

Aus dem Bereich Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Die Rolle von TRPC-Kanälen in Astrozyten des Rückenmarks

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von: Nicolaus Maria Fraundorfer
geb. am: 14. November 1990, in Roding

Tag der Promotion: 13. Juni 2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Stephan Philipp

Prof. Dr. Barbara Niemeyer-Hoth

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Astrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS).....	3
2.2 Calcium und Ca ²⁺ -Signale	3
2.3 <i>Transient Receptor Potential</i> (TRP)-Kanäle.....	5
2.4 Die Unterfamilie der TRPC-Kanäle	6
2.4.1 TRPC1	7
2.4.2 TRPC2	7
2.4.3 TRPC3	8
2.4.4 TRPC4	9
2.4.5 TRPC5	10
2.4.6 TRPC6	11
2.4.7 TRPC7	11
2.5 Bedeutung und Funktion von TRPC-Kanälen in Astrozyten	11
2.6 Ziele der Arbeit	13
3. Material und Methoden	14
3.1 Materialien	14
3.1.1 Geräte.....	14
3.1.2 Chemikalien und Enzyme	14
3.1.2.1 Chemikalien	14
3.1.2.2 Enzyme	16
3.1.3 Lösungen, Puffer und Medien	16
3.1.4 Antikörper (AK)	18
3.1.5 Oligonukleotid-Primer.....	18
3.1.6 Software.....	19
3.2 Methoden	19
3.2.1 Mauslinien	19
3.2.2 Präparation von Zellen aus dem Rückenmark der Maus.....	20
3.2.3 Immunzytochemie	22
3.2.4 <i>Fluorescence activated cell sorting</i> (FACS).....	22
3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.2.5.1 RNA-Extraktion	24
3.2.5.2 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	24
3.2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese	25

3.2.7 Ratiometrische Messungen der cytosolischen Ca ²⁺ -Konzentrationsänderung mittels Fura-2	25
3.2.8 Migrationsversuche	26
3.2.9 Proliferationsversuche	28
3.2.10 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	28
4. Ergebnisse	30
4.1 Immunzytochemische Charakterisierung von Zellkulturen aus dem Rückenmark der Maus	30
4.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung von Zellkulturen aus dem Rückenmark der Maus	32
4.2.1 Charakterisierung von doppelt gefärbten Zellkulturen aus dem Rückenmark der Maus	32
4.2.2 Charakterisierung von dreifach gefärbten Zellkulturen aus dem Rückenmark der Maus	33
4.3 Expression von TRPC-Transkripten in FACS-sortierten Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	34
4.4 TRPC3-Kanäle in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	34
4.4.1 OAG-induzierte Ca ²⁺ -Signale in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	34
4.4.2 Die Rolle von TRPC3 bei der Migration von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	36
4.4.3 Die Rolle von TRPC3 bei der Proliferation von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	37
4.5 TRPC4-Kanäle in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	38
4.5.1 TRPC4-abhängige Ca ²⁺ -Signale in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	38
4.5.2 TRPC1-abhängige Ca ²⁺ -Signale in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	40
4.5.3 Die Rolle von TRPC4 bei der Migration von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	42
4.5.4 Die Rolle von TRPC4 bei der Proliferation von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	42
5. Diskussion	44
5.1 Etablierung der Präparationstechnik und Charakterisierung von Zellkulturen aus dem Rückenmark der Maus	44
5.2 TRPC-Expression in isolierten Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	45
5.3 Die Rolle von TRPC1, TRPC3 und TRPC4 bei der Ca ²⁺ -Homöostase in Astrozyten des Rückenmarks der Maus	46
5.4 Die Rolle von TRPC3 und TRPC4 in der Proliferation von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	49
5.5 Die Rolle von TRPC3 und TRPC4 in der Migration von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus	50
6. Literaturverzeichnis	51

7. Anhang	59
7.1 Abkürzungsverzeichnis	59
7.2 Abbildungsverzeichnis	61
7.3 Tabellenverzeichnis	61
8. Danksagung	62
9. Curriculum vitae.....	63

1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von *Transient Receptor Potential* (TRP)-Ionenkanälen in primären Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus mit Hilfe von immunzytochemischen Färbungen, Migrations- und Proliferationsassays, sowie fluorometrische Messungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (*Calcium-Imaging*). Die zahlenmäßig am stärksten vertretenen Zellpopulationen in Rückenmarkskulturen aus der Maus stellen Astrozyten, Mikroglia-Zellen und Oligodendrozyten. In RT-PCR-Experimenten mit mRNA aus durchflusszytometrisch sortierten GLAST-positiven Rückenmarks-Astrozyten lassen sich Transkripte für TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC4, und TRPC6 nachweisen.

Der TRPC2/3/6/7-Agonist 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol führt in Wildtyp-, und in TRPC3-defizienten Astrozyten zu cytosolischen Ca^{2+} -Signalen, die sich nicht signifikant unterscheiden. Dennoch war sowohl die Migrations-, als auch die Proliferationsrate von Astrozyten aus TRPC3-defizienten Mäusen signifikant reduziert.

Neben 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol führte auch der TRPC4/5-Agonist EnglerinA zu einem cytosolischen Ca^{2+} -Anstieg in den Astrozyten. Das EnglerinA-induzierte Ca^{2+} -Signal war in TRPC4-defizienten Astrozyten signifikant reduziert, was auf eine funktionelle Expression von TRPC4 in den Astrozyten des Rückenmarks der Maus hinweist. Die TRPC4-defizienten Astrozyten zeigten im Vergleich zu Astrozyten aus dem Rückenmark von Wildtyp-Mäusen eine verminderte Proliferationsfähigkeit, wohingegen die Migrationsfähigkeit unverändert war.

Astrozyten aus TRPC1-defizienten Mäusen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen eine erhöhte basale cytosolische Ca^{2+} -Konzentration, sowie einen signifikant erhöhten Ca^{2+} -Anstieg nach Applikation von EnglerinA. Da heteromere TRPC1/TRPC4-Kanäle eine geringere Ca^{2+} -Permeabilität als homomere TRPC4-Kanäle aufweisen, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass TRPC1 in Astrozyten des Rückenmarks heteromere Kanäle mit TRPC4 bildet.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus funktionelle 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol- (TRPC2/3/6/7) und EnglerinA-aktivierte (TRPC1/4) Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle exprimieren, die an der Ca^{2+} -Homöostase sowie an der Migration (TRPC3) und Proliferation (TRPC3 und TRPC4) der Zellen beteiligt sind.

Summary

The role of TRPC-channels in spinal cord astrocytes

The present work deals with the characterization of transient receptor potential (TRP) ion channels in primary astrocytes from the mouse spinal cord using immunocytochemical staining, migration and proliferation assays, as well as fluorometric measurements of the cytosolic Ca^{2+} -concentration (calcium imaging). The most numerous cell populations in mouse spinal cord cultures are astrocytes, microglial cells and oligodendrocytes. Transcripts for TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC4, and TRPC6 can be detected in RT-PCR experiments with mRNA from flow cytometrically sorted GLAST-positive spinal cord astrocytes.

The TRPC2/3/6/7 agonist 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol leads to cytosolic Ca^{2+} -signals in wild-type and TRPC3-deficient astrocytes that do not differ significantly. Nevertheless, both the migration and proliferation rates of astrocytes from TRPC3-deficient mice were significantly reduced.

In addition to 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol, the TRPC4/5 agonist EnglerinA also led to a cytosolic Ca^{2+} -increase in astrocytes. EnglerinA-induced Ca^{2+} -signal was significantly reduced in TRPC4-deficient astrocytes, indicating functional expression of TRPC4 in mouse spinal cord astrocytes. The TRPC4-deficient astrocytes showed reduced proliferation ability compared to astrocytes from the spinal cord of wild-type mice, whereas migration ability was unchanged.

Compared to wild-type cells, astrocytes from TRPC1-deficient mice showed an increased basal cytosolic Ca^{2+} -concentration, as well as a significantly increased Ca^{2+} -increase after application of EnglerinA. Since heteromeric TRPC1/TRPC4 channels have lower Ca^{2+} -permeability than homomeric TRPC4 channels, this result suggests that TRPC1 forms heteromeric channels with TRPC4 in spinal cord astrocytes.

In summary, the present work shows that astrocytes from the mouse spinal cord express functional 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (TRPC2/3/6/7) and englerinA-activated (TRPC1/4) Ca^{2+} -permeable cation channels, which are involved in Ca^{2+} -homeostasis as well as in cell migration (TRPC3) and proliferation (TRPC3 and TRPC4).

2. Einleitung

2.1 Astrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS)

Der Begriff „zentrales Nervensystem“ fasst bei Wirbeltieren die Gesamtheit aller Zellen des Gehirns und des Rückenmarks zusammen. Etwa 10 % der Zellen werden von Neuronen repräsentiert, wohingegen die restlichen 90 % von verschiedenen Gliazellen gestellt werden (KIMELBERG, NEDERGAARD, 2010). Die Gruppe der Gliazellen besteht aus mehreren verschiedenen Zelltypen, wobei Astrozyten, Mikroglia-Zellen und Oligodendrozyten die zahlenstärksten Fraktionen darstellen. Besonders wichtige Funktionen werden dabei von Astrozyten erfüllt. Das Wort Astrozyt, eine aus dem Griechischen stammende Wortzusammensetzung von „*astron*“, was Stern bedeutet und „*kytos*“, was Zelle bedeutet, weist auf das sternförmige Aussehen der Zellen hin, welches durch die Zahl ihrer vielen Zellfortsätze entsteht. Astrozyten haben viele Aufgaben und spielen im ZNS eine wichtige Rolle. Sie regulieren beispielsweise den pH-Wert, die Ionen-Zusammensetzung und den Flüssigkeitshaushalt im ZNS. Über *gap junctions* sind sie untereinander verbunden und können mithilfe kleiner Moleküle wie IP_3 , ATP, Ca^{2+} und anderer *second messenger* miteinander kommunizieren. Über ihre Zellfortsätze nehmen sie Einfluss auf eine Vielzahl anderer Zellen und bilden eine Stützfunktion für den komplexen Aufbau des ZNS. Sie spielen eine große Rolle bei der Wiederaufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt zwischen Neuronen und können dadurch und durch eigene Transmitter die synaptische Signal-Übertragung beeinflussen. Zudem interagieren Astrozyten mit Zellen des Gefäßsystems, wo sie nicht nur Transmitter und wichtige Nährstoffe für den Stoffwechsel des ZNS aufnehmen und abgeben, sondern auch eine Barrierefunktion für schädliche Stoffe erfüllen. Ihnen wird damit eine wichtige Komponente an der Funktion der Blut-Hirn-Schranke zugeschrieben (CABEZAS et al., 2014). Astrozyten dienen dadurch sowohl dem Schutz, als auch der Versorgung von Neuronen. Darüber hinaus fördern sie mit *promoting*-Faktoren schon früh die Entwicklung von Neuronen und bilden durch ihren großen Einfluss auf die Angiogenese den Grundstein der Gefäßversorgung im ZNS (MARAGAKIS, ROTHSTEIN, 2006; MONTGOMERY, 1994). Astrozyten stellen sich unter dem Mikroskop als relativ große, sternförmige Gliazellen dar. Eine bessere Identifizierung gelingt durch das Anfärben von Proteinen, die vorwiegend in Astrozyten gebildet werden. Prominente Marker-Proteine sind dabei unter anderem das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (BIGNAMI, DAHL, 1974), der *glutamate aspartate transporter* (GLAST) (SHIBATA et al., 1997) und das *S100 Ca²⁺-binding protein* (S100B) (TATEISHI et al., 2006).

2.2 Calcium und Ca^{2+} -Signale

Calcium ist ein chemisches Element, welches in chemisch gebundener oder in ionisierter Form in Lebewesen vorkommt. In Verbindung mit Phosphat bildet Calcium als Hydroxylapatit einen

wichtigen Bestandteil von Knochen und Zähnen und ist in dieser festen Form maßgeblich für deren Stabilität verantwortlich. In freier Form besitzt Ca^{2+} eine große Bedeutung für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Membranpotentials und dient als pH-Puffer oder Enzymaktivator. An der Synapse reguliert Ca^{2+} die Freisetzung von Neurotransmittern und stellt so die neuronale Erregungsweiterleitung sicher. Als *second messenger* ist es wichtiger Faktor zu Erregung der Muskulatur. Des Weiteren spielt Ca^{2+} eine wichtige Rolle sowohl bei der Transkription von Genen als auch bei der Migration und der Proliferation von Zellen. Die cytoplasmatische Basiskonzentration von Ca^{2+} in nicht stimulierten Zellen liegt zwischen 50 und 150 nM, wobei lokal die Ca^{2+} -Konzentration nach Zell-Stimulation mit bis zu 100 μM etwa 1000-fach höher liegen kann (PATEL, DOCAMPO, 2010). Die Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration kommt dabei durch die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher oder durch Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum zustande. Eine besondere Funktion hat das endoplasmatische Retikulum (ER) als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher. Eine Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem ER kann dabei durch eine Aktivierung von Inositol-1,4,5-triphosphat(IP_3)-Rezeptoren oder Ryanodin-Rezeptoren vermittelt werden. IP_3 entsteht durch vorangegangene G_q -Protein-gekoppelte oder Rezeptortyrosinkinase-gekoppelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in IP_3 und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Eine Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren erfolgt über steigende Ca^{2+} -Spiegel, was zu einer zusätzlichen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER führt. Dabei wird von Ca^{2+} -induzierter Ca^{2+} -Freisetzung gesprochen. Ein weiterer Weg zur Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration geschieht über die Registrierung einer niedrigen ER- Ca^{2+} -Konzentration durch *stromal interaction molecules* (STIMs), die daraufhin ORAI-Proteine in der Zellmembran aktivieren, die als Ca^{2+} -sensitive Ionenkanäle für einen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sorgen. Der Ca^{2+} -Einstrom, der auf diese Weise zustande kommt wird als *store operated calcium entry* (SOCE) bezeichnet. Auch von zellmembranständigen TRPC-Kanälen wird angenommen, dass sie für einen Anteil des SOCE verantwortlich und somit ebenfalls in die Ca^{2+} -Homöostase von Zellen involviert sind (VENKATACHALAM et al., 2002). Um die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher wieder zu füllen, verfügt das ER über Ca^{2+} -ATPasen (SERCA), die zytoplasmatisches Ca^{2+} ins ER transportieren. Die Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum, in dem unter physiologischen Bedingungen eine Ca^{2+} -Konzentration von etwa 2 mM herrscht, geschieht über verschiedene Ca^{2+} -selektive oder nicht-selektive Kationen-Kanäle (REUTER, 1986). In Astrozyten des ZNS konnten viele verschiedene Ca^{2+} -Kanäle detektiert werden. Neben N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (CONTI et al., 1996), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-Rezeptoren (FAN et al., 1999) und durch intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung aktivierten Ca^{2+} -Kanälen (ORAI) (MORENO et al., 2012), wurden auch TRP-Kanäle nachgewiesen (SCIMEMI, 2013), die in dieser Arbeit im Fokus stehen.

2.3 *Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle*

Der Begriff TRP-Kanäle beschreibt eine große Gruppe von Ionenkanälen, die alle fast denselben Grundaufbau besitzen und permeabel für Kationen sind. Der Ausdruck „*Transient Receptor Potential*“ beschreibt eine Entdeckung, die 1969 bei der Untersuchung von mutierten Photorezeptor-Zellen der Taufliege (*Drosophila*) gemacht wurde. Bei den mutierten Zellen wurde bei andauerndem Lichtstimulus nur eine transiente, also eine schnell vorübergehende Depolarisation (*Potential*) der Photorezeptoren gemessen, während Wildtyp-Zellen eine kontinuierliche Depolarisation zeigten (COSENS, MANNING, 1969). Verantwortlich für diesen Phänotyp sind TRP-Proteine, die im Facettenauge der Fliege als lichtempfindliche Kationen-Kanäle fungieren (MONTELL, RUBIN, 1989).

In Säugetieren ließen sich bisher insgesamt 28 verschiedene TRP-Kanäle in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen nachweisen. Diese können anhand ihrer Struktur in 6 Unterfamilien eingeteilt werden (Abb. 1 a): Die Klassische (TRPC1-7), die Vanilloide (TRPV1-6), die Melastatin- (TRPM1-8), die Ankyrin- (TRPA1), die Mukolipin- (TRPML1-3) und die Polycystin-Unterfamilie (TRPP2, 3 und 5) (WU et al., 2010).

Schon 1989 wurde vermutet, dass TRP-Proteine aus einer geraden Zahl transmembraner Segmente mit cytosolischem N- und C-Terminus bestehen (MONTELL, RUBIN, 1989). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass TRP-Proteine sechs transmembran-Domänen besitzen, wobei sich zwischen der fünften und der sechsten Domäne ein porenbildender Bereich befindet (Abb. 1 b) (VANNIER et al., 1998). Ein TRP-Kanal besteht aus 4 solcher Untereinheiten (Tetramer), die entweder aus gleichen (Homotetramer) oder unterschiedlichen TRP-Proteinen (Heterotetramer) zusammengesetzt sind (Abb. 1c) (STRUBING et al., 2001). In den letzten Jahren konnte durch Kristallstrukturanalysen und Kryo-Elektronenmikroskopie die Membranstruktur vieler TRP-Kanäle aufgeklärt werden, zum Beispiel TRPV1 (CAO et al., 2013), TRPV2 (ZUBCEVIC et al., 2016), TRPV6 (SAOTOME et al., 2016), TRPA1 (PAULSEN et al., 2015), oder TRPC4 (VINAYAGAM et al., 2018). TRP-Kanäle können durch geeignete Stimuli, wie pH- oder Temperaturveränderungen oder intrazelluläre Liganden (FREICHEL et al., 2012) aktiviert werden. *In vivo* erfüllen sie viele Funktionen. Unter anderem sind sie an der Temperaturregistrierung, der Wahrnehmung von Schmerz, der Proliferation von glatten Muskelzellen oder der Ausprägung von geschlechterspezifischem Verhalten beteiligt (FLOCKERZI, 2007). David Julius und Ardem Patapoutian wurde 2021 der Nobelpreis für Physiologie/Medizin für die Entdeckung des TRPV1-Kanals als wichtiger Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Analgetika zugesprochen (CATERINA et al., 1997). Bis auf TRPV5 und TRPV6, die nahezu ausschließlich für Ca^{2+} permeabel sind und TRPM4 und TRPM5, die umgekehrt nur für monovalente Kationen permeabel sind, sind TRP-Kanäle in aktiviertem Zustand nicht-selektive Kationenkanäle und erlauben unter physiologischen Bedingungen den Einstrom von Ca^{2+} und Na^{+} (WU et al., 2010). Um die genauen Aufgaben einzelner TRP-Kanäle

zu untersuchen, stehen verschiedene Agonisten und Antagonisten von TRP-Kanälen zur Verfügung, wobei die Selektivität vieler Liganden nicht durchgängig gewährleistet ist. Einen anderen Ansatz zur Untersuchung der Funktion dieser Kanäle bietet die genetische Modifikation von Mäusen zur Inaktivierung, oder Überexpression einzelner oder mehrerer TRP-Gene.

So konnte beispielsweise nach Inaktivierung eines TRP-Gens von TRPM5-Kanälen eine Beteiligung an der Insulinfreisetzung (BRIXEL et al., 2010; COLSOUL et al., 2010) und von TRPV6-Kanälen an der Fertilität männlicher Mäuse gezeigt werden (WEISSGERBER et al., 2012).

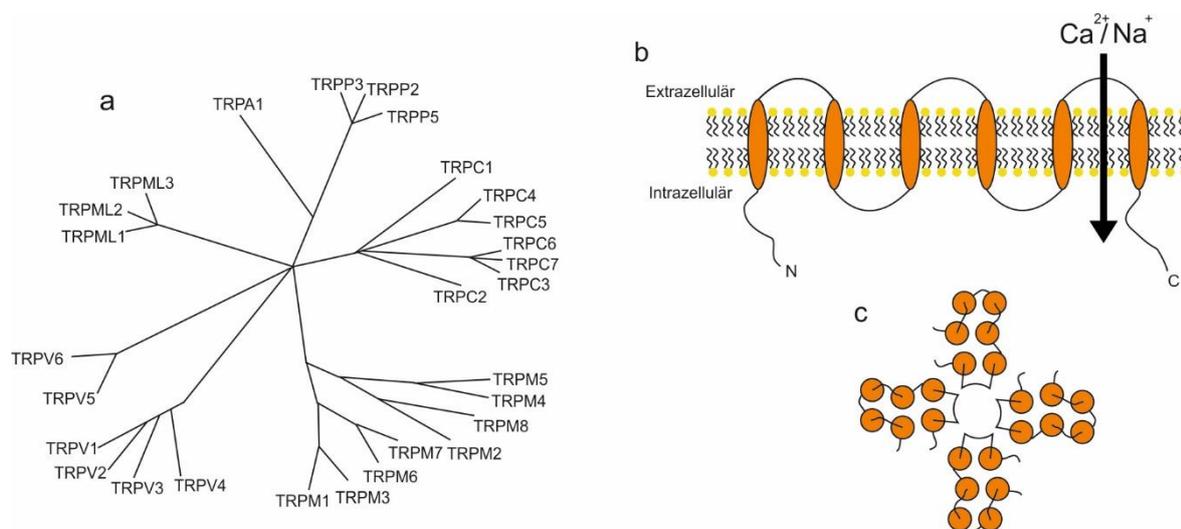


Abb. 1: **Darstellung von TRP-Kanälen.** a: Stammbaum der TRP-Familie, der die Einteilung der TRPs in 6 Unterfamilien widerspiegelt: TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPML und TRPP. b: Schematische Darstellung eines TRP-Proteins bestehend aus 6 Transmembrandomänen mit N- und C-Terminus. Die porenbildende Region befindet sich zwischen der fünften und sechsten Domäne. c: Schematische Abbildung eines tetrameren TRP-Kanals bestehend aus TRP-Proteinen. Abbildung modifiziert (CLAPHAM et al., 2001).

2.4 Die Unterfamilie der TRPC-Kanäle

Die Unterfamilie der TRPC-Kanäle besitzt 7 Mitglieder (TRPC1-7), die alle die Funktion eines nicht selektiven Kationenkanals erfüllen. Das „C“ steht dabei für den englischen Begriff „*canonical*“, zu Deutsch „ursprünglich“, und spielt auf die Ähnlichkeit der TRPC-Kanäle zu den ursprünglich in *Drosophila* entdeckten TRP-Kanälen an. Auch TRPC-Kanäle besitzen eine tetramere Struktur, die aus identischen oder aus verschiedenen TRPC-Protein-Untereinheiten aufgebaut ist (NILIUS et al., 2007). Die Peptidketten der einzelnen Untereinheiten weisen Ähnlichkeiten auf. So zeigt der C-Terminus aller TRPC-Proteine ein spezielles „*TRP box*“ Motiv, das die Aminosäuresequenz „EWKFAR“ enthält. Im N-Terminus dagegen sind „*ankyrin repeats*“ zu finden (CLAPHAM, 2003). Die Aktivierung von TRPC-Kanälen geschieht PLC-vermittelt, wobei die Aktivierung der PLC durch G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren oder durch

Rezeptor-Tyrosinkinasen erfolgt (FREICHEL et al., 2012). Daneben sind verschiedene direkte Agonisten von TRPC-Kanälen bekannt.

2.4.1 TRPC1

Der TRPC1-Kanal war der erste TRP-Kanal, der in Säugetieren entdeckt und kloniert wurde (WES et al., 1995; ZHU et al., 1995). Im Zuge dieser Entdeckung wurden weitere ähnliche TRP-Kanäle in Säugetieren gefunden, die eine Einteilung der Kanäle in die Unterfamilie der TRPC-Kanäle ermöglichte. TRPC1 findet sich sowohl in der Zellmembran, als auch im endoplasmatischen Retikulum von Zellen, intrazellulären Vesikeln oder primären Zilien (CHENG et al., 2008; NESIN, TSIOKAS, 2014). Bei Menschen und Nagetieren ist die Expression von TRPC1 in fast jedem Gewebe beschrieben, wobei vermutet wird, dass TRPC1 an vielen molekularen Vorgängen im Körper beteiligt ist (NESIN, TSIOKAS, 2014). Nach heterologer Überexpression von TRPC1 und TRPC4 oder TRPC1 und TRPC5 in HEK293-Zellen wurden Unterschiede in der Strom-Spannungs-Kurve im Vergleich zu HEK-Zellen, die TRPC4 oder TRPC5 alleine exprimieren, sichtbar (STRUBING et al., 2001). Dies legte den Schluss nahe, dass TRPC1 in der Lage ist, mit TRPC4 oder TRPC5 funktionstüchtige heteromere Kationenkanäle zu bilden. Zudem konnte gezeigt werden, dass TRPC1 auch mit TRPC3, TRPC6 und TRPC7 (DAG-sensitive TRPCs) heteromere Kanäle bildet, wobei die Strom-Spannungs-Kurve im Vergleich zu den homomeren Kanälen zwar unverändert ist, diese Kanäle jedoch eine geringere Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen aufweisen (STORCH et al., 2012). Bislang ist unklar, ob TRPC1-Proteine auch funktionstüchtige homomere Ionenkanäle bilden können (DIETRICH et al., 2014). 2008 konnten Interaktionen zwischen TRPC1-Molekülen, *stromal interaction molecules* (STIMs) und ORAI-Molekülen dargestellt werden (ZENG et al., 2008). Nach Inaktivierung des TRPC1 Gens zeigten azinäre Zellen der Glandula submandibularis eine Verringerung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (AMBUDKAR, 2014). 2017 wurden in TRPC1-defizienten Gefäßzellen aus menschlichen Nabelschnurvenen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) ein verminderter SOCE, sowie eine verminderte NO-Produktion gezeigt (QU et al., 2017). Dies löste Kontroversen aus, da TRPC1-defizienten Erythrozyten einen unveränderten SOCE zeigten (VARGA-SZABO et al., 2008).

