

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

Rolle von TRPC3 und beta-Untereinheiten spannungsabhängiger Kalziumkanäle in kortikalen Astrozyten

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2020**

vorgelegt von: Alexander Niermann
geb. am: 01.06.1990, in Hamburg

Tag der Promotion:	03.08.2020
Dekan:	Prof. Dr. M. D. Menger
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Veit Flockerzi
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. Jochen G Schneider

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	8
2	Einleitung.....	12
2.1	Astrozyten	12
2.2	Kalzium als intrazellulärer Botenstoff	13
2.3	Transient receptor potential (TRP)-Kanäle.....	14
2.4	TRPC-Kanäle	16
2.4.1	TRPC1.....	17
2.4.2	TRPC2.....	17
2.4.3	TRPC3.....	18
2.4.4	TRPC4.....	19
2.4.5	TRPC5.....	19
2.4.6	TRPC6 und TRPC7	20
2.4.7	TRPCs in Astrozyten	20
2.5	Spannungsaktivierte Kalziumkanäle (CaVs)	21
2.5.1	α 1-Untereinheit.....	23
2.5.2	β -Untereinheiten	24
2.5.3	α 2 δ und γ Untereinheiten	25
2.5.4	CaVs in Astrozyten	26
2.6	Zielsetzung der Arbeit.....	28
3	Materialien und Methoden	29
3.1	Materialien	29
3.2	Chemikalien und Lösungen	29
3.2.1	Chemikalien.....	29
3.2.2	Lösungen.....	31
3.2.3	Geräte	32
3.3	Maus-Linien	32
3.4	Isolierung von Astrozyten und Mikroglia aus dem Kortex des Gehirns von Maus und Kultivierung der isolierten Zellen	33
3.4.1	Ausplattierung der Astrozyten für die Versuche	35
3.4.2	Immunhistochemische Färbung.....	36
3.4.3	Bestimmung des Anteils der Astrozyten.....	36
3.5	Proliferations Assay.....	37
3.6	Scratch Assay.....	39

3.7	Stichwunden Versuch (durchgeführt von Dr. Thabet Belkacemi)	41
3.8	Messung der Veränderungen der Kalziumkonzentration im Zytoplasma.....	43
3.9	Statistische Analyse.....	46
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Immunhistochemische Färbung	47
4.2	Rolle von TRPC1 und TRPC3 in kortikalen Astrozyten	48
4.2.1	Funktion von TRPC1 und TRPC3 in der Proliferation kortikaler Astrozyten	48
4.2.2	Einfluss einer TRPC3 „gain of function“ Mutation auf die Migration kortikaler Astrozyten	51
4.3	Rolle von TRPC4 in kortikalen Astrozyten	52
4.4	Die Rolle der β -Untereinheiten spannungsaktivierter Kalziumkanäle in kortikalen Astrozyten.....	56
4.4.1	Spontane Kalzium Oszillationen in Astrozyten	57
4.4.2	Rolle der β -Untereinheiten von CaVs in der Proliferation der Astrozyten	59
4.4.3	Rolle der β -Untereinheiten von CaVs in der Migration von Astrozyten	60
4.4.4	Stich-Wunden Experiment, durchgeführt von Dr. Thabet Belkacemi.....	63
5	Diskussion	66
5.1	Homogenität der Astrozytenkultur aus dem Kortex von Maus	66
5.2	Die Rolle von TRPC1 und TRPC3 und TRPC4 in kortikalen Astrozyten von Maus. ..	67
5.3	Rolle von CaV β 2 und CaV β 3 in kortikalen Astrozyten.....	71
6	Literaturverzeichnis.....	75
7	Beiträge	87
8	Veröffentlichungen.....	88
9	Danksagung	89
10	Curriculum Vitae	90

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Abs	Absorption
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
Ca ²⁺	Kalzium Ion
CaV	Spannungsaktivierter Kalziumkanal
CaV β	β -Untereinheit eines spannungsaktivierten Kalziumkanals
CIRB	Calmodulin und IP ₃ -Rezeptor Bindungsstelle
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAG	Diacylglycerin
d	Tag
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EgA	Englerin A
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ecm β 2 KO	Extracardiomyozyt (Cav) β 2-Defizienz
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FKS	Fetales Kälberserum
FPKM	Fragmente pro Kilobase des Transkripts pro Millionen gemappter Reads
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (Saures Gliafaserprotein)
GLAST	Glutamat-Aspartat Transporter
GOF	Gain of function
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HVA	High-voltage-activated
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
KO	Knockout (Gen-Defizienz)
l	Liter
LVA	Low-voltage-activated
LP	Langpassfilter
min	Minute
mM	Millimolar
ms	Millisekunden
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MWK	Moonwalker
Na ⁺	Natrium-Ion
nm	Nanometer
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NMDAR	N-methyl-D-aspartate-Rezeptor
OAG	1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PES	Phenazine Ethosulfate
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
P-L-L	Poly-L-Lysin
PM	Plasmamembran
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
ROI	Region of interest
s	Sekunde

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SERCA	Sarkoendoplasmatische-Retikulum-Ca ²⁺ -ATPase
STIM	Stromal interaction molecule
s.o.	Siehe oben
SOCE	Store-operated Ca ²⁺ entry
SPF	Spezifisch-pathogenfrei
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TARP	Transmembranes AMPA Rezeptor regulatorisches Protein
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der TRP-Familie in Säugetieren.	15
Abbildung 2: TRPC-Kanal.	16
Abbildung 3: Spannungsaktivierter Kalziumkanal.	22
Abbildung 4: Einteilung der CaV-Kanäle.	24
Abbildung 5: Isolierung der Astrozyten und Mikroglia aus dem Kortex von Maus.	35
Abbildung 6: Reduktion von MTS zu Formazan.	37
Abbildung 7: Pipettierschema des Proliferationsversuchs.	38
Abbildung 8: Aufbau des Scratch Assays.	40
Abbildung 9: Stichwunden Versuch.	41
Abbildung 10: Beladung der Zelle mit Fura-2.	43
Abbildung 11: Eigenschaften der Anregungsspektren von Fura-2.	44
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung kortikaler Astrozyten in Kultur.	47
Abbildung 13: Proliferation der kortikalen Wildtyp und TRPC3-KO Astrozyten.	49
Abbildung 14: Proliferation der kortikalen Wildtyp und TRPC1-KO Astrozyten.	49
Abbildung 15: Proliferation der kortikalen Wildtyp und MWK Astrozyten:	50
Abbildung 16: Migration der Astrozyten der MWK und des zugehörigen Wildtyps <i>in vitro.</i>	52
Abbildung 17: EgA induzierte Ca²⁺-Erhöhungen in kortikalen Astrozyten.	56
Abbildung 18: Transkriptomanalyse der CaV β-Untereinheiten kortikaler Astrozyten und spannungsaktivierter Ca²⁺-Strom.	57
Abbildung 19: Spontane Ca²⁺-Oszillationen in kortikalen Astrozyten.	58
Abbildung 20: Proliferation der kortikalen Wildtyp und β3-defizienten Astrozyten.	59
Abbildung 21: Proliferation der kortikalen Wildtyp und β2-defizienten Astrozyten:	60
Abbildung 22: Migration der β3-defizienten Astrozyten im Vergleich zu Astrozyten von Wildtyp Tieren <i>in vitro.</i>	62
Abbildung 23: Migration der β2-defizienten Astrozyten im Vergleich zu Astrozyten von Wildtyp Tieren <i>in vitro.</i>	63
Abbildung 24: Stichwunden Versuch.	65

1 Zusammenfassung

Kalzium ist ein wichtiger Botenstoff des Körpers, der an der Regulierung verschiedener Prozesse wie der Proliferation und Migration von Zellen und somit an der Wundheilung beteiligt ist. Der Kalziumhaushalt von Zellen kann über verschiedene Ionenkanäle beeinflusst werden. Zu diesen Ionenkanälen gehören die Transient receptor potential Kanäle (TRP) sowie die spannungsaktivierten Kalziumkanäle (CaVs). In kortikalen Astrozyten konnten bisher die Transkripte von TRPC1, TRPC3 und TRPC4 nachgewiesen werden sowie Transkripte von Untereinheiten spannungsaktivierter Kalziumkanäle.

In der vorliegenden Arbeit wurde über eine durch den TRPC4-Agonisten Englerin A (EgA) induzierte Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration die funktionale Expression von TRPC4 in einem Anteil kortikaler Astrozyten festgestellt. Astrozyten mit fehlendem *Trpc1* zeigten hierbei einen signifikant erhöhten Ca^{2+} -Einstrom durch EgA, was für eine hemmende Rolle von TRPC1 in heterotetrameren TRPC1/TRPC4 Kanälen spricht.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Migrationsrate in kortikalen Astrozyten aus TRPC3 „gain of function“ Moonwalker (MWK) Mäusen nachgewiesen und somit die Annahme verfestigt, dass die Migration mit dem TRPC3-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom korreliert. Auch die Proliferation kortikaler Astrozyten scheint von Ca^{2+} -Signalen abhängig zu sein. So zeigten kortikale Astrozyten aus TRPC3-KO Mäusen eine im Vergleich zum Wildtyp (WT) verminderte Proliferation. Ein positiver Effekt auf die Proliferation *in vitro* durch vermehrten TRPC3 vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in Astrozyten aus TRPC1-KO oder MWK Mäusen konnte nicht festgestellt werden. Nach dem Erzeugen einer Wunde in der Großhirnrinde kommt es unter anderem durch Migration und Proliferation von Astrozyten zur Wundheilung. Zusammenfassend konnte so *in vitro* eine wichtige Rolle von TRPC3 in der durch kortikale Astrozyten vermittelten Wundheilung festgestellt werden.

Auch spannungsaktivierte Kalziumkanäle (CaVs) haben ein Einfluss auf den Ca^{2+} -Haushalt von kortikalen Astrozyten. CaVs setzen sich aus der porenbildenden $\alpha 1$ -Untereinheit sowie aus anderen Untereinheiten wie β , γ und $\alpha 2\delta$ zusammen. Letztere modulieren die physiologischen Eigenschaften der CaV-Kanäle. Vorversuche ergaben, dass im Gegensatz zu kortikalen Astrozyten aus $\beta 3$ -defizienten Mäusen, kortikale Astrozyten aus $\beta 2$ -KO Mäusen einen reduzierten spannungsaktivierten Ca^{2+} -Einstrom aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine verminderte Migration in $\beta 2$ -defizienten Astrozyten festgestellt werden, während die Proliferation nicht beeinflusst war. Dies weist darauf hin,

dass die Migration, nicht aber die Proliferation von dem in $\beta 2$ -KO kortikalen Astrozyten reduzierten Ca^{2+} -Einstrom abhängig ist. Der in $\beta 2$ -KO Mäusen reduzierte Ca^{2+} -Einstrom hatte keine Auswirkung auf die Proliferation kortikaler Astrozyten. In $\beta 3$ -defizienten Astrozyten konnten im Vergleich zum Wildtyp (WT) vermehrte spontane Ca^{2+} -Oszillationen festgestellt werden. *In vitro* war die Migration der $\beta 3$ -defizienten Astrozyten reduziert, während *in vivo* die Astrogliose der Astrozyten vermehrt war.

Zusammenfassend konnte in kortikalen Astrozyten gezeigt werden, dass erstens $\text{CaV}\beta 3$ eine CaV -unabhängige Funktion aufweist, zweitens $\text{CaV}\beta 2$ und $\text{CaV}\beta 3$ an der Migration *in vitro* beteiligt sind und drittens $\text{CaV}\beta 3$ in der kortikalen Wundheilung *in vivo* eine Rolle spielt.

Summary

Role of TRPC3 und beta-subunits of voltage activated calcium-channels in cortical astrocytes.

Calcium is an important transmitter which is involved in the regulation of various physiological processes, like proliferation and migration of cells. Thus, calcium is also involved in the process of wound healing. Ion channels like transient receptor potential (TRP) channels and voltage-activated calcium channels (CaVs) can influence the cytoplasmic calcium concentration. Transcripts of TRPC1, TRPC3 and TRPC4 as well as of beta-subunits of CaV channels have been detected in cortical astrocytes.

In the present work, the TRPC4-agonist Englerin A (EgA) induced an increase in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration in cortical astrocytes, indicating functional expression of TRPC4. In the absence of *Trpc1* an augmented EgA-induced cytoplasmic Ca^{2+} signal was measured, suggesting an inhibitory role of TRPC1 in heterotetrameric TRPC1/TRPC4 channels.

Furthermore, the present study revealed an increased migration of cortical astrocytes isolated from "TRPC3 gain of function" moonwalker (MWK) mice as compared to astrocytes isolated from the cortex of wild type (WT) mice. This supports the theory that TRPC3 induced Ca^{2+} entry contributes to the migration of cortical astrocytes. Proliferation of cortical astrocytes is also linked to TRPC3-mediated Ca^{2+} -signals. In the present study, cortical astrocytes of TRPC3-deficient mice showed less proliferation as compared to WT astrocytes. However, an increased TRPC3-dependent cytoplasmic Ca^{2+} -entry, as described for TRPC1-deficient or MWK astrocytes, did not seem to increase astrocyte proliferation. After a brain injury, proliferation and migration of astrocytes play a major role in the processes of wound healing. Thus, in summary, the present study *in vitro* suggests, that TRPC3 plays an essential role in the wound healing process mediated by cortical astrocytes.

Voltage-activated calcium channels have also been described to impact cytoplasmic Ca^{2+} levels in cortical astrocytes. CaVs are composed of a pore-forming $\alpha 1$ -unit and the auxiliary subunits β , γ , and $\alpha 2\delta$, which are known to modify physiological characteristics of CaV-channels. In previous experiments, cortical astrocytes with $\text{CaV}\beta 2$ -deficiency showed a reduction of voltage-activated Ca^{2+} entry, while Ca^{2+} entry was not altered in cortical astrocytes with $\beta 3$ -deficiency.

In the present study, absence of $\beta 2$ lead to less migration of cultured cortical astrocytes as compared to astrocytes isolated from WT mice. However, no difference between $\beta 2$ -deficient and WT astrocytes was detected in proliferation. This suggests, that migration but not proliferation might dependent on Ca^{2+} entry of cortical astrocytes with contribution of $\beta 2$. $\beta 3$ -deficient astrocytes revealed increased spontaneous Ca^{2+} oscillations as compared to WT astrocytes. It could be shown that migration of $\text{CaV}\beta 3$ -deficient cortical astrocytes *in vitro* is reduced while astrogliosis *in vivo* is enhanced.

In conclusion, the results regarding cortical astrocytes show firstly, that $\text{CaV}\beta 3$ possess a CaV -independent function in Ca^{2+} signaling, secondly, that $\text{CaV}\beta 2$ und $\text{CaV}\beta 3$ have an influence on migration *in vitro* and thirdly, that $\text{CaV}\beta 3$ plays a role in the cortical wound healing process *in vivo*.

2 Einleitung

2.1 Astrozyten

Das Nervensystem ist ein kompliziertes funktionelles System des Körpers. Es wird das periphere Nervensystem von dem zentralen Nervensystem im Gehirn und Rückenmark unterschieden. Das zentrale Nervensystem setzt sich aus den Neuronen und den Gliazellen zusammen, zu denen Oligodendrozyten, Ependymzellen, Astrozyten und Mikroglia gehören (Trepel, 2008 4. Auflage). Der Anteil der Neurone am Nervengewebe beträgt etwa 10%, während die Gliazellen die restlichen 90% ausmachen (Nishiyama et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf Astrozyten, die eine der größten Fraktionen der Gliazellen darstellen (Jäkel and Dimou, 2017).

Der Name Astrozyt setzt sich zusammen aus dem griechischen Wort für Stern (astron) und dem lateinischen Wort für Zelle (cytus), welches seine Ursprünge in dem griechischen Wort kytos hat und zum ersten Mal 1895 von Michael von Lenhossek benutzt wurde (von Lenhossek, 1895). Astrozyten haben viele verschiedene Funktionen im Gehirn: Sie können durch Aufnahme von extrazellulärem K^+ das intrazelluläre Ionenmilieu beeinflussen. Astrozyten sind außerdem in der Lage die Erregbarkeit der Neuronen durch Aufnahme von Neurotransmittern wie Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA) zu beeinflussen. Sie umgeben mit ihren Fortsätzen die Blutgefäße des Gehirns und bilden so einen Teil der Blut-Hirn-Schranke. Zudem können sie den zerebralen Blutfluss beeinflussen und sind involviert in den Transfer von Nährstoffen und anderen Stoffwechselprodukten zwischen den Neuronen und dem Blut (Kimmelberg and Nedergaard, 2010). Nach Verletzungen des ZNS können Astrozyten in einen reaktiven Status übergehen. Dieser Status wird Astrogliose genannt und wird unter anderem durch Kalziumsignale vermittelt. Hierbei kommt es zu Veränderungen der Gen-Expression sowie vermehrter Proliferation, Hypertrophie und Migration der Astrozyten bis hin zur Entstehung einer Glianarbe (Silver and Miller, 2004; Sofroniew, 2009). Außerdem findet unter anderem eine vermehrte Expression des Gens des Astrozyten-spezifischen sauren Gliafaserproteins (GFAP) statt, welches daher als Marker reaktiver Astrozyten verwendet werden kann (Anderson et al., 2014). Astrogliose kann sowohl positive als auch negative Auswirkungen im Organismus haben. So wurde z.B. eine protektive Wirkung auf das Nervengewebe nach Verletzungen des Gehirns beschrieben

(Myer et al., 2006), aber auch eine Hemmung der Regeneration von Axonen (Silver and Miller, 2004).

2.2 Kalzium als intrazellulärer Botenstoff

Kalzium ist einer der wichtigsten intrazellulären Botenstoffe des Körpers. Mit Hilfe von Veränderungen der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration können viele verschiedene Prozesse im Körper reguliert oder moduliert werden, z.B. die Muskelkontraktion, Sekretion, Proliferation, Befruchtung und schließlich auch der kontrollierte Tod der Zelle (Apoptose) (Berridge et al., 1998). Die in den Zellen entstehenden Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentrationen können z.B. als Ca^{2+} -Oszillationen räumlich, zeitlich und in ihrer Amplitude variieren, so dass unterschiedliche Prozesse beeinflusst werden (Bootman et al., 2001). Der Einstrom von Kalziumionen ins Zytoplasma kann entweder aus dem extrazellulären Bereich über die Plasmamembran (PM) oder aus intrazellulären Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgen. Das geladene Kalziumion wird mit Hilfe von Ionenkanälen durch die jeweilige Membran geschleust. Hierbei dient als treibende Kraft der große Konzentrationsgradient zwischen extrazellulärem und zytoplasmatischem Kalzium ($\sim 20.000/1$) bzw. zwischen ER und Zytosol ($\sim 10.000/1$), wodurch es zu einem schnellen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen ins Zytoplasma nach Öffnung Ca^{2+} -permeabler Kanäle kommt (Case et al., 2007).

Ein wichtiger Signalweg, der zur Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration aus den intrazellulären Organellen beiträgt, wird durch Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) vermittelt. Der Entstehung von intrazellulärem IP_3 geht eine Signalkaskade voraus: So kommt es durch den Einfluss von Neurotransmittern oder Hormonen zur Aktivierung eines G_q -Proteins über einen Rezeptor der Zelle. Das aktivierte G_q -Protein initiiert dann die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), welches sich in der Plasmamembrane befindet, zu IP_3 und Diacylglycerin (DAG) durch die membranständige Phospholipase C (PLC). IP_3 ist nun in der Lage an IP_3 -Rezeptoren (IP_3R) in der Membran des ER zu binden, die dann durch ihre Aktivität als Kalziumkanäle für eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER sorgen. Der Kalziumspeicher des ER wird unter Verbrauch von ATP mit Hilfe von sarkoendoplasmatischen-Retikulum- Ca^{2+} -ATPasen (SERCA) wieder aufgefüllt. Eine geringe Ca^{2+} -Konzentration im ER kann von „stromal interaction molecules“ (STIM) Proteinen detektiert werden. Diese befinden sich in der Membran des ER und besitzen eine Ca^{2+} -Bindestelle in dessen Lumen. Ist diese Ca^{2+} -Bindestelle nicht besetzt lagern sich STIM Moleküle zu Clustern zusammen, die dann Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle (ORA1-3) in der

Plasmamembran aktivieren. Der so aktivierte Ca^{2+} -Einstrom wird Speicher-aktivierter Ca^{2+} -Einstrom (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE) genannt (Parekh, 2010).

In Astrozyten sind neben dem SOCE (Muller et al., 2014) weitere Kanäle beschrieben, die zu einem extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom führen können. Hierzu gehören Kationenkanäle, wie der α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) Rezeptor (Fan et al., 1999), N-methyl-D-aspartate (NMDA) Rezeptoren (Schipke et al., 2001), purinerge (P2X) Rezeptoren (James and Butt, 2002) und transient receptor potential (TRP) -Kanäle (Verkhatsky et al., 2014). Auch die Expression spezifischer Kalziumkanäle, wie spannungsaktivierte Kalziumkanäle (CaVs), konnte in Astrozyten nachgewiesen werden (Rubio et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von TRP Kanälen und CaVs in Astrozyten untersucht.

