular responses in isolated rat thoracic aorta. For this purpose, effects of cyclopiazonic acid (CPA), a selective blocker of sarcoplasmic-endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase (SERCA) were tested by the use of nitric oxide synthase (NOS) and cyclooxygenase enzyme inhibitors in intact as well as in endothelium-denuded tissues. In intact vessels, the transient contractile response induced by CPA, at concentrations (10  $\mu$ M) that reportedly deplete the intracellular  $Ca^{2+}$  stores, was elevated drastically in the presence of L-NAME whereas it was inhibited by indomethacin. On the other hand, CPA elicited persistent and significant contractions in deendothelialized vessels despite the presence of both enzyme inhibitors. The data show that while CPA-induced store-operated calcium entry stimulates the release of vasoconstricting substances from endothelium and smooth muscle it also reverses the vasoconstriction via activating NOS. In conclusion, aging- or disease-related SERCA down-regulation accompanied by endothelial dysfunction may lead to detrimental vasospasms.

**Keywords:** store-operated calcium, L-NAME, cyclopiazonic acid, thoracic aorta.

## KAYNAKLAR

1. Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L.: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7), 517-29 (2003)
2. McFadzean, I. and Gibson, A.: The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 135(1), 1-13 (2002)
3. Sanders, K.M.: Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol*, 91(3), 1438-49 (2001)
4. Putney, J.W., Jr.: A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1), 1-12 (1986)
5. Putney, J.W., Jr., Broad, L.M., Braun, F.J., Lievreumont, J.P., and Bird, G.S.: Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci*, 114(Pt 12), 2223-9 (2001)
6. Winslow, M.M., Neilson, J.R., and Crabtree, G.R.: Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 15(3), 299-307 (2003)
7. Lewis, R.S.: Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 19(497-521) (2001)
8. Fagan, K.A., Smith, K.E., and Cooper, D.M.: Regulation of the Ca<sup>2+</sup>-inhibitable adenylyl cyclase type VI by capacitative Ca<sup>2+</sup> entry requires localization in cholesterol-rich domains. *J Biol Chem*, 275(34), 26530-7 (2000)
9. Hoth, M. and Penner, R.: Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355(6358), 353-6 (1992)
10. Parekh, A.B. and Penner, R.: Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*, 77(4), 901-30 (1997)
11. Thastrup, O.: Role of Ca<sup>2+</sup>-ATPases in regulation of cellular Ca<sup>2+</sup> signalling, as studied with the selective microsomal Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions*, 29(1-2), 8-15 (1990)
12. Seidler, N.W., Jona, I., Vegh, M., and Martonosi, A.: Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 264(30), 17816-23 (1989)
13. Moore, G.A., McConkey, D.J., Kass, G.E., O'Brien, P.J., and Orrenius, S.: 2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone--a novel inhibitor of liver microsomal Ca<sup>2+</sup> sequestration. *FEBS Lett*, 224(2), 331-6 (1987)
14. Tosun, M., Paul, R.J., and Rapoport, R.M.: Coupling of store-operated Ca<sup>++</sup> entry to contraction in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 285(2), 759-66 (1998)
15. Takahashi, M., Seagar, M.J., Jones, J.F., Reber, B.F., and Catterall, W.A.: Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(15), 5478-82 (1987)
16. Randriamampita, C. and Tsien, R.Y.: Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores releases a novel small messenger that stimulates Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature*, 364(6440), 809-14 (1993)
17. Fasolato, C., Hoth, M., and Penner, R.: A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J Biol Chem*, 268(28), 20737-40 (1993)