2.4.2 TRPC2

TRPC2 ist im menschlichen Genom nur als Pseudogen vorhanden, ein humanes TRPC2-Protein ist nicht bekannt. Dagegen ließ sich das TRPC2-Protein bei Nagetieren sehr wohl nachweisen, wo es besonders im vomeronasalen Organ, Erythroblasten, Spermien und Gehirnzellen gefunden werden konnte (MILLER, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass TRPC2 mit dem strukturell sehr ähnlichen TRPC6 interagiert und auf diese Weise der durch

Erythropoetin ausgelöste Ca^{2+} -Einstrom in primären, erythroiden Zellen reguliert wird (CHU et al., 2004). Zusätzlich konnten Interaktionen von TRPC2 mit IP_3 -Rezeptoren festgestellt werden (TONG et al., 2004). Weitere Forschungen zeigten zudem, dass männliche, TRPC2-defiziente Mäuse die Fähigkeit zur Geschlechtsunterscheidung verlieren und ein geringeres Aggressionspotential gegenüber anderen Männchen aufweisen (LEYPOLD et al., 2002). Die genaue molekulare Signalkaskade zur Aktivierung von TRPC2 ist bislang noch nicht verstanden.

2.4.3 TRPC3

Die erste Klonierung der TRPC3-cDNA gelang im Jahr 1996 (ZHU et al., 1996). Zusammen mit TRPC6 und TRPC7 gehört TRPC3 zu den TRPC-Kanälen, die direkt durch Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden. Die Aminosäuresequenz von TRPC6 und TRPC7 ist mit der von TRPC3 zu 69 % identisch (HOFMANN et al., 1999). TRPC3 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus, des Zellwachstums, der Zellproliferation und der pathologischen Hypertrophie von Zellen (XU et al., 2013). Über den Muskeltonus peripherer Gefäße beeinflusst TRPC3 den Gefäßwiderstand und damit den arteriellen Blutdruck (ADEBIYI et al., 2010). Eine besonders hohe TRPC3-Expression findet sich in Zellen des Gehirns und des Herzens (LICHTENEGGER, GROSCHNER, 2014). Vor allem in den cerebellären Purkinjezellen sind sie wichtiger Bestandteil von metabotropen Glutamatrezeptor-abhängigen Signalen (HARTMANN et al., 2008). Aber auch in kortikalen Astrozyten konnte eine Beteiligung von TRPC3 an zellulären Ca^{2+} -Signalen nachgewiesen werden, wobei eine Defizienz von TRPC3 mit einer geringeren Astrogliose und verbesserter Wundheilung nach einer Hirnverletzung einhergeht (BELKACEMI et al., 2017). TRPC3-Proteine interagieren mit TRPC6 und TRPC7 (LICHTENEGGER, GROSCHNER, 2014), jedoch fanden sich auch Hinweise auf Interaktionen mit ORAI-Proteinen zur Bildung heteromerer Ca^{2+} -Kanäle (LIAO et al., 2007). Interessanterweise scheint eine schwache Expression von TRPC6 in glatten Muskelzellen durch eine verstärkte Expression von TRPC3 kompensiert zu werden (DIETRICH et al., 2005). Auch TRPC1 wurde als Interaktionspartner von TRPC3 beschrieben, wobei die Ca^{2+} -Sensitivität des Kationenkanals vermindert ist, wenn TRPC1 eine Untereinheit des Kanals stellt (STORCH et al., 2012). Ein besonderes Phänomen stellt eine Mutation im TRPC3-Gen bei Mäusen dar. Hierbei ist an Position 635 der Polypeptidkette Threonin durch Alanin ersetzt. Homozygote Träger dieses Gens sind nicht überlebensfähig. Individuen, die heterozygote Träger des mutierten Gens sind, haben Koordinationsschwierigkeiten bei Bewegungen und eine verminderte Zahl an Purkinjezellen im Kleinhirn. Hieraus resultiert eine sehr unsichere Art der Fortbewegung der Mäuse, was Anlass war, diese als sogenannte *moonwalker*-Mäuse zu bezeichnen (BECKER et al., 2009). Die Rolle von TRPC3 im Ca^{2+} -Haushalt macht einen pharmakologischen Ansatzpunkt zur Beeinflussung bestimmter

neuronaler Erkrankungen denkbar (KANEKO, SZALLASI, 2013). Mithilfe von TRPC3-überexprimierenden HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass Pyrazolium 3 (Pyr3) als Inhibitor von TRPC3 fungiert (KIYONAKA et al., 2009). Da Pyr3 auch ORAI-Kanäle blockiert, wird empfohlen, Pyr10, ein weiteres Pyrazoliumderivat, zu verwenden, welches eine höhere Selektivität für TRPC3, als für ORAI aufweist (SCHLEIFER et al., 2012). Stimulierende Effekte auf TRPC3-Kanäle mit nachfolgender Ca^{2+} -Freisetzung konnten durch DAG ausgelöst werden (2.2). Ein synthetisches DAG-Analogon steht mit 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) zur Verfügung und kann zur Stimulation von TRPC3-Kanälen genutzt werden. Neben TRPC3 zeigten sich TRPC2, 6 und 7 als DAG/OAG-sensibel (HOFMANN et al., 2000). Da DAG/OAG auch über die Aktivierung der Phospholipase C eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern induziert, sollten zur Detektion TRPC3/6/7-abhängiger Ca^{2+} -Signale (Ca^{2+} -Einstrom) vor Applikation von DAG/OAG die Speicher des ERs beispielsweise durch Verwendung des SERCA-Inhibitors *Cyclopiazonic acid* (CPA) entleert werden (Abb. 2).

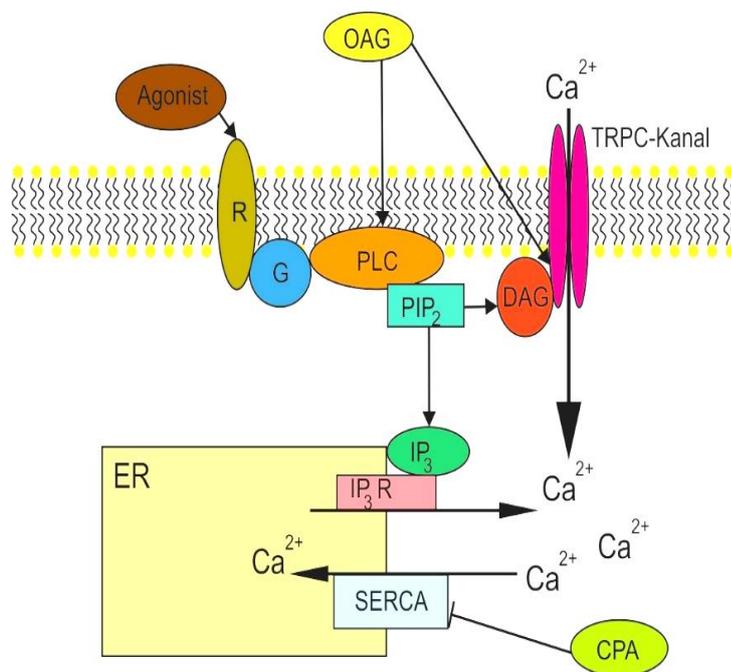


Abb. 2: **OAG/DAG-induzierter Ca^{2+} -Einstrom.** Eine Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kann durch Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (G_q), über DAG, über Aktivierung von TRPC-Kanälen durch Ca^{2+} -Einstrom und durch IP₃ vermittelte Leerung der Ca^{2+} -Speicher des ERs zustande kommen. Auch synthetisches OAG, ein Analogon von DAG, hat über eine PLC-Aktivierung, oder durch direkte TRPC-Kanal-Aktivierung Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase. Zur Leerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher kann der SERCA-Antagonist CPA verwendet werden. Grafik modifiziert (PUTNEY, 1999).

2.4.4 TRPC4

Die erste erfolgreiche Klonierung der TRPC4-cDNA wurde im Labor von Prof. Flockerzi durchgeführt (PHILIPP et al., 1996). Die höchste Ähnlichkeit mit TRPC4 besitzt TRPC5 mit einer Übereinstimmung von 65 % der Sequenz der Polypeptidketten (PHILIPP et al., 1998). Mithilfe von *resolution-mass*-Spektrometrie konnte gezeigt werden, dass TRPC1, TRPC4 und TRPC5 in Zellen des Hippocampus miteinander heteromere Kationenkanäle bilden (BROKER-LAI et al., 2017). Durch Kryoelektronenmikroskopie konnte 2018 die genaue molekulare Struktur von TRPC4-Kanälen erfolgreich untersucht werden (DUAN et al., 2018; VINAYAGAM et al., 2018). TRPC4 ist in vielen verschiedenen Gewebetypen exprimiert und konnte in Herz,

Skelettmuskel, Lunge, verschiedenen Neuronen, in Mastzellen und weiteren Organen nachgewiesen werden, wo TRPC4-Kanäle unterschiedliche Aufgaben erfüllen (FREICHEL et al., 2014). Weitere Studien zeigten, dass das Ausschalten des TRPC1- und des TRPC4-Gens einen präventiven Effekt gegenüber dem kardialen *remodeling* von Kardiomyozyten bewirkt (CAMACHO LONDONO et al., 2015). In Verhaltensexperimenten mit TRPC4-defizienten Mäusen konnte ein abgeschwächtes Angstverhalten festgestellt werden. Dabei wurden verminderte Potentiale in neuronalen Zellen der Amygdala gemessen, wobei hier eine verminderte Aktivität von $G_{\alpha q/11}$ -gekoppelten Proteinen als Auslöser vermutet wird (RICCIO et al., 2014). Das Membran-Phospholipid Phosphatinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zeigte eine hemmende Wirkung auf TRPC4-Kanäle (OTSUGURO et al., 2008). Mit Englerin A (EgA) wurde ein hocheffizienter, selektiver und direkter Agonist sowohl für TRPC4- und TRPC5-Kanäle, als auch für heterogene TRPC1/TRPC4- und TRPC1/TRPC5-Kanäle entdeckt (Abb. 3), der sich durch eine Toxizität gegenüber verschiedener Krebszellen auszeichnet, die TRPC4 und TRPC5 exprimieren (CHEUNG et al., 2018). Ein sehr potenter selektiver Blocker der TRPC1/4/5-Familie wurde mit Pico145 beschrieben (RUBAIY et al., 2017).

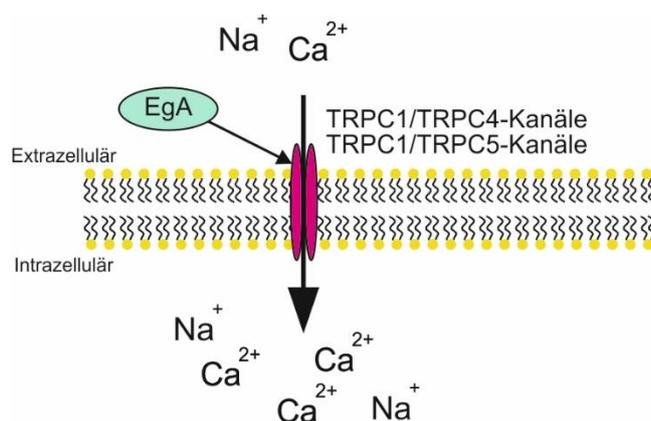


Abb. 3: **Wirkung von Englerin A an TRPC4- und TRPC5 Kanälen.** Englerin A (EgA) als potenter Aktivator von homomeren TRPC4- und TRPC5-, sowie heteromeren TRPC1/TRPC4- und TRPC1/TRPC5-Kanälen mit resultierendem Ca^{2+} - und Na^+ -Einstrom in die Zelle. Grafik modifiziert (AKBULUT et al., 2015).

2.4.5 TRPC5

Zwei Jahre nach der Klonierung der TRPC4-cDNA gelang die erfolgreiche Klonierung von TRPC5 (PHILIPP et al., 1998). TRPC5 ist weniger in peripheren Organen, dafür umso mehr im zentralen Nervensystem exprimiert. Sowohl im Hippocampus, als auch im Cerebellum, der Amygdala, oder der Retina konnte es nachgewiesen werden (ZHOLOS, 2014). TRPC5 spielt eine Rolle bei der Regulation zentraler Prozesse, wie dem Essverhalten, dem Glukosemetabolismus und dem Energiehaushalt (GAO et al., 2017). Auch für das Monitoring und die Regulierung des arteriellen Blutdrucks über Barorezeptoren wurde TRPC5 eine große Bedeutung zugesprochen (LAU et al., 2016). Sowohl beim Alterungsprozess von Gefäß-Endothelzellen, als auch bei oxidativem Stress der Gefäße wird TRPC5 ebenfalls eine Rolle zugeschrieben (LI et al., 2017; NAYLOR et al., 2011). Es wird vermutet, dass die übermäßige Aktivität von TRPC5 in der Niere zu einem Verlust von Podozyten im Glomerulum der Niere führt, und somit die Filterfunktion der Niere negativ beeinflusst, was zu Proteinurie und im

weiteren Verlauf zu einem progredienten Nierenversagen führen kann (ZHOU et al., 2017). Eine Überexpression oder Überaktivität von TRPC5 führt jedoch nicht zu einer Zunahme von Nierenerkrankungen (WANG et al., 2018). Neben EgA (2.4.4) stehen mit Riluzol und N-[3-(adamantan-2-yloxy)propyl]-3-(6-methyl-1,1-dioxo-2H-1λ⁶,2,4-benzothiadiazin-3-yl)propanamide (BTD) zwei weitere Substanzen zur Verfügung, die als TRPC5-Agonisten für Experimente verfügbar sind (BECKMANN et al., 2017; RICHTER et al., 2014).

2.4.6 TRPC6

TRPC6 wurde zum ersten Mal im Labor von Professor Birnbaumer aus Zellen des Gehirns von Mäusen kloniert (BOULAY et al., 1997) und besitzt eine große Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu TRPC3 (WU et al., 2010). TRPC6 kann direkt durch DAG aktiviert werden und wird beispielsweise in Zellen von glatten Muskeln, im pulmonalen Epithel oder von Podozyten der Niere exprimiert (DIETRICH, GUDERMANN, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von TRPC6 in den Nieren eine diabetische Nephropathie durch überschießende Proliferations- und Entzündungsreaktionen begünstigt (FU et al., 2018). Mit Hilfe des TRPC6-Inhibitors Laryxil-N-methylcarbamate (SH045) gelang es außerdem die Ödembildung in der Lunge bei einem ischämischen Lungenreperfusionsschaden günstig zu beeinflussen (HAFNER et al., 2018). Schon 2016 konnte gezeigt werden, dass Laryxilacetat als selektiver Inhibitor für TRPC6 eingesetzt werden kann (URBAN et al., 2016). Dies stellt bei autosomal dominanten Formen der fokal-segmentalen Glomerulosklerose, die durch TRPC6-*gain-of-funktion*-Mutation (CHILUIZA et al., 2013) verursacht werden, einen möglichen Ansatzpunkt zur Therapie dar.

2.4.7 TRPC7

TRPC7 ist das letzte Mitglied der TRPC-Familie, das kloniert werden konnte (OKADA et al., 1999). Auch TRPC7 ist, wie TRPC3 und TRPC6, DAG-sensitiv und teilt mit beiden Kanälen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit (WU et al., 2010). Eine Expression von TRPC7 konnte in Lungengewebe, Myokard, Gehirn, Milz und Hoden nachgewiesen werden (ZHANG, TREBAK, 2014). Eine verringerte TRPC7-Expression mit daraus folgenden Störungen im Ca²⁺-Haushalt wurde in der Vergangenheit als mögliche Komponente bipolarer Störungen gesehen (YOON et al., 2001). TRPC7-defiziente Mäuse zeigen eine höhere Krampfschwelle und eine geringere Häufigkeit von Krampfanfällen (PHELAN et al., 2014).

2.5 Bedeutung und Funktion von TRPC-Kanälen in Astrozyten

Verletzungen des zentralen Nervensystems (ZNS) sind schwerwiegende Erkrankungen mit hoher Inzidenz, die oft mit schweren neurologischen Komplikationen einhergehen. Die zahlreichen chirurgischen und pharmakologischen Einflussmöglichkeiten sind unzureichend

und es müssen in Zukunft verbesserte Therapieansätze zur Behandlung verfügbar werden. Astrozyten spielen in der Heilung des ZNS auf zellulärer Ebene eine zentrale Rolle. Im Rahmen der Heilung kann es jedoch auch zu einer überschießenden Proliferations- und Migrationsreaktion von Astrozyten kommen, was zu Vernarbungen der beschädigten Areale, und den Untergang von Neuronen in diesen Bereichen, kurz zur Astroglie führt. Im Fokus der Forschung standen in den letzten Jahren vor allem die Astrozyten des Cortex. Dabei konnte beispielsweise für TRPC1 und TRPC3 ein Effekt auf traumatische Hirnverletzungen gezeigt werden, wobei eine Hemmung oder eine Defizienz von TRPC3-Kanälen in einer geringeren Proliferations- und Migrationsrate sowie in geringerer Astroglie resultierte (BELKACEMI et al., 2017). Durch Hemmung oder Defizienz von TRPC3-Kanälen konnte eine verminderte Hochregulation des Astroglie-Markers S100B gezeigt werden (MUNAKATA et al., 2013; SHIRAKAWA, 2012). Dagegen konnte nach Applikation von Thrombin zur Simulation einer Hirnverletzungen eine Hochregulation von S100B beobachtet werden, wobei als Ursache eine Thrombin-induzierte Hochregulation von TRPC3-Kanälen in Astrozyten vermutet wurde (SHIRAKAWA et al., 2010). Die Defizienz von TRPC1 dagegen führte zu einer erhöhten Migrationsrate von Astrozyten im Cortex (BELKACEMI et al., 2017). Auch in Müllerzellen konnte nach Elimination von TRPC1 eine vermehrte Astroglie beobachtet werden (MOLNAR et al., 2016). Nach Hyperforin-induzierter Aktivierung von TRPC6-Kanälen ließen sich neben verminderter Astroglie auch neuroprotektive Effekte bei Alzheimer-Erkrankten zeigen (GRIFFITH et al., 2010).

Für die TRPC-Unterfamilie gelang es bisher, die Expression von TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC4 und TRPC6, nicht aber für TRPC5 und auch TRPC7 in Astrozyten des Rückenmarks nachzuweisen (MIYANO et al., 2010). Die Teilhabe der TRPs, insbesondere der TRPCs am Ca^{2+} -Haushalt der Astrozyten mit der Vielzahl an verschiedenen Wirkmechanismen stellt weiterhin ein interessantes Forschungsfeld dar. Dabei sollten auch weiterhin insbesondere nicht-invasive Möglichkeiten zur pharmakologischen Beeinflussung neurologischer Traumata oder neurodegenerativer Erkrankungen untersucht werden, da bisherige chirurgische oder bereits vorhandene pharmakologische Therapieansätze häufig keine zufriedenstellenden Erfolge liefern.

2.6 Ziele der Arbeit

Daraus ergeben sich für die vorliegende Dissertation die folgenden Ziele:

1. Etablierung einer Präparationstechnik und Charakterisierung von Zellkulturen aus dem Rückenmark der Maus.
2. Analyse der Expression von TRPC-Kanälen in isolierten Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus.
3. Funktionelle Untersuchungen der exprimierten TRPC-Kanäle durch Messungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration.
4. Untersuchungen zur Bedeutung der exprimierten TRPC-Kanäle in Astrozyten des Rückenmarks bezüglich Zell-Migration und -Proliferation.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Inkubator	Binder
Zentrifuge Heraeus® Megafuge® 1.0 R	ThermoScientific
Ependorf-Zentrifuge 1-14	Sigma
PCR-Gerät T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	ZEISS
Lichtquelle für Fluoreszenzmikroskop LQ-HXP 120	LEJ
Lichtmikroskop Axiovert 40C	ZEISS
Mikroskop Kamera AxioCam	ZEISS
Mikroskop Axiovert 40C (Migrationsversuche)	ZEISS
Photometer (96-well-plate-reader) Infinite M200	Tecan
Zell-Zählkammer	Neubauer Zählkammer
Gel-Elektrophorese-Kammer Consort EV 261	Sigma-Aldrich
Transluminator UVT-28 ME-HC	HeroLab
Transluminator-Kamera B1228-U5	HeroLab
Mikroskop Axiovert S100 (Ca ²⁺ -Imaging)	ZEISS
Mikroskop-Kamera Imago	TILL-Photonics
Monochromator Polychrome V (Ca ²⁺ -Imaging)	TILL-Photonics
Spektrophotometer NanoDrop 1000	peqLab
Präparierbesteck	Fine Science Tools

3.1.2 Chemikalien und Enzyme

3.1.2.1 Chemikalien

Name	Abkürzung	Hersteller/ Bezugsquelle
Agarose standard	Agarose	Roth
Roti®Garose gentechnologische Qualität	Agarose GTQ	Roth
Borsäure		Roth
Bovines Serum Albumin	BSA	AppliChem

3',3'',5',5''-Tetrabromophenol-sulfonephthalein	Bromphenol Blue	Sigma
N-[3-(adamantan-2-yloxy)propyl]-3-(6-methyl-1,1-dioxo-2H-1λ ⁶ ,2,4-benzothiadiazin-3-yl)propanamide	BTD	Labor Prof. Dr. Michael Schäfer, Pharmakologie und Toxikologie, Leipzig
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ + 2 H ₂ O	AppliChem
Cyclopiazonsäure	CPA	Alomone Labs
4',6-Diamidin-2-phenylindol	DAPI	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	AppliChem
EnglerinA	EgA	Roth
Ethidiumbromidlösung 1 %		Roth
Vectashield Mounting Medium	Fixierungsmedium	Vector laboratories
Fura-2-acetoxymethylester	Fura-2AM	Invitrogen
D-(+)-Glucose wasserfrei	Glucose	Roth
Glycerin 99 % wasserfrei		AppliChem
Harnstoff		Zentrales Chemikalienlager – Universität des Saarlandes
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Roth
Kaliumchlorid	KCl	Zentrales Chemikalienlager – Universität des Saarlandes
Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	AppliChem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂ + 6 H ₂ O	Roth
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)	MTS	Promega
Natriumchlorid	NaCl	VWR Chemicals
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Na ₂ HPO ₄ + 2 H ₂ O	Roth
1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol	OAG	Biomol GmbH
Riluzol		Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	TRIS-Puffer	Roth

Xylen-Cyanol		Sigma
--------------	--	-------

3.1.2.2 Enzyme

Alle Enzyme stammen aus dem Kit *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum™ TaqDNA-Polymerase* von Invitrogen:

- Reverse Transkriptase: SuperScript™ III
- Platinum® Taq DNA Polymerase

3.1.3 Lösungen, Puffer und Medien

PBS-Lösung:

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	137
KCl	2,7
KH ₂ PO ₄	1,5
Na ₂ HPO ₄ + 2 H ₂ O	8,1

Zellkulturmedium
ohne FCS:

Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM 41966-029 (Gibco)
1 % GlutaMAX (Invitrogen)
100 U/ml Penicillin (Sigma)
100 µg/ml Streptomycin (Sigma)

Zellkulturmedium mit FCS:

Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM 41966-029 (Gibco)
1 % GlutaMAX (Invitrogen)
100 U/ml Penicillin (Sigma)
100 µg/ml Streptomycin (Sigma)
10 % FCS (fetal calf serum, Gibco)

P-L-L Lösung:

0,1 mg poly-L-Lysin (Sigma) /ml PBS

Trypsinlösung:

0,1 ml Trypsin (Sigma) in 1 ml PBS aufgelöst
--

Paraformaldehyd-Lösung:

4 % Paraformaldehyd (PFA; Sigma) in PBS-Lösung
--

TritonX-Eselserum-Lösung:	PBS-Lösung
	0,3 % TritonX-100 (Roth)
	5 % Eselserum (Jackson ImmunoResearch)
Primäre AK-Lösung für Immunzytochemie:	PBS-Lösung
	0,3 % TritonX-100 (Roth)
	5 % Eselserum (Jackson ImmunoResearch)
	primärer Antikörper (1:1000; 1:500 und 1:300)
Sekundäre AK-Lösung für Immunzytochemie:	PBS-Lösung
	Fluoreszierende Esel-Anti-Kaninchen-Antikörper, Alexa Fluor 555, Invitrogen (1:1000 und 1:500)
	1 µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; Sigma)
BSA-PBS-Lösung:	PBS-Lösung
	0,5 % BSA
TBE-Puffer:	TRIS (90 mM)
	Borsäure (90 mM)
	EDTA (2 mM)
2 % Agarose-Gel:	TBE-Puffer
	Agarose (2 g/100 ml)
	0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung 1 %
Loading Dye:	20 g Harnstoff
	20 g Glycerin 99 %
	5 ml EDTA (1 mM)
	0,5 ml TRIS-Puffer (100 µM, pH 8,0)
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
	1 Spatelspitze Xylen-Cyanol
	add 50 ml H ₂ O
5 µM Fura-2AM-Lösung:	995 µl ml Zellkulturmedium mit FCS
	5 µl Fura-2AM (1 mM in DMSO, Invitogen)

Ca²⁺-Badlösung (2mM,
pH 7,21, 297 mosm/kg):

Substanz	Konzentration (µM)
NaCl	140
KCl	4
MgCl ₂	1
HEPES	10
Glucose	10
CaCl ₂	2

Lösungen für Fluoreszenzmessungen	
2 µM-EnglerinA-Lösung	Badlösung + 2 µM EnglerinA
BTD-Lösung	Badlösung + 20 µM BTD
BTD-EgA-Lösung	Badlösung + 10 µM BTD + 2 µM EnglerinA
Riluzol-Lösung	Badlösung + 100 µM Riluzol
Riluzol-EgA-Lösung	Badlösung + 50 µM Riluzol + 2 µM EnglerinA
CPA-Lösung	Badlösung + 10 µM CPA
OAG-CPA-Lösung	Badlösung + 100 µM OAG + 10 µM CPA

3.1.4 Antikörper (AK)

Primäre AK:

Antikörper	Hersteller
Anti-GFAP-Antikörper aus Kaninchen	Dianova
Anti-GLAST-PE-Antikörper aus Maus	Miltenyi Biotec
Anti-CD11b-FITC-Antikörper aus Ratte	Miltenyi Biotec
Anti-O4-APC-Antikörper aus Maus	Miltenyi Biotec

Sekundäre AK:

Antikörper	Hersteller
Anti-Kaninchen-Antikörper (Alexa Fluor 555 nm) vom Esel	Invitrogen

3.1.5 Oligonukleotid-Primer

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden im Labor der experimentellen und klinischen Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes entworfen und von Eurofins Genomics (Ebersberg) oder von der Firma QIAGEN® bezogen (Tab. 1 und Tab. 2).