2.3 Transient receptor potential (TRP)-Kanäle

Unter TRP-Kanälen wird eine große Gruppe kationenpermeabler Ionenkanäle zusammengefasst. Die Beschreibung geht auf Untersuchungen von Cosens und Manning im Jahr 1969 zurück. Sie stellten fest, dass Photorezeptoren einer mutierten Population der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* auf einen Lichtreiz mit einem kurzen (transienten) Rezeptorpotential antworteten, während der zugehörige Wildtyp (WT) ein anhaltendes Rezeptorpotential aufwies (Cosens and Manning, 1969). 1989 gelang Montell und Rubin die Identifizierung des Gens, welches diese Mutation trägt und für den Phänotyp *transient receptor potential (TRP)* verantwortlich ist. Das Gen wurde nach diesem Phänotyp als „TRP“-Gen bezeichnet. Dieses Gen kodiert einen Kationenkanal, der für die Depolarisation der Photorezeptorzelle nach einem Lichtreiz verantwortlich ist (Montell and Rubin, 1989). Mittlerweile sind in der Maus 28 Gene bekannt, die Proteine kodieren, welche dem ursprünglich in *Drosophila* entdeckten TRP-Kanalprotein sehr ähnlich sind. TRP-Kanäle sind aber auch in anderen Lebewesen beschrieben worden, z.B. bei Menschen, Fischen und Würmern (Flockerzi, 2007). Die TRP-Kanäle in Säugetieren werden in 6 Unterfamilien eingeteilt: TRPC (classical oder canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPML (mucolipin), TRPP (polycystin) und TRPA1 (ankyrin-like with transmembrane domains protein 1) (Clapham et al., 2005) (Abbildung 1). Die 6 Unterfamilien der TRP-Kanäle verbindet, dass sie alle aus 6 Transmembrandomänen bestehen, wobei die Kanalpore zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne gebildet wird (Vannier et al., 1999). Ein einzelner TRP Kanal setzt sich aus 4 TRP-Proteinen zusammen. Ein solcher TRP Kanal kann entweder aus identischen TRP-Proteinen bestehen - der Kanal ist dann ein

Homotetramer - oder aus verschiedenen TRP-Proteinen zusammen gesetzt sein (Heterotetramer) (Hofmann et al., 2002). Die meisten TRP-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, dies bedeutet sie leiten K^+ , Na^+ und Ca^{2+} . Allerdings ist für die Kanäle TRPV5 und TRPV6 eine hohe Kalzium-Selektivität sowie für TRPM4 und TRPM5 eine Natrium-Selektivität beschrieben (Clapham et al., 2005). TRP-Kanäle sind nicht sehr spannungssensitiv. Sie werden durch verschiedene Mechanismen aktiviert und können durch unterschiedliche intrazelluläre Botenstoffe, wie z.B. PIP_2 oder DAG moduliert werden (Voets and Nilius, 2007). Einige Kanäle insbesondere TRPV1 und TRPM3 werden durch Wärme aktiviert, andere wie TRPM8 durch Kälte. TRPA1, TRPM2 werden durch oxidativen Stress und TRPM4 und TRPM5 durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert (Zhang et al., 2018). In den letzten Jahren wurden Zusammenhänge zwischen einigen Krankheitsbildern und TRP-Kanälen hergestellt. So ist eine Mutation in TRPM2-Kanälen mit bipolaren Krankheiten sowie Amyotropher Lateralsklerose assoziiert (Hermosura et al., 2008; McQuillin et al., 2006). Eine Punktmutation in TRPP2-Kanälen (PKD2) spielt eine Rolle für die Entstehung der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (Cornec-Le Gall et al., 2014) und die fokal segmentale Glomerulosklerose wird mit Mutationen des TRPC6-Gens in Verbindung gebracht (Reiser et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Familie der TRPC-Kanäle, insbesondere auf TRPC3, TRPC1 und TRPC4.

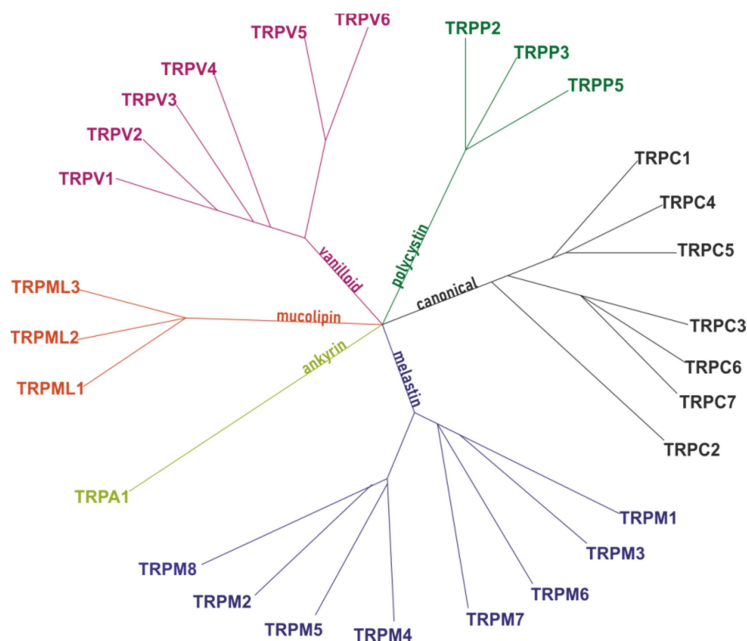


Abbildung 1: **Übersicht der TRP-Familie in Säugetieren.** Dargestellt sind die 6 TRP-Familien TRPM (blau), TRPC (schwarz), TRPV (lila), TRPML (orange), TRPA (hellgrün), TRPP (dunkelgrün) mit ihren jeweiligen Mitgliedern. Modifiziert nach Nilius und Owsianik (Nilius and Owsianik, 2011).

2.4 TRPC-Kanäle

Die „canonical“ TRPCs haben ihren Namen durch die hohe Übereinstimmung ihrer Sequenz mit dem vom *trp*-Gen von *Drosophila* kodierten Protein. Zu den TRPC-Kanalproteinen gehören sieben Vertreter, TRPC1 bis TRPC7. Diese werden nach Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen in 4 Gruppen aufgeteilt: C1, C2, C4/C5 sowie C3/C6/C7. Als tetramere Kanäle tragen alle zum Kalziumeinstrom in die Zellen bei (Clapham et al., 2001; Venkatachalam and Montell, 2007; Zhang et al., 2018). Wie die anderen TRP-Kanalproteine besitzen TRPC-Proteine 6 Transmembrandomänen mit dem Amino- (N) und Carboxy- (C) Terminus im intrazellulären Bereich (Abbildung 2 A) (Li et al., 2019). Es befinden sich mehrere Ankyrin-ähnliche Sequenzen am N-Terminus. Der C-Terminus enthält eine so genannte „TRP-Box“, einen hochkonservierten Sequenzabschnitt, und Bindungsstellen für Calmodulin und den IP₃-Rezeptor, die so genannte „CIRB Region“, welche Calmodulin und IP₃-Rezeptoren binden kann (Vazquez et al., 2004). TRPC-Kanäle werden nach Anschalten einer Signalkaskade durch Phospholipase C (PLC) aktiviert. Diese PLC wird ihrerseits durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert (Putney, 2004; Wu et al., 2010). Hierdurch können TRPC-Kanäle Einfluss auf unterschiedliche Prozesse in Zellen nehmen, z.B. auf Proliferation und Migration. Dies konnte z.B. für immortalisierte GnRH Neurone (Ariano et al., 2011) und kultivierte kortikale Astrozyten von Maus (Belkacemi, 2016) nachgewiesen werden. Wie auch andere TRP-Kanäle liegen TRPC-Kanäle entweder als Homotetramere (Abbildung 2B) oder als Heterotetramere (Abbildung 2C) vor. Auf einzelne Mitglieder der TRPC-Familie wird im Folgenden weiter eingegangen.

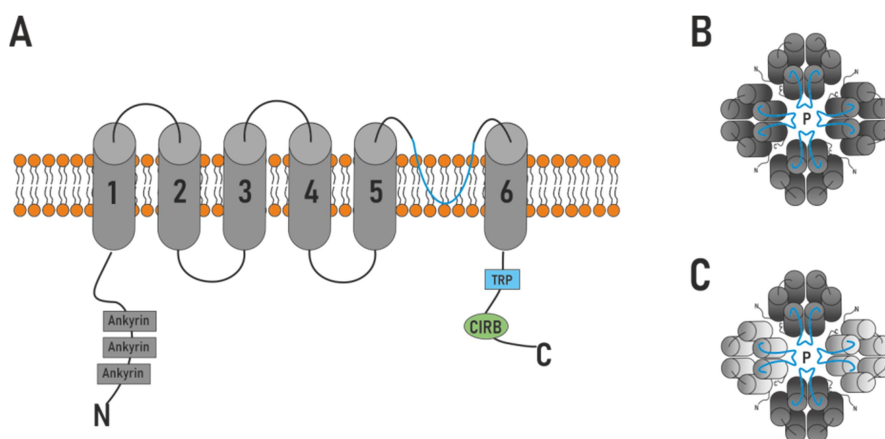


Abbildung 2: **TRPC-Kanal.** (A) TRPC Protein mit 6 Transmembrandomänen (1-6). Die porenbildende Region (blau) ist zwischen der Transmembrandomäne 5 und 6 lokalisiert. (B) Homotetramerer Kanal. (C) Heterotetramerer Kanal (z.B. TRPC1 (dunkelgrau) / TRPC4 (hellgrau)). (CIRB - Calmodulin und IP₃-Rezeptor Bindungsstelle; P - Pore)

2.4.1 TRPC1

1995 gelang es, die cDNA von TRPC1 als erste cDNA eines TRPC-Kanals zu klonieren (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1995). Seitdem konnten TRPC1-Transkripte in vielen verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Sie kommen zum Beispiel in der Niere, im Pankreas, in der Skelettmuskulatur, im Knochen, im Herzen und im Gehirn vor (Dietrich et al., 2014). TRPC1-Kanäle werden zudem mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht. So wird eine verminderte TRPC1-Expression in Zusammenhang mit der Parkinsonschen Erkrankung (Selvaraj et al., 2012) gebracht, während eine vermehrte Expression eine Rolle für die Entstehung der kardialen Hypertrophie spielt (Ohba et al., 2007). Unabhängig davon zeigen *Trpc1*^{-/-} (*Trpc1*-KO) Mäuse keine Auffälligkeiten und scheinen eine normale Lebenserwartung zu haben (Dietrich et al., 2014).

Es ist aktuell noch in Diskussion, ob TRPC1 in der Lage ist, homotetramere TRPC1 Kanäle in der Plasmamembran zu bilden, oder ob TRPC1 nur als Bestandteil von heterotetrameren Kanälen funktionell ist (Dietrich et al., 2014). So wurde TRPC1 als mögliche porenbildende Untereinheit von heterotetrameren Kanälen, wie TRPC1/TRPC5, TRPC1/TRPC4, TRPC1/TRPC3, TRPC1/TRPC6 und TRPC1/TRPC7, beschrieben (Storch et al., 2012; Strubing et al., 2001). Hierbei traten in Abhängigkeit vom Vorhandensein von TRPC1 Veränderungen der Kationenselektivität sowie der Stromspannungskurven von TRPC1/TRPC4 und TRPC1/TRPC5 Kanälen im Vergleich zu den homotetrameren TRPC4 und TRPC5 Kanälen auf. Den oben genannten heterotetrameren Kanälen ist gemein, dass TRPC1 einen negativ modulierenden Einfluss auf die Ca²⁺-Permeabilität zu haben scheint (Storch et al., 2012; Strubing et al., 2001). Zudem bildet TRPC1 möglicherweise auch heterotetramere Kanäle mit TRP Kanalproteinen, die nicht zur TRPC Unterfamilie gehören, wie z.B. mit TRPV6. Hier ist ebenfalls ein negativer Einfluss auf den Ca²⁺-Einstrom beschrieben (Schindl et al., 2012). Auch ein Einfluss von TRPC1 auf den SOCE durch mögliche Interaktion mit ORAI und STIM Proteinen wird diskutiert (Ambudkar et al., 2017), so dass zum Verständnis der vielfältigen Funktionen von TRPC1 noch weitere Forschung nötig ist.

2.4.2 TRPC2

TRPC2 kommt als Pseudogen beim Menschen vor, das heißt es wird kein funktionsfähiges Protein gebildet. In Nagetieren wird das Protein vor allem im vomeronasalen Organ exprimiert und ist in der Lage funktionelle Kanäle zu bilden, die durch DAG aktiviert werden können (Liman et al., 1999; Lucas et al., 2003). TRPC2 spielt eine Rolle in der Wahrnehmung von Pheromonen. So wurde in TRPC2-defizienten Mäusen ein verändertes

soziales und sexuelles Verhalten beschrieben: Fremde Mäuse wurden nicht mehr attackiert und es kam bei männlichen Mäusen zu einer erhöhten Anzahl von gleichgeschlechtlichen Paarungsversuchen. Jedoch kam es auch zur regulären Paarung mit weiblichen Mäusen (Leypold et al., 2002).

2.4.3 TRPC3

TRPC3 bildet zusammen mit TRPC6 und TRPC7 eine Untergruppe der TRPC-Kanäle, da sie in ihrer genetischen Sequenz zu ~75% übereinstimmen. Zusätzlich ist ihnen gemein, dass sie durch DAG aktiviert werden können (Hofmann et al., 1999). Neben homotetrameren Kanälen, scheint TRPC3 auch heterotetramere Kanäle, unter anderem zusammen mit TRPC1, zu bilden. Es konnten beide Kanalproteine koimmunpräzipitiert werden und TRPC1 hatte einen negativen Einfluss auf die Ca^{2+} -Permeabilität von TRPC1/TRPC3 Kanälen im Vergleich zu TRPC3 Kanälen (Belkacemi et al., 2017; Storch et al., 2012; Wang et al., 2016). Mit der Beteiligung von TRPC3 am SOCE in Spinalganglion-Neuronen wurde eine weitere Funktion von TRPC3 beschrieben (Alkhani et al., 2014).

TRPC3 wird unter anderem im kardiovaskulären System und im Gehirn und dort vor allem in den Purkinjezellen des Kleinhirns exprimiert (Tiapko and Groschner, 2018). Es spielt eine wichtige Rolle bei der motorischen Koordination. So kommt es bei TRPC3-KO Mäusen zu einem beeinträchtigten Gehverhalten (Hartmann et al., 2008). Ein ähnlich auffälliges Verhalten konnte in sogenannten „Moonwalker-Mäusen“ (MWK) beobachtet werden. Hier führt eine Punktmutation im *Trpc3*-Gen, bei der Alanin durch Threonin (T635A) ersetzt ist, zu einer „gain of function“ (GOF) Mutation, die zu einer erhöhten Öffnungsfrequenz des TRPC3 Kanales führt. Während homozygote TRPC3 T635A Mäuse nicht lebensfähig sind, konnte in heterozygoten TRPC3 T635A Mäusen eine gestörte motorische Koordination und ein Verlust von Purkinjezellen festgestellt werden (Becker, 2014; Becker et al., 2009). In Endothelzellen spielt TRPC3 außerdem eine Rolle in der Regulation der Vasodilatation und des Tonus von Mesenterialarterien (Senadheera et al., 2012). TRPC3 kann zudem einen Einfluss auf Proliferation und Migration von Zellen haben. So wird TRPC3 im Herzen durch Regulation von Proliferation und Differenzierung kardialer Fibroblasten mit der Entstehung von Vorhofflimmern in Verbindung gebracht (Harada et al., 2012). Des Weiteren wurde bei Blockade von TRPC3 Kanälen durch die Pyrazolverbindung Pyr3, die als spezifischer Inhibitor von TRPC3 beschrieben wurde (Kiyonaka et al., 2009), eine verminderte Proliferation und Migration von Melanomzellen beobachtet (Oda et al., 2017).

2.4.4 TRPC4

1996 erfolgte die erste Klonierung von TRPC4 cDNAs aus Zellen der Nebenniere (Philipp et al., 1996). Mittlerweile wurde die Expression des TRPC4 Gens in vielen verschiedenen Geweben beschrieben. Dieses Protein wird zum Beispiel in Zellen der Niere, des Skelettmuskels, des kardiovaskulären Systems, in Immunzellen sowie in Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert (Broker-Lai et al., 2017; Freichel et al., 2014). TRPC4 ist in der Lage homo- und heterotetramere Kationenkanäle zu bilden. In TRPC1/TRPC4 Kanälen hat TRPC1 einen negativen Einfluss auf die Ca^{2+} -Permeabilität von Kanälen (Storch et al., 2012). TRPC4 kann über Signalkaskaden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert werden. Kürzlich wurde beschrieben, dass dies vor allem durch gleichzeitige Aktivierung von $\text{G}_{i/o}$ und PLC geschieht (Thakur et al., 2016).

TRPC4-defiziente Mäuse wurden erstmals 2001 durch Freichel et al. beschrieben. Die Tiere waren lebensfähig, fortpflanzungsfähig und zeigten keine großen Auffälligkeiten (Freichel et al., 2001). Jedoch weisen sie ein weniger ängstliches Verhalten im Vergleich zum WT auf (Riccio et al., 2014). Durch Versuche mit TRPC1/TRPC4 doppel KO Mäusen konnte eine Beteiligung von TRPC1/TRPC4 an der Feineinstellung des Kalziumhaushaltes von Kardiomyozyten und an der Entwicklung von kardialer Hypertrophie bei Mäusen festgestellt werden (Camacho Londono et al., 2015). Zudem spielen heterotetramere TRPC1/TRPC4 Kanäle eine Rolle bei Krampfanfällen und Exzitotoxizität im zentralen Nervensystem (Phelan et al., 2012; Phelan et al., 2013). Außerdem wird eine Beteiligung von heterotetrameren TRPC1/TRPC4/TRPC5 Kanälen an Regulationsmechanismen des räumlichen Arbeitsgedächtnis vermutet (Broker-Lai et al., 2017). TRPC4 ist an der Proliferation von Zellen des Nierenzellkarzinoms beteiligt. Durch Aktivierung von TRPC4 Kanälen mit Hilfe von Englerin A konnte eine Verminderung des Tumorwachstums bewirkt werden. Englerin A fungiert hierbei als Agonist von TRPC4 und TRPC5 Kanälen (Akbulut et al., 2015; Carson et al., 2015).

2.4.5 TRPC5

TRPC5 und TRPC4 ähneln sich in ihrer Aminosäuresequenz zu etwa 65 % (Beck et al., 2013; Philipp et al., 1998) und bilden zusammen eine Untergruppe der TRPC-Kanäle. Das TRPC5 Gen wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert. Aus diesem Gewebe erfolgte 1998 die Klonierung der cDNA von TRPC5 (Philipp et al., 1998). TRPC5 bildet homotetramere Kanäle, kann aber auch heterotetramere Kanäle zusammen mit TRPC1 bilden (Hofmann et al., 2002). Die Aktivierung von TRPC5 erfolgt über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Außerdem wird TRPC5 auch durch Ca^{2+} selbst (Gross et al., 2009) sowie durch

druckinduzierte Dehnung von Membranen aktiviert (Gomis et al., 2008). TRPC5-Kanäle werden mit der Wahrnehmung von kalten Temperaturen im peripheren Nervensystem in Verbindung gebracht (Zimmermann et al., 2011). In gonadotropen Zellen der Hypophyse wurde kürzlich über eine Beteiligung von TRPC5 an der Signaltransduktion von GnRH berichtet. Hierbei trägt TRPC5 durch eigene Ca^{2+} -Permeabilität und durch Aktivierung von spannungsaktivierten Kalziumkanälen zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei (Beck et al., 2017). Außerdem spielt TRPC5 eine Rolle bei Krampfanfällen und Exzitotoxizität (Phelan et al., 2013). Wie auch TRPC4-KO Mäuse, zeigen TRPC5-KO Mäuse bis auf eine Verminderung der Ängstlichkeit (Riccio et al., 2009) keine Auffälligkeiten im Phänotyp.

2.4.6 TRPC6 und TRPC7

TRPC6 und TRPC7 bilden zusammen mit TRPC3 eine Untergruppe der TRPC Familie. Sie können alle durch DAG aktiviert werden und kommen in vielen Geweben vor. So konnte die Expression von TRPC7 in Organen wie Lunge, Herz, Auge, Hirn und Milz festgestellt werden. Das TRPC6 Gen wird z.B. in der Placenta, im Dünndarm, in Milz und Lunge exprimiert (Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999). TRPC6 spielt eine Rolle in der Differenzierung von Myofibroblasten und könnte dadurch zur Entstehung von Lungenfibrose beitragen (Hofmann et al., 2017). Zudem wird beschrieben, dass TRPC6 wichtig für die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion und somit für den Gasaustausch in den Alveolen der Lunge ist (Weissmann et al., 2006). TRPC7 gehört zu den am wenigsten erforschten Proteinen der TRPC Familie. In einer Studie wurde angenommen, dass TRPC7 durch Angiotensin II aktiviert wird und als Ca^{2+} -Kanal in den Prozess der Apoptose im Myokard involviert ist (Sato et al., 2007). Außerdem wurde eine wichtige Rolle von TRPC7 in der Auslösung von Krampfanfällen *in vitro* und *in vivo* bei Mäusen beschrieben (Phelan et al., 2014).

2.4.7 TRPCs in Astrozyten

In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von TRPC Kanälen in kortikalen Astrozyten untersucht werden. Die Expression von einzelnen TRPC Transkripten in Astrozyten wurde von einigen Forschungsgruppen beschrieben: TRPC1 (Akita and Okada, 2011; Malarkey et al., 2008), TRPC2 (Grimaldi et al., 2003; Miyano et al., 2010), TRPC3 (Akita and Okada, 2011; Grimaldi et al., 2003; Shirakawa et al., 2010), TRPC4 (Ronco et al., 2014; Song et al., 2005), TRPC5 (Malarkey et al., 2008; Miyano et al., 2010), TRPC6 (Beskina et al., 2007), TRPC7 (Miyano et al., 2010). In unserem Labor konnte die Arbeitsgruppe von Andreas Beck mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) Transkripte von

TRPC1, TRPC2, TRPC3 und TRPC4 in Astrozyten des Kortex nachweisen. TRPC5, TRPC6 und TRPC7 konnten hingegen nicht nachgewiesen werden (Belkacemi et al., 2017). Transkriptomanalysen von mit fluorescence-activated cell sorting (FACS) sortierten Astrozyten ergaben dagegen einen positiven Nachweis von mRNA für TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC6 und TRPC7 (Belkacemi, 2016). Transkripte von TRPC4 konnten nur in geringem Maß, solche von TRPC5 nicht nachgewiesen werden. Zudem gelang die Amplifikation der vollständigen cDNA für TRPC1 und TRPC3 aus kultivierten kortikalen Astrozyten von Maus (Belkacemi et al., 2017).

TRPC1 und TRPC3 haben Einfluss auf den Kalziumhaushalt von kortikalen Astrozyten. So wird ein Thrombin-induzierter TRPC3-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom in Astrozyten beschrieben (Shirakawa et al., 2010). Zudem sind TRPC1 und TRPC3 an Bradykinin-induzierten Ca^{2+} -Signalen in kortikalen Astrozyten von Maus beteiligt (Akita and Okada, 2011). Des Weiteren scheinen TRPC1 und TRPC3 heterotetramere Kanäle in kortikalen Astrozyten zu bilden. Hierbei wird eine hemmende Funktion von TRPC1 auf TRPC3 angenommen. So zeigten Astrozyten aus *Trpc1*^{-/-} Mäusen einen erhöhten OAG-induzierten Kalziumeinstrom im Vergleich zum WT, während Astrozyten aus *Trpc3*^{-/-} Mäusen einen erniedrigten Kalziumeinstrom aufwiesen. Zudem wiesen *Trpc1*^{-/-} Astrozyten *in vitro* eine erhöhte Migration und *Trpc3*^{-/-} Astrozyten eine verminderte Migration im Vergleich zum WT auf (Belkacemi et al., 2017).

Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden schon früh mit Proliferation in Verbindung gebracht (Balk, 1971; Durham and Walton, 1982). Daher stellte sich die Frage, ob TRPC1 und TRPC3 auch einen Einfluss auf die Proliferation von kortikalen Astrozyten haben. Des Weiteren zeigten aus MWK Mäusen (heterozygote TRPC3 T653A (gain of function) Mäuse, siehe 2.4.3) isolierte Astrozyten eine höhere basale Ca^{2+} -Konzentration sowie einen erhöhten Kalziumeinstrom nach Zugabe von extrazellulärem Kalzium (Belkacemi et al., 2017).

2.5 Spannungsaktivierte Kalziumkanäle (CaVs)

Spannungsaktivierte Kalziumkanäle sind in der Plasmamembran (PM) lokalisierte Ca^{2+} -selektive Ionenkanäle. Sie werden über eine Depolarisation der PM aktiviert und vermitteln einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Sie sind an vielen zellulären Prozessen wie z.B. der Muskelkontraktion, der Exozytose von Transmittern und der Expression von Genen beteiligt (Catterall et al., 2005). CaVs werden nach der für die Öffnung benötigten Depolarisation des Membranpotentials in low-voltage-activated (LVA) (ab ~ -60 mV) und high-voltage-activated

(HVA) (ab ~ -20 mV) Kanäle unterteilt (Bean, 1985). Die letzteren beinhalten die L-, N-, P/Q und R-Typ Kanäle, während die LVA Kanäle den T-Typ repräsentieren. Die verschiedenen Kanaltypen können durch ihre Spannungsabhängigkeit (HVA oder LVA) und ihre Pharmakologie unterschieden werden. Der L-Typ Kanal unterliegt einem lang anhaltenden Ca^{2+} -Einstrom („long lasting“) bei langsamer spannungsabhängiger Inaktivierung und kann durch Dihydropyridine, Phenylalkylamine sowie Benzodiazepine blockiert werden. N-Typ Kanäle können durch das Gift der Kegelschnecke ω -conotoxin GVIA (Catterall et al., 2005; McCleskey et al., 1987; Tsien et al., 1988) und P/Q-Typ Kanäle durch aus Trichternetzspinnen gewonnenem ω -Agatoxin inhibiert werden (Adams et al., 1993; Catterall et al., 2005). Das Peptid SNX-482, welches aus Vogelspinnen der Gattung *Hysteroocrates Gigas* gewonnen wird, ist in der Lage R-Typ Kanäle zu blockieren (Newcomb et al., 1998). Als einziger Vertreter der LVA-Kanäle, weist der T-Typ Kanal, neben der Aktivierung bei geringer Membrandepolarisation, ein transientes Öffnungsverhalten auf (Nowycky et al., 1985). Ein wirklich spezifischer T-Typ Blocker konnte bisher nicht identifiziert werden (Catterall, 2011). Eine weitere Unterteilung der CaVs erfolgt nach der jeweiligen $\alpha 1$ -Untereinheit (siehe 2.5.1). Sie ist die porenbildende, ionenleitende Untereinheit und ist in der Lage alleine LVA-Kalziumkanäle zu bilden. HVA-Kalziumkanäle benötigen zusätzlich die Untereinheiten β , γ , und $\alpha 2\delta$ (Abbildung 3) (Catterall et al., 2005). Die zusätzlichen Untereinheiten sorgen dafür, dass die $\alpha 1$ -Untereinheit in die Plasmamembran inseriert wird und sie beeinflussen die Eigenschaften der HVA-Kanäle (Hofmann et al., 1994).

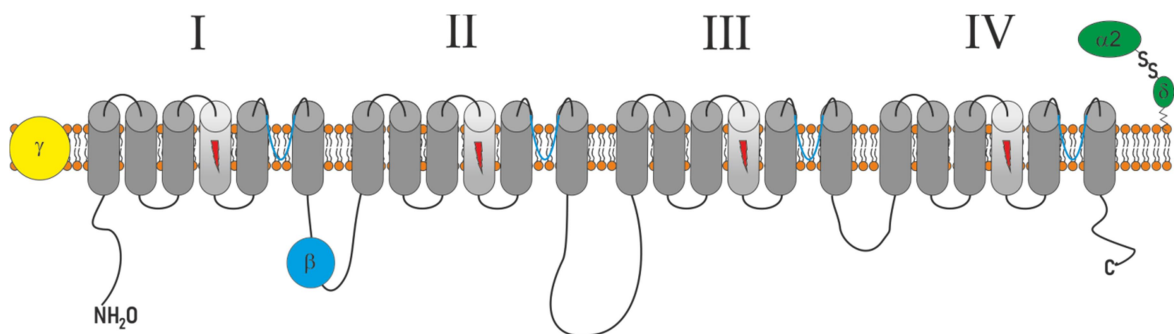


Abbildung 3: **Spannungsaktivierter Kalziumkanal.** Dargestellt sind die verschiedenen Untereinheiten eines spannungsaktivierten Kalziumkanals (CaV). CaV $\alpha 1$ (grau) besteht aus 4 Domänen (I-IV), die jeweils 6 Transmembransegmente besitzen. Der Spannungssensor befindet sich in den Transmembransegmenten 4 (roter Blitz). Die Pore wird von den 5. und 6. Segmenten gebildet (blau). CaV β (blau) bindet an die intrazelluläre Schleife zwischen der 1. und 2. Domäne, CaV $\alpha 2\delta$ (grün) ist extrazellulär über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Plasmamembran verankert und CaV γ (gelb) ist in der Plasmamembran lokalisiert.

2.5.1 α 1-Untereinheit

Die α 1-Untereinheit ist die ionenleitende Untereinheit der CaVs. Sie bildet die Pore und den Spannungssensor des Kanals. Auch die Regulierung und Modifikation durch Botenstoffe oder Kanalblocker findet an Bindungsstellen der α 1-Untereinheit statt. Sie besitzt vier Domänen, die jeweils aus 6 Transmembransegmenten bestehen (S1-S6) (Abbildung 3). Der Spannungssensor ist im vierten Transmembransegment enthalten, während die Pore von den fünften und sechsten Segmenten gebildet wird (Catterall et al., 2005). Seit der Aufreinigung des Kanalproteins und der ersten Klonierung der cDNA aus dem Skelettmuskel von Kaninchen (Flockerzi et al., 1986; Tanabe et al., 1987), sind bis heute 10 Gene beschrieben, die α 1-Untereinheiten in Säugetieren kodieren. Die erste klonierte α 1-Untereinheit wurde zunächst als α 1S (Skelettmuskel) beschrieben. Die Benennung neu identifizierter α 1-Untereinheiten erfolgte nach dem Alphabet (α 1A- α 1I) (Birnbaumer et al., 1994). Eine neue Namensgebung wurde durch Ertel (2000) vorgeschlagen. Hierbei entstanden drei Gruppen (CaV1-3), in denen α 1-Untereinheiten mit ähnlicher Aminosäuresequenz (~80% Übereinstimmung) zusammengefasst wurden. Innerhalb der Gruppe erfolgte die Durchnummerierung der α 1-Untereinheiten nach der Reihenfolge der Identifizierung (Abbildung 4). So umfasst die Gruppe CaV1 die Untereinheiten CaV1.1 (α 1S), CaV1.2 (α 1C), CaV1.3 (α 1D) und CaV1.4 (α 1F). Sie werden alle den L-Typ Kanälen zugeordnet. Die zweite Gruppe CaV2 enthält CaV2.1 (α 1A), CaV2.2 (α 1B) und CaV2.3 (α 1E) und umfasst P/Q-, N- und R-Typ Kanäle. Die dritte Gruppe setzt sich zusammen aus CaV3.1 (α 1G), CaV3.2 (α 1H) und CaV3.3 (α 1I), die allesamt T-Typ Kanäle bilden (Ertel et al., 2000). CaVs haben einen hohen Stellenwert in der Medizin. So werden die L-Typ Ca^{2+} -Kanal Blocker Amlodipin (ein Dihydropyridin) und Verapamil (ein Phenylalkylamin) unter anderem in der Therapie der arteriellen Hypertonie eingesetzt. Verapamil stellt zusätzlich eine Option der Therapie der AV-Knoten-Reentrytachykardie dar (Goy and Fromer, 1991). Eine „gain of function“ Mutation des CaV2.1 Kanals wird mit dem Syndrom der familiären hemiplegischen Migräne in Verbindung gebracht (Vecchia et al., 2015). Zudem spielen Mutationen des für CaV3.2 kodierenden Gens eine Rolle für die Entstehung der idiopathischen generalisierten Epilepsie (Heron et al., 2007).

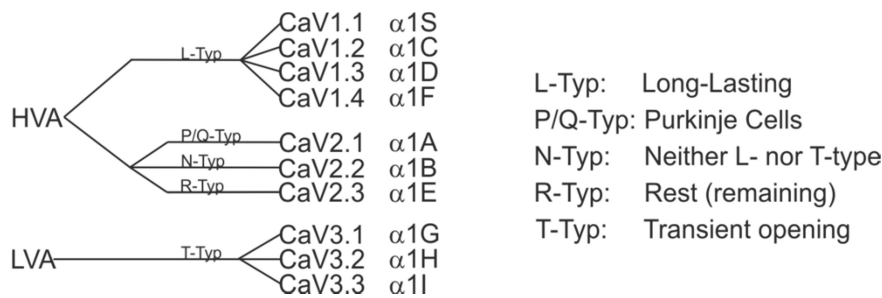


Abbildung 4: Einteilung der CaV-Kanäle.

2.5.2 β -Untereinheiten

Die Klonierung der ersten β -Untereinheit (CaV β) erfolgte 1989 aus Skelettmuskulatur (Ruth et al., 1989). Es folgten Klonierungen der β -Untereinheiten $\beta 2 - \beta 4$, so dass heutzutage vier für β -Untereinheiten kodierende Gene (*Cacnb1 - Cacnb4*) bekannt sind. Die β -Untereinheiten befinden sich im Zytoplasma und binden an die intrazelluläre Schleife zwischen der 1, und 2. Domäne der HVA-Kanäle (Abbildung 3) (Pragnell et al., 1994). Sie sind in der Lage physiologischen Eigenschaften der HVA-Kanäle, wie Öffnungswahrscheinlichkeit oder Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik, zu modulieren. Zudem können sie den Transport von CaV1 und CaV2 Untereinheiten zur Plasmamembran erhöhen (Dolphin, 2006). β -Untereinheiten sind nicht nur an der Regulation von CaVs beteiligt, sondern können auch frei im Zytoplasma mit Proteinen interagieren und haben Einfluss auf die Gentranskription (Rima et al., 2016). So ist z.B. CaV $\beta 1$ in der Genexpression von muskulären Vorläuferzellen involviert (Taylor et al., 2014). Das Vorkommen von CaV $\beta 1$ Transkripten konnte unter anderem in Hirn, Milz, Herz und Skelettmuskel nachgewiesen werden (Powers et al., 1992). CaV $\beta 1$ -KO Mäuse sind nicht lebensfähig und versterben nach der Geburt an Asphyxie (Gregg et al., 1996).

Auch CaV $\beta 2$ -KO Mäuse sind nicht lebensfähig. Sie weisen in ihrer embryonalen Entwicklung einen reduzierten L-Typ Kalziumeinstrom in Kardiomyozyten auf und versterben an Herzversagen (Weissgerber et al., 2006). Ein Überleben von CaV $\beta 2$ -KO Mäusen konnte durch transgene Expression von CaV $\beta 2$ in Kardiomyozyten erzielt werden. Tiere der hierdurch entstandenen Linie wiesen eine $\beta 2$ -Defizienz aller Zellen mit Ausnahme der Kardiomyozyten auf und wurden daher als „extracardiomyozyt“ $\beta 2$ -KO Mäuse (ecm $\beta 2$ -KO) bezeichnet (Katiyar et al., 2015). CaV $\beta 2$ (*Cacnb2*) konnte mit verschiedenen Erkrankungen, z.B. Depression, Schizophrenie, plötzlichem Herztod und Bluthochdruck in Verbindung gebracht werden (Soldatov, 2015).

Ein erhöhter Blutdruck konnte auch bei CaV β 3-KO Mäusen festgestellt werden, nachdem sie eine hoch salzhaltige Diät erhalten hatten (Murakami et al., 2000). CaV β 3-KO Mäuse zeigen einen unauffälligen Phänotyp. Sie weisen jedoch eine gesteigerte Aggressivität, eine Verminderung der Ängstlichkeit sowie eine reduzierte Schmerzwahrnehmung bei durch Entzündung verursachten Schmerzen auf. Diese Veränderungen werden durch eine reduzierte Expression von N-Typ Kanälen erklärt (Murakami et al., 2002; Murakami et al., 2007). Zudem ist eine Verminderung der Aktivität von N-Typ und L-Typ Kalziumkanälen bei Mäusen mit β 3-Defizienz beschrieben (Namkung et al., 1998). Neben der Modulation der CaVs, werden für die β 3-Untereinheit auch von den CaVs unabhängige Funktionen in der Zelle diskutiert. So wird vermutet, dass CaV β 3 die Aktivität des N-methyl-d-aspartat Rezeptors (NMDAR) im Hippocampus negativ reguliert (Jeon et al., 2008). Berggren et al. konnten in Pankreaszellen von β 3-KO Mäusen eine gesteigerte Insulinsekretion feststellen. Diese wurde auf eine erhöhte Frequenz von Glukose-induzierten Ca²⁺-Oszillationen sowie auf eine vermehrte Bildung von IP₃, gefolgt von einem erhöhten IP₃-induzierten Kalziumausstrom aus dem ER, zurückgeführt (Berggren et al., 2004). Dagegen zeigten Belkacemi et al., dass die β 3-Untereinheit direkt den IP₃-induzierten Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER hemmt (Belkacemi et al., 2018).

Eine spontan aufgetretene Mutation des für CaV β 4 kodierenden Gens führte zur β 4-KO (lethargic (lh/lh)) Maus. Diese weist ein reduziertes Körpergewicht, eine erhöhte Sterblichkeit sowie Ataxie und Krampfanfälle auf (Burgess et al., 1997). Auch beim Menschen wird ein Zusammenhang von *Cacnb4* Mutationen und Krampfanfällen angenommen. So werden z.B. durch die R468Q-*Cacnb4* Mutation veränderte CaV2.1 Ionenströme mit der schweren myoklonischen Epilepsie im Kindesalter in Verbindung gebracht (Ohmori et al., 2008).

2.5.3 α 2 δ und γ Untereinheiten

Bisher konnten vier CaV α 2 δ (1-4) identifiziert werden. Diese werden jeweils aus vier unterschiedlichen Genen (*Cacna2d1* – *Cacna2d4*) kodiert (Dolphin, 2013). Das extrazelluläre α 2-Protein ist über Disulfidbrücken mit dem δ -Protein verbunden, welches über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Plasmamembran verankert ist (Abbildung 3) (Davies et al., 2010). CaV α 2 δ Untereinheiten können ebenfalls die Eigenschaften von CaVs über Protein-Protein Interaktionen modulieren. Ihnen wird eine Rolle in der Stabilisierung des Kanals in der Plasmamembran zugeschrieben. Zudem sind CaV α 2 δ in der Lage den Ca²⁺-Einstrom von CaV α /CaV β Komplexen zu erhöhen sowie deren Ionendurchlässigkeit zu beeinflussen (Hofmann et al., 2015). Außerdem wird eine Beteiligung von CaV α 2 δ an dem

Transport von $\text{CaV}\alpha 1$ zur Plasmamembran angenommen (Dolphin, 2013). In „Ducky“-Mäusen, die einen Verlust der $\alpha 2\delta 2$ -Untereinheit durch eine Mutation im dafür kodierenden Gen aufweisen, konnte ein verringerter Kalziumeinstrom in Purkinjezellen festgestellt werden. Die Mäuse zeigen phänotypisch Ataxie und Krampfanfälle (Barclay et al., 2001). Mutationen im *Cacna2d4* Gen werden mit einer autosomal rezessiven Stäbchen Dystrophie in Verbindung gebracht (Wycisk et al., 2006). In diesem Zusammenhang konnten in $\text{CaV}\alpha 2\delta 4$ -KO Mäusen eine verminderte präsynaptische Dichte von $\text{CaV}1.4$ Kanälen sowie Störungen der strukturellen Organisation von Synapsen in Photorezeptorzellen festgestellt werden (Kerov et al., 2018). Es wird angenommen, dass die $\alpha 2\delta$ -Untereinheiten ebenfalls CaV unabhängige Funktionen wie $\beta 3$ (siehe 2.5.2) aufweisen. So kann die $\alpha 2\delta 1$ -Untereinheit Pregabalin binden und spielt eine Rolle in der Behandlung des neuropathischen Schmerzes. Eine Mutation von $\text{CaV}\alpha 2\delta 1$ führt über eine Verringerung der Bindungsaffinität von Pregabalin im Gehirn und im Rückenmark zu einem Verlust dessen analgetischer Wirksamkeit (Field et al., 2006). Weiter wird $\text{CaV}\alpha 2\delta 3$ eine Rolle in der synaptischen Morphogenese (Kurshan et al., 2009) und bei Kontakten zwischen Prä- und Postsynapse (Fell et al., 2016) zugeschrieben.

Es sind zurzeit 8 verschiedene Gene bekannt, die für γ -Untereinheiten bzw. $\gamma 1$ -ähnliche Proteine kodieren. Hierbei wird $\gamma 1$ als Untereinheit der CaVs angesehen (Hofmann et al., 2015). So konnte z.B. in $\gamma 1$ -KO Mäusen eine veränderte Inaktivierung von L-Typ Kalziumströmen festgestellt werden (Freise et al., 2000; Ursu et al., 2004). Den meisten übrigen Untereinheiten wird eine Rolle als transmembrane α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-Rezeptor regulatorische Proteine (TARP) zugeschrieben, in der sie unter anderem an dem Transport zur Plasmamembran von AMPA Rezeptoren beteiligt sind (Straub and Tomita, 2012).

2.5.4 CaVs in Astrozyten

Spannungsaktivierte Kalziumkanäle wurden vornehmlich den erregbaren Zellen wie Neuronen und Muskelzellen zugeschrieben. Obwohl Astrozyten als nicht erregbare Zellen gelten, gibt es zahlreiche Hinweise auf die Expression von CaV Untereinheiten. So wurde die Expression verschiedener α -Untereinheiten, wie $\text{CaV}1.2$, $\text{CaV}2.2$ oder $\text{CaV}3.1$ in Astrozyten festgestellt (Belkacemi, 2016; D'Ascenzo et al., 2004; Latour et al., 2003). Einige wenige Arbeiten berichten über die funktionelle Anwesenheit von spannungsaktivierten Kalziumkanälen in Gliazellen (Burgos et al., 2007; D'Ascenzo et al., 2004; MacVicar, 1984; MacVicar and Tse, 1988). Belkacemi (2016) konnte in kortikalen Astrozyten durch Patch

Clamp Versuche *in vitro* eine Reduktion der Amplitude von L-Typ Kanälen in β 2-KO Mäusen messen, während keine Veränderung im β 3-KO zu detektieren war (Belkacemi, 2016). Cheli et al. (2016) konnten zeigen, dass durch L-Typ Kalziumkanäle vermittelte Kalziumveränderungen in Astrozyten eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen, wie der Proliferation und Migration, spielen (Cheli et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Auswirkungen von β -Untereinheiten auf die Migration und Proliferation von kortikalen Astrozyten untersucht.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die Rolle von TRPC3, TRPC1- und β -Untereinheiten von spannungsabhängigen Kalziumkanälen in kortikalen Astrozyten weiterführend zu untersuchen. Hierbei ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Haben TRPC1 und TRPC3 Einfluss auf die Proliferation von kortikalen Astrozyten *in vitro*?
- Nimmt die „gain of function“ Mutation des TRPC3 Kanals der MWK-Mäuse Einfluss auf Proliferation und Migration in kortikalen Astrozyten *in vitro*?
- Hat TRPC4 Einfluss auf den Kalziumhaushalt kortikaler Astrozyten?
- Nimmt CaV β 3 Einfluss auf den zytosolischen Ca²⁺-Haushalt kortikaler Astrozyten?
- Haben CaV β 2 und CaV β 3 Einfluss auf die Proliferation und Migration kortikaler Astrozyten *in vivo* und *in vitro*?

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Gebogene Pinzette	Fine Science Tools
Micro-Federschere	Fine Science Tools
50 ml Falconröhrchen	Falcon
10 ml Spritze	B. Braun
20 G Nadel	B. Braun
Falcon Filters (40 µm)	Falcon
75 cm ² Zellkulturflaschen	BD (Becton Dickinson), Falcon
25 cm ² Zellkulturflasche	BD (Becton Dickinson), Falcon
Deckgläser (ø 12 mm)	Thermo
Deckgläser (ø 25mm)	Orsatec
6-Well-Platte	Falcon
24-Well-Platte	Falcon
96-Well-Platte	Falcon
Pipettenspitze	Sarstedt
Mikropapier	VWR

3.2 Chemikalien und Lösungen

3.2.1 Chemikalien

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Kalziumchlorid-Dihydrat (AppliChem)
CellTiter 96®	CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega)
DAPI	1 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Sigma)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco)
EgA,	Englerin A (Roth)
Eindeck-Medium	Vectashield Vector
Eselserum	Jackson ImmunoResearch
FKS	Fetales Kälberserum (Gibco)

Fura-2AM	Invitrogen
Gewebekleber	Loctite
Glucose	D-(+)-Glucose wasserfrei (Roth)
GlutaMAX	Invitrogen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Roth)
KCl	Kaliumchlorid (Zentrales Chemiekalienlager, Universität des Saarlandes)
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat (AppliChem)
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Roth)
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Roth)
NaCl	Natriumchlorid (VWR Chemicals)
PBS	Phosphatgepufferter Salzlösung
Penicillin	Sigma
PFA	Paraformaldehyd (Sigma)
PLL	Poly-L-Lysin (Sigma)
Primärer Anti-GFAP Antikörpern eines Hasen	Dako
Sekundärer fluoreszierender Antikörper Anti-Rabbit Alexa Flour 555	Invitrogen
Streptomycin	Sigma
TritonX	Roth
Trypsin	Sigma

3.2.2 Lösungen

P-L-L Lösung: 0,1 mg poly-L-Lysin in 1 l PBS

Paraformaldehyd Lösung: 4 % Paraformaldehyd in PBS-Lösung

Zellmedium (DMEM) mit FKS:

Substanz	Zusammensetzung
FKS	10%
GlutaMAX	1%
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Zellmedium (DMEM) ohne FKS:

Substanz	Zusammensetzung
GlutaMAX	1%
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

2 mM Ca²⁺-Lösung für Kalzium Imaging Experimente:

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

PBS-Lösung:

Substanz	Konzentration
KCl	2,7
KH ₂ PO ₄	1,5
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,1
NaCl	137

3.2.3 Geräte

Zentrifuge	Heraeus® Megafuge®1.1r, Thermo Scientific
Inkubator	Binder
Fluoreszenz-Mikroskop	Axiovert 200M, Zeiss
Mikroskop-Kamera	AxioCam, Zeiss
Mikroskop (Migrations Assay)	Axiovert 40C, Zeiss
Vibratom	Leica
Mikroskop (Kalzium Imaging)	Axiovert S100, Zeiss
Monochromator	Polychrome V, TILL-Photonics
Mikroskop-Kamera (Kalzium Imaging)	Imago, TILL-Photonics

3.3 Maus-Linien

Für die Versuche zur Untersuchung der TRPC-Kanäle wurden *Trpc3*^{-/-} (Hartmann et al., 2008), *Trpc1*^{-/-} (Dietrich et al., 2007), *Trpc4*^{-/-} (Freichel et al., 2001) und heterozygote *Trpc3*^{T635A} Moonwalker-Mäuse (MWK) (Becker et al., 2009) benutzt. Die MWK-Mäuse wurden von Harwell Science and Innovation (Harwell, Oxfordshire, UK) erworben. Es erfolgte ein Transfer der Embryos in die Versuchstierhaltung des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie in Homburg. Die Experimente zu den CaVs wurden mit homozygoten Cavβ3-KO Mäusen (Murakami et al., 2002) und extracardiomyocyte β2-Defizienz (ecmβ2-KO) Mäusen (Weissgerber et al., 2006) durchgeführt. Als Kontrolle zu den Gen-defizienten Mäusen wurden Mäuse des jeweilig korrespondierenden Wildtyp (WT) Stammes verwendet (für *Trpc4*-KO, *Trpc3*-KO und Cavβ3-KO C57BL6/N Mäuse, für *Trpc1*-KO 129SvJ/C57Bl6/N Mäuse). Die Haltung der Mäuse erfolgte in der spezifisch-pathogenfreien (SPF) Versuchstierhaltung im Institut für Pharmakologie und Toxikologie in Homburg. Das Töten der Tiere und die Organentnahme wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und Genehmigung durch das Landesamt für Verbraucherschutz Saarbrücken sowie den geltenden Richtlinien der Universität des Saarlandes durchgeführt. Die *in vivo* Stichwunden Experimente (siehe 3.7) wurden von Dr. Thabet Belkacemi, ebenfalls in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und geltenden Richtlinien der Universität des Saarlandes durchgeführt. Hierzu lag ein vom saarländischen Landesamt für Verbraucherschutz genehmigter Tierversuchsantrag vor.