18. Bezzerides, V.J., Ramsey, I.S., Kotecha, S., Greka, A., and Clapham, D.E.: Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol*, 6(8), 709-20 (2004)
19. Irvine, R.F.: 'Quantal' Ca<sup>2+</sup> release and the control of Ca<sup>2+</sup> entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett*, 263(1), 5-9 (1990)
20. Rosado, J.A.: Discovering the mechanism of capacitative calcium entry. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(6), C1104-6 (2006)
21. Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Jr., and Meyer, T.: STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol*, 15(13), 1235-41 (2005)
22. Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D.: STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature*, 437(7060), 902-5 (2005)
23. Spassova, M.A., Soboloff, J., He, L.P., Xu, W., Dziadek, M.A., and Gill, D.L.: STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(11), 4040-5 (2006)
24. Cosens, D.J. and Manning, A.: Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224(5216), 285-7 (1969)
25. Bloomquist, B.T., Shortridge, R.D., Schnewly, S., Perdew, M., Montell, C., Steller, H., Rubin, G., and Pak, W.L.: Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA*, and its role in phototransduction. *Cell*, 54(5), 723-33 (1988)
26. Hardie, R.C. and Minke, B.: Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of Ca<sup>2+</sup> and *trp*. *Cell Calcium*, 18(4), 256-74 (1995)
27. Zhu, X., Chu, P.B., Peyton, M., and Birnbaumer, L.: Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila trp* gene. *FEBS Lett*, 373(3), 193-8 (1995)
28. Wes, P.D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., and Montell, C.: TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(21), 9652-6 (1995)
29. Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L.: *trp*, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell*, 85(5), 661-71 (1996)
30. Minke, B. and Selinger, Z.: The roles of *trp* and calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol*, 6(4), 459-66 (1996)
31. Minke, B.: TRP channels and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Calcium*, 40(3), 261-75 (2006)
32. Clapham, D.E.: TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), 517-24 (2003)
33. Corey, D.P.: New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron*, 39(4), 585-8 (2003)
34. Delmas, P.: Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell*, 118(2), 145-8 (2004)
35. Montell, C., Birnbaumer, L., and Flockerzi, V.: The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, 108(5), 595-8 (2002)
36. Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S., Andahazy, M., Story, G.M., and Patapoutian, A.: Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*, 307(5714), 1468-72 (2005)

37. Clapham, D.E., Julius, D., Montell, C., and Schultz, G.: International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*, 57(4), 427-50 (2005)
38. Vannier, B., Zhu, X., Brown, D., and Birnbaumer, L.: The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J Biol Chem*, 273(15), 8675-9 (1998)
39. Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T.: Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7461-6 (2002)
40. Dietrich, A., Chubanov, V., Kalwa, H., Rost, B.R., and Gudermann, T.: Cation channels of the transient receptor potential superfamily: Their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacol Ther*, 112(3), 744-60 (2006)
41. Sweeney, M., McDaniel, S.S., Platoshyn, O., Zhang, S., Yu, Y., Lapp, B.R., Zhao, Y., Thistlethwaite, P.A., and Yuan, J.X.: Role of capacitativ Ca<sup>2+</sup> entry in bronchial contraction and remodeling. *J Appl Physiol*, 92(4), 1594-602 (2002)
42. Kumar, B., Dreja, K., Shah, S.S., Cheong, A., Xu, S.Z., Sukumar, P., Naylor, J., Forte, A., Cipollaro, M., McHugh, D., Kingston, P.A., Heagerty, A.M., Munsch, C.M., Bergdahl, A., Hultgardh-Nilsson, A., Gomez, M.F., Porter, K.E., Hellstrand, P., and Beech, D.J.: Upregulated TRPC1 channel in vascular injury in vivo and its role in human neointimal hyperplasia. *Circ Res*, 98(4), 557-63 (2006)
43. Mori, Y., Wakamori, M., Miyakawa, T., Hermosura, M., Hara, Y., Nishida, M., Hirose, K., Mizushima, A., Kurosaki, M., Mori, E., Gotoh, K., Okada, T., Fleig, A., Penner, R., Iino, M., and Kurosaki, T.: Transient receptor potential 1 regulates capacitativ Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *J Exp Med*, 195(6), 673-81 (2002)
44. Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., Mori, Y., Ono, K., Iijima, T., and Ito, H.: Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 42(3), 498-507 (2007)
45. Bollimuntha, S., Singh, B.B., Shavali, S., Sharma, S.K., and Ebadi, M.: TRPC1-mediated inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion neurotoxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 280(3), 2132-40 (2005)
46. Gailly, P.: New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*, 1600(1-2), 38-44 (2002)
47. Vandebrouck, C., Martin, D., Colson-Van Schoor, M., Debaix, H., and Gailly, P.: Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol*, 158(6), 1089-96 (2002)
48. Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C., and Koentges, G.: Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science*, 295(5559), 1493-500 (2002)
49. Leypold, B.G., Yu, C.R., Leinders-Zufall, T., Kim, M.M., Zufall, F., and Axel, R.: Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(9), 6376-81 (2002)
50. Yu, Y., Fantozzi, I., Remillard, C.V., Landsberg, J.W., Kunichika, N., Platoshyn, O., Tigno, D.D., Thistlethwaite, P.A., Rubin, L.J., and Yuan, J.X.: Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(38), 13861-6 (2004)
51. Bush, E.W., Hood, D.B., Papst, P.J., Chapo, J.A., Minobe, W., Bristow, M.R., Olson, E.N., and McKinsey, T.A.: Canonical transient receptor potential channels

- promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. *J Biol Chem*, 281(44), 33487-96 (2006)
52. Liu, D., Scholze, A., Zhu, Z., Kreutz, R., Wehland-von-Trebra, M., Zidek, W., and Tepel, M.: Increased transient receptor potential channel TRPC3 expression in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 18(11), 1503-7 (2005)
  53. Freichel, M., Suh, S.H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V., and Nilius, B.: Lack of an endothelial store-operated  $Ca^{2+}$  current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4<sup>-/-</sup> mice. *Nat Cell Biol*, 3(2), 121-7 (2001)
  54. Tiruppathi, C., Freichel, M., Vogel, S.M., Paria, B.C., Mehta, D., Flockerzi, V., and Malik, A.B.: Impairment of store-operated  $Ca^{2+}$  entry in TRPC4<sup>+/-</sup> mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ Res*, 91(1), 70-6 (2002)
  55. Greka, A., Navarro, B., Oancea, E., Duggan, A., and Clapham, D.E.: TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat Neurosci*, 6(8), 837-45 (2003)
  56. Kuwahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Hill, J.A., and Olson, E.N.: TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest*, 116(12), 3114-26 (2006)
  57. Winn, M.P., Conlon, P.J., Lynn, K.L., Farrington, M.K., Creazzo, T., Hawkins, A.F., Daskalakis, N., Kwan, S.Y., Ebersviller, S., Burchette, J.L., Pericak-Vance, M.A., Howell, D.N., Vance, J.M., and Rosenberg, P.B.: A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, 308(5729), 1801-4 (2005)
  58. Lessard, C.B., Lussier, M.P., Cayouette, S., Bourque, G., and Boulay, G.: The overexpression of presenilin2 and Alzheimer's-disease-linked presenilin2 variants influences TRPC6-enhanced  $Ca^{2+}$  entry into HEK293 cells. *Cell Signal*, 17(4), 437-45 (2005)
  59. Lievreumont, J.P., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr.: Mechanism of inhibition of TRPC cation channels by 2-aminoethoxydiphenylborane. *Mol Pharmacol*, 68(3), 758-62 (2005)
  60. Parekh, A.B. and Putney, J.W., Jr.: Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 85(2), 757-810 (2005)
  61. Vannier, B., Peyton, M., Boulay, G., Brown, D., Qin, N., Jiang, M., Zhu, X., and Birnbaumer, L.: Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative  $Ca^{2+}$  entry channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5), 2060-4 (1999)
  62. Montell, C.: The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, 2005(272), re3 (2005)
  63. Minke, B. and Cook, B.: TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev*, 82(2), 429-72 (2002)
  64. Liu, X., Singh, B.B., and Ambudkar, I.S.: TRPC1 is required for functional store-operated  $Ca^{2+}$  channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region. *J Biol Chem*, 278(13), 11337-43 (2003)
  65. Beech, D.J., Xu, S.Z., McHugh, D., and Flemming, R.: TRPC1 store-operated cationic channel subunit. *Cell Calcium*, 33(5-6), 433-40 (2003)
  66. Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E.: TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron*, 29(3), 645-55 (2001)
  67. Bergdahl, A., Gomez, M.F., Dreja, K., Xu, S.Z., Adner, M., Beech, D.J., Broman, J., Hellstrand, P., and Sward, K.: Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to