Tab. 1: In PCRs verwendete Eurofins-Oligonukleotid-Primer.

Gen	Vorwärts (5'→3')	Rückwärts (5'→3')	Größe
TRPC1	TAAAGATTTGCTCGCACAAGCCC	TTTGACTGGGAGACAAACTCCTTCTGG	71 bp
TRPC2	TCTGCCAGCTCACGAATCGC	TTTCGTTGAAATTGCCTAGCTTCTCG	73 bp
TRPC3	CAGCATTCTCAATCAGCCAACACG	AAGATGGCTAATTCTCCGTCCG	98 bp
TRPC4	TGAGAAGGAAGCCAGAAAGCTTCG	CCTTAACATTCTCCTCCGTCAAGCC	68 bp
TRPC5	GTGGGCGATGCATTACTCTACGC	GTGGGCTGCCAACATAATGGG	68 bp
TRPC6	TCCAGGAAATTGAGGATGATGCG	TTGGAAGCCTTGCTTTTGACCC	97 bp
TRPC7	AGGCCAAACGCTGTGAAAACG	CCGCTTCATGATCTTCTGGTATCTGG	52 bp
HPRT	GTCAACGGGGGACATAAAAAGTTATTGG	GCTTGCAACCTTAACCATTTTGGG	60 bp

Tab. 2: In PCRs verwendete Qiagen®-Oligonukleotid-Primer.

Gen	Produkt-Nr.	Größe
Trpc1	QT00134988	92 bp
Trpc2	QT01049839	115 bp
Trpc3	QT00124194	98 bp
Trpc4	QT00115444	113 bp
Trpc5	QT00169757	100 bp
Trpc6	QT00170905	114 bp
Trpc7	QT00124145	98 bp
HPRT	QT00166768	168 bp

3.1.6 Software

Excel 2016	Microsoft Corporation
Word 2016	Microsoft Corporation
Image J	Wayne Rasband
TILL-Vision	TILL Photonics
AxioVision Rel. 4.7	Zeiss
Igor Pro 5.1	Wave Metrics
Corel Draw	Corel Corporation

3.2 Methoden

3.2.1 Mauslinien

Das Töten der Mäuse und Organentnahmen wurden unter Einhaltung der Tierschutz-Versuchstierverordnung des Bundesministeriums der Justiz und für Verbraucherschutz der Bundesrepublik Deutschland und den geltenden Richtlinien der Universität des Saarlandes durchgeführt. Die murinen Astrozyten des Rückenmarks wurden aus neugeborenen Mäusen

(p3 – p5) präpariert. Die genutzten WT-Mäuse entstammten den Linien C57BL6/N und 129SvJ/C57Bl6/N. Für die Experimente wurden außerdem Zellen von TRPC1-defizienten Mäusen (DIETRICH et al., 2007), TRPC3-defizienten Mäusen (HARTMANN et al., 2008) und TRPC4-defizienten Mäusen verwendet (FREICHEL et al., 2001), wobei in Experimenten mit Mäusen der KO-Genotypen TRPC3-KO und TRPC4-KO die Linie C57BL6/N als Wildtyp-Kontrolle und in den Experimenten mit TRPC1-KO-Mäusen Tiere der Linie 129SvJ/C57Bl6/N verwendet wurden.

3.2.2 Präparation von Zellen aus dem Rückenmark der Maus

Zu Beginn der Präparation wurde die dorsale Haut mit Ethanol gereinigt und desinfiziert. Anschließend wurde die Maus mit Hilfe einer großen Schere dekapitiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Körper der Maus an allen vier Gliedmaßen mit Nadeln auf eine Styroporfläche fixiert (Abb. 4 a, b). Nacheinander wurden vorsichtig die dorsale Haut, die dorsalen Muskelgruppen samt Fettgewebe und schließlich die dorsalen Anteile der Wirbel, die den Wirbelkanal mitformen, entfernt (Abb. 4 c-g). Unter Benutzung einer sehr feinen Pinzette wurde daraufhin das nun offenliegende Rückenmark mobilisiert, ohne es zu verletzen und in eine sterile Petrischale (3,5 cm Durchmesser) mit auf Eis gekühltem PBS überführt (Abb. 4 h, i).

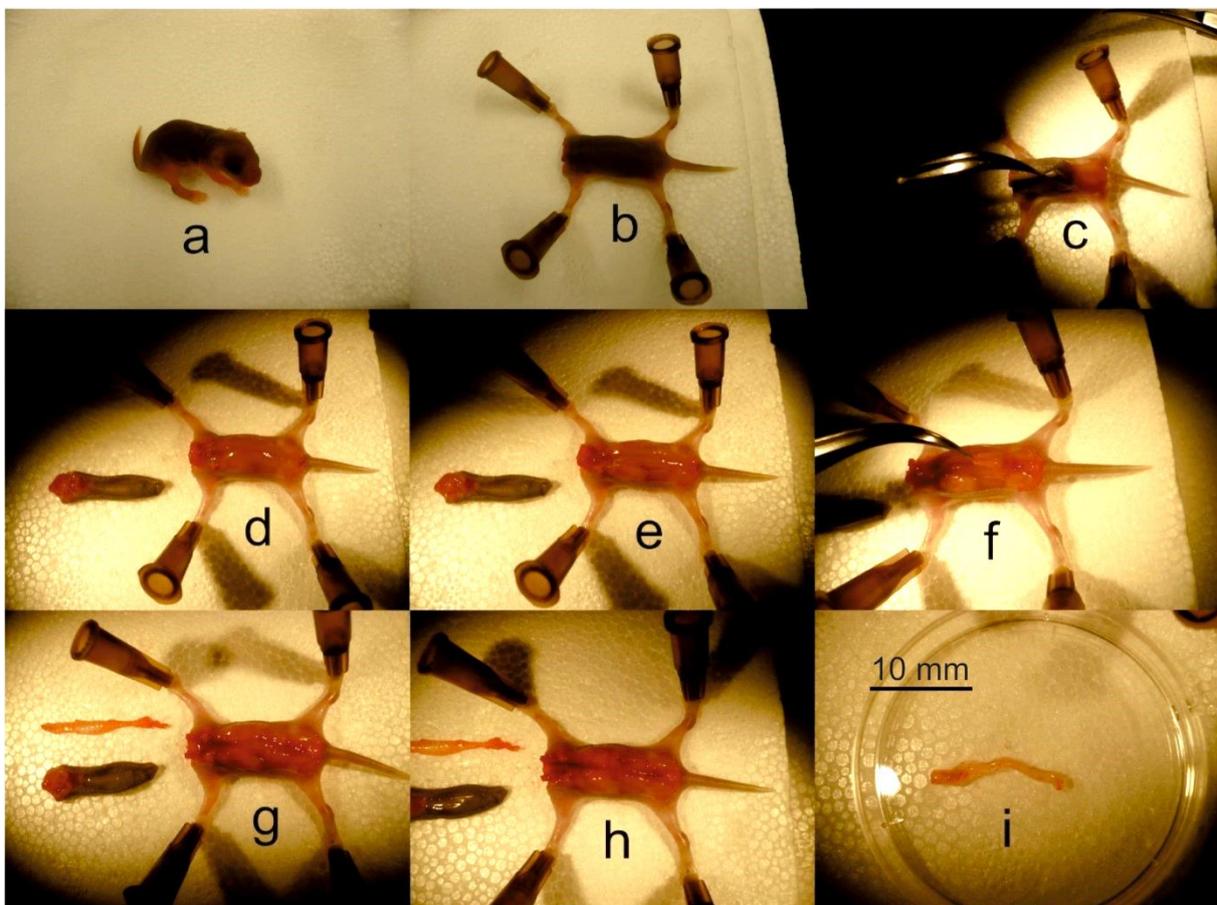


Abb. 4: **Makroskopische Präparation des Rückenmarks.** a: Mäusejungtier (p 3-5); b: Mäusekörper nach Dekapitation an allen Extremitäten auf Styropor aufgespannt; c und d:

Einschneiden und Entfernen sowohl der dorsalen Hautanteile, als auch des subkutanen Fettgewebes; e: beidseitiges Einschneiden der Rückenmuskulatur längs der Wirbelsäule; f und g: seitliches Einschneiden der Wirbelkörper und Entfernen der dorsalen Anteile der Wirbelkörper; h und i: vorsichtiges Lösen des Rückenmarks aus dem offenen Wirbelkanal und Transfer in ein kleines Schälchen mit kaltem PBS.

Nach Entfernung der Rückenmarkshäute und der in ihnen enthaltenen Gefäße unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (Abb. 5) wurde das nun gesäuberte Rückenmark in ein steriles 50 ml Röhrchen mit 10 ml auf Eis gekühltem Zellmedium ohne FCS (3.1.3) gegeben.

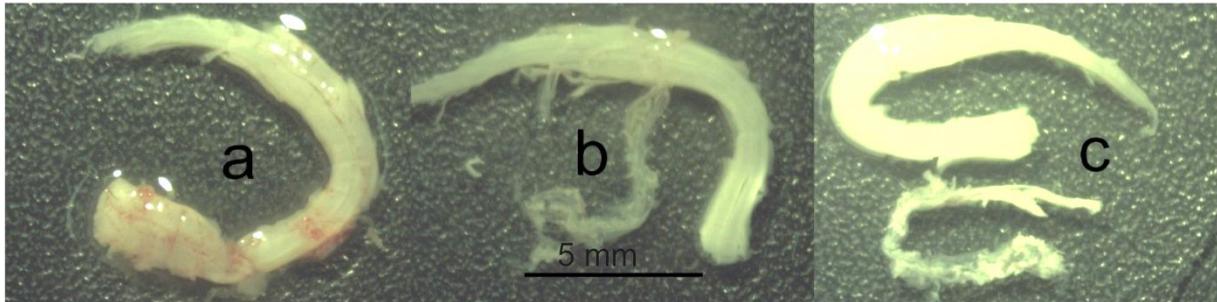


Abb. 5: **Mikroskopische Präparation des Rückenmarks.** a: Rückenmark in PBS, Gefäße, die in den Rückenmarkshäuten verlaufen sind sichtbar; b: die Rückenmarkshäute sind etwa zur Hälfte entfernt und stellen sich als weißes, bindegewebiges Gewebe mit kleinen Gefäßen dar; c: Rückenmark und Rückenmarkshäute vollständig getrennt voneinander.

Nach Abschluss der Präparation wurde zuerst das Medium abgesaugt, 5 ml Trypsin-Lösung (3.1.3) zu dem Rückenmark in das Röhrchen hinzugegeben und das Röhrchen anschließend bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Nach Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von 10 ml Zellmedium mit FCS wurde das Röhrchen 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und durch 10 ml Zellmedium ohne FCS ersetzt. Um die Zellen aus ihren Verbänden zu lösen, wurde daraufhin der Inhalt des Röhrchens mit einer 10 ml Spritze (B. Braun) durch eine 20 G Kanüle (0,90 x 40 mm; B. Braun) zehn Mal aufgesogen und wieder in das Röhrchen zurückgespritzt. Die dadurch erhaltene Zellsuspension wurde durch ein 40 µm Zellsieb (BD Falcon) in ein neues steriles 50 ml Röhrchen gefiltert und für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, durch 10 ml Zellmedium mit FCS ersetzt und die Zellen durch zehn Mal Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Je 5 ml der Suspension wurden in eine mit poly-L-Lysin (P-L-L) beschichtete 25 cm² Zellkultur-Flasche (BD Falcon) gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem luftbefeuchtenden Inkubator in Kultur gehalten. Dabei wurden Zellen von 3 - 4 Mäusen in eine Kulturflasche vereinigt. Der erste Medium-Wechsel fand nach 2 - 3 Tagen statt. Folgende Medium-Wechsel wurden einmal pro Woche durchgeführt, bis ein konfluenten Zellrasen entstanden war. Um Mikrogliazellen zu entfernen, wurde die Kulturflasche leicht geschüttelt, um möglichst viele dieser Zellen zu mobilisieren und mit dem Zellmedium anschließend abzusaugen. Astrozyten wurden durch dieses Manöver nicht mobilisiert. Zur Zellernte wurden die verbliebenen Astrozyten mit 5 ml

PBS-Lösung gewaschen und nach Absaugen des PBS mit 3 ml Trypsin-Lösung (3.1.3) für 3 bis 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Schlagen der Kultur-Flasche wurden die adhärennten Astrozyten mobilisiert und durch Zugabe von 7 ml Zellmedium mit FCS inkubiert. Die so entstandene Zell-Suspension war im Folgenden Grundlage der durchgeführten Experimente.

3.2.3 Immunzytochemie

Für die Immunfärbeversuche wurde je 1 ml der Zell-Suspension (3.2.2) in eine kleine Petrischale pipettiert, in welcher sich je vier mit P-L-L beschichtete kleine, runde Deckgläser (ø12 mm; Thermo) befanden. Anschließend wurden 2 ml des Zellmediums mit FCS (3.1.3) in die Petrischalen pipettiert und diese für fünf bis sieben Tage inkubiert, bis die Deckgläser fast durchgehend mit Zellen bewachsen waren. Die Deckgläser wurden mit einer Pinzette entnommen und in die Mulden einer 24-Mulden-Platte (Falcon) verteilt. Die Zellen wurden auf jedem Deckglas mit je 400 µl Paraformaldehyd-Lösung (3.1.3) für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, je fünfmal mit PBS-Lösung gewaschen und mit je 100 µl TritonX-Eselerum-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um die fixierten Zellen zu permeabilisieren und unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren. Nach Absaugen der Flüssigkeit wurden je 100 µl primäre Antikörperlösung in jede Mulde gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die primären Antikörper (anti-GFAP, 3.1.4) wurden zum Markieren von Astrozyten-Strukturen verwendet, wobei verschiedene Konzentrationen (1:1000, 1:500) der Antikörper für die Immunfärbungen getestet wurden. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen fünfmal mit PBS-Lösung gewaschen und mit 100 µl einer sekundären Antikörperlösung, sowie 1 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma) zum Anfärben der Zellkerne für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der sekundäre Antikörper trägt einen Fluoreszenzfarbstoff und bindet an den primären Antikörper. Auch hier wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen getestet (1:1000, 1:500). Eine Stunde später wurden die Zellen auf den Deckgläsern fünfmal mit PBS-Lösung gewaschen, kurz luftgetrocknet und anschließend mit Fixierungsmedium (Vectashield Vector) auf Objektträger fixiert. Von den so hergestellten Präparaten wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 200M, ZEISS) unter Verwendung einer Lichtquelle (HXP 120) und der Software AxioVision Rel. 4.7 mit einer Kamera (AxioCam, ZEISS; verwendete Objektive: Neofluar 40 x 0,75, ZEISS; Fluor 20 x 0,75, ZEISS; Plan-Apochromat 64 x 1,40, ZEISS) Bilder zur weiteren Analyse aufgenommen.

3.2.4 *Fluorescence activated cell sorting (FACS)*

Eine Zellsuspension (3.2.2) wurden in ein 50 ml Röhrchen pipettiert und für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wurde das gesamte Zellmedium abgesaugt und durch 5 ml BSA-PBS-Lösung ersetzt. Der Röhrchen-Inhalt wurde daraufhin zwei bis drei Mal auf- und

abpipettiert und anschließend nochmal für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und zu dem nun verbliebenen Zellsediment 600 µl der BSA-PBS-Lösung pipettiert. Der Röhrchen-Inhalt wurde anschließend auf- und abpipettiert, bis das Zellpellet gelöst war und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. 100 µl dieser Lösung wurden als ungefärbte Kontrollprobe in ein eigenes Eppendorf-Gefäß pipettiert und auf Eis gelegt. Zu den restlichen 500 µl wurden fluoreszierende Antikörper in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen gegeben, vermischt und für etwa 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. In dieser Arbeit wurden die Zellproben gleichzeitig entweder mit zwei oder drei verschiedenen Antikörpern gefärbt, wobei die zweifach gefärbten Proben mit jeweils 30 µl anti-GLAST-PE-Antikörper und 20 µl anti-CD11b-FITC-Antikörper und zu den dreifach gefärbten Proben 30 µl anti-GLAST-PE-Antikörper, 20 µl anti-CD11b-FITC-Antikörper und 30 µl anti-O4-APC-Antikörper gegeben wurden. Zur Anregung des antikörpergekoppelten PE wurde eine Wellenlänge von 565 nm verwendet, für FITC 490 nm und für APC 650 nm. Die zur Detektion der Zellen gemessenen Emissionen wurden für PE bei 578 nm, bei FITC bei 525 nm und bei APC bei 660 nm gemessen.

Nach Inkubation der Antikörper wurde das Eppendorf-Gefäß erneut für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, 1,5 ml BSA-PBS-Lösung addiert, erneut für 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Sediment wurde in 400 µl BSA-PBS-Lösung resuspendiert und durch einen 30 µm-Filter (BD Biosciences) filtriert bis zur FACS-Analyse auf Eis gelagert.

GLAST-positive, große Zellen wurden als Astrozyten betrachtet, von GLAST-negativen, kleineren, CD11b-positiven Mikrogliazellen getrennt und nachfolgend für PCR-Versuche verwendet, jeweils 100 GLAST-positive Zellen wurden dabei in PCR-Reaktionsröhrchen sortiert (Abb. 6).

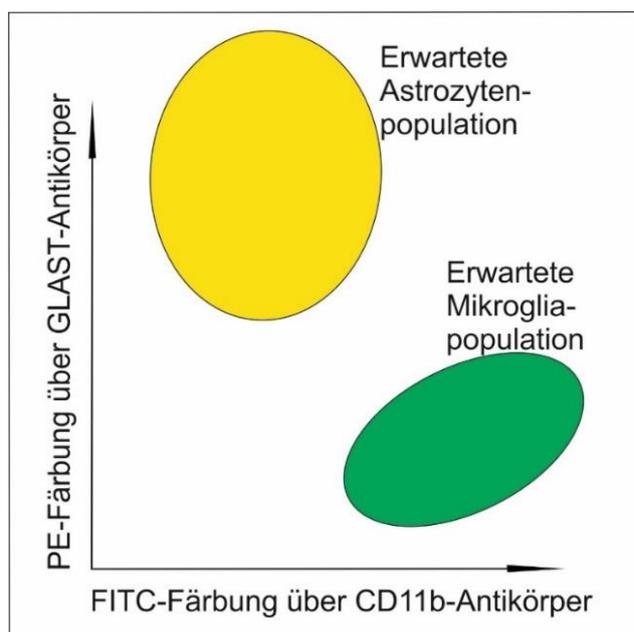


Abb. 6: „*Fluorescence-activated cell sorting*“ (FACS) nach Markierung mit **Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern**. Exemplarisch ist eine theoretische FACS-Analyse nach Färbung mit Anti-GLAST-PE-Antikörpern und Anti-CD11b-FITC-Antikörpern abgebildet. Durch Verwendung dieser Antikörper lassen sich in Zell-Kulturen typischerweise eine GLAST-positive Astrozyten-Subpopulation und eine CD11b-positive Mikroglia-Subpopulation darstellen.

3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In der vorliegenden Arbeit wurden Primer wie in Tab. 1 und Tab. 2 (3.1.5) dargestellt verwendet, um die Expression von TRPC-Kanälen in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus zu untersuchen.

3.2.5.1 RNA-Extraktion

Die untersuchte RNA stammte aus je 100 FACS-sortierten Astrozyten. Die Astrozyten wurden bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Fortsetzung der Experimente bei -80 °C in sterilen Röhren gelagert. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy® Micro Kits (Qiagen) extrahiert und in 10 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Qualität und die Menge der erhaltenen RNA wurde mithilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop 1000, peqLab) überprüft.

3.2.5.2 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

0,5 µl der Astrozyten-RNA-Lösung (3.2.5.1) wurden in ein weiteres PCR-Reaktions-Röhrchen überführt und mit Hilfe des *SuperScript® III One-Step RT-PCR Systems* mit *Platinum™ TaqDNA-Polymerase* (Invitrogen) mit TRPC-spezifischen Oligonukleotidprimern (Tab. 1 und Tab. 2) transkribiert und amplifiziert.

Folgender Reaktionsansatz wurde hergestellt:

- 0,5 µl RNA-Lösung
 - 12,5 µl 2X Reaction Mix (0,4 mM dNTP, 24 mM MgSO₄)
 - 0,5 µl RT/Platinum Taq DNA-Polymerase
 - 0,75 µl Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)
 - 0,75 µl Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)
 - 10 µl RNase-freies Wasser
- Σ 25 µl/Probe

Die RNA wurde mit Hilfe des nachfolgenden Protokolls zunächst transkribiert (DNA-Erststrang-Synthese) und die cDNA nachfolgend amplifiziert:

	Temperatur in ° C	Dauer	Zyklus
DNA-Erststrang-Synthese aus RNA	50	30 min	
PCR	94	2 min	
	94	15 s	1 - 15
	62	15 s	1 - 15
	70	20 s	1 - 15

	94	15 s	16 - 45
	62	15 s	16 - 45
	70	20 s + 2 s/Zyklus	16 - 45
	72	5 min	
	4	∞	

3.2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

In dieser Arbeit wurde die in 3.2.5.2 amplifizierte DNA für die Gel-Elektrophorese verwendet, um zu prüfen, ob gewisse DNA-Abschnitte in den Zellen vorhanden sind. Hierzu wurde 2 % Agarose-Gel angefertigt, da die erwartete Größe der DNA-Fragmente bei etwa 150 – 200 bp lag. Zur Herstellung dieses Gels wurde 2 g Agarose und 1 g Agarose GTQ in 100 ml TBE-Puffer unter Wärmezufuhr aufgelöst. Nachdem die Mischung abgekühlt war, wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid 1 % hinzugefügt und in einen geeigneten Gelträger gegossen, sodass es nach Aushärten die gewünschte Form besaß. Ethidiumbromid interkaliert in DNA-Stränge, fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht und macht auf diese Weise markierte DNA-Fragmente im Gel sichtbar (SHARP et al., 1973).

Das feste Agarose-Gel wurde in eine Gel-Elektrophorese-Kammer gelegt und mit TBE -Puffer übergossen, bis es vollständig bedeckt war. Anschließend wurde zu jeder Probe LoadingDye (3.1.3) hinzugefügt und die Proben in die Geltaschen des Agarose-Gels pipettiert. Anhand des LoadingDye konnte die Wanderung der DNA-Fragmente durch das Gel optisch nachvollzogen werden. In eine der Geltaschen wurde eine Probe mit definierten DNA-Strängen als Molekulargewichtsstandard (*Low Molecular Weight DNA Ladder*) pipettiert, um eine spätere Größen-Einordnung der amplifizierten DNA-Stränge zu ermöglichen. Durch Anlegen einer Spannung von 120 V wurden DNA-Stränge elektrophoretisch getrennt, durch Auflegen des Gels auf einen Transluminator mit UV-Licht (312 nm Wellenlänge) sichtbar gemacht und fotografiert.

3.2.7 Ratiometrische Messungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationsänderung mittels Fura-2

In dieser Arbeit wurde Fura-2 zur Messung der Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration verwendet. Fura-2 ist ein polarer, Ca^{2+} -bindender, fluoreszierender Farbstoff (GRYNKIEWICZ et al., 1985). Da er in dieser Form die Zellmembran nicht passieren kann, wird er als membranpermeabler Acetoxymethylester verwendet (Fura-2AM). In der Zelle wird die Esterbindung von unspezifischen Esterasen gespalten, wodurch das Fura-2-Molekül freigesetzt wird und die Zelle nicht mehr verlassen kann. Es handelt sich um einen ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff, dessen Anregungsmaximum in Gegenwart von Ca^{2+} bei 335 nm und in Abwesenheit von Ca^{2+} bei 362 nm liegt. Durch Messung der Fluoreszenzmuster

nach Anregung bei 340 und 380 nm (F340/F380) können relative Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen unabhängig von der Farbstoffmenge bestimmt werden.