3.4 Isolierung von Astrozyten und Mikroglia aus dem Kortex des Gehirns von Maus und Kultivierung der isolierten Zellen

Zur Isolierung von Astrozyten und Mikroglia wurden Mäuse im Alter von 0 bis 3 Tagen durch Dekapitation mit Hilfe einer Schere getötet. Nach Desinfektion der Kopfhaut mit Ethanol wurde der Schädel an der Nase mit einer gebogenen Pinzette (Fine Science Tools) fixiert und entlang der Falx mittels Micro-Federschere (Fine Science Tools) eröffnet, um das Gehirn freizulegen. Das Gehirn wurde mit Hilfe einer gebogenen Pinzette entnommen und möglichst schnell in eine Petrischale (3,5 cm) überführt, welche mit kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) aufgefüllt wurde. Zur Sicherstellung einer präziseren Bearbeitung fanden alle folgenden Schritte unter einem Stereomikroskop unter 10-facher Vergrößerung statt. Die beiden Hirn-Hemisphären wurden entlang der Fissura longitudinalis Cerebri mit einer gebogenen Pinzette vorsichtig getrennt und das Kleinhirn entfernt. Um möglichst nur Astrozyten aus dem Kortex zu erhalten, erfolgte die vorsichtige Entfernung von Thalamus, Hippocampus und Amygdala. Zur Vermeidung einer Kontamination der später angelegten Astrozyten-Kultur mit Fibroblasten, wurden die Hirnhäute (Meningen) zusätzlich entfernt. Die Abfolge der Präparation ist in Abbildung 5 dargestellt. Die auf diese Weise erhaltenen Kortizes wurden in 20 ml Eis-gekühltem DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) ohne FKS (Fetales Kälberserum), versetzt mit 100 U/ml Penicillin (Sigma), 100 µg/ml Streptomycin (Sigma) und 1% GlutaMAX (Invitrogen), in einem 50 ml Falconröhrchen gesammelt. Um eine Kultur des gewonnenen Zellmaterials anlegen zu können, wurde das Medium vorsichtig entfernt und die Kortizes mit Hilfe von 5 ml Trypsin (5 g/l, Sigma) für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C angedaut. Im Folgenden wurde das Trypsin mit Hilfe von 10 ml DMEM, versetzt mit 10% FKS (Gibco), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1% GlutaMAX, inhibiert. Die Zellen wurden 5 min bei 200 x g und 25°C zentrifugiert (Heraeus® Megafuge®1.1r, Thermo Scientific) und anschließend der Flüssigkeitsüberstand entfernt und mit 10 ml DMEM ohne FKS aufgefüllt. Um isolierte Zellen zu erhalten, wurden die anverdauten Kortices in einer 10 ml Spritze (B. Braun) mit einer aufgesetzten 20 G Nadel (B. Braun) 10 mal hoch und runter pipettiert und anschließend mit Hilfe eines Falcon Filters (40 µm) in ein neues Falconröhrchen (50 ml) filtriert. Die Zellsuspension wurde danach 5 Minuten bei 200

x g und 25°C zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand entfernt. Im letzten Schritt wurden die Zellen mit DMEM mit 10% FKS, versetzt mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1% GlutaMAX, in eine Suspension gebracht und zu je drei Gehirnen in 75 cm² Zellkulturflaschen (BD Falcon), welche vorher mit poly-L-lysine (P-L-L) beschichtet wurden, ausplattiert. Die Zellen wurden in einem Inkubator (Binder) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die anfallenden toten Zellen und Zelltrümmer wurden durch einen Mediumwechsel am 2. bis 3. Tag entfernt. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Wechsel des Mediums pro Woche, bis eine Konfluenz erreicht war.

Eine Abweichung der Standardprozedur fand bei den MWK und den Cavβ2-defizienten Mäusen statt. Da hier die Genotypisierung der jeweiligen Maus erst nach der Präparation stattfinden konnte, wurde jede Maus separat präpariert und die gewonnenen Zellen separat kultiviert. Hierzu wurden folgende Schritte des Protokolls geändert: Es wurde zum Andauen der Zellen 1 ml Trypsin (s.o.) verwendet. Dieses wurde mit 3 ml DMEM mit 10% FKS, versetzt mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1% GlutaMAX, inhibiert. Im letzten Schritt wurde die Zellsuspension in einer 25 cm² Zellkulturflasche (BD Falcon) ausplattiert.

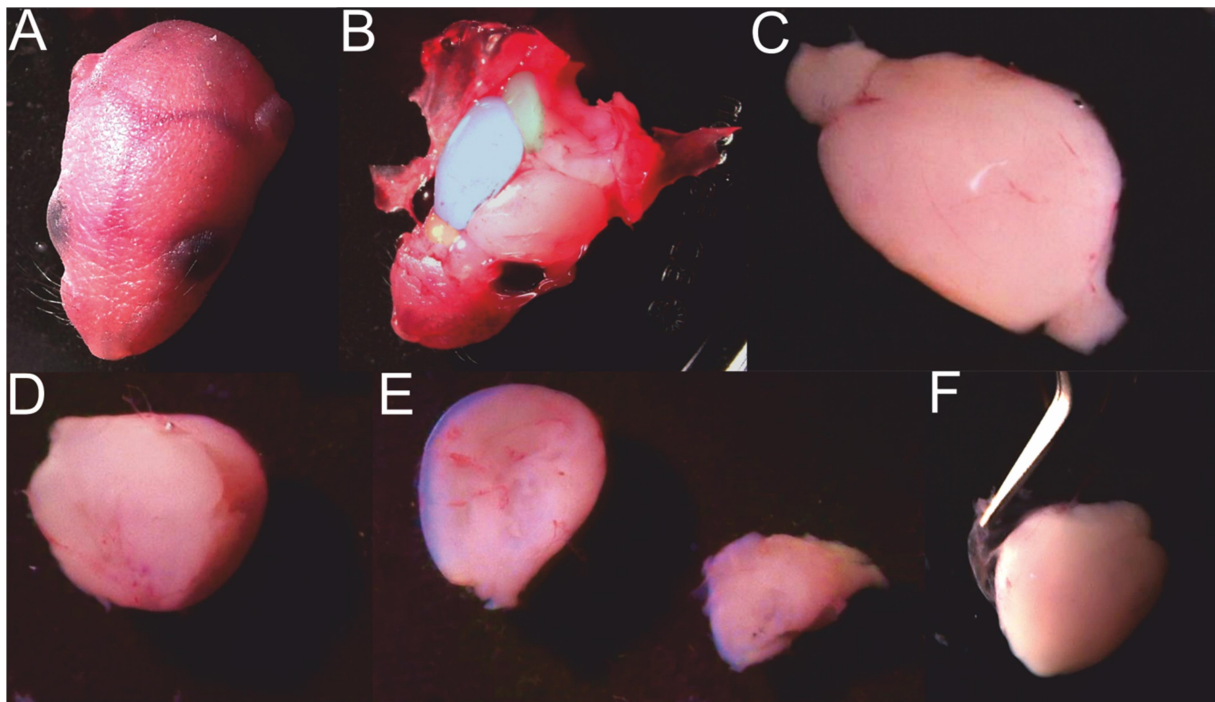


Abbildung 5: **Isolierung der Astrozyten und Mikroglia aus dem Kortex von Maus.** (A) Nicht präparierter, abgetrennter Kopf einer Maus. (B) Kopf einer Maus nach Entfernung der Haut und Eröffnung der Kalotte mit Blick auf die Kortizes, Bulbi Olfactorii und Cerebella. Zur Orientierung: rechter Kortex (blau), rechter Bulbus Olfactorius (gelb) und rechtes Cerebellum (grün). (C) Hirn-Hemisphäre von kranial. (D) Hirn-Hemisphäre in kaudaler Ansicht nach Entfernung des Bulbus Olfactorius und des Cerebellums. (E) ventrale Ansicht des Kortex (links) nach erfolgter Entfernung von Thalamus, Hippocampus und Amygdala (rechts). (F) Entfernung der Meningen mit einer Pinzette.

3.4.1 Ausplattierung der Astrozyten für die Versuche

Um für die nachfolgenden Versuche möglichst nur Astrozyten zu erhalten, wurden zuerst durch vorsichtiges Beklopfen der Zellkulturflasche zusätzliche auf den Astrozyten wachsende Mikroglia-Zellen gelöst und mit dem Medium zusammen entfernt. Die Astrozyten haften fester am Boden der Zellkulturflasche und werden hierbei nicht gelöst. Anschließend wurde mit PBS gewaschen, um das verbliebene Medium und FKS in der Zellkulturflasche auszuspülen. Um die Astrozyten in eine Suspension zu bringen, wurden die Zellen für 3-5 min mit 2 ml (25 cm² Zellkulturflasche) und 3 ml (75 cm² Zellkulturflasche) Trypsin (5 g/l) inkubiert und durch Beklopfen der Flaschen gelöst. Im Anschluss wurde das Trypsin durch Hinzugabe von 7 ml Medium mit FKS inhibiert und die vereinzelt Astrozyten für die jeweiligen Versuche auf Glasplättchen (Ca²⁺-Imaging und immunhistochemische Färbung) oder in 6- (Scratch Assay) beziehungsweise 96-Well-Platten (Proliferations Assay) ausplattiert.

3.4.2 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Färbung wurden zunächst Deckgläser (\varnothing 12 mm, Thermo Fisher Scientific) mit P-L-L beschichtet und in eine 24-Well-Platte transferiert. Anschließend wurden die Astrozyten auf die jeweiligen Deckgläser ausplattiert. Nachdem die Zellen annähernd Konfluenz erreichten, erfolgte eine 15-minütige Fixierung mit 4% Paraformaldehyd (PFA, Sigma) bei Raumtemperatur. Danach wurde das PFA durch fünfmalige Hinzugabe und Absaugen von PBS ausgewaschen. Es erfolgte die Zugabe einer PBS-Lösung bestehend aus 0,3% TritonX (Roth), um die Zellen zu permeabilisieren und von 5% Eselserum (Jackson ImmunoResearch), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Astrozyten wurden 60 Minuten in dieser Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend erfolgte fünfmaliges waschen mit PBS. Um die Astrozyten anzufärben, wurde im nächsten Schritt eine zweite Lösung bestehend aus primären Anti-GFAP Antikörpern von Kaninchen (Dako) in einer Konzentration von 1:500, 0,3%igem TritonX und 5%igem Eselserum hinzugegeben und für 24 Stunden bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fünfmalig mit Hilfe von PBS gewaschen. Es wurde eine dritte Lösung bestehend aus PBS, einem sekundären fluoreszierenden Antikörper anti-Rabbit Alexa Flour 555 (Invitrogen) in einer Konzentration von 1:500 und 1 $\mu\text{g/ml}$ 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma) zum Anfärben der Zellkerne hinzugegeben. Die Astrozyten wurden für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte fünfmaliges Waschen mit PBS. Die Deckgläser wurden mit Hilfe von Eindeck-Medium (Vectashield, Vector labs, VWR) auf einem Objektträger fixiert. Im Anschluss wurden Bilder der Zellen mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Filtern aufgenommen. Hierzu wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 200M, ZEISS) verwendet, das mit einer Kamera (AxioCam, ZEISS), einer Lichtquelle (HXP 120) und mit den entsprechenden Fluoreszenz-Filtern (DAPI, Cy3) ausgestattet war. Die Aufnahmen wurden mit der Software AxioVision Rel. 4.7 (Zeiss) durchgeführt.

3.4.3 Bestimmung des Anteils der Astrozyten

Der prozentuale Anteil der angefärbten Astrozyten wurde mit Hilfe des Programmes ImageJ (NIH) bestimmt. Zunächst wurden alle Zellkerne anhand der DAPI Färbung markiert und ausgezählt. Im nächsten Schritt wurden alle GFAP-positiven Zellen gezählt und anschließend deren relativer Anteil bestimmt.

3.5 Proliferations Assay

Mit Hilfe des Proliferations Assays wurde das Zellwachstum der Astrozyten über einen Zeitraum von 7 Tagen beurteilt. Hierzu wurde ein fotometrisches Verfahren mit Hilfe des CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega) verwendet. Dieses enthält eine Tetrazolium Komponente [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) und ein Elektronen koppelndes Reagent (phenazine ethosulfate; PES). PES kann durch metabolisch aktive Zellen im Zytoplasma oder auch an der Zelloberfläche reduziert werden. Das reduzierte PES reduziert wiederum im Zell-Nährmedium Tetrazolium zu Formazan (Abbildung 6). Dieses ist löslich im Zell-Nährmedium und absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 490 nm. Die Absorption des reduzierten Formazans verhält sich direkt proportional zu der Anzahl der lebenden Zellen und ist daher umso höher, umso mehr lebende Zellen vorhanden sind.

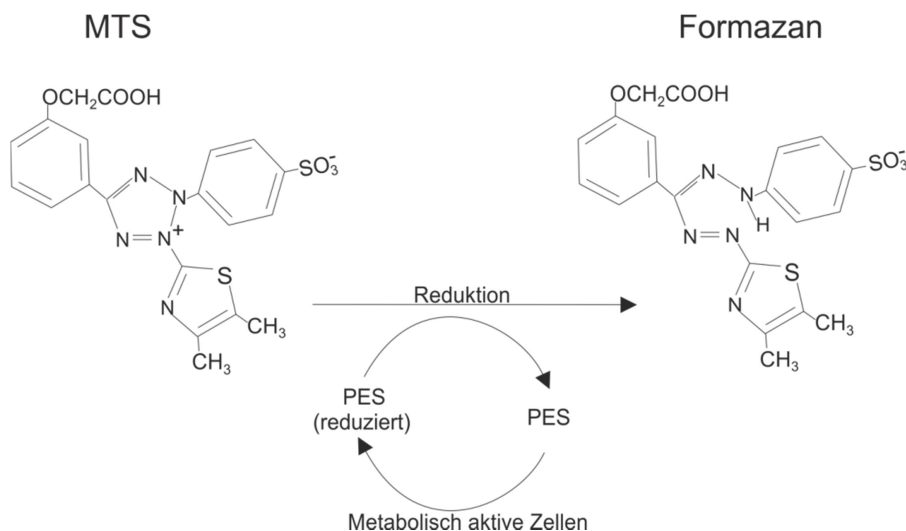


Abbildung 6: **Reduktion von MTS zu Formazan.** PES wird durch metabolisch aktive Zellen reduziert und ist dadurch in der Lage MTS zu dem löslichen Formazan zu reduzieren. Das entstandene Formazan absorbiert Licht der Wellenlänge von 490 nm und ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

Zur Durchführung des Proliferations Tests wurde eine 96-Well-Platte verwendet und nach folgendem Schema pipettiert (Abbildung 7):

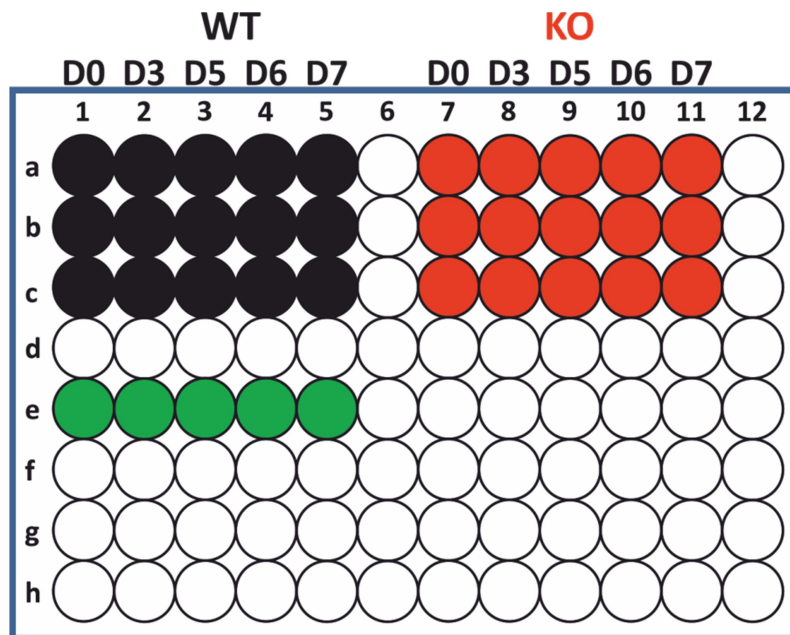


Abbildung 7: **Pipettierschema des Proliferationsversuchs.** Es wurden pro Genotyp je 3 Proben (a-c) für jeden Messtag (D0, D3, D5, D6, D7) ausplattiert: z.B. beim WT (schwarz) für Messtag 0 (D0) die Proben a1, b1, c1 und beim KO (rot) für Messtag 0 (D0) die Proben a7, b7, c7. Zusätzlich wurde als Kontrolle pro Messtag je 1 Well mit 10%igem FKS Nährmedium ohne Zellen angelegt (grün) (e 1-5).

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde eine Zellkonzentration von 5000 Zellen pro 100 µl 10% FKS Nährmedium eingestellt und mit einer Multikanalpipette in die jeweiligen Wells pipettiert. Hierzu wurde folgende Formel verwendet:

$$V_1 = \frac{V_2 \cdot c_2}{c_1}$$

V1: Volumen, welches aus der Zellkultur entnommen wird
 c1: Zellkonzentration in der Zellsuspension
 V2: Volumen 10% FKS Nährmedium
 c2: gewünschte Zellkonzentration ($\frac{5000 \text{ Zellen}}{100 \mu\text{l}}$)

In diesem Experiment wurden die Astrozyten mit veränderten Genotypen und die Astrozyten der Wildtyp-Kontrolle parallel auf der gleichen 96-Well-Platte ausplattiert, um für dieselben Ausgangsbedingungen zu sorgen. Zusätzlich erfolgte als Kontrolle die Ausplattierung von je einem Well mit 10% FKS Nährmedium ohne Zellen pro Messtag (Abbildung 7). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator (Binder) inkubiert. Die Messungen erfolgten jeweils an den Tagen: 0, 3, 5, 6, 7. Zur Messung wurden pro Well je 20 µl Cell-Titer 96® hinzugefügt und für 60 Minuten im Inkubator (Binder) inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm mit dem 96-Well-Plate-Reader (infinite M200 TECAN) ermittelt. Mit

dem Ziel nur die Absorption der Zellen zu erhalten, erfolgte die Subtraktion der Absorption des 10% FKS Nährmediums ohne Zellen (Hintergrundabsorption).

3.6 Scratch Assay

Der Scratch Assay diente dazu, die Migration der verschiedenen Genotypen der Astrozyten *in vitro* miteinander zu vergleichen. Hierzu wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausplattiert. Zunächst wurden die einzelnen Wells mit Poly-L-Lysinen beschichtet und mit Hilfe einer 20 G Nadel je zwei horizontale Orientierungslinien auf die Rückseite der Well-Platte eingeritzt. Mit dem Ziel die Migration der verschiedenen Genotypen, durch möglichst ähnliche Ausgangsbedingungen, besser vergleichen zu können, erfolgte pro Versuch eine Ausplattierung von je drei Wells pro Genotyp auf derselben 6-Well-Platte. Die Astrozyten wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ für 3-5 Tage inkubiert, bis sie eine Konfluenz erreichten. Anschließend wurde das 10% FKS-Medium durch absaugen entfernt. Mit einer 200 µl Pipettenspitze (Sarstedt) wurden pro Well je 2 Wunden erzeugt, indem mit der Pipettenspitze durch vertikales Ritzen zellfreie Flächen erzeugt wurden (Abbildung 8). In diese zellfreien Flächen erfolgte dann die später ausgewertete Migration der Astrozyten. Die entstandenen zerstörten Zellen und Zellinhalte wurden durch Hinzugabe und Absaugen von PBS entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Hinzugabe von 0% FKS-Medium und die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Es wurde 0% FKS-Medium verwendet, um die Proliferation, der Zellen durch die im FKS enthaltenen Wachstumsfaktoren möglichst gering zu halten und so hauptsächlich die Migration zu messen. Im weiteren Verlauf wurden je 4 Aufnahmen pro Well zu den Zeitpunkten: 0, 4, 8 und 24 Stunden getätigt. Hierzu wurde ein Mikroskop (Axiovert 40C, Zeiss), welches mit einer Kamera (AxioCam, Zeiss) ausgestattet war, benutzt. Um sicherzustellen, dass die Aufnahmen immer von dem gleichen Ausschnitt stammten, wurden zur Orientierung die Schnittlinien der erzeugten Wunden und der auf der Rückseite eingeritzten Orientierungslinien verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes Image J (NIH). Hierbei wurde die direkt nach der erzeugten Wunde (bei Stunde 0) entstandenen zellfreie Fläche ermittelt und als 100% festgelegt. Die durch Migration der einzelnen Zellen schrumpfende zellfreie Fläche wurde dann nach 4, 8, 24 Stunden gemessen. Die gemessenen Werte wurden auf die bei Stunde 0 ermittelte zellfreie Fläche normiert.