- endothelin-1 by reducing store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry dependent on TRPC1. *Circ Res*, 93(9), 839-47 (2003)
68. Bergdahl, A., Gomez, M.F., Wihlborg, A.K., Erlinge, D., Eyjolfson, A., Xu, S.Z., Beech, D.J., Dreja, K., and Hellstrand, P.: Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: correlation with store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(4), C872-80 (2005)
  69. Flemming, R., Cheong, A., Dedman, A.M., and Beech, D.J.: Discrete store-operated calcium influx into an intracellular compartment in rabbit arteriolar smooth muscle. *J Physiol*, 543(Pt 2), 455-64 (2002)
  70. Flemming, R., Xu, S.Z., and Beech, D.J.: Pharmacological profile of store-operated channels in cerebral arteriolar smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 139(5), 955-65 (2003)
  71. Parton, R.G. and Simons, K.: The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(3), 185-94 (2007)
  72. Isshiki, M. and Anderson, R.G.: Function of caveolae in  $\text{Ca}^{2+}$  entry and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signal transduction. *Traffic*, 4(11), 717-23 (2003)
  73. Lockwich, T., Singh, B.B., Liu, X., and Ambudkar, I.S.: Stabilization of cortical actin induces internalization of transient receptor potential 3 (Trp3)-associated caveolar  $\text{Ca}^{2+}$  signaling complex and loss of  $\text{Ca}^{2+}$  influx without disruption of Trp3-inositol trisphosphate receptor association. *J Biol Chem*, 276(45), 42401-8 (2001)
  74. Lockwich, T.P., Liu, X., Singh, B.B., Jadlovec, J., Weiland, S., and Ambudkar, I.S.: Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J Biol Chem*, 275(16), 11934-42 (2000)
  75. Torihashi, S., Fujimoto, T., Trost, C., and Nakayama, S.: Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol Chem*, 277(21), 19191-7 (2002)
  76. Garcia-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B.S., Skidd, P.M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M.P., and Sessa, W.C.: Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem*, 272(41), 25437-40 (1997)
  77. Bucci, M., Gratton, J.P., Rudic, R.D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G., and Sessa, W.C.: In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med*, 6(12), 1362-7 (2000)
  78. Maniatis, N.A., Brovkovich, V., Allen, S.E., John, T.A., Shajahan, A.N., Tiruppathi, C., Vogel, S.M., Skidgel, R.A., Malik, A.B., and Minshall, R.D.: Novel mechanism of endothelial nitric oxide synthase activation mediated by caveolae internalization in endothelial cells. *Circ Res*, 99(8), 870-7 (2006)
  79. Brazer, S.C., Singh, B.B., Liu, X., Swaim, W., and Ambudkar, I.S.: Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *J Biol Chem*, 278(29), 27208-15 (2003)
  80. Dreja, K., Voldstedlund, M., Vinten, J., Tranum-Jensen, J., Hellstrand, P., and Sward, K.: Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(8), 1267-72 (2002)
  81. Tosun, M., Erac, Y., Selli, C., and Karakaya, N.: Sarcoplasmic-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibition prevents endothelin A receptor antagonism in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(4), H1961-6 (2007)
  82. Dietrich, A., Mederos, Y.S.M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovska, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., Essin, K., Pinkenburg, O., Luft, F.C., Gudermann, T., and Birnbaumer, L.: Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol*, 25(16), 6980-9 (2005)

83. Eder, P., Poteser, M., Romanin, C., and Groschner, K.: Na<sup>+</sup> entry and modulation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange as a key mechanism of TRPC signaling. *Pflugers Arch*, 451(1), 99-104 (2005)
84. Rosker, C., Graziani, A., Lukas, M., Eder, P., Zhu, M.X., Romanin, C., and Groschner, K.: Ca<sup>2+</sup> signaling by TRPC3 involves Na<sup>+</sup> entry and local coupling to the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Biol Chem*, 279(14), 13696-704 (2004)
85. Beech, D.J., Muraki, K., and Flemming, R.: Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP. *J Physiol*, 559(Pt 3), 685-706 (2004)
86. Zhang, S., Remillard, C.V., Fantozzi, I., and Yuan, J.X.: ATP-induced mitogenesis is mediated by cyclic AMP response element-binding protein-enhanced TRPC4 expression and activity in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(5), C1192-201 (2004)
87. Lee, K.P., Jun, J.Y., Chang, I.Y., Suh, S.H., So, I., and Kim, K.W.: TRPC4 is an essential component of the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in mouse visceral smooth muscle cells. *Mol Cells*, 20(3), 435-41 (2005)
88. Shaul, P.W., Smart, E.J., Robinson, L.J., German, Z., Yuhanna, I.S., Ying, Y., Anderson, R.G., and Michel, T.: Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem*, 271(11), 6518-22 (1996)
89. Michel, J.B., Feron, O., Sacks, D., and Michel, T.: Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem*, 272(25), 15583-6 (1997)
90. Seth, M., Sumbilla, C., Mullen, S.P., Lewis, D., Klein, M.G., Hussain, A., Soboloff, J., Gill, D.L., and Inesi, G.: Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) gene silencing and remodeling of the Ca<sup>2+</sup> signaling mechanism in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(47), 16683-8 (2004)
91. Erac, Y., Selli, C., Aydin, I.T., Kosova, B., Akcali, K.C., and Tosun, M.: Expressional and functional profile of TRPC gene family in aging rat aorta. *Febs J*, 273(S1), 121 (2006)
92. Selli, C., Erac, Y., Kosova, B., and Tosun, M.: Post-transcriptional silencing of TRPC1 ion channel gene by RNA interference upregulates TRPC6 expression and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in A7r5 vascular smooth muscle cells *Vascul Pharmacol*, (2009) DOI: 10.1016/j.vph.2009.04.001
93. Boulay, G., Zhu, X., Peyton, M., Jiang, M., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L.: Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem*, 272(47), 29672-80 (1997)
94. Cayouette, S., Lussier, M.P., Mathieu, E.L., Bousquet, S.M., and Boulay, G.: Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem*, 279(8), 7241-6 (2004)
95. Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y., and Mori, Y.: The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor-activated Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel. *Circ Res*, 88(3), 325-32 (2001)
96. Jung, S., Strotmann, R., Schultz, G., and Plant, T.D.: TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(2), C347-59 (2002)