Zu 10 ml Zellsuspension (3.2.2) wurden 35 ml Zellmedium mit FCS gegeben und à 3 ml auf 15 kleine Schälchen (\varnothing 3,5, Falcon) verteilt, in welchem jeweils ein mit P-L-L beschichtetes Deckglas (\varnothing 25 mm; OrsaTec) lag. Nach 5 - 7 Tagen wurde das Medium abgesaugt und durch 1 ml 5 μM -Fura-2AM-Lösung (3.1.3) ersetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 im Dunkeln wurden die Zellen dreimal mit je 300 μl Badlösung gewaschen, bevor das Deckglas in eine Messkammer gelegt wurde. Es wurde entweder ein offene oder eine geschlossene Messkammer genutzt. Bei der offenen Messkammer ist es möglich, Lösungen mit einer Pipette hinzuzufügen. Ein Lösungswechsel ist nicht möglich. Um einen Lösungswechsel zu ermöglichen wurde eine geschlossene Messkammer verwendet, in welcher die Zellen ständig mit Lösung perfundiert wurden. Bei den Messungen wurden Zellen aus ausgewählten Bereichen der Deckgläser alle 2 Sekunden nacheinander für je 30 ms mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm und 380 nm beleuchtet (Polychrome V, TILL-Photonics) und die Emissionen mit einer Kamera (Imago, TILL-Photonics) aufgezeichnet. Zellen, deren Ca^{2+} -Signal gemessen werden sollte, wurden als „*regions of interest*“ (ROI) markiert. Aus den beiden Emissionswerten (bei 340 nm und 380 nm) der ROIs wurde nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz der beiden Wellenlängen, die an einer zellfreien Zone gemessen wurde, mit dem Programm TILL-Vision der Quotient F340/F380 gebildet, um die Veränderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration im zeitlichen Verlauf darzustellen. Im Rahmen der Auswertung ließ sich für jede gemessene Zelle die Entwicklung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen vorgegebenen Zeitraum abbilden. In den Abbildungen des Ergebnisteils sind entweder wenige, repräsentative Messungen oder Mittelwerte +/-SEM dargestellt.

Zusätzlich wurden in einzelnen Versuchsreihen die jeweils maximal gemessenen cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen verschiedener Genotypen (*peak amplitude*) und die gesamte Ca^{2+} -Menge, die in einem bestimmten Zeitraum ins Cytosol abgegeben oder aufgenommen wurde gemessen und verglichen. Zur Bestimmung der Menge dieses cytosolischen Gesamtcalciums wurden die Graphen jeder gemessenen Zelle auf ihren basalen Ca^{2+} -Wert genullt und anschließend die Fläche zwischen Graph und zur x-Achse parallelverlaufenden Linie der basalen Ca^{2+} -Konzentration, also das Integral des Graphen, für einen bestimmten Zeitraum berechnet (*area under the curve*, AUC).

3.2.8 Migrationsversuche

Das *scratch-assay* ist eine Methode anhand derer die Migrationsfähigkeit von Zellen untersucht werden kann und dient zur Untersuchung der Wundheilung *in vitro*. Hierbei wird in einem durchgehend bewachsenen Zellrasen eine zellfreie Fläche durch einen Kratzer

geschaffen. Im Anschluss wird beobachtet, um wie viel in welchem Tempo diese zellfreie Fläche wiederbesiedelt wird.

2 ml Zellsuspension (3.2.2) wurden in mit P-L-L beschichteten Untereinheiten einer 6-Mulden-Platte (Falcon) pipettiert und 1 ml Zellmedium mit FCS hinzugefügt. In die 6-Mulden-Platte wurden zuvor mit einer Nadel (0,90 x 40 mm, B. Braun) an der Unterseite Markierungslinien eingeritzt, um das Wiederauffinden der zu untersuchenden Regionen im Zellrasen zu erleichtern (Abb. 7). Anschließend wurden die Zellen für 5 bis 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um einen durchgehend bewachsenen Zellrasen zu erhalten. Für das Erzeugen einer zellfreien Fläche wurde der Zellrasen nach Absaugen des Mediums zweimal mit einer sterilen Pipetten-Spitze (200 µl Pipetten-Spitze, Sarstedt) senkrecht zu den äußeren Markierungslinien entfernt (Abb. 7) und mit 3 ml PBS gewaschen, um etwaige gelöste Zellen und Rückstände des FCS im Zellmedium und somit verbliebene Wachstumsfaktoren zu entfernen. Nach Zugabe von 3 ml Zellmedium ohne FCS wurden die Zellen wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch Entzug der Wachstumsfaktoren, die im FCS enthalten sind, wird die Proliferation und das Wachstum der Zellen stark reduziert und deren Einfluss auf das Schrumpfen der zellfreien Fläche (*scratch*) minimiert.

Im Folgenden wurden 0, 4, 8 und 24 Stunden nach Erstellen der zellfreien Fläche Bilder von der Schnittstelle des äußeren und inneren Kratzers mit einer Kamera (AxioCam, Zeiss) unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 40C, Zeiss) gemacht (4 Bilder pro Mulde; Abb. 7). Mithilfe der Software Image J wurde auf jedem Bild die zellfreie Fläche bestimmt. Durch Vergleichen der zu den unterschiedlichen Zeiten gemessenen Flächen konnte die Migrationsfähigkeit der Zellen ermittelt werden. Dabei wurde die zellfreie Fläche zum Zeitpunkt 0 als 100 % definiert.

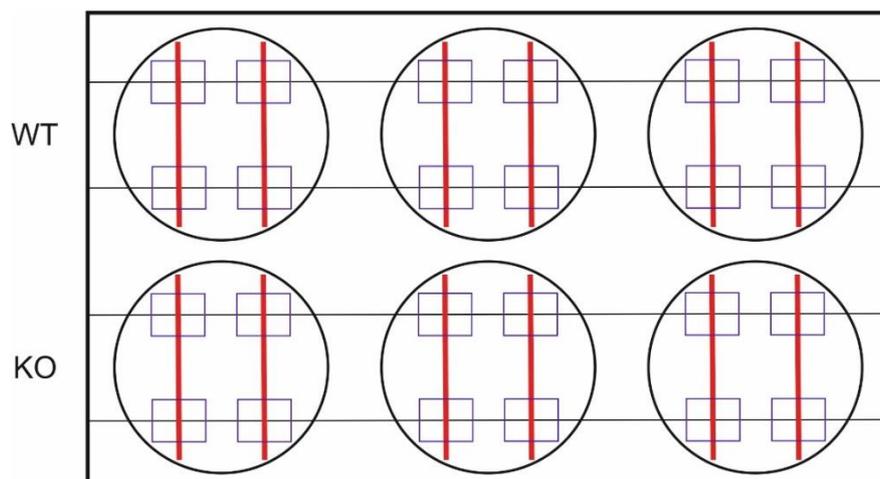


Abb. 7: **Schematische Darstellung einer 6-Mulden-Platte bei den Migrationsversuchen.** Bei jedem Versuchsdurchlauf wurden gleichzeitig je drei TRPC-KO-Astrozyten-Kulturen und drei korrespondierende Wildtyp-Kulturen angelegt. Die Anordnung der äußeren horizontalen Markierungslinien wurden vorab auf der Rückseite der Platte mit einer Spritzennadel angefertigt, der vertikale *scratch* (rot) im Zellrasen wurde durch eine 200 µl Pipettenspitze gemacht. In jeder der Mulden gibt es insgesamt 4 Schnittstellen zwischen horizontaler

Markierungslinie und *scratch* (blaue Kästchen), an denen direkt nach Durchführung des *scratch*, sowie 4, 8 und 24 h später Fotos gemacht wurden, um die Veränderung der zellfreien Fläche und damit die Migrationsfähigkeit der Zellen zu analysieren.

3.2.9 Proliferationsversuche

Der CellTiter 96® AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay ist eine kalorimetrische Untersuchungsmethode, bei der die Anzahl lebender Zellen bestimmt wird. Intakte, nicht aber tote Zellen nehmen den Stoff MTS (3.1.2.1) auf und reduzieren diesen durch Dehydrogenasen zu löslichem Formazan (Abb. 8). Der Formazan-Gehalt der Zellen kann anhand seiner Extinktion bei einer Wellenlänge von 490 nm ermittelt werden, wodurch sich Rückschlüsse auf die Anzahl der zu Stoffwechsel fähigen und somit lebenden Zellen machen lassen.

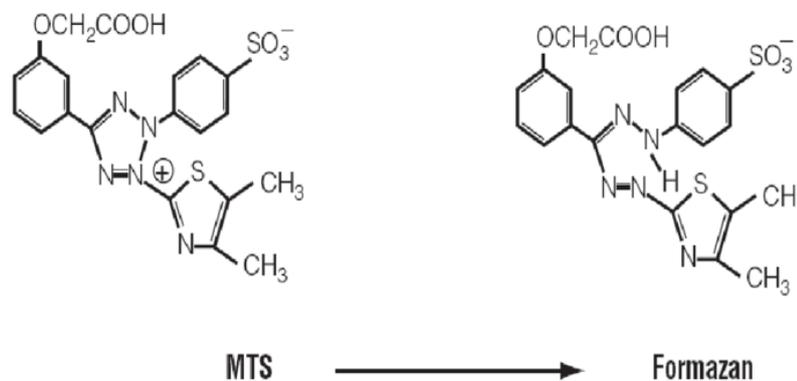


Abb. 8: **Reduktion von MTS zu Formazan.** Farbloses MTS wird durch Dehydrogenasen von stoffwechselaktiven lebenden Zellen zu farbigem Formazan reduziert, dessen Extinktionsmaximum bei 490 nm liegt. (Quelle: Promega: TECHNICAL BULLETIN CellTiter 96® AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay; Instructions for Use of Products; 2012: S. 2)

Eine Zellsuspension (3.2.2) wurde mithilfe einer Neubauer-Zellzählkammer auf eine Zellkonzentration von 5×10^4 Zellen pro ml eingestellt und je 100 μ l Suspension (5×10^3 Zellen) wurden in eine Mulde einer 96-Mulden-Platte gegeben. Die Zellen wurden für 7 Tage bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und ihre Zahl an den Tagen 0, 3, 5, 6 und 7 nach Plattierung mit einem Photometer (Infinite M200, Tecan) anhand des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay bestimmt. Dabei wurden je 20 μ l MTS in die für diesen Tag vorhergesehenen Mulden pipettiert und nach einer Stunde Inkubation die Extinktion bei $\lambda=490$ nm gemessen. Mit Zellmedium gefüllte Mulden ohne Zellen dienten als Kontrollproben der Hintergrund-Extinktion.

3.2.10 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte durch die Programme Excel 2016 und Igor Pro 5.1. Ergebnisse der einzelnen Versuche werden in der vorliegenden Dissertation als Mittelwerte

(+/-SEM) mit (y/xx) dargestellt, wobei (xx) die Anzahl der untersuchten Zellen (Ca²⁺-Imaging), Mulden (Proliferationsmessung) und *scratch*-Regionen (Migrationsmessung) und (y) die Anzahl der unabhängigen durchgeführten Experimente wiedergegeben. Zur Prüfung der Signifikanz von Unterschieden wurden ungepaarte zweiseitige t-Tests durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden dabei mit Sternchen dargestellt: $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$. Graphische Bearbeitungen von Diagrammen und Bildern wurden mit der Software CoreIDRAW X5 umgesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Immunzytochemische Charakterisierung von Zellkulturen aus dem Rückenmark der Maus

Die in 3.2.2 beschriebenen Zellkultur aus dem Rückenmark war nach zwei bis drei Wochen in einer 25 cm² Kulturflasche konfluent. Gewaschen und unter dem Mikroskop zeigte sich eine heterogene Zusammensetzung der Zelltypen (Abb. 9).

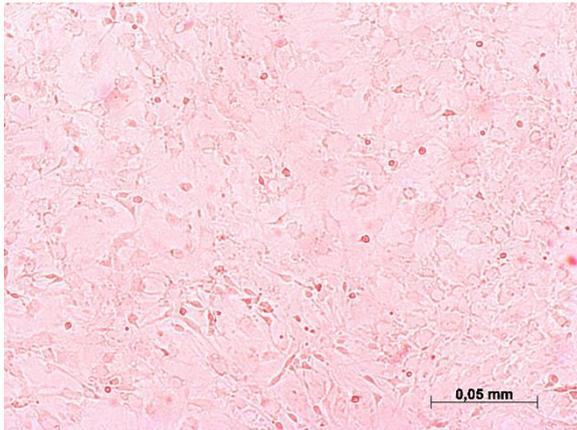


Abb. 9: **Durchlichtmikroskopisches Bild einer etwa 3 Wochen alten konfluent wachsenden Zellkultur aus dem Rückenmark der Maus ohne Färbung.** Zu sehen sind verschiedene Zelltypen: mögliche Zelltypen des zentralen Nervensystems sind Astrozyten, Mikrogliazellen, Neurone und Oligodendrozyten, auch eine Kontamination mit Fibroblasten aus den Rückenmarkshäuten konnte nicht ausgeschlossen werden.

Um den Anteil der Astrozyten in der Kultur zu identifizieren wurden die Zellen auf Deckgläsern inkubiert und mit Antikörpern gegen Astrozyten-spezifische Proteine, wie das *glial fibrillary acid protein* (GFAP) und den *glutamate aspartate transporter* (GLAST) sowie mit fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern angefärbt (3.2.3). Zum Anfärben der Zellkerne wurde der Fluoreszenzstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. DAPI ist in der Lage, auch intakte Zellmembranen zu überwinden und lagert sich vor allem in AT-reichen Abschnitten doppelsträngiger DNA ein (TANIOUS et al., 1992). Zunächst wurden Zellkulturen verwendet, bei deren Präparation die Rückenmarkshäute nicht entfernt wurden (Abb. 5). Dadurch wurden die Kulturen möglicherweise durch Fibroblasten verunreinigt, die daraufhin durch starkes Wachstum andere Zellarten in der Kultur verdrängten (Abb. 10). Als Folge konnten anfangs in den Färbeversuchen nur sehr wenige Zellen als GFAP-positiv identifiziert werden. In allen Folgeversuchen wurden daraufhin die Rückenmarkshäute entfernt, um reinere Astrozyten-Kulturen zu erhalten.

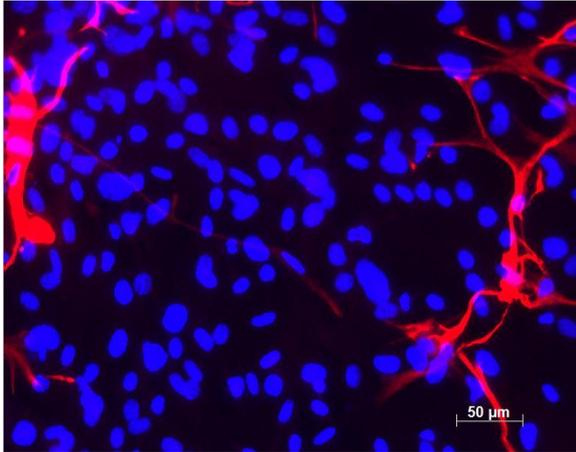


Abb. 10: **GFAP-Färbung einer Astrozytenkultur ohne vorangegangene Entfernung der Rückenmarkshäute.** Die GFAP-Färbung tritt rot hervor, die DAPI-Färbung blau. Es sind kaum GFAP-positive Astrozyten zu erkennen, obwohl sehr viele Zellen anhand ihrer Zellkerne im Bild zu sehen sind. Antikörper: primär rabbit-anti-GFAP (1:1000), sekundär anti-rabbit Alexa Fluor 555 nm (1:1000).

Durch das sorgfältige Entfernen der Rückenmarkshäute während der Präparation (Abb. 5) ließen sich mit der GFAP-Färbung $65 \pm 1,99\%$, (insgesamt 938 ausgewertete Zellen aus 2 Experimenten) der Zellen anfärben (Abb. 11). Die Verwendung des anti-GLAST-Antikörpers, der ebenfalls spezifisch Astrozyten markiert, ergab mit $70 \pm 1,27\%$, (insgesamt 874 ausgewertete Zellen aus 2 Experimenten) positiver Zellen ein ähnliches Bild. (Abb. 12).

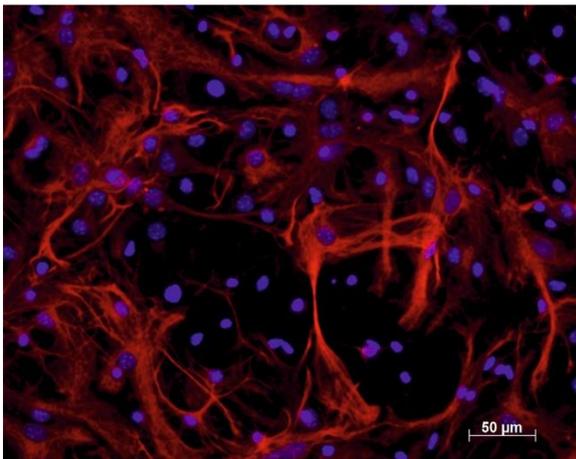


Abb. 11: **Färbung von Zellkulturen des Rückenmarks nach Entfernung der Rückenmarkshäute und 3 Wochen Kulturdauer.** Die GFAP-Färbung tritt rot hervor, die DAPI-Färbung blau. Antikörper: primär rabbit-anti-mouse-GFAP (1:500), sekundär anti-rabbit Alexa Fluor 555 nm (1:500).

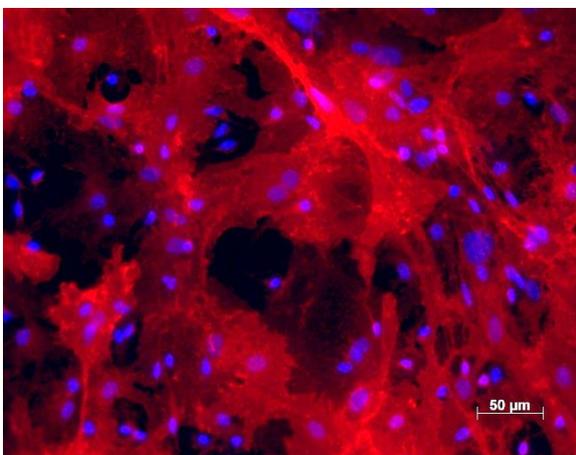


Abb. 12: **GLAST-Färbung von Zellkulturen des Rückenmarks.** Die GLAST-Färbung tritt rot hervor, die DAPI-Färbung blau. Antikörper: anti-GLAST-PE (1:30).

4.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung von Zellkulturen aus dem Rückenmark der Maus

Im Folgenden wurde die Zusammensetzung von Rückenmarkskulturen nach Entfernung der Rückenmarkshäute mit Hilfe von *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) analysiert.

4.2.1 Charakterisierung von doppelt gefärbten Zellkulturen aus dem Rückenmark der Maus

Anders als bei den Immunfärbeversuchen wurden anti-GFAP-Antikörper in diesen Experimenten nicht verwendet, da diese Antikörper zytoplasmatische Strukturen färben, wofür die Zellmembran vor der Färbung permeabilisiert werden müsste. GLAST hingegen ist ein zellmembranständiges Protein von Astrozyten und konnte auch ohne Permeabilisierung mit anti-GLAST-Antikörpern markiert werden (JUNGBLUT et al., 2012). Das CD11b-Molekül diente als spezifischer Oberflächenmarker von Mikrogliazellen.

Abb. 13 zeigt die FACS-Analyse zu einer Rückenmarkskultur der Maus nach circa drei Wochen Kulturzeit vor (a) und nach (b) Doppelfärbung mit anti-GLAST-PE- und anti-CD11b-FITC-Antikörpern. Die Analyse der ungefärbten Kontrollprobe zeigt keine Fluoreszenzemissionen (Abb. 13 a). Nach Inkubation der Kultur mit anti-GLAST-PE-Antikörpern ließ sich dagegen eine Färbung von 56,8 % der Zellen feststellen (Abb. 13 b). Diese wurden als Astrozyten betrachtet. 11,6 % der Zellen zeigten eine FITC-Fluoreszenz und wurden als Mikrogliazellen betrachtet (Abb. 13 b). Ein Anteil von 31,6 % aller untersuchten Zellen blieb ungefärbt. Dabei handelt es sich vermutlich im Wesentlichen um Oligodendrozyten oder um schnell wachsende Fibroblasten. Daher wurden im Folgenden Dreifachfärbungen mit APC-gekoppelten anti-O4-Antikörpern zur Markierung von Oligodendrozyten durchgeführt.

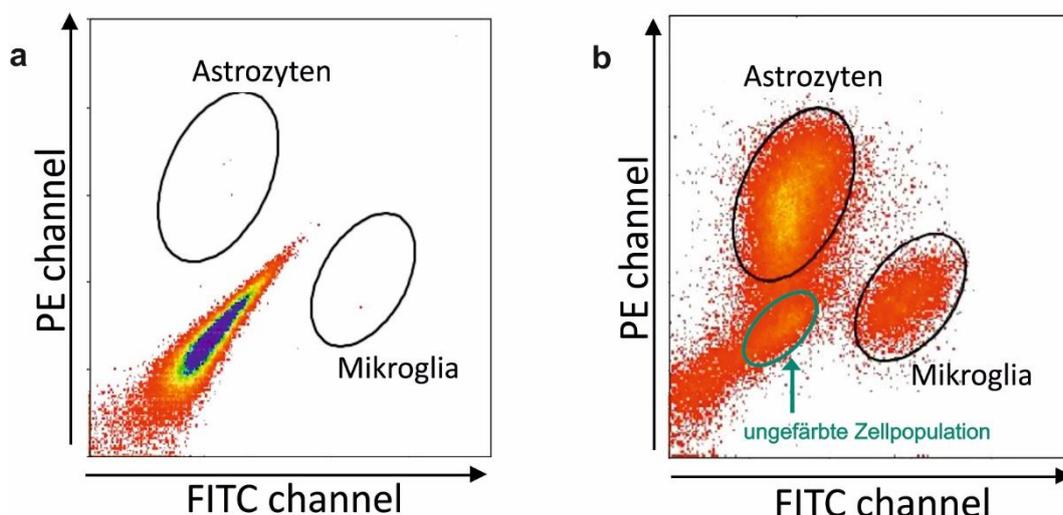


Abb. 13: **Durchflusszytometrische Analyse einer Zellkultur des Rückenmarks der Maus.** a: ungefärbte Probe. b: Färbung mit anti-GLAST-PE- und anti-CD11b-FITC-Antikörpern. GLAST-positive Zellen (Astrozyten) und CD11b-positive Zellen (Mikroglia) sind gekennzeichnet.

4.2.2 Charakterisierung von dreifach gefärbten Zellkulturen aus dem Rückenmark der Maus

Zusätzlich zu den bereits verwendeten anti-GLAST-PE-Antikörpern und den anti-CD11b-FITC Antikörpern wurden anti-O4-APC-Antikörper verwendet und damit eine Dreifachfärbung durchgeführt. O4 ist als Oberflächenprotein von Oligodendrozyten ein valider Oligodendrozyten-Marker (SOMMER, SCHACHNER, 1981).

Auch nach Dreifachfärbung zeigte sich ein ähnliches Bild bei Betrachtung der PE- und FITC-Fluoreszenz (Abb. 14 a). 59,1 % der Zellen zeigten PE-Fluoreszenz und konnten als GLAST-positive Astrozyten betrachtet werden. 18,8 % der Zelle waren CD11b-positive Mikrogliazellen. Bei Betrachtung der APC-Fluoreszenz zeigte sich insbesondere bei Gegenüberstellung mit der PE-Fluoreszenz der Astrozyten (Abb. 14 b) eine deutlich abgegrenzte Population APC-positiver Zellen, die als Oligodendrozyten mit einem Anteil von 9,9 % der gesamten Zellpopulation betrachtet werden konnten. Diese Zellen sind in Darstellungen blau gekennzeichnet und ließen sich bei Gegenüberstellung von APC- und FITC-Fluoreszenz (Abb. 14 c) nur unvollständig von den PE-gefärbten Astrozyten abgrenzen, da sich die Emissionen von APC (Maximum bei circa 660 nm) und PE (Maximum bei circa 580 nm) stärker überlagern, als von APC und FITC (Maximum bei circa 519 nm).