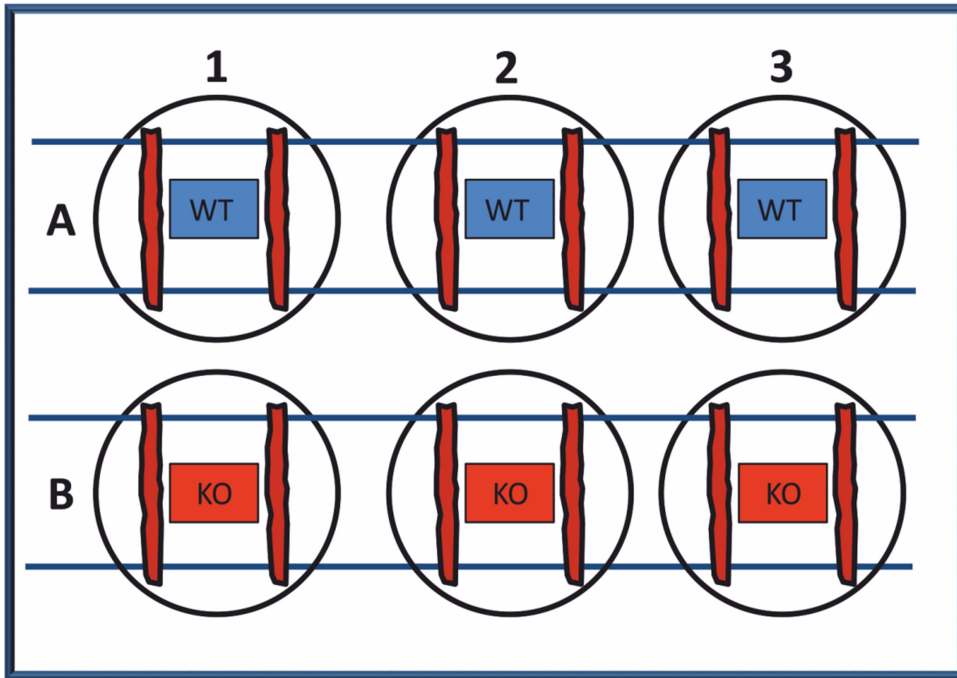


Abbildung 8: **Aufbau des Scratch Assays.** Es wurden pro Genotyp jeweils 3 Proben ausplattiert: A1-3 für den Wildtyp (WT) und B1-3 für den veränderten Genotyp (KO). Die 4 dunkelblauen, horizontalen Linien repräsentieren die auf der Rückseite der Platte eingeritzten Orientierungslinien. Die erzeugten zellfreien Flächen werden jeweils durch die zwei roten vertikalen Balken pro Well dargestellt.

3.7 Stichwunden Versuch (durchgeführt von Dr. Thabet Belkacemi)

Die Entwicklung von Astrogliose und Glianarben wurde mit Hilfe des Stichwunden Versuches näher untersucht (Saadoun et al., 2005). Die Experimente, für die eine Tierversuchsgenehmigung vorlag (AZ C1-2.4.2.2/16-2015), wurden an 8 Wochen alten Mäusen im Labor von Prof. Veit Flockerzi von Dr. Thabet Belkacemi durchgeführt. Zum Setzen einer gezielten Stichverletzung im Kortex der Mäuse erfolgte zunächst eine intraperitoneale Betäubung der Mäuse mit Ketamin (87 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (13 mg/kg Körpergewicht). Die Mäuse wurden bis zum Zeitpunkt des kompletten Verlustes des Zwischenzehenreflexes in ihren Käfigen behalten. Anschließend wurden die Mäuse auf ein stereotaktisches mit einer Heizplatte (35°C) ausgerüstetes Instrument transferiert und der Kopf mit 70% Ethanol desinfiziert. Im nächsten Schritt erfolgten ein 1 cm langer Schnitt entlang der Sagittalebene und die Entfernung der schädelbedeckenden Membran mittels Pinzette. Nach der Ausdünnung des Schädelknochens mit einem Bohrer, wurde in der rechten Hemisphäre, 2 mm neben der Sagittalnaht und 4 mm hinter dem Bulbus Olfactorius, mit einem 3 mm langen Skalpell eine 2 mm tiefe Wunde im Kortex erzeugt (Abbildung 9).

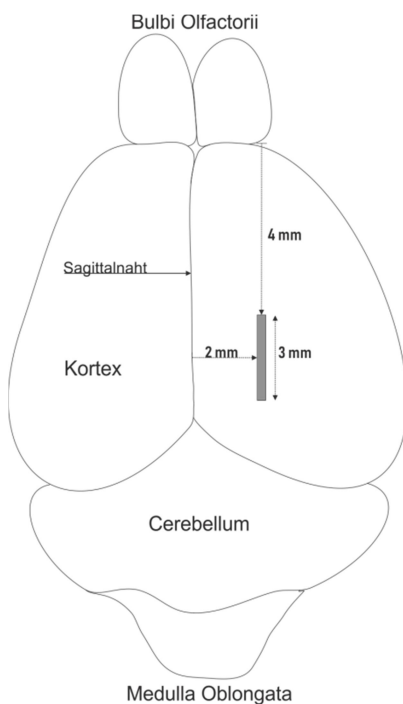


Abbildung 9: **Stichwunden Versuch.** Vereinfachte Darstellung eines Gehirns einer Maus mit Bulbi Olfactorii, Kortexes, Cerebellum und Medulla Oblongata. Die 3 mm lange und 2 mm tiefe Stichverletzung (grau) befindet sich 2 mm lateral der Sagittalnaht und 4 mm hinter dem rechten Bulbus Olfactorius im rechten Kortex.

Nach Reinigung und Hautnaht erhielten die Mäuse subkutan das Schmerzmittel Buprenorphin (0,05 mg/kg) und wurden bis zum Erwachen auf einer Wärmeplatte im Käfig gelagert. Danach erfolgte der Transfer in die Tierhaltung, in der sie für drei Tage überwacht wurden.

Zur Auswertung der kortikalen Wundheilung erfolgte nach 3 Tagen eine erneute intraperitoneale Anästhesie der Mäuse mit Ketamin (87 mg/kg Körpergewicht) und Xylazine (13 mg/kg Körpergewicht). Nach Verlust des Zwischenzehenreflexes wurden die Mäuse auf einer Platte fixiert. Der Thorax der Tiere wurde anschließend mit einer scharfen Schere eröffnet. Es erfolgte die Perfusion der Mäuse mit 30 ml PBS und 30 ml 4% PFA durch eine im linken Ventrikel platzierte 25 G Nadel und die Eröffnung des rechten Vorhofes. Im nächsten Schritt wurden die Gehirne der Mäuse entfernt und über Nacht in 4% PFA fixiert. Nach dem Waschen mit PBS, wurden die Gehirne mit einem Skalpell rostral und caudal auf den zerebralen Kortex reduziert, mit Hilfe von Gewebekleber (Loctite) auf einem Vibratom (Leica) fixiert und anschließend wurden 35 µm dicke coronale Schnitte der Wundregion angefertigt. Hieraus wurden je 4 Schnitte zur Immunhistochemie verwendet.

Es erfolgte die Inkubation der Schnitte in einer 48-Well-Platte mit einer Lösung bestehend aus 3% (v/v) TritonX (Roth) und 5% (v/v) Eselserum in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach dem Entfernen dieser Inkubations-Lösung, erfolgte eine erneute Inkubation mit einer Lösung bestehend aus 3% (v/v) TritonX (Roth), 5% (v/v) Eselserum und einem primären Hasen Anti-GFAP Antikörper (DAKO, 1:1000) in PBS bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimalig mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 1 Stunde mit dem sekundären Esel Anti-Hasen Alexa Fluor 555 Antikörper (Invitrogen, 1:1000) und 1 µg/ml DAPI inkubiert. Mit Hilfe des Eindeck-Mediums (Thermo Fisher Scientific) wurden die Schnitte auf einem Objektträger fixiert. Es erfolgten Aufnahmen der Schnitte mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 200M, Zeiss), ausgestattet mit einer Kamera (AxioCam, Zeiss). Hierbei wurde die Software AxioVision Rel. 4.7 benutzt und es wurden Mosaik Bilder mit 10%iger Überlappung angefertigt. Mit Hilfe von AxioVision wurde die Fläche der reaktiven Astrozyten (GFAP-positive Zellen), das Kortex Ödem (Vergrößerung der Kortexdicke) und die Verteilung reaktiver Astrozyten (die gemessene Intensität der GFAP Fluoreszenz entlang des Kortex), analysiert.

3.8 Messung der Veränderungen der Kalziumkonzentration im Zytoplasma

Kalzium-Imaging ist eine häufig verwendete Technik um Ca^{2+} Veränderungen im Zytosol zu detektieren. Sie beruht darauf, dass Fluorophore Verbindungen ihre spektralen Eigenschaften verändern, abhängig davon, ob sie Ca^{2+} gebunden haben oder nicht. In den durchgeführten Experimenten wurde Fura-2AM verwendet (Grynkiewicz et al., 1985). Fura-2AM ist eine lipophile Substanz, die durch ihre Bindung mit Acetoxymethylester unpolar ist und frei durch die Zellmembran diffundieren kann. Durch Abspaltung der Ester über intrazelluläre Esterasen wird es hydrophil bzw. polar (Abbildung 10), reichert sich in der Zelle an und kann mit Ca^{2+} Chelatkomplexe bilden.

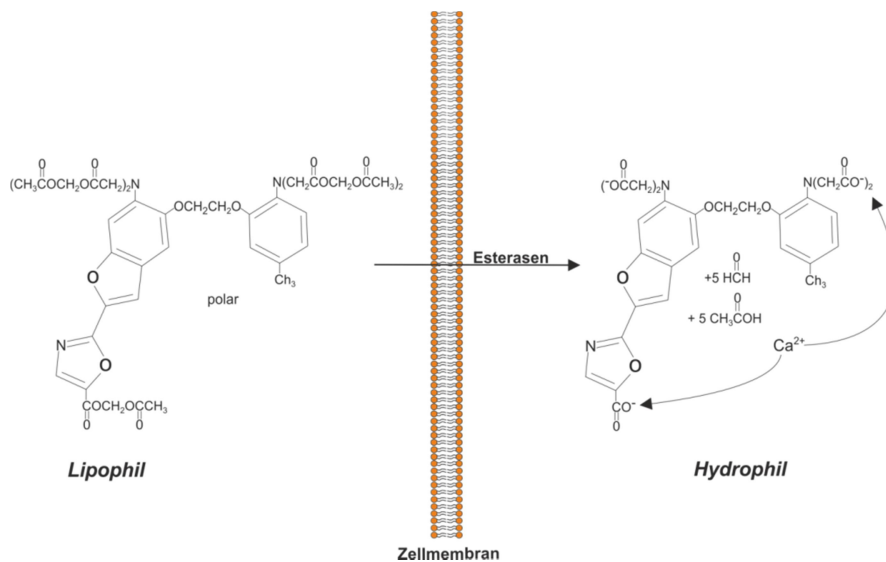


Abbildung 10: **Beladung der Zelle mit Fura-2.** Nach dem Übertritt von Fura-2AM über die Zellmembran, erfolgt die Abspaltung des Acetoxymethylesters durch endogene Esterasen im inneren der Zelle. Hierdurch entsteht hydrophiles Fura-2, welches die Zelle nicht mehr verlassen kann und fähig ist Komplexe mit Kalzium zu bilden.

Fura-2 kann mit UV-Licht angeregt werden und hat ein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von etwa 510 nm. Die Emission kann photometrisch bestimmt werden. Hierbei unterscheiden sich 2 Anregungsspektren: Kommt es zu Chelatkomplexen mit Ca^{2+} besitzt Fura-2 bei 340 nm sein Anregungsmaximum, während für Ca^{2+} freies Fura-2 das Anregungsmaximum zu höheren Wellenlängen verschoben ist. Daraus resultiert, dass bei vermehrter Kalziumbindung die Fluoreszenz bei Anregung mit 340 nm ansteigt, während sich die Fluoreszenz bei Anregung mit 380 nm verringert (Abbildung 11). Das Emissionsspektrums bleibt unabhängig von der Kalziumbindung und ist proportional zur

Konzentration des Farbstoffes und der intrazellulären Kalzium-Ionen. In den Experimenten wurde das Fura-2 abwechselnd bei 340 und 380 nm angeregt und die Emission mit einem Langpassfilter (LP) 440 nm gemessen. Durch Bildung des Quotienten F340/F380 können die Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen unabhängig von Zeldicke und Farbstoffkonzentration in den Zellen dargestellt werden. So kommt es bei einem Anstieg des Intrazellulären Kalziums zu einem Anstieg des Quotienten F340/ F380.

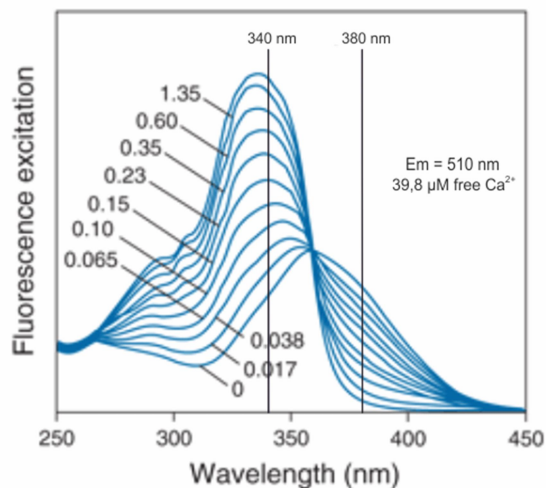


Abbildung 11: **Eigenschaften der Anregungsspektren von Fura-2.** Das Anregungsmaximum von Kalzium-gebundenen Fura-2 liegt bei 340 nm Wellenlänge, während es bei nicht Kalzium-gebundenem Fura-2 nach rechts verschoben ist. Die Fluoreszenz-Emission bleibt dabei unabhängig von der anregenden Wellenlänge bei einem Maximum von etwa 510 nm. Die Fluoreszenz bei Anregung mit 360 nm ist unabhängig von einer Bindung an Ca^{2+} (isosbestische Wellenlänge). Die Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration werden über die Berechnung des Quotienten F340/F380 ermittelt. *Quelle: Modifiziert aus: The Molecular Probes Handbook, Thermofisher.*

In der vorliegenden Arbeit wurden für das Kalzium-Imaging zunächst Deckgläser (\varnothing 25 mm, Orsatec) in kleinen Kulturschalen mit P-L-L beschichtet und mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Ausplattierung von den 2-3 Wochen alten kultivierten Astrozyten auf die Deckgläser. Diese wurden bei 5% CO_2 und $37^\circ C$ für 3-5 Tage kultiviert, bis die Kultur annähernd konfluent wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 5 μM Fura-2AM (Invitrogen) im Medium beladen und dunkel bei 5% CO_2 und $37^\circ C$ inkubiert. Die Fura-2 AM Inkubation zu den Versuchen, bezüglich der Beta-Untereinheiten von spannungsaktivierten Kalziumkanälen in Astrozyten erfolgte für 50 Minuten (Protokoll 1). Da auch eine kürzere Inkubationszeit zu einer ausreichenden Fura-2 Beladung der Astrozyten führte, wurden die

späteren Experimente zu den TRPC-Kanälen der Astrozyten nach jeweils 30 Minuten Fura-2 AM Inkubation durchgeführt (Protokoll 2).

Die Deckgläser wurden in einer offenen Kammer fixiert. Die untere nicht von Zellen bewachsene Seite der Deckgläser, wurde mit Hilfe von Mikropapier (VWR) gesäubert. Die Zellen wurden dreifach mit 2 mM Ca^{2+} -Lösung (siehe 0) gespült, um das nicht in die Zellen diffundierte Fura-2AM auszuwaschen und anschließend mit 300 μl 2 mM Ca^{2+} -Lösung inkubiert. Für die Messungen wurde das Axiovert S100 Carl Zeiss Mikroskop verwendet, welches mit einem Monochromator (Polychrome V, TILL-Photonics) ausgestattet war. Die Zellen wurden alle 2 Sekunden (s) für jeweils 30 Millisekunden (ms) mit 340 nm und 380 nm Wellenlänge angeregt und die hierdurch entstandene Fluoreszenz bei > 440 nm (Langpass 440 nm) wurde mit Hilfe einer Kamera (Imago, TILL-Photonics) in je einer Aufnahme aufgezeichnet. Hierbei erfolgte im Protokoll 1 (Experiment β -Untereinheiten CaVs) die Aufzeichnung für 33 Minuten ohne Zugabe von Substanzen in die Kammer, um spontane zytosolische Ca^{2+} -Oszillationen in Astrozyten zu erfassen. Im Protokoll 2 (Experimente zu TRPCs) wurde für 300 s aufgezeichnet und es erfolgte die Zugabe von 1 μM Englerin A (EgA, Roth) in die offene Kammer mittels einer Pipette bei 120 s (300 μl 2 mM Ca^{2+} Lösung im Bad plus 300 μl 2 μM EgA in 2 mM Ca^{2+} Lösung \Rightarrow 600 μl 1 μM EgA in 2 mM Ca^{2+} Lösung). EgA ist bekannt als hochpotenter Aktivator von TRPC4 und TRPC5 Kanälen (Akbulut et al., 2015; Carson et al., 2015). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Berechnung des Quotienten, der bei 340 nm und 380 nm entstandenen Bilder, nach dem Abzug der Fluoreszenz der beiden Wellenlängen der zellfreien Fläche (Hintergrundfluoreszenz). Alle Astrozyten wurden unter Zuhilfenahme von morphologischen Kriterien, wie z.B. Größe und Zellform markiert (region of interest, ROI). Der Hintergrund-korrigierte Quotient F340/F380 wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Für den Versuch „Spontane Kalzium-Oszillationen in Astrozyten“ (siehe 4.4.1) wurde der Anteil der Astrozyten, die spontane Oszillationen zeigten, ermittelt. Des Weiteren erfolgte die Bestimmung der Anzahl der spontanen Kalzium-Oszillationen pro oszillierender Zelle.

Für die Auswertung der in „Rolle von TRPC4 in kortikalen Astrozyten“ (siehe 4.3) zusammengefassten Ergebnisse erfolgte die Ermittlung des Anteils der Astrozyten, die EgA-induzierte Ca^{2+} -Signale zeigten. Die Ca^{2+} -Signale wurden weiter quantifiziert, indem für die reagierenden Zellen die Fläche unter der jeweiligen Kurve (Area under the curve, AUC) und der maximale Netto F340/F380 Anstieg ermittelt wurden.

3.9 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel 2010, Igor Pro 6.37 (Wavemetrics), Till-Vision (Till Photonics), AxioVision Rel. 4.7 (ZEISS) und Image J (NIH) durchgeführt. Die Ergebnisse von Wildtyp und KO (bzw. MWK) Astrozyten wurden durch einen ungepaarten zweiseitigen t-Test im direkten Vergleich auf Signifikanz überprüft und folgendermaßen eingeteilt: $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$. Die graphische Bearbeitung der Diagramme und Bilder erfolgte mit CorelDRAW X5 (Corel Corporation) und Corel PHOTO-PAINT X5 (Corel Corporation).

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Färbung

Die Präparation und Kultivierung der kortikalen Astrozyten wurde mit dem Ziel durchgeführt, eine möglichst reine, aus Astrozyten bestehende Kultur zu erhalten. Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Ziel der Färbung war es festzustellen, wie viele Prozent der Zellen Astrozyten entsprachen, da in Primärkulturen die Gefahr einer Verunreinigung durch andere Zellen besteht. Bei der Präparation von kortikalen Astrozyten gelangen zum Beispiel auch andere Hirnzellen wie Mikroglia in die Kultur (Schildge et al., 2013). Um dies zu überprüfen wurden die Zellen aus den konfluenten Kulturen auf mit P-L-L beschichteten Deckgläsern ausplattiert. Die Astrozyten wurden mit Hilfe des Astrozyten-spezifischen Antikörpers GFAP markiert und alle Zellkerne mit DAPI angefärbt. Es erfolgte eine Auszählung aller Kerne dreier angefärbter Präparate. Anschließend wurde die Anzahl aller DAPI und GFAP-positiven Zellen bestimmt, mit dem Ergebnis, dass von insgesamt 513 mit DAPI angefärbten Zellen 462 GFAP-positiv waren. 51 Zellen waren hingegen nur mit DAPI angefärbt (Abbildung 12). Das Ergebnis zeigt, dass mindestens 90% der kultivierten Zellen GFAP-positiv und somit Astrozyten waren.

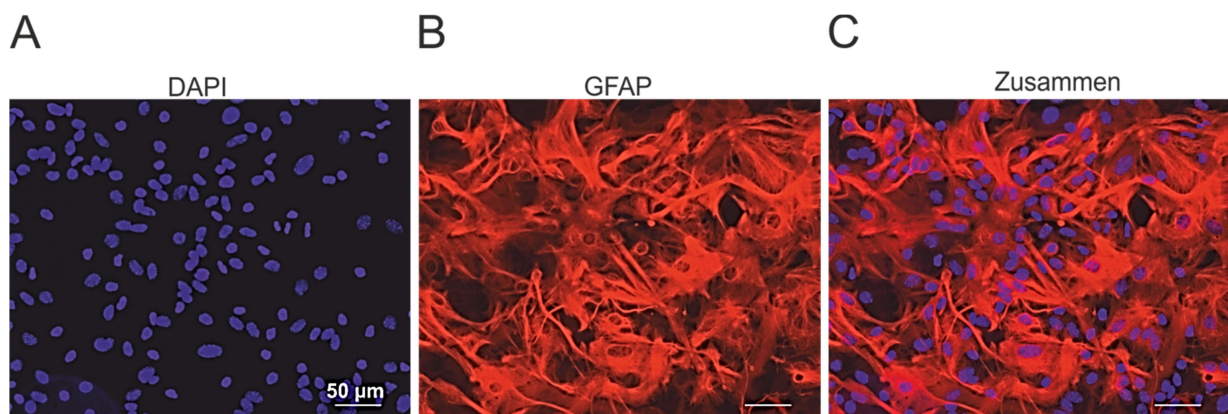


Abbildung 12: **Immunhistochemische Färbung kortikaler Astrozyten in Kultur.** (A) Anfärbung der Zellkerne mit Hilfe von DAPI, es sind Zellkerne der Astrozyten, aber auch anderer Zellen zu sehen. (B) Markierung der Zellen in (A) mit dem Astrozyten-spezifischen Antikörper GFAP (Anti-GFAP (von immunisierten Kaninchen) und Anti-Kaninchen-IgG Alexa Fluor 555 (von immunisierten Eseln)). (C) Überlagerte Darstellung beider Färbungen (A und B).

4.2 Rolle von TRPC1 und TRPC3 in kortikalen Astrozyten

4.2.1 Funktion von TRPC1 und TRPC3 in der Proliferation kortikaler Astrozyten

Mit dem Ziel mehr über die Funktion insbesondere der TRPC1- und TRPC3-Kanäle im Hinblick auf die Proliferation von kortikalen Astrozyten zu erfahren, wurde das Proliferations Assay durchgeführt. Hierbei erfolgte die Messung der Proliferation kultivierter kortikaler Astrozyten über 7 Tage mittels eines fotometrischen Verfahrens unter Verwendung der Substanz CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) *in vitro*.

4.2.1.1 Proliferation kortikaler Astrozyten mit TRPC3-Defizienz

Für die Versuche wurden zunächst die Astrozyten von Mäusen mit einer TRPC3-Defizienz (TRPC3-KO) mit Astrozyten von Wildtyp (WT) Mäusen verglichen. Hierbei erfolgte die Ausplattierung von jeweils 5000 Astrozyten pro Well und die Bestimmung der zur Zellzahl proportionalen Absorption an den Tagen 0, 3, 5, 6 und 7. Die TRPC3-KO sowie die WT Astrozyten zeigten am Tag 0 eine annähernd gleiche Absorption (Abbildung 13 A). Zum besseren Vergleich beider Zelltypen und zur relativen Darstellung wurde eine Normalisierung auf den Tag 0 vorgenommen (Abbildung 13 B). Die Astrozyten des Wildtyps zeigten ein stetiges Wachstum bis zum Erreichen von Tag 6. An Tag 7 konnte ein leichter Abfall der Zellzahl festgestellt werden (Abbildung 13). Die Astrozyten des TRPC3-KO wiesen eine insgesamt geringere Proliferation der Zellen bis zum dritten Tag im Vergleich zum WT auf, was allerdings nicht signifikant war. Ab Tag 3 wurde ein Plateau erreicht und es konnte eine annähernd gleichbleibende Zellzahl beobachtet werden, jedoch mit leichtem Abfall an Tag 7. An den Tagen 5 bis 7 konnte ein signifikant geringeres Wachstum der TRPC3-defizienten Astrozyten gegenüber den Astrozyten des Wildtyps festgestellt werden (Abbildung 13).

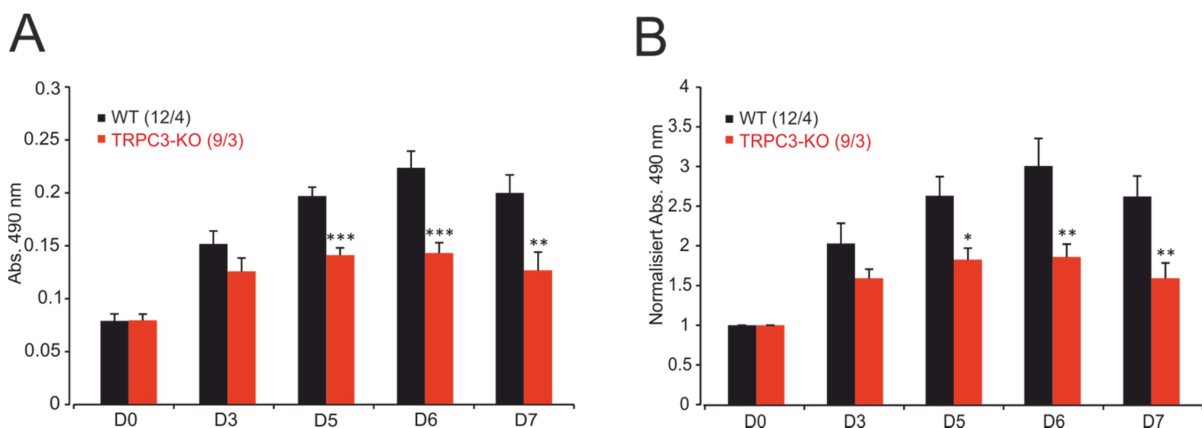


Abbildung 13: **Proliferation der kortikalen Wildtyp und TRPC3-KO Astrozyten.** (A) Mittelwert der ermittelten Absorption (Abs.) des Formazans bei 490 nm an den jeweiligen Messtagen (D0, D3, D5, D6, D7) von Wildtyp (WT, schwarz) und TRPC3-defizienten (TRPC3-KO, rot) Astrozyten. Die Absorption wurde nach einstündiger Inkubation mit MTS ausgelesen und ist proportional zur Zellzahl. (B) Messdaten in (A) normalisiert auf die Messwerte am Messtag 0. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n: Anzahl der Experimente von x verschiedenen Kulturen (n/x)). Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

4.2.1.2 Proliferation kortikaler Astrozyten mit TRPC1-Defizienz

Die Astrozyten aus der TRPC1-KO Maus zeigten eine stetige Zunahme der Zellzahl, bis zum Erreichen eines Plateaus an Tag 5 (Abbildung 14). An Tag 7 konnte ein leichter Abfall der Astrozytenanzahl festgestellt werden. Die Wildtyp Astrozyten wiesen ein ähnliches Wachstumsverhalten auf, jedoch ohne Abfall der Zellzahl an Tag 7 (Abbildung 14). Ein unterschiedliches Wachstum beider Genotypen konnte nur an Tag 3 und Tag 7 bei den auf den Wert an Tag 0 normalisierten Messwerten festgestellt werden. Allerdings war die Proliferation an Tag 3 bei den TRPC1-KO Astrozyten größer und an Tag 7 bei den WT Astrozyten größer (Abbildung 14 B).

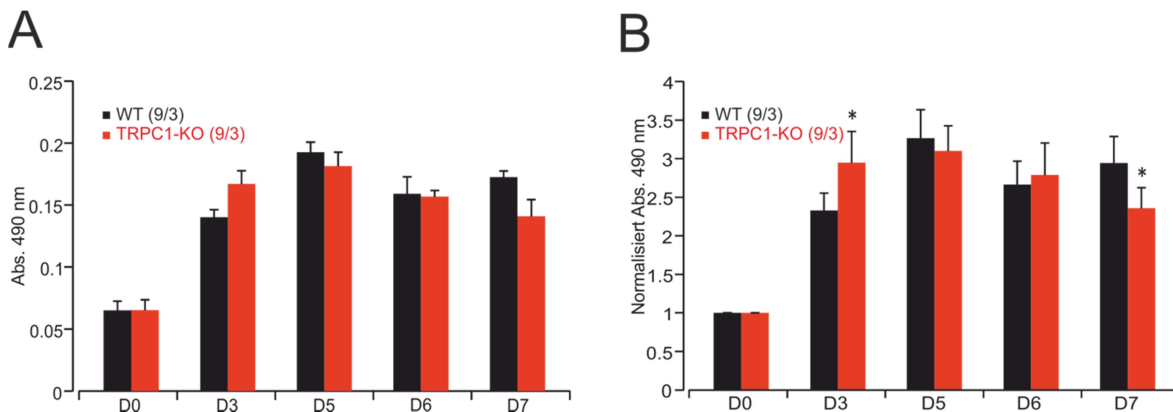


Abbildung 14: **Proliferation der kortikalen Wildtyp und TRPC1-KO Astrozyten.** (A) Mittelwert der Absorption des Formazans bei 490 nm an den jeweiligen Messtagen (D0, D3, D5, D6, D7) von Wildtyp (WT, schwarz) und TRPC1-defizienten Astrozyten (TRPC1-KO, rot). Die Absorption wurde nach einstündiger Inkubation mit MTS ausgelesen und ist proportional zur Zellzahl. (B) Messdaten in (A) normalisiert auf die Messwerte am Messtag 0. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n: Anzahl der Experimente von x verschiedenen Kulturen (n/x)). Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$.

4.2.1.3 Proliferation kortikaler Astrozyten mit TRPC3 gain of function Mutation (Moonwalker-Mäuse)

Die Astrozyten der Moonwalker (MWK)-Maus unterliegen der TRPC3 gain of function Mutation, der eine Punktmutation (T635A) zugrunde liegt. Diese führt zu einer gesteigerten Öffnungsfrequenz des Kanals (Becker, 2014) und zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom in die Astrozyten (Belkacemi et al., 2017).

Bei den Astrozyten der MWK-Mäuse und des zugehörigen WTs konnte an Tag 0 eine geringere Ausgangs-Absorption bei den Astrozyten der MWK-Mäuse gemessen werden (Abbildung 15 A). Im weiteren Verlauf kam es zu einer Vermehrung der Zellen beider Genotypen, bis ab Tag 5 ein Plateau erreicht wurde (Abbildung 15). An Tag 5 zeigte sich eine signifikant kleinere Proliferation bei den MWK Astrozyten im Vergleich zu den WT Astrozyten. Nach Normalisierung auf den Tag 0 konnte jedoch kein signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden (Abbildung 15 B). An Tag 7 kam es zu einer Reduzierung der Zellzahl der TRPC3 gain of function Astrozyten. Der Wildtyp wies hingegen eine weiterhin konstante Zellzahl auf. Somit ergab sich kein Unterschied bis zu Tag 7 in der Proliferation der beiden Genotypen.

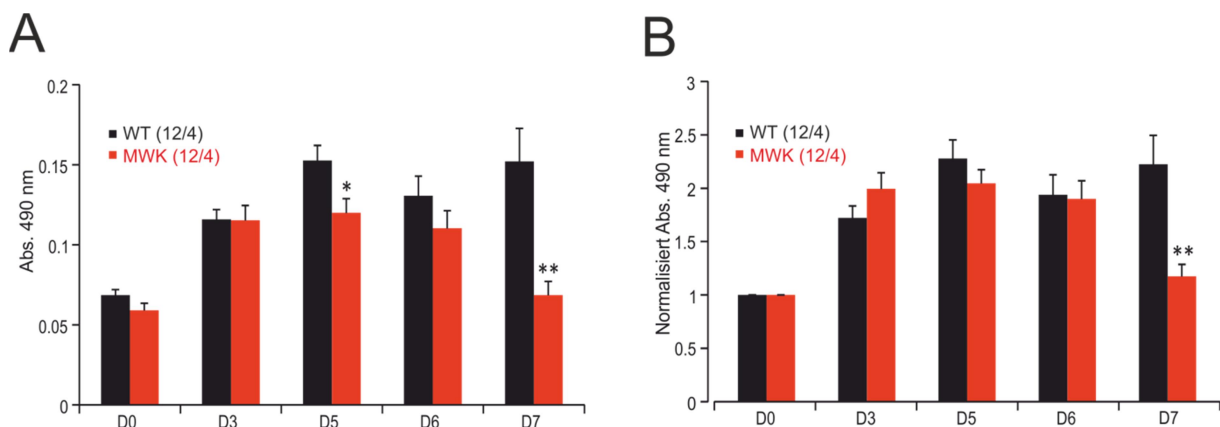


Abbildung 15: **Proliferation der kortikalen Wildtyp und MWK Astrozyten:** (A) Mittelwert der ermittelten Absorption des Formazans bei 490 nm an den jeweiligen Messtagen (D0, D3, D5, D6, D7) von Astrozyten des Wildtyps (WT, schwarz) und der Moonwalker Maus (MWK, rot). Die Absorption wurde nach einstündiger Inkubation mit MTS ausgelesen und ist proportional zur Zellzahl. (B) Messdaten in (A) normalisiert auf die Messwerte am Messtag 0. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n: Anzahl der Experimente von x verschiedenen Kulturen (n/x)). Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: * = p < 0,05, ** = p < 0,01.

4.2.2 Einfluss einer TRPC3 „gain of function“ Mutation auf die Migration kortikaler Astrozyten

In zuvor durchgeführten Migrationsversuchen wiesen kortikale *Trpc1*^{-/-} Astrozyten im Vergleich zum WT eine erhöhte Migrationsrate auf, wohingegen kortikale Astrozyten aus TRPC3-KO Mäusen eine geringere Migrationsrate als WT Astrozyten zeigten (Belkacemi et al., 2017). Im Folgenden sollte untersucht werden welchen Einfluss die gain of function Mutation von TRPC3 auf die Migration der isolierten kortikalen Astrozyten hat.

Im sogenannten Scratch Assay (siehe 3.6) wurde die Migrationsrate von WT (Wildtyp) und MWK (TRPC3 gain of function) Astrozyten in Kultur verglichen (Abbildung 16): Die durch den Scratch entstandene zellfreie Fläche in den Kulturen beider Genotypen wurde nach und nach durch Migration der Astrozyten wieder bedeckt. Nach 4 Stunden war die zellfreie Fläche in der Kultur der MWK-Astrozyten um $10,4 \pm 0,54\%$ (35 Scratchanalysen in 3 unabhängigen Kulturen) reduziert, während sich die Fläche des zugehörigen Wildtyps um $7,8 \pm 0,32\%$ (35 Scratchanalysen in 3 unabhängigen Kulturen) verkleinerte. Nach 8 Stunden bedeckten die MWK-Astrozyten schon $17,9 \pm 0,69\%$ und die des WT $14,7 \pm 0,62\%$ der zellfreien Fläche. Nach 24 Stunden bedeckten die Zellen der MWK-Mäuse $39,7 \pm 1,54\%$, während die Zellen des Wildtyps $28,7 \pm 1,35\%$ der zellfreien Fläche wieder besetzten (Abbildung 16). Zu allen Zeitpunkten war im Vergleich zum WT eine statistisch signifikant größere Fläche des Scratches bei kortikalen Astrozyten der MWK-Mäuse wieder bedeckt. Dies bedeutet, dass die Migrationsrate der MWK-Astrozyten signifikant höher ist, als bei den Astrozyten des korrespondierenden Wildtyps.

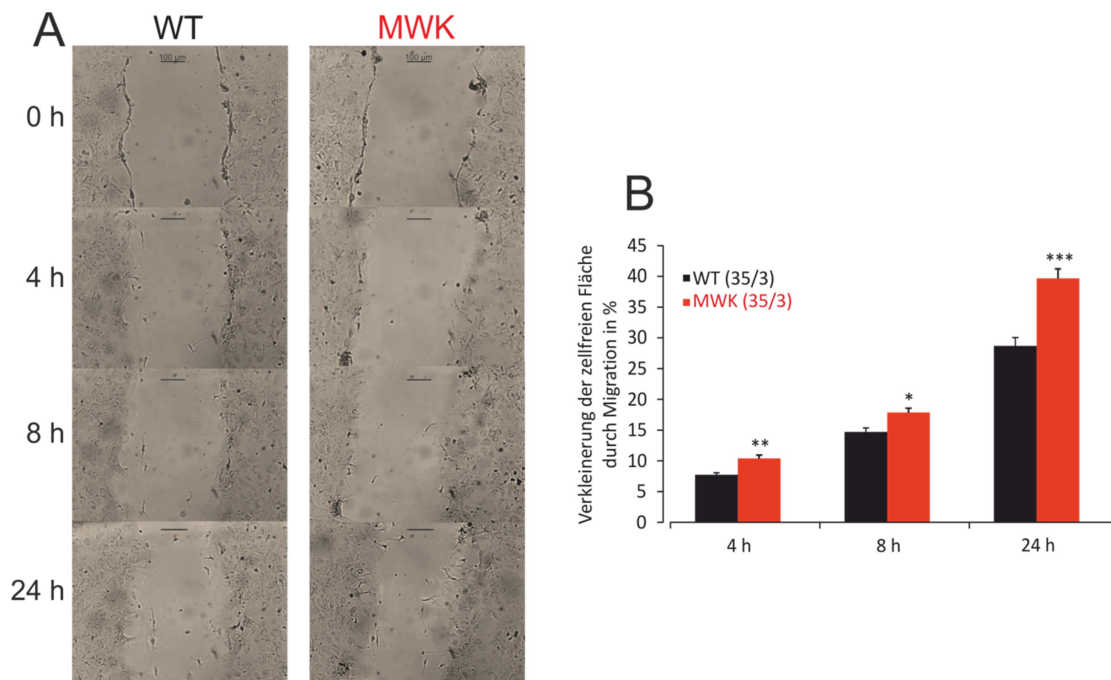


Abbildung 16: **Migration der Astrozyten der MWK und des zugehörigen Wildtyps *in vitro*.** (A) Repräsentative Bilder der erzeugten zellfreien Flächen der Wildtyp (WT) und der Moonwalker (MWK) Astrozytenkultur nach 0, 4, 8 und 24 Stunden (h) nach dem Scratch. (B) Darstellung der Verkleinerung der zellfreien Fläche in Prozent der WT (schwarz) und MWK-Astrozyten (rot) nach 4 h, 8 h und 24 h. Hierbei wurde die zellfreie Fläche nach 0 h als 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n: Anzahl der Experimente von x verschiedenen Kulturen (n/x)). Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

4.3 Rolle von TRPC4 in kortikalen Astrozyten

Während RNA Sequenzierungen an sortierten Astrozyten aus dem Kortex von Maus so gut wie kein *Trpc4* Transkript ergaben, konnte über die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) *Trpc4* in den kortikalen Astrozyten nachgewiesen werden (siehe 2.4.7 und (Belkacemi et al., 2017)). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob TRPC4 funktionell in den kultivierten Astrozyten aus dem Kortex von Maus vorhanden ist. TRPC4 ist ein Ca^{2+} -permeabler Kationenkanal und so wurden zum funktionellen Nachweis von TRPC4 Kalzium-Imaging Experimente durchgeführt. Hierzu erfolgte die Kultivierung von Astrozyten aus WT und TRPC4-defizienten Mäusen als Kontrolle. Diese wurden für die Ca^{2+} -Imaging Experimente auf Deckgläser ausplattiert. Für die Messung wurden die Deckgläser in einer offenen Kammer fixiert und mit 2 mM Ca^{2+} -Lösung inkubiert. Um TRPC4 zu aktivieren, erfolgte die Zugabe von 1 μ M Englerin A in die offene Kammer nach 120 s, welches als potenter Aktivator von TRPC4 und TRPC5 beschrieben wurde (Akbulut et al., 2015). *Trpc5*

Transkripte konnten in kortikalen Astrozyten nicht detektiert werden (siehe 2.4.7 und (Belkacemi et al., 2017). Daher wurde in diesem Versuch angenommen, dass EgA in den Astrozyten nur als Aktivator von TRPC4 agiert. Veränderungen der zytosolischen Kalziumkonzentration wurden für 300 s aufgezeichnet und ausgewertet.

Die Ergebnisse waren sehr variabel: Nur Zellen in 3 WT Experimenten von 7 aus zwei unabhängigen Präparationen haben auf Englerin A mit einem Ca^{2+} -Anstieg reagiert. Die folgenden Analysen basieren auf den Experimenten bei denen mindestens eine Zelle mit einem Ca^{2+} -Anstieg reagierte. Die Astrozyten des WT zeigten nach Zugabe von 1 μM Englerin A einen transienten zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg (Abbildung 17 A, B). Dies konnte in $65 \pm 15,6\%$ (75 reagierende Zellen von insgesamt 115 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten) der Astrozyten beobachtet werden, während $35 \pm 15,6\%$ keine Ca^{2+} -Veränderungen zeigten (Abbildung 17G). Es konnten auch in einigen Zellen der TRPC4-KO Mäuse Ca^{2+} -Signale nach Zugabe von 1 μM EgA detektiert werden (Abbildung 17 E, F). Jedoch reagierte hier nur ein sehr geringer Prozentsatz der Zellen (5 reagierende Zelle von Insgesamt 115 Zellen aus 4 unabhängigen Experimenten) (Abbildung 17 G) Die reagierenden Zellen wiesen eine signifikant geringere Amplitude des EgA-induzierten Ca^{2+} -Signals (Abbildung 17 H) im Vergleich zum Wildtyp auf, während sich die Fläche unterhalb der Ca^{2+} -Kurve (Area under the curve, AUC) nicht vom Wildtyp unterschied (Abbildung 17 I).

In der Zusammenschau der Ergebnisse, zeigt dies dass EgA einen TRPC4 abhängigen Ca^{2+} -Einstrom in den Astrozyten aktiviert hat. TRPC4 scheint somit in einem Großteil der Astrozyten funktionell vorhanden zu sein.

TRPC4 und TRPC1 können zusammen heteromere Kanäle bilden wobei TRPC1 als Untereinheit dieser Kanäle fungiert und die Kalziumpermeabilität reduziert (Storch et al., 2012). Um einen möglichen Einfluss von TRPC1 auf TRPC4 in kortikalen Astrozyten zu untersuchen, wurde das oben beschriebene Kalzium-Imaging Experiment mit Astrozyten von *Trpc1*^{-/-} Mäusen wiederholt. Wie bei den WT Astrozyten reagierten bei den Experimenten mit den TRPC1-defizienten Astrozyten lediglich in 3 von 7 Experimenten (aus zwei unabhängigen Präparationen) die Zellen auf Englerin A. Auch hier wurden im Folgenden nur die Experimente ausgewertet, bei denen mindestens eine Zelle auf EgA reagierte. Hierbei wiesen $48 \pm 24\%$ (53 reagierende Zellen von insgesamt 109 Zellen (aus 3 unabhängigen Experimenten) der Zellen Ca^{2+} -Transienten nach Zugabe von 1 μM EgA auf (Abbildung 17 C, D), was allerdings nicht signifikant weniger als in WT Astrozyten war (Abbildung 17 G). Die Astrozyten mit *Trpc1*-Defizienz zeigten einen signifikant erhöhten Ca^{2+} -Einstrom durch EgA, d.h. eine signifikant höhere Amplitude des EgA-induzierten Ca^{2+} -Signals (Abbildung 17 H) und eine signifikant größere Fläche unterhalb der Ca^{2+} -Kurve (AUC) (Abbildung 17 I). Die

Ergebnisse deuten darauf hin, dass TRPC1 einen reduzierenden Einfluss auf die Kalziumpermeabilität von kortikalen Astrozyten haben könnte.