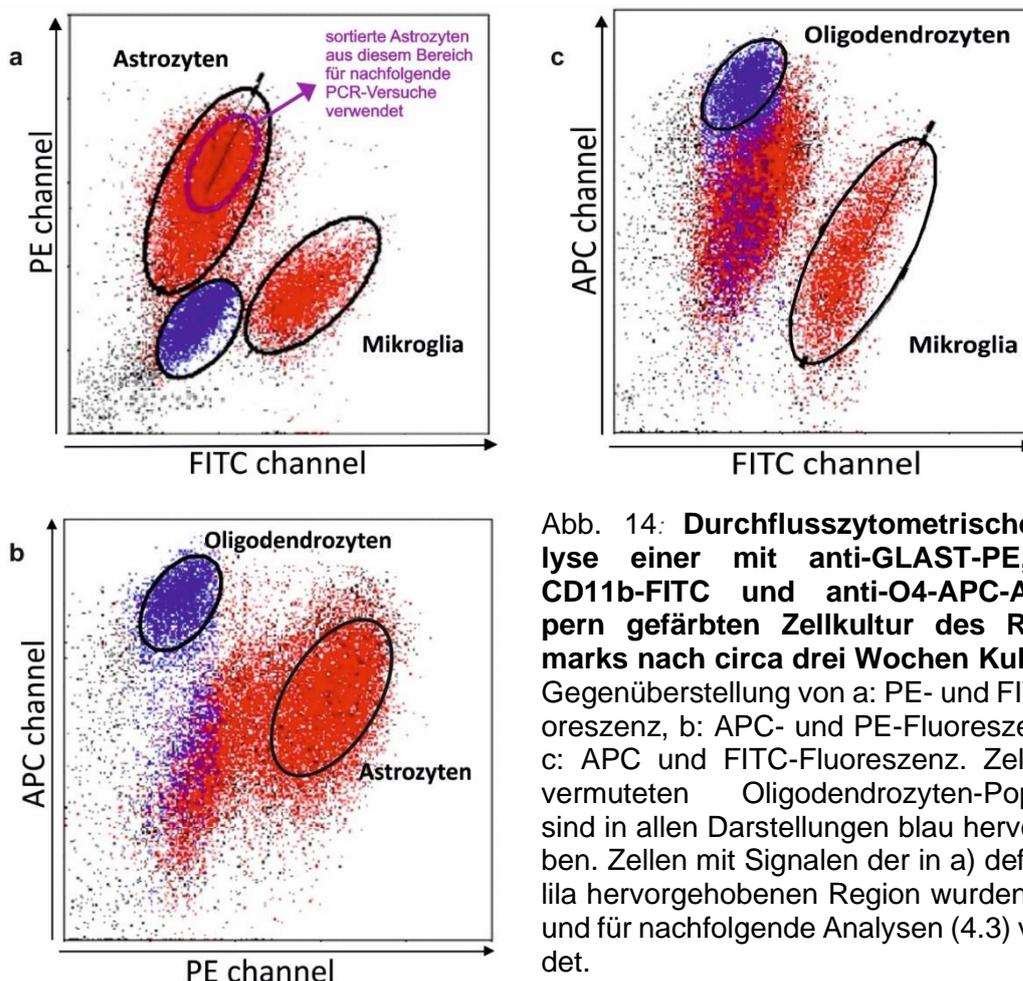


Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse einer mit anti-GLAST-PE, anti-CD11b-FITC und anti-O4-APC-Antikörpern gefärbten Zellkultur des Rückenmarks nach circa drei Wochen Kulturzeit. Gegenüberstellung von a: PE- und FITC-Fluoreszenz, b: APC- und PE-Fluoreszenz und c: APC und FITC-Fluoreszenz. Zellen der vermuteten Oligodendrozyten-Population sind in allen Darstellungen blau hervorgehoben. Zellen mit Signalen der in a) definierten lila hervorgehobenen Region wurden isoliert und für nachfolgende Analysen (4.3) verwendet.

4.3 Expression von TRPC-Transkripten in FACS-sortierten Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

Jeweils 100 durchflusszytometrisch sortierte GLAST-positive Astrozyten (4.2) wurden auf die Expression von TRPC-Transkripten mit Hilfe von RT-PCR (3.2.5.1 und 3.2.5.2) untersucht. Das HPRT-Transkript diente als Positiv-Kontrolle. Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch getrennt (3.2.6) und sichtbar gemacht (Abb. 15).

Abb. 15 zeigt in zwei unabhängigen Experimenten die Gegenwart von Transkripten für TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC4 und TRPC6 in GLAST-positiven Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus. TRPC5- und TRPC7-Transskripte konnten hingegen nicht reproduzierbar nachgewiesen werden, wobei TRPC5 in 4 unabhängigen Experimenten nur einmal nachgewiesen werden konnte und TRPC7 gar nicht.

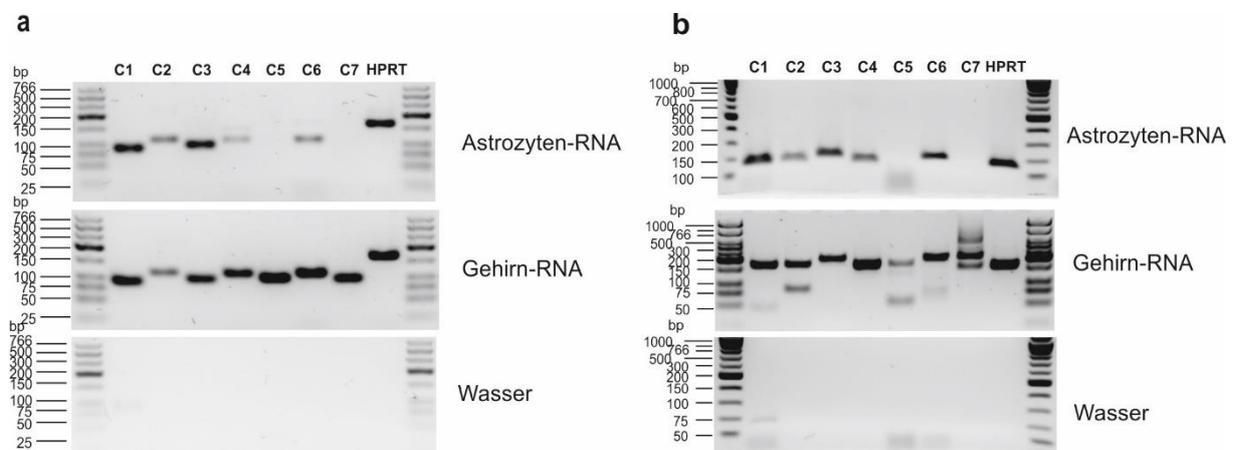


Abb. 15: Nachweis von TRPC-Transkripten in Astrozyten des Rückenmarks mit Hilfe von RT-PCR. Verwendung von zwei unabhängigen Oligonukleotid-Primer-Sätzen a) Qiagen Primer und b) Eurofins Primer und jeweils unabhängige RNA-Proben. RNA aus Maus-Hirn diente als Positiv-Kontrolle, Wasser als Negativ-Kontrolle.

4.4 TRPC3-Kanäle in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

PCR-Analysen (4.3) zeigten, dass TRPC3-Transkripte in Astrozyten aus dem Rückenmark exprimiert werden. Deshalb sollte nun überprüft werden ob sich TRPC3-Ionenkanäle auch funktionell in diesen Zellen nachweisen lassen.

4.4.1 OAG-induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

Mit Hilfe von Ca^{2+} -Imaging-Experimenten (3.2.7) wurde untersucht ob TRPC3-Kanäle funktionell in Astrozyten des Rückenmarks vorhanden sind. Durch Phospholipase C synthetisiertes DAG aktiviert als *second messenger* (2.2) TRPC2-, 3-, 6- und 7-Kanäle (HOFMANN et al., 2000; LUCAS et al., 2003). Mit 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) steht ein synthetisches Analogon für DAG zur Verfügung, das bereits zur Stimulation von TRPC3-Kanälen in Astrozyten des Cortex der Maus verwendet wurde (BELKACEMI et al., 2017).

Vor Applikation von OAG wurden die Ca^{2+} -Speicher des ER zunächst mit Hilfe des SERCA-Inhibitors *cyclopiazonic acid* (CPA) entleert (Abb. 16 und Abb. 2), um den Ca^{2+} -Einstrom von außen in die Zelle sichtbar zu machen. Die Experimente wurden in einer geschlossenen Messkammer mit Perfusionssystem durchgeführt. Nach Entleeren der Speicher und Erreichen einer stabilen cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde 100 μM OAG perfundiert.

88,4 \pm 2,6% der WT-Astrozyten reagierten auf die Applikation von OAG mit wiederkehrenden transienten cytosolischen Ca^{2+} -Signalen (Ca^{2+} -Oszillationen) in einer Frequenz von 3,04 \pm 0,34 *peaks* in 1100 s (Abb. 16). Um zu untersuchen, ob die Ca^{2+} -Signale abhängig von TRPC3 sind, wurden dieselben Experimente mit Astrozyten aus dem Rückenmark TRPC3-defizienter Mäuse durchgeführt. 84,8 \pm 7,85% der TRPC3-defizienten Astrozyten wiesen ebenfalls cytosolische OAG-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen in einer Frequenz von 3,02 \pm 0,31 *peaks* in 1100 s auf (Abb. 16).

Weder der Anteil der auf OAG reagierenden Astrozyten, noch die Anzahl der Oszillationen in 1100 s waren somit signifikant gegenüber den WT-Astrozyten verändert, was darauf hinweist, dass TRPC3 an diesen transienten Ca^{2+} -Signalen nicht beteiligt ist, oder ein anderer OAG-sensitiver TRPC-Kanal bei TRPC3-Defizienz kompensatorisch hochreguliert wird.

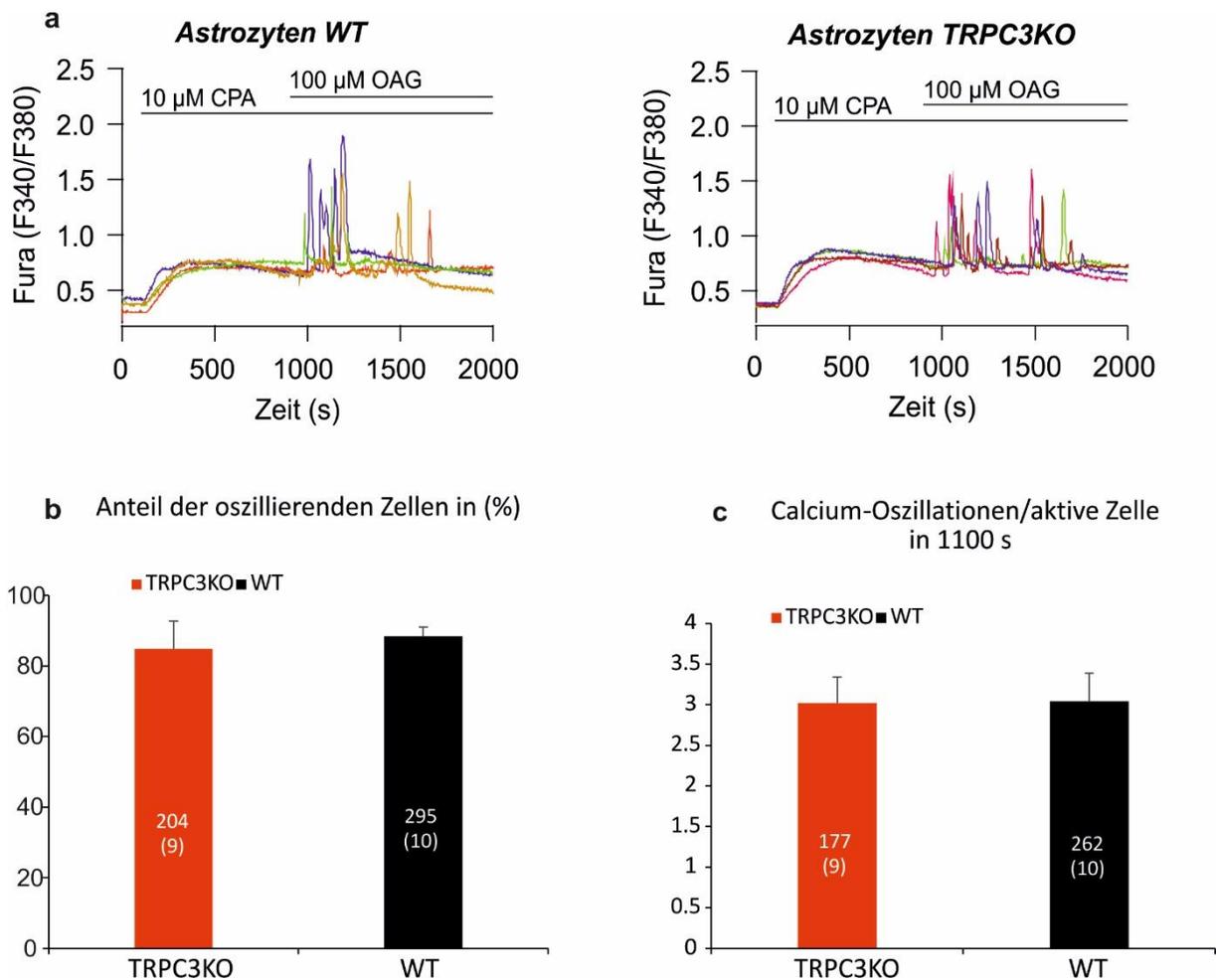


Abb. 16: **OAG-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen in Astrozyten des Rückenmarks von WT- und TRPC3KO-Mäusen.** a: Exemplarische Darstellung der zeitlichen Veränderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in einzelnen WT- und TRPC3-defizienten Astrozyten. b: Prozentualer Anteil der oszillierenden Zellen beider Genotypen. c: Anzahl der Oszillationen definiert als Zahl der Amplituden in Gegenwart von OAG in 1100 s pro aktiver Zelle beider Genotypen. In b) und c) sind Mittelwerte \pm SEM dargestellt (n = Anzahl der untersuchten Zellen in x unabhängigen Experimenten $n(x)$).

4.4.2 Die Rolle von TRPC3 bei der Migration von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

Bei einer Verletzung des Rückenmarks wandern Astrozyten in den Wundbereich ein und unterstützen die Wundheilung durch Bildung einer Glia-Narbe (SAADOUN et al., 2005; SILVER, MILLER, 2004). Zur Untersuchung der Migration von Astrozyten wurde in dieser Arbeit die Methode des *scratch assays* (3.2.8) verwendet. In einer konfluenten Astrozyten-Kultur wurde mit Hilfe einer 200 μ l Pipetten-Spitze eine zellfreie Zone (künstliche Wunde) erzeugt und anschließend nach 0, 4, 8 und 24 Stunden Bilder der Region angefertigt (Abb. 17 a). Das Nährmedium für die Zellen enthielt kein FCS, um die Proliferation der Zellen zu unterdrücken. Anhand der gemachten Bilder ließen sich die jeweils verbliebenen zellfreien Flächen nach 4, 8 und 24 h und der Anteil der durch Migration wieder besiedelten Flächen im Vergleich zur zellfreien Fläche nach *scratch* (Stunde 0) bestimmen.

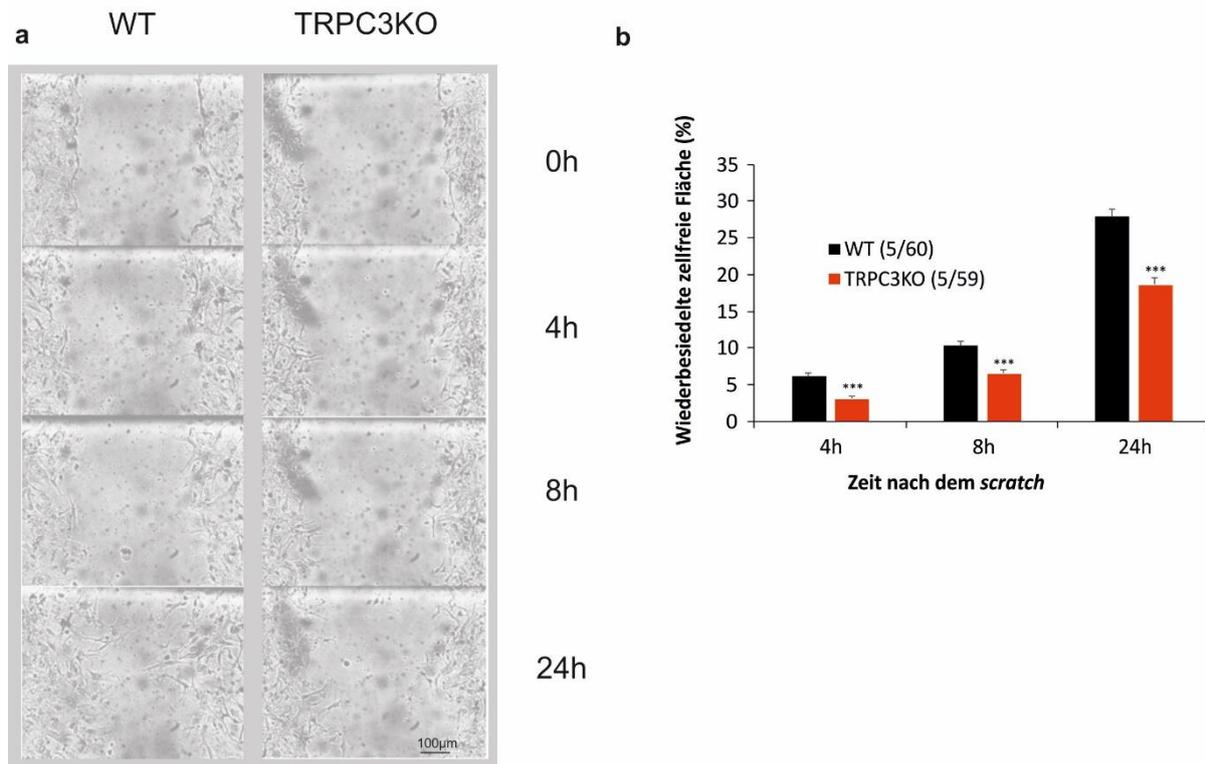


Abb. 17: *In vitro* Migration von WT- und TRPC3KO-Astrozyten. a: Exemplarische Darstellung eines *scratch*-assays von WT- (links) und TRPC3KO-Zellen (rechts) nach 0h, 4h, 8h und 24 h. b: Prozentuale Reduktion der zellfreien Fläche nach 4, 8 und 24 Stunden bezogen auf den Ausgangswert (Stunde 0). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 5 Experimenten, wobei 60 *scratch*-Regionen für WT (schwarz) und 59 *scratch*-Regionen für TRPC3KO (rot) analysiert wurden. Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: *** = $p < 0,001$.

Vier Stunden nach dem *scratch* waren 6,2 \pm 0,4% der zellfreien Fläche in der Zellkultur aus WT-Mäusen wieder bedeckt, wohingegen lediglich 3,1 \pm 0,3% der zellfreien Fläche bei TRPC3KO-Zellen wieder mit Zellen besetzt war (Abb. 17 b). Nach acht Stunden bedeckten WT-Zellen 10,4 \pm 0,5% der zellfreien Fläche und TRPC3KO-Zellen 6,6 \pm 0,4%. Nach 24 Stunden waren es bei WT-Zellen 27,9 \pm 1,0% im Unterschied zu 18,7 \pm 0,8% bei TRPC3KO-Zellen. Zu allen Zeitpunkten war in der WT-Zellkultur die Reduktion der zellfreien Fläche (Wunde) signifikant größer.

Dies zeigt, dass die Migrationsfähigkeit von TRPC3-defizienten Astrozyten vermindert ist.

4.4.3 Die Rolle von TRPC3 bei der Proliferation von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

Zur Untersuchung des Proliferationsverhalten von Astrozyten des Rückenmarks wurde ein *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* durchgeführt (3.2.9). Dabei wurden zu Beginn des Experiments je 5000 Zellen ausgesät. Messungen fanden an Tag 0, 3, 5, 6 und 7 statt. Die Werte der Messungen an Tag 0 bestätigten, dass die Ausgangsmengen

von WT- und TRPC3KO-Zellen identisch waren (Abb. 18). Sowohl WT, als auch TRPC3-defiziente Zellen zeigten im Weiteren eine Erhöhung der Zellzahl bis Tag 5, wobei die Proliferationsrate der WT-Zellen etwas höher lag (Abb. 18). Während die Zellzahl von WT-Mäusen von Tag 5 bis Tag 7 stabil blieb, nahm die Zahl der TRPC3KO-Zellen von Tag 5 bis Tag 7 wieder ab.

Die Experimente deuten darauf hin, dass TRPC3 bei der Proliferation von Astrozyten eine Rolle spielt.

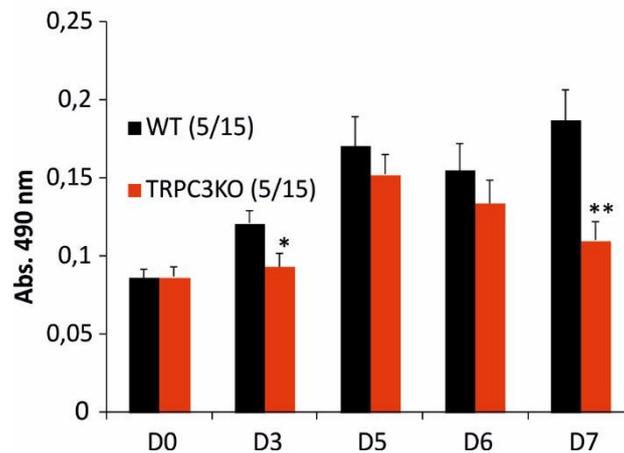


Abb. 18: **Proliferation von Wildtyp- und TRPC3KO-Astrozyten.** Absorption (490 nm) durch Formazan als Maß für die Anzahl der WT (schwarz) und TRPC3-defizienten Astrozyten (rot) direkt nach Aussäen von 5×10^3 Zellen (D0) und 3, 5, 6, und 7 Tage (D3-D7) danach. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 5 unabhängigen Experimenten, bei denen für beide Genotypen für jeden Mess-Tag insgesamt 15 Messwerte erhoben wurden. Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

4.5 TRPC4-Kanäle in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

4.5.1 TRPC4-abhängige Ca^{2+} -Signale in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

Auch TRPC4 ist in Astrozyten des Rückenmarks exprimiert (siehe 4.3). Um herauszufinden, ob TRPC4 bei der Ca^{2+} -Homöostase von Astrozyten eine Rolle spielt, wurde zu vorbereiteten Zellen (3.2.7) der TRPC4-Aktivator Englerin A (EgA) appliziert und anschließend die Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration mit Hilfe von Fura-2 gemessen. Englerin A ist ein pflanzlicher Stoff, der als potenter Aktivator von TRPC4 und TRPC5 beschrieben wurde (AKBULUT et al., 2015). Die Messungen wurden in einer offenen Messkammer durchgeführt, in welche Lösungen durch Pipettieren direkt appliziert werden konnten. 1 μ M EgA führte in 71,01 \pm 5,63% der Zellen aus dem Rückenmark zu einem transienten Ca^{2+} -Anstieg (Abb. 19 a). Da EgA mit einer Eppendorf-Pipette ins Bad appliziert wurde, wurde überprüft, ob der Applikationsdruck das Ca^{2+} -Signal auslöst. Wie in Abb. 19 b gezeigt, führte die Applikation von Badlösung ohne EgA zu keinem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den Astrozyten, wohingegen die darauffolgende Applikation von EgA wieder ein transientes Ca^{2+} -

Signal auslöste, wobei dieses deutlich schwächer ausfiel. Ursache hierfür könnte eine nach Applikation unzureichende Durchmischung der Lösungen in der Messkammer und damit einhergehende niedrigere EgA-Konzentration an den gemessenen Zellen sein.

Um zu untersuchen, ob der EgA-induzierte Ca^{2+} -Anstieg abhängig von TRPC4 ist, wurden auch Astrozyten aus dem Rückenmark TRPC4-defizienter Mäuse analysiert (Abb. 19 c). In TRPC4-defizienten Zellen war die EgA-induzierte Ca^{2+} -Antwort deutlich reduziert. Dies zeigt, dass TRPC4-Kanäle in Astrozyten des Rückenmarks der Maus aktiv sind. Dennoch zeigten auch 17,14 \pm 6,22% der aus TRPC4KO-Mäusen isolierten Zellen einen Ca^{2+} -Anstieg, der allerdings deutlich geringer als in WT-Zellen war (Abb. 19 c).