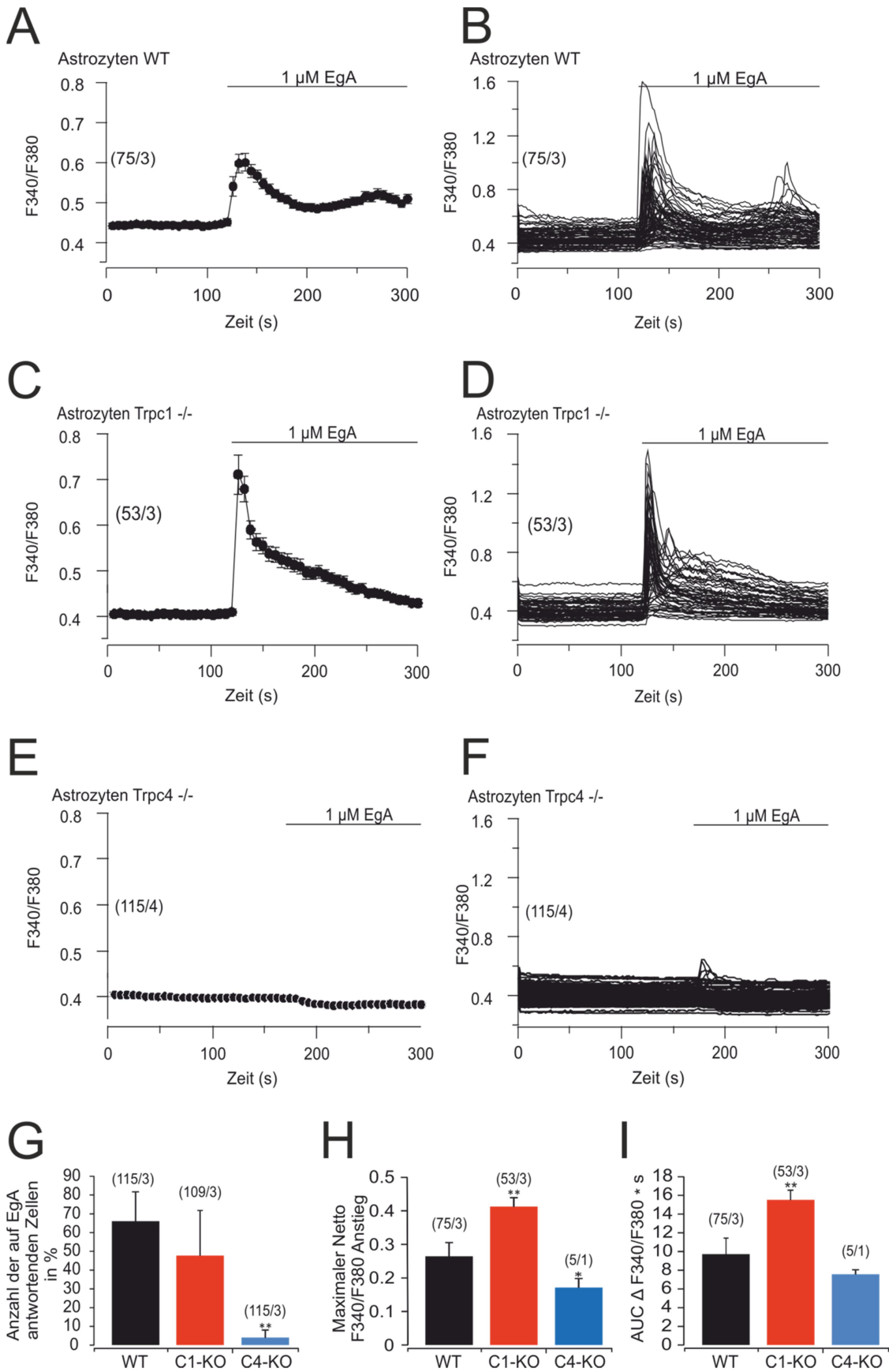


Abbildung 17: **EgA induzierte Ca²⁺-Erhöhungen in kortikalen Astrozyten.** (A-F) Zytosolische Ca²⁺-Änderungen (F340/380) in kultivierten Astrozyten aus dem Kortex von Wildtyp (WT, A, B), TRPC1-KO (*Trpc1*^{-/-}, C, D) und TRPC4-KO (*Trpc4*^{-/-}, E, F) Mäusen. 1 µM EgA wurde ab 120 s (A-D) bzw. 160 s (E, F) appliziert. A, C, E zeigen Mittelwerte (±SEM) der Einzelzellen in B, D und F. A – D (n: Anzahl der auf EGA antwortenden Zellen von x verschiedenen Experimenten (n/x)). E, F (n: Anzahl der Zellen von x verschiedenen Experimenten (n/x)). (G) Prozentualer Anteil der auf EgA antwortenden WT (schwarz), TRPC1-KO (rot) und TRPC4-KO (blau) Astrozyten aus den gewerteten Kulturen (n: Anzahl der Zellen von x verschiedenen Experimenten (n/x)). (H, I) Maximale Ca²⁺-Amplitude (F340/F380 Netto; H) und Fläche unter der Kurve (AUC, I) der Ca²⁺-Transienten in WT (schwarz), TRPC1-KO (rot) und TRPC4-KO (blau) Astrozyten (n: Anzahl der auf EGA antwortenden Zellen von x verschiedenen Experimenten (n/x)). Dargestellt sind in G, H und I Mittelwerte ± SEM. Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: ** = p < 0,01.

4.4 Die Rolle der β-Untereinheiten spannungsaktivierter Kalziumkanäle in kortikalen Astrozyten

In unserem Labor (Belkacemi, 2016) konnte mit Hilfe einer Transkriptomanalyse die Expression der Beta-Untereinheiten 1-4 von spannungsaktivierten Ca²⁺-Kanälen (CaVs) in kortikalen Astrozyten detektiert werden (Abbildung 18 A). Des Weiteren wurde der spannungsaktivierte Kalziumeinstrom in Astrozyten mit Hilfe der Patch Clamp Technik analysiert. Hierbei wurde kein Unterschied der Ca²⁺-Ströme von β3-KO Astrozyten und dem zugehörigen WT festgestellt (Abbildung 18 B). Die Defizienz von β2 hingegen führt zu einer Reduktion des spannungsaktivierten Ca²⁺-Einstroms in kultivierten Astrozyten um ca. 40% (Abbildung 18 C). Der globale β2-KO ist aufgrund von wichtigen Funktionen der β2-Untereinheit im Herzen der Maus letal, sodass für die Isolation der Astrozyten die *ecmβ2*-KO Maus verwendet wurde (siehe 3.3) (Katiyar et al., 2015). Da β3 in den Astrozyten vorhanden ist, aber keinen Einfluss auf den spannungsaktivierten Ca²⁺ Strom hat, scheint es andere CaV-unabhängige Funktionen in Astrozyten auszuüben. In Beta-Zellen aus dem Pankreas der β3-defizienten Maus konnten im Vergleich zu Wildtyp Mäusen höherfrequente Ca²⁺-Oszillationen gemessen werden (Berggren et al., 2004), und Belkacemi, A. et al. konnten zeigen, dass β3-Defizienz zu einer erhöhten IP₃-induzierten Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speicher von embryonalen Fibroblasten führt (Belkacemi et al., 2018).

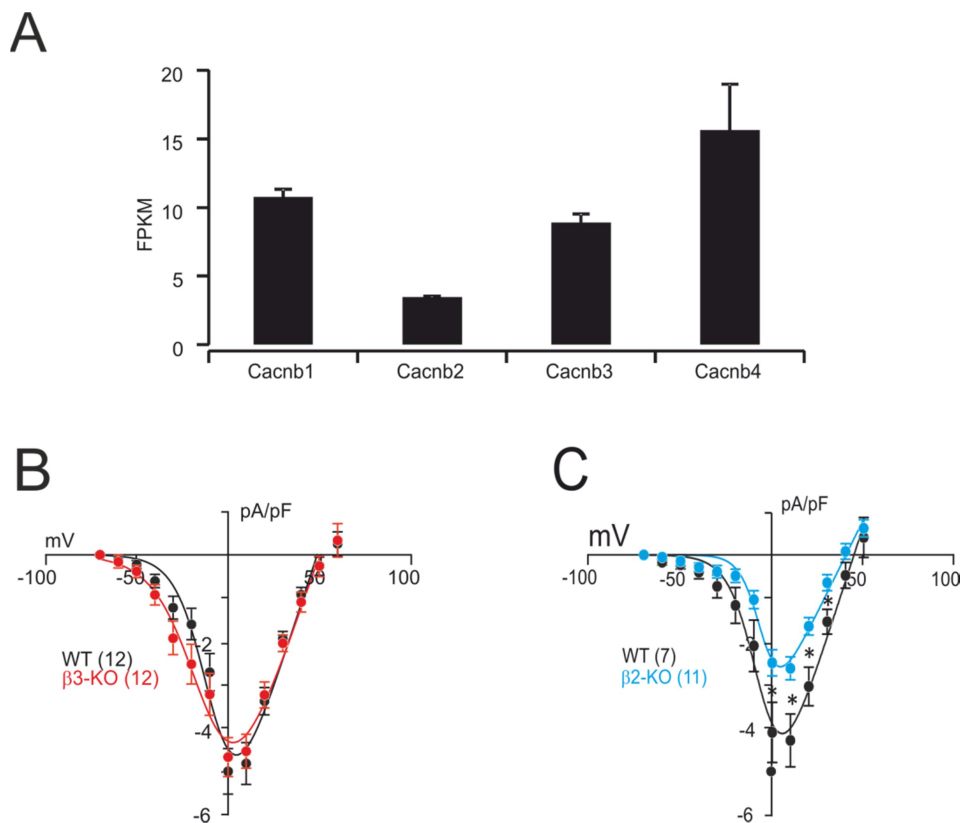


Abbildung 18: **Transkriptomanalyse der CaV β -Untereinheiten kortikaler Astrozyten und spannungsaktivierter Ca^{2+} -Strom.** Expression der vier CaV β -Untereinheiten (*Cacnb1-Cacnb4*) in FACS-sortierten kortikalen Astrozyten dargestellt als Anzahl der Fragmente pro Kilobase des Transkripts pro Millionen gemappter Reads (FPKM). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Präparationen (Belkacemi, 2016). **(B,C)** Strom-Spannungsabhängigkeit von spannungsaktivierten Ca^{2+} -Strömen in Astrozyten aus Wildtyp (WT, schwarz) und $\beta 3$ -defizienten Mäusen ($\beta 3$ -KO, rot, B) und WT (schwarz) und $\beta 2$ -defizienten Mäusen ($\beta 2$ -KO, blau, C). Verwendung der Graphiken mit freundlicher Genehmigung von Dr. Belkacemi, T. aus (Belkacemi, 2016).

4.4.1 Spontane Kalzium Oszillationen in Astrozyten

Um einen möglichen Einfluss der $\beta 3$ -Untereinheit von spannungsaktivierten Kalziumkanälen auf spontane Ca^{2+} -Oszillationen in kortikalen Astrozyten zu untersuchen, erfolgten Kalzium-Imaging Experimente in kultivierten Astrozyten aus WT und $\beta 3$ -defizienten Mäusen mittels Fura2-AM. Hierbei wurden die Astrozyten auf Deckgläsern kultiviert, das Deckglas in einer offenen Kammer fixiert und die Zellen mit 2 mM Ca^{2+} -Lösung überschichtet. Die Aufzeichnung erfolgte für 33 min. $42,5 \pm 8\%$ (114 Zellen aus 5 Experimenten) der Astrozyten aus Wildtyp Mäusen wiesen spontane Ca^{2+} -Oszillationen auf (Abbildung 19 A, C). In den übrigen Zellen konnten keine spontanen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen gemessen werden. Die Astrozyten aus $\beta 3$ -defizienten Mäusen zeigten hingegen mit $82 \pm 3\%$

(121 Zellen aus 3 Experimenten) einen signifikant höheren Anteil an Zellen mit spontanen Ca^{2+} -Transienten (Abbildung 19 B, C). Des Weiteren wiesen die Astrozyten der $\beta 3$ -KO Mäuse auch eine erhöhte Anzahl an Ca^{2+} -Transienten (Oszillationen) innerhalb der 33 minütigen Messung pro Zelle auf (Abbildung 19 D). WT Astrozyten zeigten im Durchschnitt $2,5 \pm 0,5$ (48 Zellen aus 5 Experimenten) Ca^{2+} -Transienten pro aktiver Zelle auf, während bei $\beta 3$ -KO Astrozyten $5,1 \pm 0,03$ (99 Zellen aus 3 Experimenten) spontane Ca^{2+} -Transienten ermittelt werden konnten. Der Anteil der Astrozyten mit zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen sowie der Durchschnitt der Ca^{2+} -Transienten pro aktiver Zelle, war somit jeweils statistisch signifikant höher in den $\beta 3$ -defizienten Astrozyten als in zugehörigen WT Astrozyten.

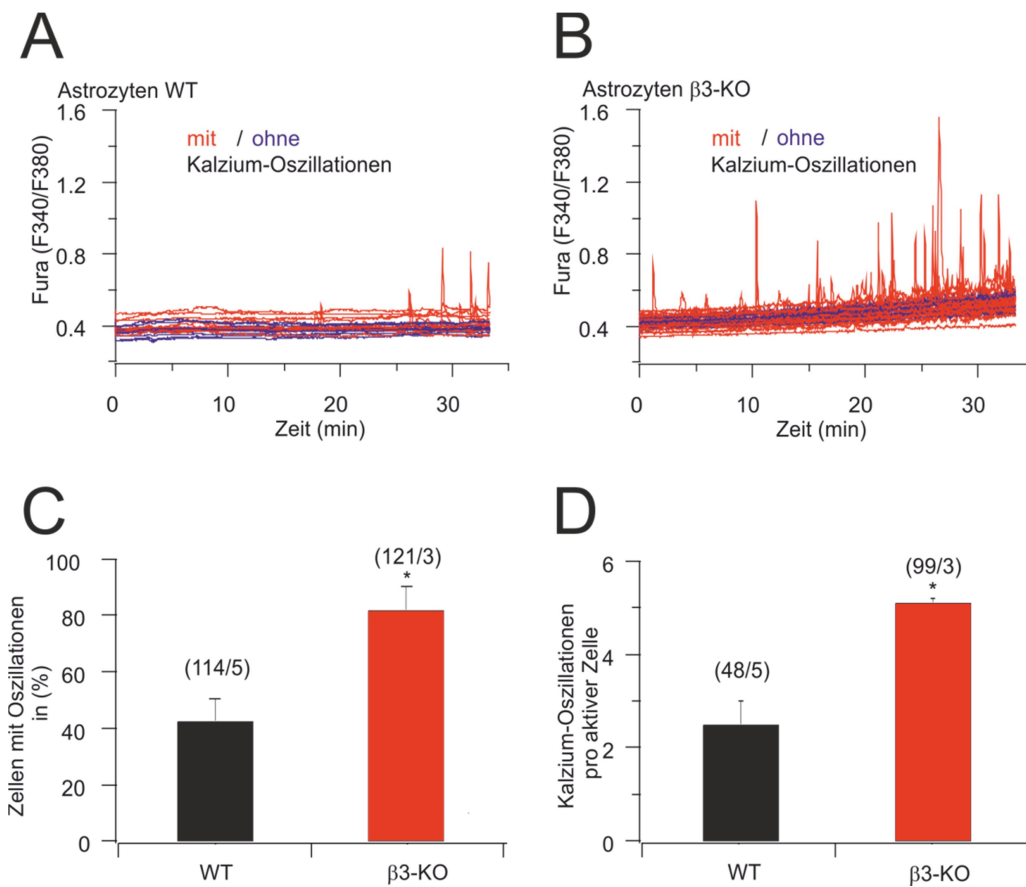


Abbildung 19: **Spontane Ca^{2+} -Oszillationen in kortikalen Astrozyten.** (A, B) Gemessene zytosolische Ca^{2+} -Veränderungen dargestellt durch den Quotienten F340/F380 in Astrozyten aus Wildtyp (WT) und $\beta 3$ -defizienten Mäusen ($\beta 3$ -KO). Es sind Beispiele von Zellen mit (rot) und ohne (blau) Ca^{2+} -Oszillationen abgebildet. (C) Prozentualer Anteil der oszillierenden Zellen des jeweiligen Genotyps. (D) Anzahl der Ca^{2+} -Transienten pro oszillierender Zelle (aktiver Zelle). Dargestellt in C und D sind Mittelwerte \pm SEM (n: Anzahl der Zellen von x verschiedenen Experimenten (n/x)). Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$.

4.4.2 Rolle der β -Untereinheiten von CaVs in der Proliferation der Astrozyten

Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden schon früh mit Proliferation von Zellen in Verbindung gebracht (Balk, 1971; Durham and Walton, 1982). Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der β -Untereinheiten auf die Proliferation von kortikalen Astrozyten, wurden Proliferationsversuche mit Wildtyp Astrozyten und $\beta 3$ - bzw. $\beta 2$ -defizienten Astrozyten durchgeführt (siehe 3.5, 4.2.1).

4.4.2.1 Proliferation $\beta 3$ -defizienter kortikaler Astrozyten

WT und der $\beta 3$ -KO Astrozyten zeigten am Tag 0 eine annähernd gleiche Absorption und daher eine ähnliche Ausgangszahl lebendiger Zellen (

Abbildung 20 A). Im weiteren Verlauf wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Absorption beider Genotypen beobachtet. Lediglich am Messtag 7 konnte ein Abfall der Zellzahl bestimmt werden. Die Proliferation der WT und der $\beta 3$ -KO Zellen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (

Abbildung 20 A, B).

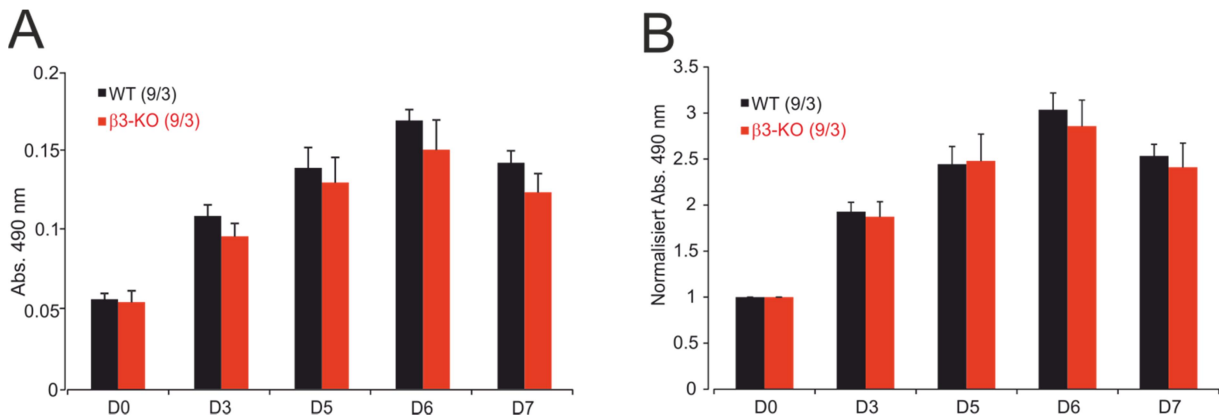


Abbildung 20: **Proliferation der kortikalen Wildtyp und $\beta 3$ -defizienten Astrozyten.** (A) Mittelwert der ermittelten Absorption des Formazans bei 490 nm an den jeweiligen Messtagen (D0, D3, D5, D6, D7) von Wildtyp (WT, schwarz) und $\beta 3$ -defizienten ($\beta 3$ -KO, rot) Astrozyten. Die Absorption wurde nach einstündiger Inkubation mit MTS ausgelesen und ist proportional zur Zellzahl. (B) Messdaten aus (A) normalisiert auf die Messwerte am Messtag 0. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n: Anzahl der Experimente von x verschiedenen Kulturen (n/x)).

4.4.2.2 Proliferation β 2-defizienter kortikaler Astrozyten

Wie im vorangegangenen Experiment zeigten die Astrozyten sowohl aus Wildtyp Mäusen als auch aus β 2-defizienten Mäusen einen kontinuierlichen Anstieg der Zellzahl bis zum Tag 6 (Abbildung 21 A). Am Tag 7 konnte ein Abfall der Zellzahl beider Genotypen festgestellt werden. Nach der Normalisierung der Messwerte auf den Tag 0, wurde eine durchgehend geringere Proliferation der β 2-defizienten Astrozyten im Vergleich zu den WT Astrozyten beobachtet, dieser Unterschied erwies sich jedoch nicht als statistisch signifikant (Abbildung 21 B).

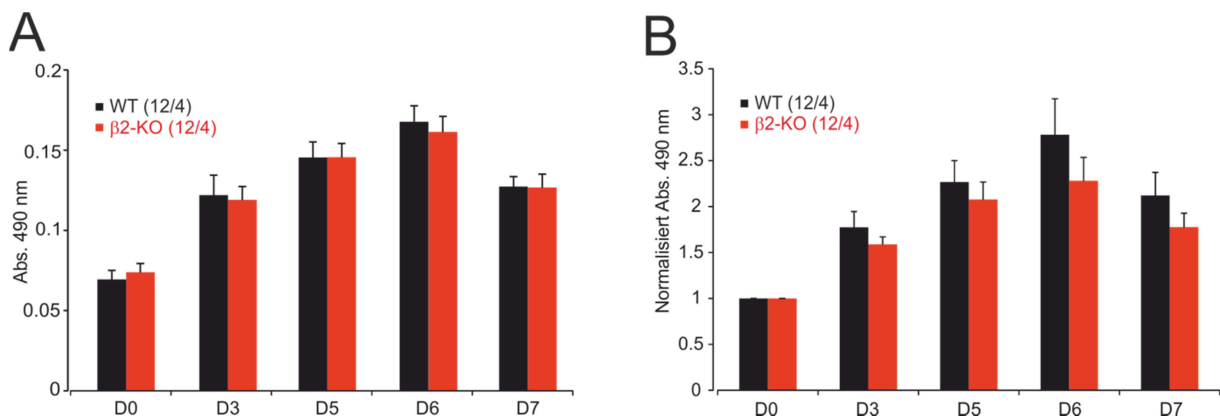


Abbildung 21: **Proliferation der kortikalen Wildtyp und β 2-defizienten Astrozyten: (A)** Mittelwert der ermittelten Absorption des Formazans bei 490 nm Wellenlänge an den jeweiligen Messtagen (D0, D3, D5, D6, D7) von Wildtyp (WT, schwarz) und β 2-defizienten (β 2-KO, rot) Astrozyten. Die Absorption wurde nach einstündiger Inkubation mit MTS ausgelesen und ist proportional zur Zellzahl. **(B)** Messdaten aus (A) normalisiert auf die Messwerte am Messtag 0. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n: Anzahl der Experimente von x verschiedenen Kulturen (n/x)).

Sowohl β 3- als auch β 2-Untereinheiten spannungsaktivierter Ca^{2+} -Kanäle scheinen keinen Einfluss auf die Proliferation kortikaler Astrozyten zu haben.