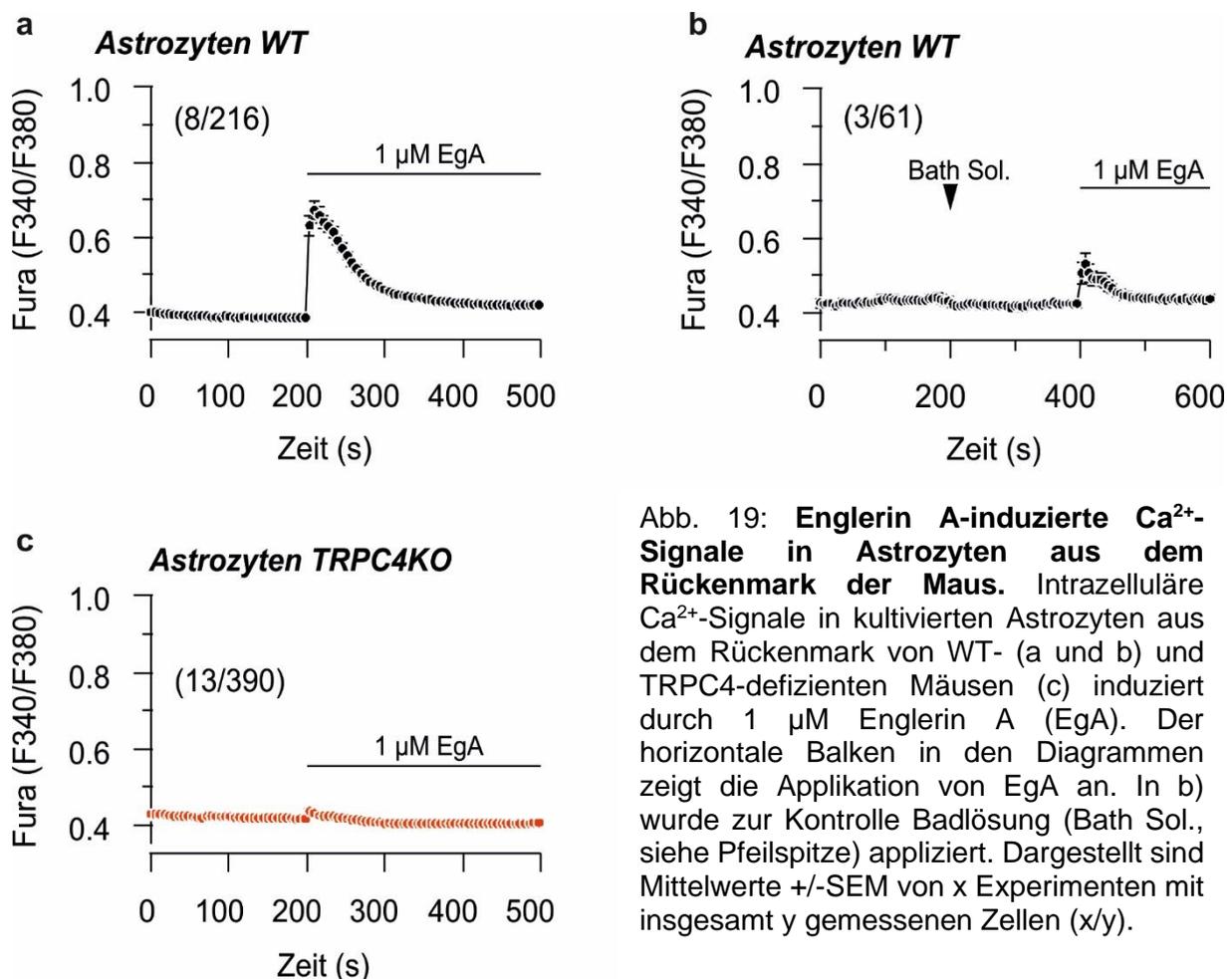


Abb. 19: **Englerin A-induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus.** Intrazelluläre Ca^{2+} -Signale in kultivierten Astrozyten aus dem Rückenmark von WT- (a und b) und TRPC4-defizienten Mäusen (c) induziert durch 1 μM Englerin A (EgA). Der horizontale Balken in den Diagrammen zeigt die Applikation von EgA an. In b) wurde zur Kontrolle Badlösung (Bath Sol., siehe Pfeilspitze) appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von x Experimenten mit insgesamt y gemessenen Zellen (x/y).

EgA aktiviert nicht nur TRPC4, sondern auch TRPC5 (Akbulut et al., 2015). Zwar konnte TRPC5 in den Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus nicht reproduzierbar nachgewiesen werden (4.3), jedoch könnte TRPC5 in einer Subpopulation der Astrozyten oder niedrig exprimiert vorliegen. Daher wurden im Folgenden weitere TRPC5-Agonisten, *N*-[3-(adamantan-2-yloxy)propyl]-3-(6-methyl-1,1-dioxo-2H-1 λ ⁶,2,4-benzothiadiazin-3-yl)propanamide (BTD) (BECKMANN et al., 2017) und Riluzol (RICHTER et al., 2014) neben EgA appliziert. 50 μM Riluzol und 10 μM BTD führten beide zu kleinen transienten Ca^{2+} -

Signalen in den Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus (Abb. 20 a und b). Dabei reagierten $15,70 \pm 7,16\%$ der WT-Zellen auf BTD und $15,94 \pm 8,45\%$ auf Riluzol. Dies weist darauf hin, dass etwa 15% der kultivierten Zellen funktionelle TRPC5-Kanäle exprimieren. Da in den Präparaten auch Reste von Zellen anderer Herkunft vorlagen (4.2.2.) bleibt unklar, ob es sich bei den gemessenen Zellen tatsächlich um Astrozyten handelt. Als Kontrolle wurde nach Applikation von Riluzol und BTD wieder EgA appliziert, woraufhin sich jeweils ein deutlicher, TRPC4-vermittelter Ca^{2+} -Anstieg messen ließ. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der EgA-induzierte kleine Ca^{2+} -Anstieg in TRPC4-defizienten Zellen (Abb. 19 c) durch die Aktivierung von TRPC5 zustande kommt.

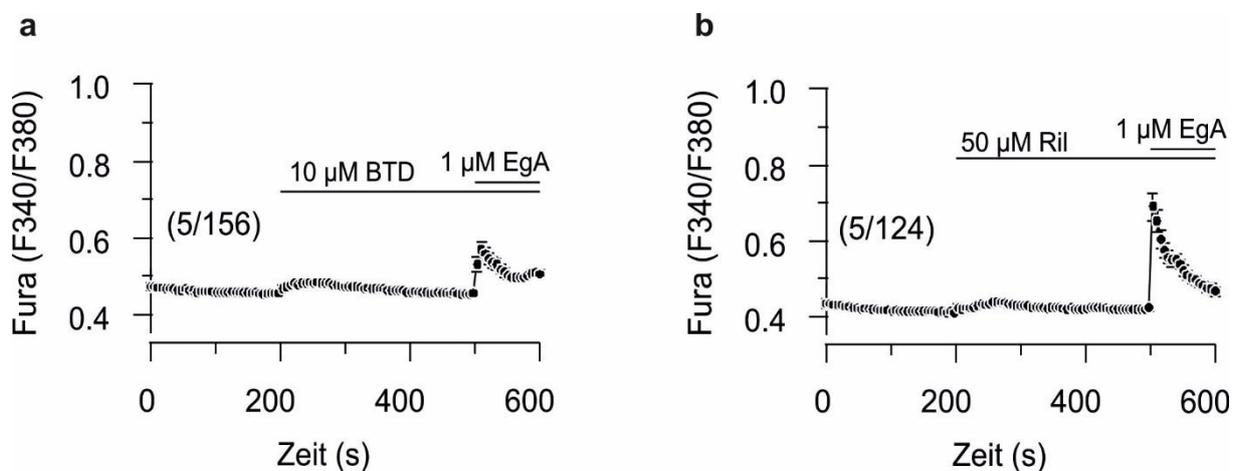


Abb. 20: **BTD- und Riluzol-induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus (WT)**. Die horizontalen Balken in den Diagrammen zeigen jeweils die Applikationen von BTD (a), Riluzol (Ril, b) und Englerin A (EgA, a und b) an. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von x Experimenten mit insgesamt y gemessenen Zellen (x/y).

4.5.2 TRPC1-abhängige Ca^{2+} -Signale in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

Wie in 4.3 gezeigt, ließen sich auch RNA-Fragmente in Astrozyten des Rückenmarks nachweisen, die für TRPC1 kodieren. Da die TRPC1-Untereinheit, wie in 2.4.1 beschrieben, mit TRPC4-Untereinheiten heterotetramere TRPC-Kanäle bilden kann, stellte sich die Frage, ob und zu welchem Teil dies in Zellen des Rückenmarks geschieht. Heterotetramere TRPC1/TRPC4-Kanäle sind weniger durchlässig für Ca^{2+} als homotetramere TRPC4-Kanäle (STORCH et al., 2012). Um zu untersuchen, ob TRPC1 an der Kanalbildung mit TRPC4 beteiligt ist, wurden im Folgenden EgA-induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten aus dem Rückenmark TRPC1-defizienter Mäuse und dem entsprechenden Wildtyp verglichen. $73,71 \pm 8,19\%$ der TRPC1KO- und $71,01 \pm 5,63\%$ der WT-Astrozyten wiesen einen EgA-induzierten Ca^{2+} -Anstieg auf (Abb. 21 a und b). Dabei war zwar die Amplitude als Maß der maximal gemessenen cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration des Ca^{2+} -Signals signifikant höher in TRPC1-defizienten Astrozyten, die *area under the curve* (AUC) als Maß für die Gesamtheit des Ca^{2+} -Einstroms im Rahmen der Experimente war jedoch nicht signifikant unterschiedlich

(Abb. 21 c und d). Auffällig zeigte sich jedoch bereits zu Beginn der Experimente eine höhere basale cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in TRPC1-defizienten Astrozyten im Vergleich zu WT-Astrozyten (Abb. 21 b). Dies stützt die Hypothese, dass in Abwesenheit von TRPC1 vermehrt TRPC4-homomere Kanalkomplexe gebildet werden, welche sowohl eine höhere basale Aktivität aufweisen, als auch einen verbesserten EgA-induzierten Ca^{2+} -Einstrom zulassen.

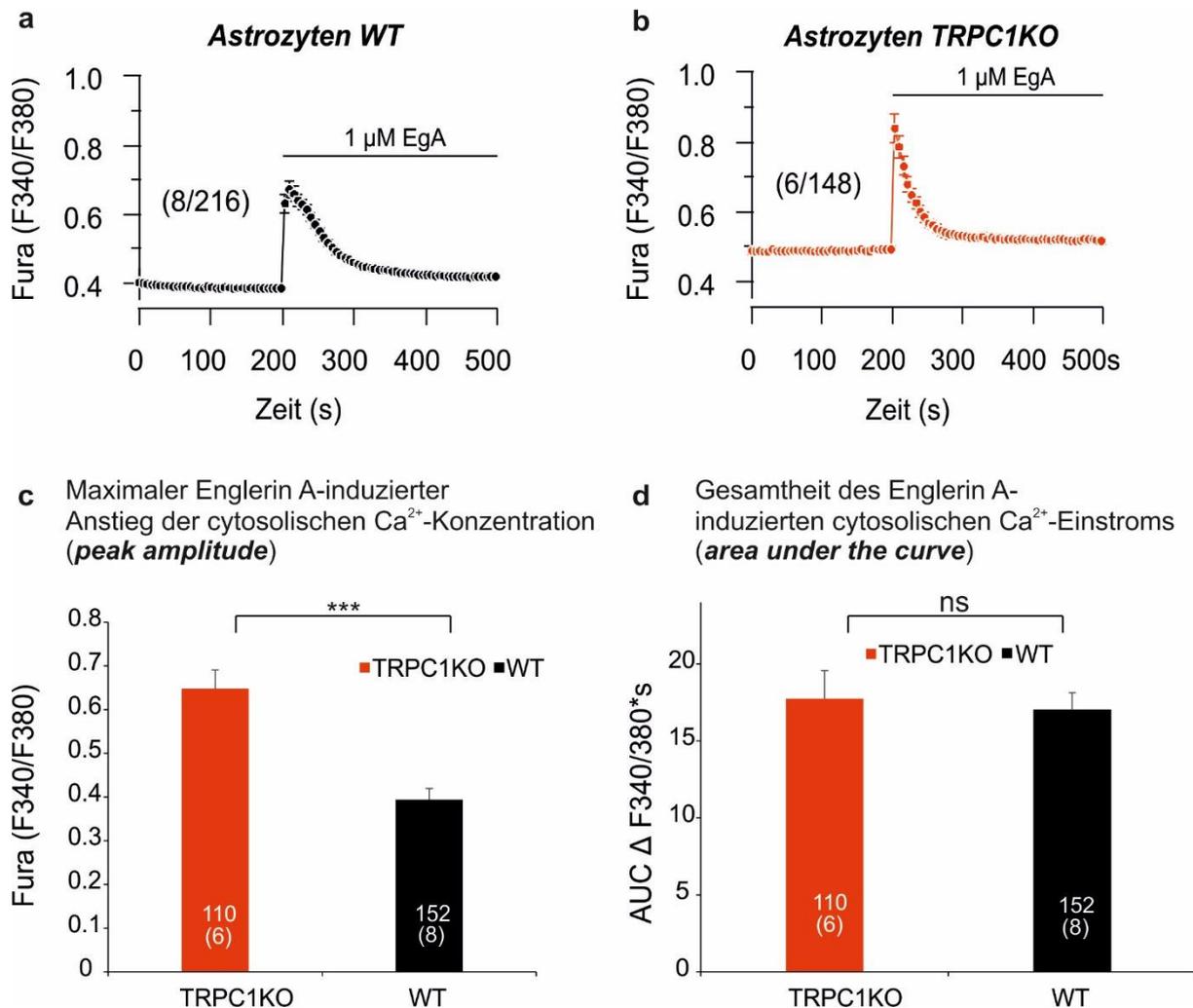


Abb. 21: **EgA-induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten-Präparaten aus dem Rückenmark von WT und TRPC1-defizienten Mäusen.** a und b: Intrazelluläre Ca^{2+} -Signale in kultivierten Zellen aus dem Rückenmark von WT- (a) und TRPC1-defizienten Mäusen (b) induziert durch 1 μM Englerin A (EgA). Der horizontale Balken in den Diagrammen zeigt die Applikation von EgA an. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von x Experimenten mit insgesamt y gemessenen Zellen (x/y). a zeigt dasselbe Experiment wie in Abb. 18 a. c: Darstellung der Amplitude der Ca^{2+} -Signale (*peak amplitude*) als Maß für die maximale cytosolische Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation mit 1 μM Englerin A. d: Darstellung des gesamten Englerin A-vermittelten cytosolischen Ca^{2+} -Signals nach Stimulation mit 1 μM Englerin A von WT und TRPC1-defizienten Zellen des Rückenmarks. c und d: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils x Experimenten mit insgesamt y gemessenen Zellen y(x). Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant unterschiedlich.

4.5.3 Die Rolle von TRPC4 bei der Migration von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von TRPC4 auf die Migrationsfähigkeit von Astrozyten des Rückenmarks wurden wie bereits für TRPC3 beschrieben (4.4.2) *scratch assays* (3.2.8) mit TRPC4-defizienten Astrozyten-Kulturen und dem korrespondierenden Wildtyp durchgeführt.

Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und TRPC4-defizienten Zellen. Die zellfreie Fläche 4 h nach *scratch* in den Kulturen der WT-Astrozyten war um 5,6 +/- 0,37% verkleinert, während es bei den TRPC4KO-Zellen 6,1 +/- 0,45% waren. Nach 8 h waren es 10,3 +/- 0,53% respektive 10,9 +/- 0,78% und nach 24 h 25,5 +/- 0,95% beziehungsweise 26,2 +/- 1,52%.

Offensichtlich haben TRPC4-Kanäle im Unterschied zu TRPC3-Kanälen (4.4.2) keinen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus (Abb. 22).

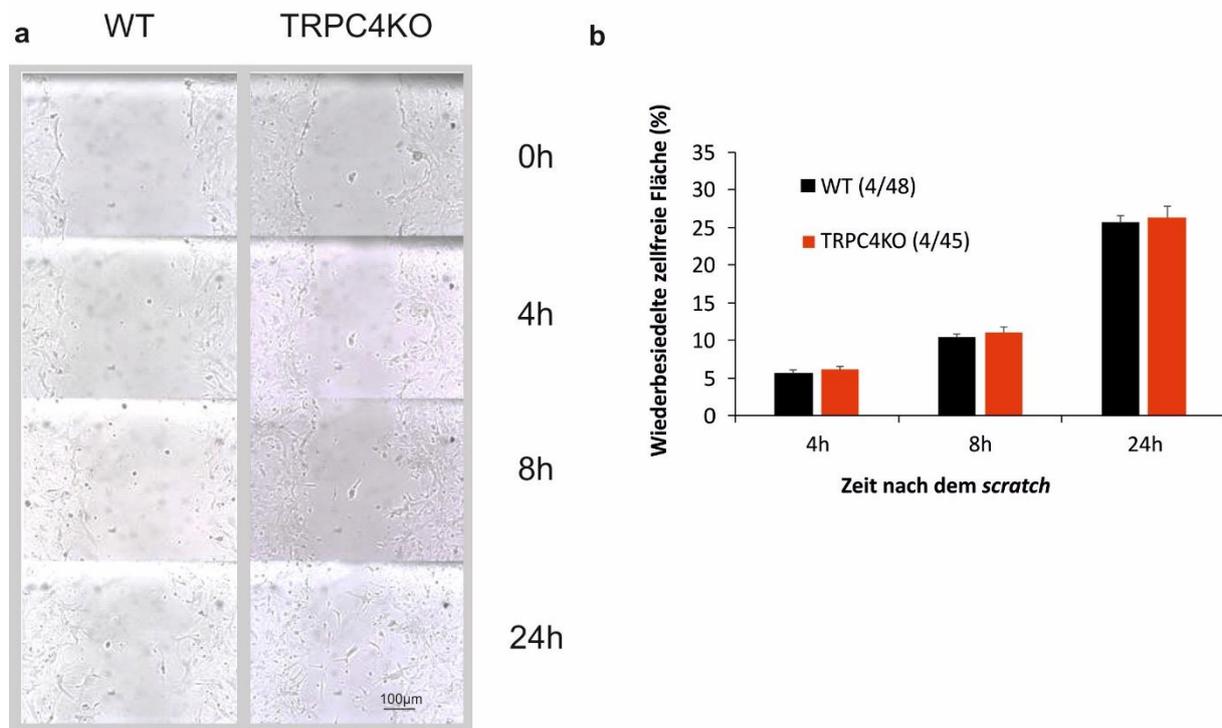


Abb. 22: **In vitro Migration von WT- und TRPC4KO-Astrozyten.** a: Exemplarische Darstellung eines *scratch-assays* von WT- (links) und TRPC4KO-Astrozyten (rechts) nach 0h, 4h, 8h und 24 h. b: Prozentuale Reduktion der zellfreien Fläche nach 4, 8 und 24 Stunden bezogen auf den Ausgangswert (Stunde 0). Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM aus jeweils 4 Experimenten, wobei 48 *scratch*-Regionen für WT (schwarz) und 45 *scratch*-Regionen für TRPC4KO (rot) analysiert wurden.

4.5.4 Die Rolle von TRPC4 bei der Proliferation von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

Um einen möglichen Einfluss von TRPC4 auf das Proliferationsverhalten von Astrozyten des Rückenmarks zu untersuchen, wurde in analoger Weise zu den Untersuchungen von TRPC3

(4.4.3) ein *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* mit TRPC4-defizienten Astrozyten und WT-Astrozyten durchgeführt.

Die gemessenen Werte für Tag 0 zeigen, dass die Ausgangskonzentrationen von WT-Astrozyten und TRPC4KO-Astrozyten fast identisch waren (Abb. 23). Bis Tag 5 stiegen die Zellzahlen der Astrozyten-Proben beider Genotypen, wobei die Anzahl der stoffwechselaktiven WT-Astrozyten ab Tag 5 signifikant höher lag, als die der TRPC4KO-Astrozyten (Abb. 23). Im Weiteren blieb die Astrozyten-Zahl der WT-Proben von Tag 5 bis Tag 7 stabil, während die Anzahl der TRPC4KO-Zellen von Tag 5 bis Tag 7 leicht abnahm. Das weist darauf hin, dass - ebenso wie TRPC3 - TRPC4 einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Astrozyten des Rückenmarks der Maus hat.

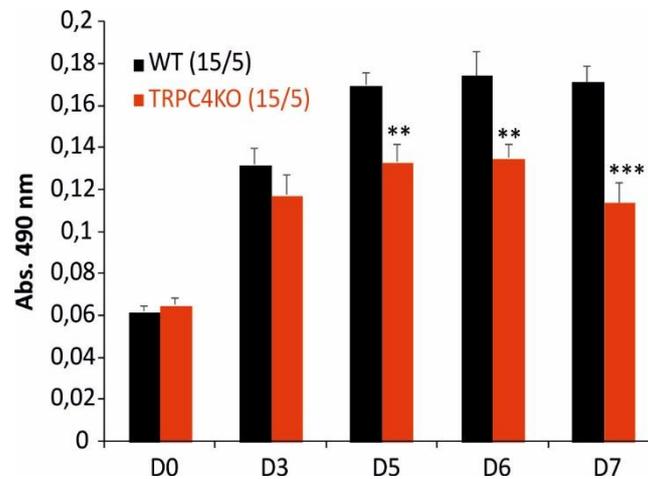


Abb. 23: **Proliferation von Wildtyp- und TRPC4KO-Astrozyten.** a: Absorption (490 nm) durch Formazan als Maß für die Anzahl der WT (schwarz) und TRPC4-defizienten Astrozyten (rot) direkt nach Aussäen von 5×10^3 Zellen (D0) und 3, 5, 6, und 7 Tage (D3-D7) danach. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 5 unabhängigen Experimenten, bei denen für beide Genotypen für jeden Mess-Tag insgesamt 15 Messwerte erhoben wurden. Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Die Experimente zeigen, dass TRPC4 in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus funktionell exprimiert ist. Des Weiteren weisen die Ca^{2+} -Imaging Experimente mit TRPC1KO-Astrozyten darauf hin, dass heteromere TRPC1/TRPC4-Kanäle vorhanden sind. Während die Migration in TRPC4-defizienten Astrozyten im Vergleich zu Wildtypzellen nicht verändert war, scheint TRPC4 jedoch eine Rolle bei der Proliferation von Rückenmarksastrozyten zu spielen.

5. Diskussion

5.1 Etablierung der Präparationstechnik und Charakterisierung von Zellkulturen aus dem Rückenmark der Maus

Die Basis für Zellkulturen des Rückenmarks stellten für alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente neugeborene Mäuse (p3 – 5) dar. Unter möglichst aseptischen und sterilen Bedingungen gelang es mit der beschriebenen Präparationstechnik Zellkulturen aus dem Rückenmark möglichst ohne Kontaminationen durch Bakterien oder Fibroblasten aus den Rückenmarkshäuten herzustellen. Unter dem Mikroskop zeigten sich die hergestellten Astrozyten-Kulturen sehr heterogen zusammengesetzt, sodass zur Identifikation der Astrozyten Immunfärbungen mit Astrozyten-spezifischen Antikörpern (anti-GFAP und anti-GLAST) erfolgten (Abb. 11 und Abb. 12). Sowohl GFAP (ENG, GHIRNIKAR, 1994), als auch GLAST gelten als guter Astrozyten-Marker (SCHMITT et al., 1997). Die Auswertung ergab, dass 65 % - 70 % der kultivierten Zellen aus dem Rückenmark der Maus als Astrozyten identifiziert werden konnten.

Für eine genauere Charakterisierung von Astrozyten-Kulturen des Rückenmarks wurden durchflusszytometrische Experimente durchgeführt. Hierbei wurden anfangs anti-GLAST-PE-Antikörper zur Erkennung von Astrozyten und anti-CD11b-FITC-Antikörper zur Erkennung von Mikroglia-Zellen verwendet, in der Erwartung, dass diese beiden Zelltypen die größten Subpopulationen stellten. Anti-GFAP-Antikörpern und anti-GLAST-Antikörpern wird dieselbe Sensitivität bei der Erkennung von Astrozyten zugeschrieben (JUNGBLUT et al., 2012). Allerdings ist der anti-GLAST Antikörper gerade in der Durchflusszytometrie dem anti-GFAP-Antikörper überlegen, da er vor allem Proteine der Zellmembran und nicht des Cytosols anfärbt (SCHMITT et al., 1997). Dies hat den Vorteil, dass die Zellen vorab nicht permeabilisiert werden müssen und in vitalem Zustand sortiert werden können. Der anti-O4 Antikörper stellt einen validen Marker zur Erkennung von Oligodendrozyten dar (SOMMER, SCHACHNER, 1981). Größere Oligodendrozyten-Subpopulationen innerhalb Zellkulturen des ZNS wurden bereits beschrieben (CHEN et al., 2007). Die Analysen von dreifach gefärbten (anti-GLAST-PE, anti-CD11b-FITC, anti-O4-APC) Astrozyten-Kulturen des Rückenmarks ergaben einen Astrozyten-Anteil von 57-59%, einen Mikroglia-Anteil von 12-19% und einen Oligodendrozyten-Anteil von 9% (Abb. 14). Es wird angenommen, dass im Gehirn adulter Mäuse Oligodendrozyten etwa 20% aller Zellen ausmachen (VALERIO-GOMES et al., 2018). Die prozentuale Abweichung könnte durch das Vorliegen unterschiedlicher untersuchter Gewebe (Rückenmark vs. Cortex), oder durch den im Rahmen der Kultivierung entstehenden Selektionsvorteil für Astrozyten und damit einhergehender Verschiebung der prozentualen Anteile der Sub-Populationen in Astrozyten-Kulturen des Rückenmarks zustande kommen (SCHILDGE et al., 2013). Mögliche weitere Zell-Subpopulationen in Astrozyten-Zellkulturen aus dem Rückenmark könnten Neuronen, Endothelzellen aus kleinen Gefäßen oder

Ependym-Zellen bilden, zudem ist das Vorliegen von Fibroblasten-Subpopulationen aufgrund des Verbleibs von Resten mikroskopisch nicht sichtbarer Rückenmarkshäute im Rahmen der Präparation denkbar.

Andere Studien, die sich ebenfalls mit der Charakterisierung von Zellkulturen des Rückenmarks beschäftigten, berichten von einem Astrozyten-Gehalt in den Kulturen von bis zu 85 - 90 % (KERSTETTER, MILLER, 2012). Dies kann in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In dieser Arbeit wurden die Erwartungsbereiche für Astrozyten in FACS-Analysen sehr restriktiv gesetzt, um die Homogenität sortierter Populationen für Folgeversuche zu verbessern. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit findet sich in der weiteren Verarbeitung der isolierten Zellen aus dem Rückenmark. Während sich die Präparation des Gewebes in anderen Arbeiten sehr ähnlich gestaltete, wurden die Kulturflaschen bereits 24 Stunden nach der Präparation der Zellen für mehrere Stunden geschüttelt, um weniger adhärenente Zellen, wie Mikrogliazellen und Oligodendrozyten zu lösen und diese anschließend aus den Kulturen zu entfernen (KAWAMATA et al., 2014; KERSTETTER, MILLER, 2012). In darauffolgenden durchflusszytometrischen Analysen ließen sich so prozentual mehr Astrozyten darstellen. Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet, um den kultivierten Zellen eine Zellproliferation unter möglichst natürlichen Bedingungen zu ermöglichen. Erst unmittelbar vor den Experimenten (Messungen der Ca^{2+} -Konzentration, Migrationsexperimente, Proliferationsexperimente) wurden die Zellkulturen geschüttelt, um weniger adhärenente Zellen zu lösen und zu entfernen.

5.2 TRPC-Expression in isolierten Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

Miyano et al. konnten in Astrozyten des Rückenmarks von Ratten TRPC-Transkripte für TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC4 und TRPC6 nachweisen (MIYANO et al., 2010). Das entspricht den Ergebnissen dieser Arbeit, in der ebenfalls TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC4 und TRPC6 reproduzierbar in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus nachgewiesen wurden. Dieses Expressionsmuster deckt sich weitgehend auch mit dem von Astrozyten-Kulturen aus anderen Geweben. In Astrozyten des Cortex von Mäusen ließen sich Transkripte von TRPC1 und 3 (AKITA, OKADA, 2011), und zusätzlich TRPC2 und 4 (BELKACEMI et al., 2017) nachweisen. In menschlichen fetalen Astrozyten des Gehirns wurden Transkripte für TRPC1, 3, 4 und 6 detektiert (SONG et al., 2005) und in Astrozytom-Zellen gelang der Nachweis von Transkripten für TRPC1, 4 und 6 (BARAJAS et al., 2008) und TRPC1, 3, 4 und 5 (NAKAO et al., 2008).

5.3 Die Rolle von TRPC1, TRPC3 und TRPC4 bei der Ca²⁺-Homöostase in Astrozyten des Rückenmarks der Maus

TRPC2, 3, 6 und 7 werden durch G_q-gekoppelte Rezeptoren und nachfolgend gebildetes DAG aktiviert (ROHACS, 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus auf Applikation von OAG - einem DAG-Analogon - mit cytosolischen Ca²⁺-Oszillationen antworten, wobei es sich dabei um Ca²⁺-Einstrom handelt, da eine intrazelluläre Speicher-Ca²⁺-Freisetzung zuvor durch CPA-vermittelte Entleerung ausgeschlossen wurde. Ca²⁺-Oszillationen in Astrozyten des Cortex nach Applikation von OAG wurden bereits beschrieben (BELKACEMI et al., 2017; GRIMALDI et al., 2003). Dabei konnte für TRPC3-gendefiziente Astrozyten des Cortex im Vergleich zu Wildtyp-Astrozyten des Cortex eine niedrigere Zahl von Oszillationen nach OAG-Applikation festgestellt werden (BELKACEMI et al., 2017), was darauf hindeutet, dass OAG-induzierte Ca²⁺-Oszillationen teilweise TRPC3-vermittelt sein könnten. Zwischen TRPC3-gendefizienten und Wildtyp-Astrozyten des Rückenmarks lässt sich demgegenüber im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zahl oszillierender Zellen oder Anzahl an Oszillationen/Zelle feststellen. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür könnte der Blick auf die TRPC-Expression von Astrozyten des Rückenmarks bieten: Neben TRPC3 sind auch TRPC2 und TRPC6 als DAG/OAG-sensitive TRPC-Kanäle exprimiert. Es ist denkbar, dass sich diese Kanäle in ausreichender Menge in Astrozyten des Rückenmarks finden lassen, um eine fehlende TRPC3-Aktivität zu kompensieren. Schließlich konnten auch bei TRPC3-gendefizienten Astrozyten des Cortex Ca²⁺-Oszillationen nach OAG-Applikation gesehen werden, auch wenn deren Zahl geringer war, als bei den Wildtyp-Zellen (BELKACEMI et al., 2017). Dies deutet darauf hin, dass ein gewisser Anteil des DAG/OAG-induzierten Ca²⁺-Einstroms TRPC3-unabhängig über eine Aktivität anderer OAG-sensibler Ca²⁺-Kanäle zustande kommt. Ähnliche Experimente an partiell TRPC6-gendefizienten Gefäßmuskelzellen von Ratten zeigten, dass TRPC6 eine Rolle in OAG-vermittelten Ca²⁺-Oszillationen spielt (LI et al., 2008). Dietrich et al. beschrieben außerdem eine kompensatorisch erhöhte Expression von TRPC3 in TRPC6-gendefizienten Zellen (DIETRICH et al., 2005), was im Umkehrschluss eine kompensatorisch erhöhte TRPC6-Expression in TRPC3-gendefizienten denkbar macht.

Transkripte für TRPC4 konnten in dieser Arbeit reproduzierbar in Astrozyten des Rückenmarks nachgewiesen werden. Um die Funktionalität vorhandener TRPC4-Kanäle zu überprüfen, wurden Experimente mit Englerin A als selektivem und direktem TRPC4-Agonisten durchgeführt (AKBULUT et al., 2015). Anhand der Änderung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Applikation von Englerin A und dem Ergebnis, dass in TRPC4-defizienten Astrozyten das EgA-induzierte Ca²⁺-Signal deutlich reduziert war, konnte ich zeigen, dass in den Astrozyten des Rückenmarks funktionelle TRPC4-Kanäle vorhanden sind. Da in TRPC4-

defizienten Astrozyten immer noch ein kleines EgA-induziertes Ca^{2+} -Signal zu detektieren war und in einer der vier durchgeführten RT-PCRs auch TRPC5 nachgewiesen wurde, könnte TRPC5 am EgA-induzierten Ca^{2+} -Signal in Astrozyten des Rückenmarks beteiligt sein, da EgA auch als TRPC5-Aktivator beschrieben wurde (AKBULUT et al., 2015). Tatsächlich führten auch andere TRPC5-Aktivatoren, wie LTD (BECKMANN et al., 2017) und Riluzol (RICHTER et al., 2014) zu einem kleinen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in einigen Zellen (Abb. 20 a und b).

Die Expression von TRPC4 und TRPC5 in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus ist bisher kaum erforscht, jedoch konnten TRPC4-Transkripte in Astrozyten des visuellen Cortex von Ratten (MALARKEY et al., 2008), und in Astrozyten aus dem Cortex der Maus nachgewiesen werden (BELKACEMI et al., 2017). Interessanterweise ließ sich sowohl für das Rett-Syndrom, als auch für die Alzheimer-Krankheit in Astrozyten eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nachweisen, wobei vermutet wurde, dass dies zumindest anteilig durch eine ebenfalls nachgewiesene TRPC4-Überexpression vermittelt wird (DONG et al., 2018; RONCO et al., 2014). Diese Entdeckung macht TRPC4 zu einem möglichen Zielmolekül für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, die das Rückenmark betreffen.

Zwar war TRPC5 im Rahmen von RT-PCRs in Astrozyten aus dem Cortex der Maus nicht nachweisbar (BELKACEMI et al., 2017), jedoch konnte in Astrozyten des visuellen Cortex von Ratten die Expression von TRPC5 nachgewiesen werden (MALARKEY et al., 2008), wobei 24 Stunden alte Astrozyten bereits zu 70%, 8 Tage alte Astrozyten 97% und 55 Tage alte Astrozyten zu 100% TRPC5 exprimierten. In gemischten Astrozyten-Neuronen-Kulturen der Maus konnte mittels RT-PCR in Astrozyten des Mäusecortex TRPC5 nicht nachgewiesen werden, interessanterweise jedoch in Neuronen, wobei festgestellt werden konnte, dass TRPC5 bei oxidativem Stress (in Form von H_2O_2) aktiviert werden kann und über eine Zink-vermittelte Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} -Gehalts (Ca^{2+} -Einstrom) eine wichtige Rolle in der Signalkaskade zur neuronalen Apoptose spielt. Durch Verwendung des TRPC5-Antagonisten NU6027 konnte dabei der negative Einfluss von oxidativem Stress nicht nur reduziert, sondern sogar der Zelltod verhindert werden (PARK et al., 2019), was interessante Ansatzpunkte für weitere Forschungen bietet.

In TRPC4-KO-Zellen ließen sich nach Applikation von EgA geringe Veränderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration messen (4.5.1), was auf eine EgA-induzierte TRPC5-Aktivität in Zellen des Rückenmarks hinweist. Da in FACS-sortierten Astrozyten aus dem Rückenmark TRPC5 nicht reproduzierbar nachgewiesen werden konnte, ist auch eine Zell-zu-Zell-Aktivierung von Astrozyten über TRPC5-exprimierende Mikroglia-Zellen, oder Oligodendrozyten nach Applikation von EgA denkbar. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte sich darin finden, dass TRPC5 in einer Astrozyten-Subpopulation oder sehr niedrig exprimiert vorliegen könnte, wobei letztlich auch eine Kontamination der PCR-Probe das

Ergebnis erklären könnte. Bisher ließen sich Transkripte für TRPC5 in Mikroglia-Zellen nicht nachweisen (BELKACEMI et al., 2017), jedoch konnten in Oligodendrozyten mit Hilfe von RT-PCRs neben Transkripten für TRPC4 auch Transkripte für TRPC5 nachgewiesen werden (PAEZ et al., 2011). Damit ist eine zumindest anteilige Zell-zu-Zell-Aktivierung TRPC4-defizienter Astrozyten im Rückenmark über TRPC5-exprimierende Oligodendrozyten nach Applikation von EgA, BTB oder Riluzol denkbar.

TRPC1 konnte bereits in Astrozyten des Mäusecortex nachgewiesen werden (AKITA, OKADA, 2011; BELKACEMI et al., 2017; MALARKEY et al., 2008; REYES et al., 2013). In RT-PCR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch in Astrozyten des Rückenmarks TRPC1 exprimiert ist. Strubing et al. stellten fest, dass TRPC1 mit anderen TRPCs, beispielsweise TRPC4 oder TRPC5, funktionelle heterotetramere Kanäle bildet (STRUBING et al., 2001), wobei sich die Kanal-Eigenschaften je nach Zusammensetzung unterscheiden. So konnten Storch et al. zeigen, dass Kationenkanäle, die sich heterotetramer aus TRPC1- und TRPC4-Untereinheiten zusammensetzen, bei Aktivierung weniger permeabel gegenüber Ca^{2+} sind, als homotetramere TRPC4-Kanäle (KO et al., 2017; STORCH et al., 2012). Korrelierend ließ sich in Zellen mit überwiegend heterotetrameren TRPC1/TRPC4-Kanälen aufgrund des reduzierten Ca^{2+} -Einstroms eine niedrigere basale cytosolische Ca^{2+} -Konzentration feststellen, als in Zellen mit überwiegend homotetrameren TRPC4-Kanälen. Diese Beobachtung lässt sich anhand der durchgeführten Experimente mit TRPC1-defizienten Astrozyten des Rückenmarks bestätigen. Dabei wiesen TRPC1-defiziente Astrozyten im Vergleich zu WT-Astrozyten zu Beginn der durchgeführten Experimente eine höhere basale cytosolische Ca^{2+} -Konzentration auf (Abb. 21 b). Bei fehlender Expression von TRPC1 können sich nur homotetramere TRPC4-Kanäle formieren, was einen stärkeren Ca^{2+} -Einstrom begünstigt. In Skelettmuskelzellen wurden ähnliche Interaktionen zwischen TRPC1 und TRPC3 beschrieben, wobei gezeigt werden konnte, dass TRPC1 heterotetramere Ionen-Kanäle mit TRPC3 bildet (CHEUNG et al., 2011). In TRPC1-gendefizienten Astrozyten des Cortex ließen sich, verglichen zu korrelierenden WT-Astrozyten, durch OAG signifikant mehr Zellen stimulieren, wobei sich in aktiven Zellen signifikant mehr OAG-vermittelte Oszillationen feststellen ließen (BELKACEMI et al., 2017). Hinsichtlich dieser Ergebnisse ist es denkbar, dass TRPC1 negative Einflüsse auf die Aktivität von TRPC3 und/oder TRPC4 hat, wenn heterotetramere Ionen-Kanäle gebildet werden. TRPC1 wurde bereits als negativer Regulator für TRPC4 und TRPC5 beschrieben (KIM et al., 2019).

Passend zu diesen Ergebnissen war in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus die *peak amplitude* des EgA-vermittelten Ca^{2+} -Anstiegs bei TRPC1-gendefizienten Astrozyten im Vergleich zu Wildtyp-Astrozyten signifikant erhöht (Abb. 21 c).

Andererseits konnte nach Reizung menschlicher Bronchialepithelzellen durch mechanische Dehnung eine erhöhte TRPC1-Expression, verbunden mit einer höheren cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration gemessen werden (YU, LI, 2017). Umgekehrt ließ sich nach Vorbehandlung der Epithelzellen mit dem TRPC1-Antagonist SKF96365, oder unter Verwendung von TRPC1-spezifischer siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine signifikant geringere cytosolische Ca^{2+} -Konzentration feststellen. Ähnliche Beobachtungen ließen sich auch bei Neuronen aus dem Hippocampus-Bereich von adulten Mäusen machen, in welchen nach Stimulation durch elektromagnetische Felder im extrem niedrigen Frequenzbereich ebenfalls eine signifikante Hochregulation der TRPC1-Expression mit korrelierend höherer cytosolischer Ca^{2+} -Konzentration gemessen wurde (MA et al., 2016). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass TRPC1 auch an Ca^{2+} -Kanal-aktivierenden Prozessen beteiligt ist. So wurde beispielsweise vermutet, dass TRPC1 auch im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und am *store-operated- Ca^{2+} -entry* (SOCE) beteiligt ist (CHEN et al., 2015; LIU et al., 2000; RAO et al., 2006). Andererseits hielten es einige Forschergruppen für möglich, dass TRPC1-Kanäle nicht funktionell sind und TRPC1 nicht in Plasmamembranen exprimiert wird (DIETRICH et al., 2014; KIM et al., 2014). Erst kürzlich wurde beispielweise in Experimenten an Astrozyten des Mäusecortex beschrieben, dass TRPC1 keine Beteiligung am SOCE hat (BELKACEMI et al., 2017). Die unterschiedlichen, teilweise auch widersprüchlichen Ergebnisse vieler Forschergruppen TRPC1 betreffend deuten darauf hin, dass der genaue Funktions- und Aktivierungsmechanismus von TRPC1 noch nicht eindeutig verstanden ist.

5.4 Die Rolle von TRPC3 und TRPC4 in der Proliferation von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl TRPC3, als auch TRPC4 in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus exprimiert sind. Bei beiden gelang eine Aktivierung mit Agonisten. Die Daten legen nahe, dass sowohl TRPC3 als auch TRPC4 Einfluss auf den Ca^{2+} -Haushalt der Astrozyten haben. Da TRPC-Kanäle und ihr Beitrag zum Ca^{2+} -Haushalt für Zell-Proliferation (ARIANO et al., 2011) und neuronales Überleben (JIA et al., 2007) von großer Bedeutung sind, wurden Experimente zum Proliferationsverhalten von Astrozyten des Rückenmarks durchgeführt. Eine verringerte Zellzahl in Proben kann entweder auf eine verringerte Proliferationsrate, oder auf eine kürzere Überlebenszeit von Zellen hinweisen. Sowohl für TRPC3- als auch für TRPC4-gendefiziente Astrozyten des Rückenmarks ließen sich in den Experimenten dieser Arbeit verringerte Zellzahlen im Vergleich zu Wildtyp-Proben beobachten (Abb. 18 und Abb. 23). Ähnliche Erkenntnisse wurden auch von anderen Forschergruppen beschrieben: TRPC3-gendefiziente Astrozyten des Cortex zeigten eine verringerte Proliferationsrate (BELKACEMI et al., 2017) ebenso wie Melanom-Zellen nach Hemmung von TRPC3 (ODA et al., 2017). Zeng et al. zeigten, dass die Proliferationsrate von Zellen durch

TRPC4-Inhibierung gesenkt und durch Über-Exprimierung von TRPC4 erhöht werden kann (ZENG et al., 2013). In Tumorzellen wird TRPC4 eine proliferationssteigernde Wirkung zugeschrieben (GAUNT et al., 2016), wobei nach direkter Stimulation von TRPC4- und TRPC5-Kanälen mit Englerin A ein schnelles und selektives Absterben von Nierenkrebszellen detektiert werden konnte (AKBULUT et al., 2015). Diese Beobachtungen können durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden, wobei sowohl TRPC3, als auch TRPC4 einen positiven Effekt auf das Proliferationsverhalten von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus zu haben scheint. Dabei könnte Ca^{2+} ein Mediator wichtiger Stoffwechselprozesse sein und beispielsweise als Aktivator bestimmter Kinasen fungieren, die protektiv auf Zellen wirken, intrazelluläre Proliferationsvorgänge fördern und so deren Überlebenszeit verlängern (JIA et al., 2007; PINTO et al., 2015). Alle Beobachtungen weisen darauf hin, dass sowohl Aktivierung, als auch Inhibierung Ca^{2+} -permeabler TRPC-Kanäle einen interessanten möglichen Ansatzpunkt für spezifische Krebstherapien bieten könnten.

5.5 Die Rolle von TRPC3 und TRPC4 in der Migration von Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus

Für die Migration von Zellen spielen TRPC-Kanäle mit ihrem Einfluss auf den Ca^{2+} -Haushalt eine bedeutende Rolle (ARIANO et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TRPC3-gendefiziente Astrozyten des Rückenmarks verglichen zu WT-Astrozyten eine signifikant verminderte Migrationsfähigkeit aufweisen (Abb. 17). Gleiches konnte bereits 2017 von Belkacemi et al. für Astrozyten des Cortex beschrieben werden (BELKACEMI et al., 2017). Es wird angenommen, dass eine geringere TRPC3-Aktivität einen erniedrigten Ca^{2+} -Einstrom in Zellen erzeugt, was scheinbar in einer verringerten, beziehungsweise verlangsamten Zell-Migration resultiert (WEI et al., 2012). Für TRPC4-gendefiziente Astrozyten des Rückenmarks konnte in dieser Arbeit hingegen kein signifikanter Unterschied im Migrationsverhalten festgestellt werden (Abb. 22). Im Unterschied dazu konnte bei Untersuchungen an TRPC4-exprimierenden Medulloblastom-Zellen gezeigt werden, dass eine EgA-vermittelte TRPC4-Aktivierung nicht nur eine Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, sondern auch eine Steigerung der Migrationsfähigkeit bewirken kann (WEI et al., 2017). Offensichtlich haben TRPC-vermittelte Signale in verschiedenen Zelltypen unterschiedlichen Einfluss auf deren Migrationsverhalten.

6. Literaturverzeichnis

1. Adebisi A, Zhao G, Narayanan D, Thomas-Gatewood CM, Bannister JP, Jaggar JH (2010) Isoform-selective physical coupling of TRPC3 channels to IP3 receptors in smooth muscle cells regulates arterial contractility. *Circ Res* 106:1603-1612
2. Akbulut Y, Gaunt HJ, Muraki K, Ludlow MJ, Amer MS, Bruns A, Vasudev NS, Radtke L, Willot M, Hahn S, Seitz T, Ziegler S, Christmann M, Beech DJ, Waldmann H (2015) (-)-Englerin A is a potent and selective activator of TRPC4 and TRPC5 calcium channels. *Angew Chem Int Ed Engl* 54:3787-3791
3. Akita T, Okada Y (2011) Regulation of bradykinin-induced activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels by Ca²⁺ nanodomains in mouse astrocytes. *J Physiol* 589:3909-3927
4. Ambudkar IS (2014) Ca²⁺ signaling and regulation of fluid secretion in salivary gland acinar cells. *Cell Calcium* 55:297-305
5. Ariano P, Dalmazzo S, Owsianik G, Nilius B, Lovisolo D (2011) TRPC channels are involved in calcium-dependent migration and proliferation in immortalized GnRH neurons. *Cell Calcium* 49:387-394
6. Barajas M, Andrade A, Hernandez-Hernandez O, Felix R, Arias-Montano JA (2008) Histamine-induced Ca²⁺ entry in human astrocytoma U373 MG cells: evidence for involvement of store-operated channels. *J Neurosci Res* 86:3456-3468
7. Becker EB, Oliver PL, Glitsch MD, Banks GT, Achilli F, Hardy A, Nolan PM, Fisher EM, Davies KE (2009) A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6706-6711
8. Beckmann H, Richter J, Hill K, Urban N, Lemoine H, Schaefer M (2017) A benzothiadiazine derivative and methylprednisolone are novel and selective activators of transient receptor potential canonical 5 (TRPC5) channels. *Cell Calcium* 66:10-18
9. Belkacemi T, Niermann A, Hofmann L, Wissenbach U, Birnbaumer L, Leidinger P, Backes C, Meese E, Keller A, Bai X, Scheller A, Kirchhoff F, Philipp SE, Weissgerber P, Flockerzi V, Beck A (2017) TRPC1- and TRPC3-dependent Ca²⁺ signaling in mouse cortical astrocytes affects injury-evoked astrogliosis in vivo. *Glia* 65:1535-1549
10. Bignami A, Dahl D (1974) Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J Comp Neurol* 153:27-38
11. Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* 272:29672-29680
12. Brixel LR, Monteilh-Zoller MK, Ingenbrandt CS, Fleig A, Penner R, Enklaar T, Zabel BU, Prawitt D (2010) TRPM5 regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Pflugers Arch* 460:69-76
13. Broker-Lai J, Kollwe A, Schindeldecker B, Pohle J, Nguyen Chi V, Mathar I, Guzman R, Schwarz Y, Lai A, Weissgerber P, Schwegler H, Dietrich A, Both M, Sprengel R, Draguhn A, Kohr G, Fakler B, Flockerzi V, Bruns D, Freichel M (2017) Heteromeric channels formed by TRPC1, TRPC4 and TRPC5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. *EMBO J* 36:2770-2789
14. Cabezas R, Avila M, Gonzalez J, El-Bacha RS, Baez E, Garcia-Segura LM, Jurado Coronel JC, Capani F, Cardona-Gomez GP, Barreto GE (2014) Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci* 8:211
15. Camacho Londono JE, Tian Q, Hammer K, Schroder L, Camacho Londono J, Reil JC, He T, Oberhofer M, Mannebach S, Mathar I, Philipp SE, Tabellion W, Schweda F, Dietrich A, Kaestner L, Laufs U, Birnbaumer L, Flockerzi V, Freichel M, Lipp P (2015) A background Ca²⁺ entry pathway mediated by TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling. *Eur Heart J* 36:2257-2266

16. Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D (2013) TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 504:113-118
17. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824
18. Chen HC, Wang CH, Shih CP, Chueh SH, Liu SF, Chen HK, Lin YC (2015) TRPC1 is required for survival and proliferation of cochlear spiral ganglion stem/progenitor cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 79:2290-2294
19. Chen Y, Balasubramanian V, Peng J, Hurlock EC, Tallquist M, Li J, Lu QR (2007) Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc* 2:1044-1051
20. Cheng KT, Liu X, Ong HL, Ambudkar IS (2008) Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels. *J Biol Chem* 283:12935-12940
21. Cheung KK, Yeung SS, Au SW, Lam LS, Dai ZQ, Li YH, Yeung EW (2011) Expression and association of TRPC1 with TRPC3 during skeletal myogenesis. *Muscle Nerve* 44:358-365
22. Cheung SY, Henrot M, Al-Saad M, Baumann M, Muller H, Unger A, Rubaiy HN, Mathar I, Dinkel K, Nussbaumer P, Klebl B, Freichel M, Rode B, Trainor S, Clapham DE, Christmann M, Waldmann H, Abbas SK, Beech DJ, Vasudev NS (2018) TRPC4/TRPC5 channels mediate adverse reaction to the cancer cell cytotoxic agent (-)-Englerin A. *Oncotarget* 9:29634-29643
23. Chiluita D, Krishna S, Schumacher VA, Schlondorff J (2013) Gain-of-function mutations in transient receptor potential C6 (TRPC6) activate extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2). *J Biol Chem* 288:18407-18420
24. Chu X, Tong Q, Cheung JY, Wozney J, Conrad K, Mazack V, Zhang W, Stahl R, Barber DL, Miller BA (2004) Interaction of TRPC2 and TRPC6 in erythropoietin modulation of calcium influx. *J Biol Chem* 279:10514-10522
25. Clapham DE, Runnels LW, Strubing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387-396
26. Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517-524
27. Colsoul B, Schraenen A, Lemaire K, Quintens R, Van Lommel L, Segal A, Owsianik G, Talavera K, Voets T, Margolskee RF, Kokrashvili Z, Gilon P, Nilius B, Schuit FC, Vennekens R (2010) Loss of high-frequency glucose-induced Ca²⁺ oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in *Trpm5*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5208-5213
28. Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Melone M (1996) Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* 17:254-258
29. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285-287
30. Dietrich A, Mederos YSM, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L (2005) Increased vascular smooth muscle contractility in *TRPC6*^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 25:6980-6989
31. Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaja G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L, Gudermann T (2007) Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch* 455:465-477
32. Dietrich A, Fahlbusch M, Gudermann T (2014) Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator? *Cells* 3:939-962
33. Dietrich A, Gudermann T (2014) TRPC6: physiological function and pathophysiological relevance. *Handb Exp Pharmacol* 222:157-188
34. Dong Q, Liu Q, Li R, Wang A, Bu Q, Wang KH, Chang Q (2018) Mechanism and consequence of abnormal calcium homeostasis in Rett syndrome astrocytes. *Elife* 7
35. Duan J, Li J, Zeng B, Chen GL, Peng X, Zhang Y, Wang J, Clapham DE, Li Z, Zhang J (2018) Structure of the mouse TRPC4 ion channel. *Nat Commun* 9:3102
36. Eng LF, Ghirnikar RS (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4:229-237

37. Fan D, Grooms SY, Araneda RC, Johnson AB, Dobrenis K, Kessler JA, Zukin RS (1999) AMPA receptor protein expression and function in astrocytes cultured from hippocampus. *J Neurosci Res* 57:557-571
38. Flockerzi V (2007) An introduction on TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*:1-19
39. Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B (2001) Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* 3:121-127
40. Freichel M, Almering J, Tsvilovskyy V (2012) The Role of TRP Proteins in Mast Cells. *Front Immunol* 3:150
41. Freichel M, Tsvilovskyy V, Camacho-Londono JE (2014) TRPC4- and TRPC4-containing channels. *Handb Exp Pharmacol* 222:85-128
42. Fu Y, Wang C, Zhang D, Xin Y, Li J, Zhang Y, Chu X (2018) Increased TRPC6 expression is associated with tubular epithelial cell proliferation and inflammation in diabetic nephropathy. *Mol Immunol* 94:75-81
43. Gao Y, Yao T, Deng Z, Sohn JW, Sun J, Huang Y, Kong X, Yu KJ, Wang RT, Chen H, Guo H, Yan J, Cunningham KA, Chang Y, Liu T, Williams KW (2017) TrpC5 Mediates Acute Leptin and Serotonin Effects via Pomc Neurons. *Cell Rep* 18:583-592
44. Gaunt HJ, Vasudev NS, Beech DJ (2016) Transient receptor potential canonical 4 and 5 proteins as targets in cancer therapeutics. *Eur Biophys J* 45:611-620
45. Griffith TN, Varela-Nallar L, Dinamarca MC, Inestrosa NC (2010) Neurobiological effects of Hyperforin and its potential in Alzheimer's disease therapy. *Curr Med Chem* 17:391-406
46. Grimaldi M, Maratos M, Verma A (2003) Transient receptor potential channel activation causes a novel form of [Ca²⁺]_i oscillations and is not involved in capacitative Ca²⁺ entry in glial cells. *J Neurosci* 23:4737-4745
47. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450
48. Hafner S, Burg F, Kannler M, Urban N, Mayer P, Dietrich A, Trauner D, Broichhagen J, Schaefer M (2018) A (+)-Larixol Congener with High Affinity and Subtype Selectivity toward TRPC6. *ChemMedChem* 13:1028-1035
49. Hartmann J, Dragicevic E, Adelsberger H, Henning HA, Sumser M, Abramowitz J, Blum R, Dietrich A, Freichel M, Flockerzi V, Birnbaumer L, Konnerth A (2008) TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron* 59:392-398
50. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397:259-263
51. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2000) Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med (Berl)* 78:14-25
52. Jia Y, Zhou J, Tai Y, Wang Y (2007) TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat Neurosci* 10:559-567
53. Jungblut M, Tiveron MC, Barral S, Abrahamsen B, Knobel S, Pennartz S, Schmitz J, Perraut M, Pfrieder FW, Stoffel W, Cremer H, Bosio A (2012) Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1. *Glia* 60:894-907
54. Kaneko Y, Szallasi A (2013) TRP channels as therapeutic targets. *Curr Top Med Chem* 13:241-243
55. Kawamata H, Ng SK, Diaz N, Burstein S, Morel L, Osgood A, Sider B, Higashimori H, Haydon PG, Manfredi G, Yang Y (2014) Abnormal intracellular calcium signaling and SNARE-dependent exocytosis contributes to SOD1G93A astrocyte-mediated toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 34:2331-2348
56. Kerstetter AE, Miller RH (2012) Isolation and culture of spinal cord astrocytes. *Methods Mol Biol* 814:93-104

57. Kim J, Kwak M, Jeon JP, Myeong J, Wie J, Hong C, Kim SY, Jeon JH, Kim HJ, So I (2014) Isoform- and receptor-specific channel property of canonical transient receptor potential (TRPC)1/4 channels. *Pflugers Arch* 466:491-504
58. Kim J, Ko J, Myeong J, Kwak M, Hong C, So I (2019) TRPC1 as a negative regulator for TRPC4 and TRPC5 channels. *Pflugers Arch* 471:1045-1053
59. Kimelberg HK, Nedergaard M (2010) Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7:338-353
60. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y (2009) Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5400-5405
61. Ko J, Myeong J, Yang D, So I (2017) Calcium permeability of transient receptor potential canonical (TRPC) 4 channels measured by TRPC4-GCaMP6s. *Korean J Physiol Pharmacol* 21:133-140
62. Lau OC, Shen B, Wong CO, Tjong YW, Lo CY, Wang HC, Huang Y, Yung WH, Chen YC, Fung ML, Rudd JA, Yao X (2016) TRPC5 channels participate in pressure-sensing in aortic baroreceptors. *Nat Commun* 7:11947
63. Leypold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R (2002) Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6376-6381
64. Li M, Zacharia J, Sun X, Wier WG (2008) Effects of siRNA knock-down of TRPC6 and InsP(3)R1 in vasopressin-induced Ca(2+) oscillations of A7r5 vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Res* 58:308-315
65. Li Z, Guo G, Wang H, Si X, Zhou G, Xiong Y, Li S, Dai R, Yang C (2017) TRPC5 channel modulates endothelial cells senescence. *Eur J Pharmacol* 802:27-35
66. Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L (2007) Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4682-4687
67. Lichtenegger M, Groschner K (2014) TRPC3: a multifunctional signaling molecule. *Handb Exp Pharmacol* 222:67-84
68. Liu X, Wang W, Singh BB, Lockwich T, Jadlowiec J, O'Connell B, Wellner R, Zhu MX, Ambudkar IS (2000) Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells. *J Biol Chem* 275:3403-3411
69. Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40:551-561
70. Ma Q, Chen C, Deng P, Zhu G, Lin M, Zhang L, Xu S, He M, Lu Y, Duan W, Pi H, Cao Z, Pei L, Li M, Liu C, Zhang Y, Zhong M, Zhou Z, Yu Z (2016) Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields Promote In Vitro Neuronal Differentiation and Neurite Outgrowth of Embryonic Neural Stem Cells via Up-Regulating TRPC1. *PLoS One* 11:e0150923
71. Malarkey EB, Ni Y, Parpura V (2008) Ca²⁺ entry through TRPC1 channels contributes to intracellular Ca²⁺ dynamics and consequent glutamate release from rat astrocytes. *Glia* 56:821-835
72. Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2:679-689
73. Miller BA (2014) Trpc2. *Handb Exp Pharmacol* 222:53-65
74. Miyano K, Morioka N, Sugimoto T, Shiraishi S, Uezono Y, Nakata Y (2010) Activation of the neurokinin-1 receptor in rat spinal astrocytes induces Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores and extracellular Ca²⁺ influx through TRPC3. *Neurochem Int* 57:923-934
75. Molnar T, Yarishkin O, Iuso A, Barabas P, Jones B, Marc RE, Phuong TT, Krizaj D (2016) Store-Operated Calcium Entry in Muller Glia Is Controlled by Synergistic Activation of TRPC and Orai Channels. *J Neurosci* 36:3184-3198

76. Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313-1323
77. Montgomery DL (1994) Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol* 31:145-167
78. Moreno C, Sampieri A, Vivas O, Pena-Segura C, Vaca L (2012) STIM1 and Orai1 mediate thrombin-induced Ca²⁺ influx in rat cortical astrocytes. *Cell Calcium* 52:457-467
79. Munakata M, Shirakawa H, Nagayasu K, Miyanojima J, Miyake T, Nakagawa T, Katsuki H, Kaneko S (2013) Transient receptor potential canonical 3 inhibitor Pyr3 improves outcomes and attenuates astrogliosis after intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke* 44:1981-1987
80. Nakao K, Shirakawa H, Sugishita A, Matsutani I, Niidome T, Nakagawa T, Kaneko S (2008) Ca²⁺ mobilization mediated by transient receptor potential canonical 3 is associated with thrombin-induced morphological changes in 1321N1 human astrocytoma cells. *J Neurosci Res* 86:2722-2732
81. Naylor J, Al-Shawaf E, McKeown L, Manna PT, Porter KE, O'Regan D, Muraki K, Beech DJ (2011) TRPC5 channel sensitivities to antioxidants and hydroxylated stilbenes. *J Biol Chem* 286:5078-5086
82. Nesin V, Tsiokas L (2014) Trpc1. *Handb Exp Pharmacol* 222:15-51
83. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87:165-217
84. Oda K, Umemura M, Nakakaji R, Tanaka R, Sato I, Nagasako A, Oyamada C, Baljinnyam E, Katsumata M, Xie LH, Narikawa M, Yamaguchi Y, Akimoto T, Ohtake M, Fujita T, Yokoyama U, Iwatsubo K, Aihara M, Ishikawa Y (2017) Transient receptor potential cation 3 channel regulates melanoma proliferation and migration. *J Physiol Sci* 67:497-505
85. Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K, Mori Y (1999) Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca²⁺-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 274:27359-27370
86. Otsuguro K, Tang J, Tang Y, Xiao R, Freichel M, Tsvilovskyy V, Ito S, Flockerzi V, Zhu MX, Zholos AV (2008) Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 283:10026-10036
87. Paez PM, Fulton D, Spreuer V, Handley V, Campagnoni AT (2011) Modulation of canonical transient receptor potential channel 1 in the proliferation of oligodendrocyte precursor cells by the golgi products of the myelin basic protein gene. *J Neurosci* 31:3625-3637
88. Park SE, Song JH, Hong C, Kim DE, Sul JW, Kim TY, Seo BR, So I, Kim SY, Bae DJ, Park MH, Lim HM, Baek IJ, Riccio A, Lee JY, Shim WH, Park B, Koh JY, Hwang JJ (2019) Contribution of Zinc-Dependent Delayed Calcium Influx via TRPC5 in Oxidative Neuronal Death and its Prevention by Novel TRPC Antagonist. *Mol Neurobiol* 56:2822-2835
89. Patel S, Docampo R (2010) Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca²⁺ signaling. *Trends Cell Biol* 20:277-286
90. Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D (2015) Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 520:511-517
91. Phelan KD, Shwe UT, Abramowitz J, Birnbaumer L, Zheng F (2014) Critical role of canonical transient receptor potential channel 7 in initiation of seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:11533-11538
92. Philipp S, Cavalie A, Freichel M, Wissenbach U, Zimmer S, Trost C, Marquart A, Murakami M, Flockerzi V (1996) A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J* 15:6166-6171

93. Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L, Schroth G, Freichel M, Murakami M, Cavalie A, Flockerzi V (1998) A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* 17:4274-4282
94. Pinto MC, Kihara AH, Goulart VA, Tonelli FM, Gomes KN, Ulrich H, Resende RR (2015) Calcium signaling and cell proliferation. *Cell Signal* 27:2139-2149
95. Putney JW, Jr. (1999) TRP, inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, and capacitative calcium entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14669-14671
96. Qu YY, Wang LM, Zhong H, Liu YM, Tang N, Zhu LP, He F, Hu QH (2017) TRPC1 stimulates calciumsensing receptorinduced storeoperated Ca²⁺ entry and nitric oxide production in endothelial cells. *Mol Med Rep* 16:4613-4619
97. Rao JN, Platoshyn O, Golovina VA, Liu L, Zou T, Marasa BS, Turner DJ, Yuan JX, Wang JY (2006) TRPC1 functions as a store-operated Ca²⁺ channel in intestinal epithelial cells and regulates early mucosal restitution after wounding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G782-792
98. Reuter H (1986) Voltage-dependent mechanisms for raising intracellular free calcium concentration: calcium channels. *Ciba Found Symp* 122:5-22
99. Reyes RC, Verkhratsky A, Parpura V (2013) TRPC1-mediated Ca²⁺ and Na⁺ signalling in astroglia: differential filtering of extracellular cations. *Cell Calcium* 54:120-125
100. Riccio A, Li Y, Tsvetkov E, Gapon S, Yao GL, Smith KS, Engin E, Rudolph U, Bolshakov VY, Clapham DE (2014) Decreased anxiety-like behavior and Galphaq/11-dependent responses in the amygdala of mice lacking TRPC4 channels. *J Neurosci* 34:3653-3667
101. Richter JM, Schaefer M, Hill K (2014) Riluzole activates TRPC5 channels independently of PLC activity. *Br J Pharmacol* 171:158-170
102. Rohacs T (2013) Regulation of transient receptor potential channels by the phospholipase C pathway. *Adv Biol Regul* 53:341-355
103. Ronco V, Grolla AA, Glasnov TN, Canonico PL, Verkhratsky A, Genazzani AA, Lim D (2014) Differential deregulation of astrocytic calcium signalling by amyloid-beta, TNFalpha, IL-1beta and LPS. *Cell Calcium* 55:219-229
104. Rubaiy HN, Ludlow MJ, Bon RS, Beech DJ (2017) Pico145 - powerful new tool for TRPC1/4/5 channels. *Channels (Austin)* 11:362-364
105. Saadoun S, Papadopoulos MC, Watanabe H, Yan D, Manley GT, Verkman AS (2005) Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci* 118:5691-5698
106. Saotome K, Singh AK, Yelshanskaya MV, Sobolevsky AI (2016) Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6. *Nature* 534:506-511
107. Schildge S, Bohrer C, Beck K, Schachtrup C (2013) Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *J Vis Exp*
108. Schleifer H, Doleschal B, Lichtenegger M, Oppenrieder R, Derler I, Frischauf I, Glasnov TN, Kappe CO, Romanin C, Groschner K (2012) Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca²⁺ entry pathways. *Br J Pharmacol* 167:1712-1722
109. Schmitt A, Asan E, Puschel B, Kugler P (1997) Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *J Neurosci* 17:1-10
110. Scimemi A (2013) A TRP among the astrocytes. *J Physiol* 591:9-15
111. Sharp PA, Sugden B, Sambrook J (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12:3055-3063
112. Shibata T, Yamada K, Watanabe M, Ikenaka K, Wada K, Tanaka K, Inoue Y (1997) Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J Neurosci* 17:9212-9219
113. Shirakawa H, Sakimoto S, Nakao K, Sugishita A, Konno M, Iida S, Kusano A, Hashimoto E, Nakagawa T, Kaneko S (2010) Transient receptor potential canonical 3

- (TRPC3) mediates thrombin-induced astrocyte activation and upregulates its own expression in cortical astrocytes. *J Neurosci* 30:13116-13129
114. Shirakawa H (2012) [Pathophysiological significance of the canonical transient receptor potential (TRPC) subfamily in astrocyte activation]. *Yakugaku Zasshi* 132:587-593
 115. Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156
 116. Sommer I, Schachner M (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83:311-327
 117. Song X, Zhao Y, Narcisse L, Duffy H, Kress Y, Lee S, Brosnan CF (2005) Canonical transient receptor potential channel 4 (TRPC4) co-localizes with the scaffolding protein ZO-1 in human fetal astrocytes in culture. *Glia* 49:418-429
 118. Storch U, Forst AL, Philipp M, Gudermann T, Mederos y Schnitzler M (2012) Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *J Biol Chem* 287:3530-3540
 119. Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29:645-655
 120. Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD (1992) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31:3103-3112
 121. Tateishi N, Shimoda T, Yada N, Shinagawa R, Kagamiishi Y (2006) [S100B: astrocyte specific protein]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 26:11-16
 122. Tong Q, Chu X, Cheung JY, Conrad K, Stahl R, Barber DL, Mignery G, Miller BA (2004) Erythropoietin-modulated calcium influx through TRPC2 is mediated by phospholipase Cgamma and IP3R. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1667-1678
 123. Urban N, Wang L, Kwiek S, Rademann J, Kuebler WM, Schaefer M (2016) Identification and Validation of Larixyl Acetate as a Potent TRPC6 Inhibitor. *Mol Pharmacol* 89:197-213
 124. Valerio-Gomes B, Guimaraes DM, Szczupak D, Lent R (2018) The Absolute Number of Oligodendrocytes in the Adult Mouse Brain. *Front Neuroanat* 12:90
 125. Vannier B, Zhu X, Brown D, Birnbaumer L (1998) The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J Biol Chem* 273:8675-8679
 126. Varga-Szabo D, Authi KS, Braun A, Bender M, Ambily A, Hassock SR, Gudermann T, Dietrich A, Nieswandt B (2008) Store-operated Ca²⁺ entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflugers Arch* 457:377-387
 127. Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL (2002) The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol* 4:E263-272
 128. Vinayagam D, Mager T, Apelbaum A, Bothe A, Merino F, Hofnagel O, Gatsogiannis C, Raunser S (2018) Electron cryo-microscopy structure of the canonical TRPC4 ion channel. *Elife* 7
 129. Wang X, Dande RR, Yu H, Samelko B, Miller RE, Altintas MM, Reiser J (2018) TRPC5 Does Not Cause or Aggravate Glomerular Disease. *J Am Soc Nephrol* 29:409-415
 130. Wei C, Wang X, Zheng M, Cheng H (2012) Calcium gradients underlying cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 24:254-261
 131. Wei WC, Huang WC, Lin YP, Becker EBE, Ansorge O, Flockerzi V, Conti D, Cenacchi G, Glitsch MD (2017) Functional expression of calcium-permeable canonical transient receptor potential 4-containing channels promotes migration of medulloblastoma cells. *J Physiol* 595:5525-5544
 132. Weissgerber P, Kriebs U, Tsvilovskyy V, Olausson J, Kretz O, Stoerger C, Mannebach S, Wissenbach U, Vennekens R, Middendorff R, Flockerzi V, Freichel M (2012) Excision of Trpv6 gene leads to severe defects in epididymal Ca²⁺ absorption and male fertility much like single D541A pore mutation. *J Biol Chem* 287:17930-17941
 133. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995) TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9652-9656

134. Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* 62:381-404
135. Xu XP, Lozinskaya I, Costell M, Lin ZJ, Ball JA, Bernard R, Behm DJ, Marino JP, Schnackenberg CG (2013) Characterization of Small Molecule TRPC3 and TRPC6 agonist and Antagonists. *Biophysical Journal* 104:454a-454a
136. Yoon IS, Li PP, Siu KP, Kennedy JL, Macciardi F, Cooke RG, Parikh SV, Warsh JJ (2001) Altered TRPC7 gene expression in bipolar-I disorder. *Biol Psychiatry* 50:620-626
137. Yu Q, Li M (2017) Effects of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) on the mechanical stretch-induced expression of airway remodeling-associated factors in human bronchial epithelioid cells. *J Biomech* 51:89-96
138. Zeng B, Yuan C, Yang X, Atkin SL, Xu SZ (2013) TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 13:103-116
139. Zeng W, Yuan JP, Kim MS, Choi YJ, Huang GN, Worley PF, Muallem S (2008) STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol Cell* 32:439-448
140. Zhang X, Trebak M (2014) Transient receptor potential canonical 7: a diacylglycerol-activated non-selective cation channel. *Handb Exp Pharmacol* 222:189-204
141. Zholos AV (2014) Trpc5. *Handb Exp Pharmacol* 222:129-156
142. Zhou Y, Castonguay P, Sidhom EH, Clark AR, Dvela-Levitt M, Kim S, Sieber J, Wieder N, Jung JY, Andreeva S, Reichardt J, Dubois F, Hoffmann SC, Basgen JM, Montesinos MS, Weins A, Johnson AC, Lander ES, Garrett MR, Hopkins CR, Greka A (2017) A small-molecule inhibitor of TRPC5 ion channels suppresses progressive kidney disease in animal models. *Science* 358:1332-1336
143. Zhu X, Chu PB, Peyton M, Birnbaumer L (1995) Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Lett* 373:193-198
144. Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1996) trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* 85:661-671
145. Zubcevic L, Herzik MA, Jr., Chung BC, Liu Z, Lander GC, Lee SY (2016) Cryo-electron microscopy structure of the TRPV2 ion channel. *Nat Struct Mol Biol* 23:180-186

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Alle Chemikalien, die für Lösungen, Puffer und Medien verwendet wurden, sind im Material und Methoden Teil zu finden.

AK	Antikörper
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AUC	<i>Area Under Curve</i>
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pair</i>
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CPA	Cyclopiazonic acid
D	Tag
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleotidsäure
EgA	Englerin A
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GLAST	<i>Glutamate Aspartate Transporter</i>
h	Stunde
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
KO	gendefizient
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
ms	Millisekunde
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
Na ⁺	Natrium
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

NO	Stickstoffmonoxid
OAG	1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
p	<i>post partum</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PIP ₂	Phosphatinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
P-L-L	Poly-L-lysine
Pyr3	Pyrazolium 3
R	Rezeptor
Ril	Riluzol
ROI	<i>region of interest</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmatic reticulum calcium ATPase</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCE	<i>store-operated-Ca²⁺-entry</i>
STIM	<i>stromal interaction molecule</i>
TRPC	<i>Transient Receptor Potential Canonical</i>
μM	Mikromolar
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung von TRP-Kanälen.....	6
Abb. 2: OAG/DAG-induzierter Ca^{2+} -Einstrom.....	9
Abb. 3: Wirkung von Englerin A an TRPC4- und TRPC5 Kanälen..	10
Abb. 4: Makroskopische Präparation des Rückenmarks..	20
Abb. 5: Mikroskopische Präparation des Rückenmarks..	21
Abb. 6: „Fluorescence-activated cell sorting“ (FACS) nach Markierung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern.....	23
Abb. 7: Schematische Darstellung einer 6-Mulden-Platte bei den Migrationsversuchen.....	27
Abb. 8: Reduktion von MTS zu Formazan.....	28
Abb. 9: Durchlichtmikroskopisches Bild einer etwa 3 Wochen alten konfluent wachsenden Zellkultur aus dem Rückenmark der Maus ohne Färbung.....	30
Abb. 10: GFAP-Färbung einer Astrozytenkultur ohne vorangegangene Entfernung der Rückenmarkshäute.....	31
Abb. 11: Färbung von Zellkulturen des Rückenmarks nach Entfernung der Rückenmarkshäute und 3 Wochen Kulturdauer.....	31
Abb. 12: GLAST-Färbung von Zellkulturen des Rückenmarks.....	31
Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse einer Zellkultur des Rückenmarks der Maus.....	32
Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse einer mit anti-GLAST-PE, anti-CD11b-FITC und anti-O4-APC-Antikörpern gefärbten Zellkultur des Rückenmarks nach circa drei Wochen Kulturzeit.....	33
Abb. 15: Nachweis von TRPC-Transkripten in Astrozyten des Rückenmarks mit Hilfe von RT-PCR.....	34
Abb. 16: OAG-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen in Astrozyten des Rückenmarks von WT- und TRPC3KO-Mäusen.....	36
Abb. 17: In vitro Migration von WT- und TRPC3KO-Astrozyten.....	37
Abb. 18: Proliferation von Wildtyp- und TRPC3KO-Astrozyten.....	38
Abb. 19: Englerin A-induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus.....	39
Abb. 20: BTD- und Riluzol-induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten aus dem Rückenmark der Maus (WT).....	40
Abb. 21: EgA-induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten-Präparaten aus dem Rückenmark von WT und TRPC1-defizienten Mäusen.....	41
Abb. 22: In vitro Migration von WT- und TRPC4KO-Astrozyten.....	42
Abb. 23: Proliferation von Wildtyp- und TRPC4KO-Astrozyten.....	43

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In PCRs verwendete Eurofins-Oligonukleotid-Primer.....	19
Tab. 2: In PCRs verwendete Qiagen®-Oligonukleotid-Primer.....	19

8. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich in der Zeit der Entstehung meiner Dissertationsarbeit begleitet und unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Veit Flockerzi für die Weichenstellung meines Promotionsthemas, sowie für das zur Verfügungstellen seiner Laborräumlichkeiten und Geräte, mit denen ich die Experimente durchführen durfte, auf denen diese Arbeit fußt.

Ebenso großen Dank möchte ich PD Dr. Stephan Philipp für die Betreuung meiner Promotion und die Durchführung der FACS-Analysen entgegenbringen.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Andreas Beck und Dr. Thabet Belkacemi bedanken, die mir beide mit hoher fachlicher Expertise zur Seite standen und mich mit hilfreichen Ratschlägen beim wissenschaftlichen Arbeiten, sowie bei Fragestellungen aller Art unterstützten.

Großes Lob und Dank möchte ich dem gesamten Laborteam aussprechen:

Dr. Petra Weißgerber, Tanja Maurer, Tom Janke und ihren Kollegen für die Bereitstellung der für die Arbeit benötigten Tiere aus der Versuchstierhaltung,

Dr. Barbara Wardas, Sandra Plant, Heidi Löhr, Martin Simon-Thomas und Dr. Anouar Belkacemi für die gute Zusammenarbeit und die warme Atmosphäre im Labor des Instituts für klinische und experimentelle Pharmakologie.

Besonderen Dank möchte ich Dr. Alexander Niermann aussprechen, der mich als Mitstreiter, Kommilitone und guter Freund begleitete und weiter begleitet.

Letztlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die mir in der langen Zeit der Promotion zur Seite standen und den Glauben an mich auch dann nicht verloren, als das Leben die eine oder andere Hürde für mich bereit hatte.

9. Curricilum vitae

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.