4.4.3 Rolle der β -Untereinheiten von CaVs in der Migration von Astrozyten

Veränderungen der zytosolischen Kalziumkonzentration durch zum Beispiel Kalzium-Oszillationen, haben einen Einfluss auf die Migration von Zellen (Rondé et al., 2000). Zum Einen konnte gezeigt werden, dass β 3-defiziente Astrozyten eine erhöhte Frequenz an zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen aufweisen (Abbildung 19) und zum Anderen war der spannungsaktivierte Ca^{2+} -Einstrom in β 2-defizienten Astrozyten signifikant reduziert

(Abbildung 18 C). Um einen möglichen Einfluss der β -Untereinheiten auf die Migration von Astrozyten zu untersuchen wurde ein Scratch Assay (siehe 3.6 und 4.2.2) durchgeführt.

4.4.3.1 Migration von β 3-defizienten kortikalen Astrozyten

Für den Migrations-Versuch wurden Astrozyten aus WT und β 3-KO Mäusen auf je 3 Wells einer 6-Well-Platte ausplattiert. Nachdem die Astrozytenkulturen eine konfluente Monoschicht erreicht hatten, erfolgte die Herstellung einer zellfreien Fläche durch vertikales Ritzen (Scratch). Bilder der gleichen Stelle wurden direkt nach dem Scratch (0 Stunden) sowie nach 4, 8 und 24 Stunden aufgenommen (Abbildung 22 A). Hierbei wurde die bei 0 Stunden erfasste zellfreie Fläche als 100% gesetzt. In den Astrozytenkulturen beider Genotypen (Wildtyp und β 3-KO) wurde die zellfreie Fläche nach und nach wieder mit Astrozyten besiedelt. Die Astrozyten der β 3-defizienten Mäuse wiesen dabei zu allen Messzeiten eine statistisch signifikant geringere Migration als die Astrozyten des zugehörigen Wildtyps auf (Abbildung 22 A, B). Nach 4 h waren $6,8 \pm 0,3\%$ (34 Scratchanalysen in 3 unabhängigen Kulturen) des Scratches in der Kultur der WT Astrozyten und $5,1 \pm 0,28\%$ (35 Scratchanalysen in 3 unabhängigen Kulturen) in der Kultur der β 3-defizienten Astrozyten wieder bedeckt. Nach 8 h verkleinerte sich die zellfreie Fläche beim WT um $12 \pm 0,57\%$, während beim β 3-KO nur eine Verkleinerung von $9 \pm 0,43\%$ gemessen werden konnte. Nach 24 h zeigte der WT eine Reduktion der zellfreien Fläche von $22,8 \pm 1,06\%$. β 3-KO Astrozyten hatten zu diesem Zeitpunkt allerdings nur $17,6 \pm 1,05\%$ der Fläche wieder besetzt.

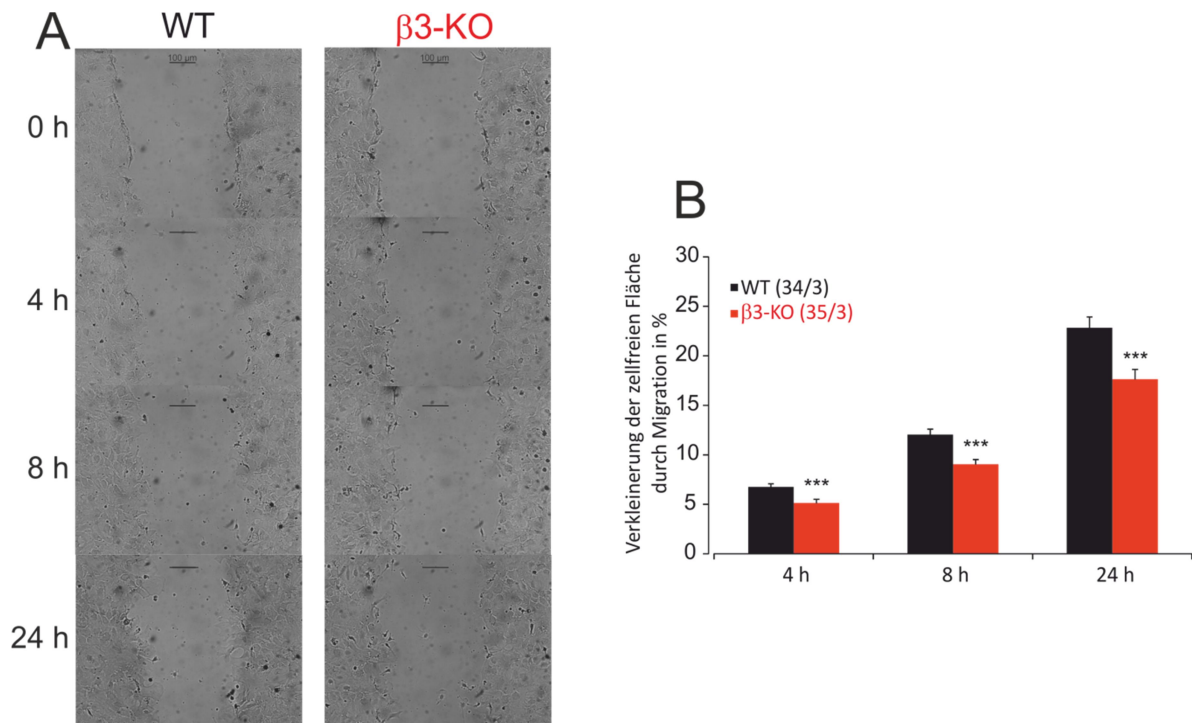


Abbildung 22: **Migration der β3-defizienten Astrozyten im Vergleich zu Astrozyten von Wildtyp Tieren *in vitro*.** (A) Repräsentative Bilder der erzeugten zellfreien Flächen der Wildtyp (WT) und der β3-defizienten (β3-KO) Astrozyten nach 0, 4, 8 und 24 Stunden (h). (B) Darstellung der Verkleinerung der zellfreien Fläche nach Migration in Prozent der WT (schwarz) und β3-KO (rot) Astrozyten nach 4 h, 8 h und 24 h bezogen auf die als 100% gesetzte zellfreie Fläche nach 0 h. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (n: Anzahl der Experimente von x verschiedenen Kulturen (n/x)). Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: *** = p < 0,001.

4.4.3.2 Migration von β2-defizienten Astrozyten

Kortikale Astrozyten aus WT und *ecmβ2*-KO Mäusen wurden auf je 3 Wells einer 6-Well-Platte ausplattiert. Nach Erreichen von Konfluenz, erfolgte die Herstellung einer zellfreien Fläche durch einen Scratch. Es wurden Bilder der gleichen Stelle bei 0, 4, 8 und 24 Stunden aufgenommen (Abbildung 23 A). Zur Auswertung wurde die bei 0 Stunden erfasste zellfreie Fläche als 100% gesetzt. Beide Genotypen zeigten eine kontinuierliche Verkleinerung der erzeugten zellfreien Fläche über die Zeit (Abbildung 23 A). Die β2-defizienten Astrozyten zeigten nach 4 Stunden eine Reduktion der zellfreien Fläche um $6,9 \pm 0,39\%$ (34 Scratchanalysen in 3 unabhängigen Kulturen), während der zugehörige WT eine Reduktion von $7,7 \pm 0,35$ (36 Scratchanalysen in 3 unabhängigen Kulturen) aufwies. Nach 8 h waren beim β2-KO $11,9 \pm 0,5\%$ der zellfreien Fläche wieder bedeckt und beim WT $14 \pm 0,47\%$. Nach einem Tag (24 h) betrug die Verkleinerung der zellfreien Fläche $22 \pm 1\%$ bei β2-defizienten Astrozyten. Beim WT hingegen waren $29 \pm 1,32\%$ der Fläche mit Astrozyten

besiedelt. Somit konnte bei allen Messzeiten eine verminderte Migration der Astrozyten aus $\beta 2$ -defizienten Mäusen festgestellt werden. Diese war nach 8 und 24 Stunden statistisch signifikant reduziert (Abbildung 23 B).

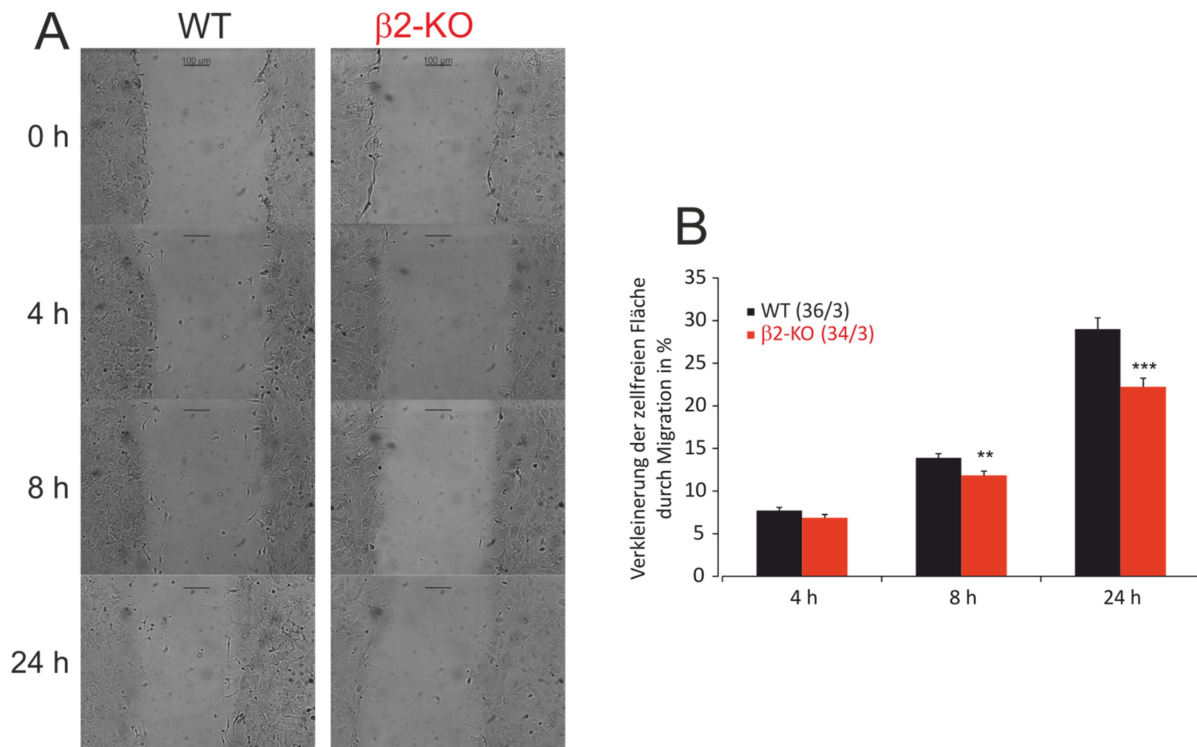


Abbildung 23: **Migration der $\beta 2$ -defizienten Astrozyten im Vergleich zu Astrozyten von Wildtyp Tieren *in vitro*.** (A) Repräsentative Bilder der erzeugten zellfreien Flächen der Wildtyp (WT) und der $\beta 2$ -defizienten ($\beta 2$ -KO) Astrozyten nach 0, 4, 8 und 24 Stunden (h) (B) Darstellung der Verkleinerung der zellfreien Fläche durch Migration in Prozent der WT (schwarz) und $\beta 2$ -defizienten Astrozyten (rot) nach 4 h, 8 h und 24 h. Hierbei wurde die zellfreie Fläche nach 0 h als 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n: Anzahl der Experimente von x verschiedenen Kulturen (n/x)). Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Somit weisen sowohl $\beta 3$ - als auch $\beta 2$ -defiziente Astrozyten eine signifikant reduzierte Migrationsrate im Scratch Assay auf (Abbildung 22 und Abbildung 23).

4.4.4 Stich-Wunden Experiment, durchgeführt von Dr. Thabet Belkacemi

Als nächstes wurde die Rolle von $\beta 3$ -Untereinheiten von CaVs in der Entstehung von Astrogliose nach Verletzungen im Gehirn von Labormäusen *in vivo* untersucht. Die Durchführung des Experiments erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben: Drei Tage nach dem Zufügen der Stichverletzung am Gehirn, wurden die Mäuse getötet, die Gehirne in 4% PFA fixiert und 35 μ m dicke coronale Schnitte aus der verletzten Hirnregion angefertigt. Die

Schnitte wurden anschließend mit einem Antikörper gegen GFAP inkubiert und die GFAP-positiven Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper sichtbar gemacht (siehe 3.7).

Die β 3-KO Mäuse zeigten einen statistisch signifikant größeren GFAP-positiven Bereich um die Stichverletzung herum im Vergleich zum WT (Abbildung 24 A, C). Die Analyse der GFAP-abhängigen Fluoreszenzintensität gemessen an gleich großen Rechtecken entlang des verletzten Kortex (normalisiert zur Gegenseite), ergab ebenfalls statistisch signifikant höhere Werte bei β 3-KO Mäusen im Vergleich zum WT (Abbildung 24 B). Das entstandene Ödem (gemessene Kortexdicke der verletzten Seite, normalisiert zur kontralateralen Seite), war bei β 3-defizienten Mäusen allerdings signifikant geringer als bei Wildtyp Mäusen (Abbildung 24 D).

Das heißt, dass in β 3-defizienten Mäusen die Astrogliose nach einer Stichverletzung in der Großhirnrinde von Maus signifikant stärker ausgeprägt ist, als bei den korrespondierenden Wildtyp Mäusen. Im Gegensatz dazu ist die Entzündungsreaktion, die an der Ausdehnung des Kortex zu erkennen ist, deutlich geringer ausgeprägt wenn die Mäuse keine β 3-Untereinheit spannungsaktivierter Ca^{2+} Kanäle besitzen.

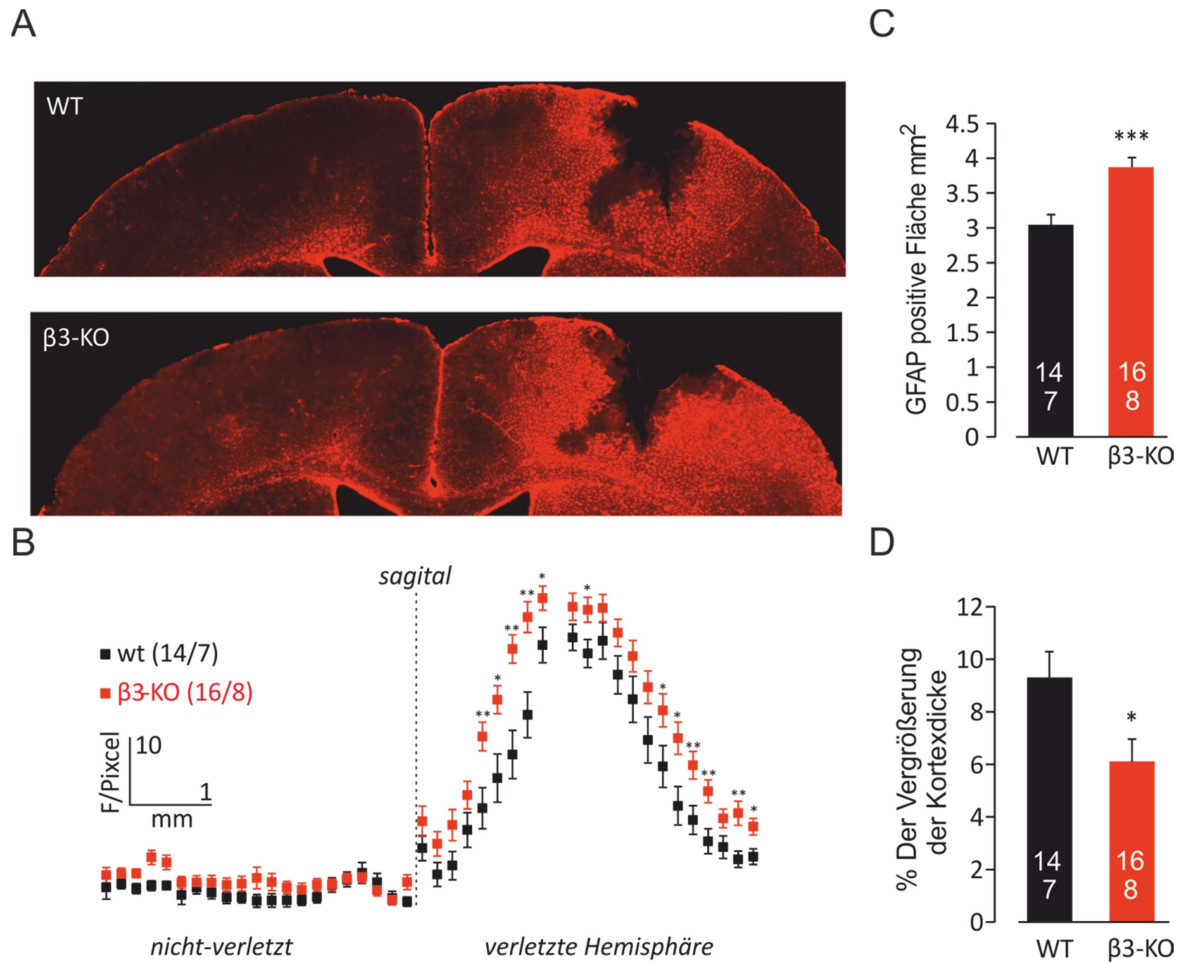


Abbildung 24: **Stichwunden Versuch.** **(A)** Repräsentative Aufnahmen eines Hirnschnittes einer Wildtyp (WT, oben) und einer β 3-defizienten (β 3-KO, unten) Maus mit den jeweils erzeugten Wunden. Zu sehen ist die Verteilung der GFAP-positiven reaktiven Astrozyten. **(C)** Jeweilige GFAP-positive Fläche in WT und β 3-KO Hirnschnitten in mm². **(B)** Verteilung der reaktiven Astrozyten in WT und in β 3-KO Schnitten entlang des Kortex. **(D)** Prozentuale Vergrößerung der Kortexdicke nach dem Zufügen der Stichverletzung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 7 WT Mäusen (14 Schnitte) und von 8 β 3-KO Mäusen (16 Schnitte). Die Sternchen repräsentieren das Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Verwendung der Graphiken mit freundlicher Genehmigung von Dr. Thabet Belkacemi, der die Experimente und deren Analyse durchgeführt hat.

5 Diskussion

5.1 Homogenität der Astrozytenkultur aus dem Kortex von Maus

Da die in dieser Arbeit verwendeten Kulturen Primärkulturen sind, können bei der Entnahme der Zellen aus der Hirnrinde außer den Astrozyten auch andere Zellen in die Kultur gelangen. Hierbei kommen vor allem Mikroglia, Oligodendrozyten und Neuronen als kontaminierende Zellen infrage. Das Nährmedium schafft jedoch einen selektiven Vorteil für die Gliazellen, sodass es zum Absterben der Neurone in der Astrozytenkultur innerhalb der ersten Tage kommt (Schildge et al., 2013). Zudem kann die Kultur durch unzureichendes Entfernen der Hirnhäute durch Fibroblasten verunreinigt werden (Schildge et al., 2013). Die Reinheit der Astrozytenkultur wurde mittels Immunhistochemie überprüft. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Identifikation der Astrozyten über die positive Markierung mit einem Antikörper (anti-GFAP), der das Astrozyten-spezifische saure Gliafaserprotein erkennt (GFAP). Neben GFAP sind auch andere zur Identifikation von Astrozyten geeignete Marker, wie der Astrozyten-spezifische Glutamat-Aspartat Transporter (GLAST), beschrieben (Jungblut et al., 2012; Mori et al., 2006). GLAST befindet sich im Gegensatz zum GFAP nicht im Zytosol, sondern an der Zellmembran, wird extrazellulär von Antikörpern erkannt und ermöglicht das Sortieren von lebenden Astrozyten (Jungblut et al., 2012) mit Hilfe dieser Antikörper. In unserem Labor (Belkacemi, 2016) sowie in anderen Arbeiten (Jungblut et al., 2012; Shimada et al., 2012) konnte eine gleichwertige Eignung von GFAP und GLAST als Marker zur Identifikation kultivierter Astrozyten festgestellt werden.

Die Bestimmung des prozentualen Anteils der Astrozyten ergab eine hohe Reinheit der Astrozytenkultur von ~90% (siehe 4.1), vergleichbar mit anderen Arbeiten und den in unserem Labor etablierten kortikalen Astrozytenkulturen (Akita and Okada, 2011; Belkacemi, 2016). Somit wurde eine ähnliche Qualität der Kulturen erreicht und es konnte in der vorliegenden Arbeit auf den in unserem Labor erhobenen Ergebnissen aufgebaut werden. Die Qualität der Kulturen war für die Experimente des Proliferations Assay, Scratch Assay und Kalzium-Imaging ausreichend und konnte z.B. beim Kalzium-Imaging durch Auswahl der Astrozyten nach morphologischen Kriterien gesteigert werden. Für RT-PCR und vor allem RNA-Sequenzierung reicht die Reinheit der Kultur nicht aus, daher basieren die dieser Arbeit zugrunde liegenden Transkriptom-Analysen auf Glast-markierten FACS-sortierten Astrozyten (Belkacemi, 2016).

5.2 Die Rolle von TRPC1 und TRPC3 und TRPC4 in kortikalen Astrozyten von Maus.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von Ca^{2+} -Imaging und dem TRPC4 Agonisten Englerin A (EgA) gezeigt werden, dass funktionelle TRPC4 Kanäle in den kortikalen Astrozyten vorhanden sind (Abbildung 17). Die Ergebnisse waren jedoch sehr variabel, denn nur in jeweils 3 von 7 Experimenten reagierten die Astrozyten mit einem zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg auf die Zugabe von Englerin A. EgA agiert auch als Agonist von TRPC5 (Akbulut et al., 2015). Da TRPC5 in den Astrozyten weder über RT-PCR noch in der RNA Sequenzierung nachweisbar war (Belkacemi, 2016; Belkacemi et al., 2017), wurde keine Reaktion TRPC4-defizienter Astrozyten auf die Zugabe von EgA in den Ca^{2+} -Imaging Experimenten erwartet. Nichtsdestotrotz konnte in 5 von 115 gemessenen Zellen ein EgA-induzierter zytosolischer Ca^{2+} -Anstieg detektiert werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den verwendeten Kulturen nicht um reine Astrozytenkulturen handelt (siehe 5.1). Neben Astrozyten können sich z.B. auch Mikroglia und Oligodendrozyten in den Kulturen befinden. So konnte für Mikroglia eine Expression von TRPC4 beschrieben werden (Belkacemi et al., 2017), während Oligodendrozyten TRPC4 aber auch TRPC5 exprimieren können (Paez et al., 2011). Es könnte demnach sein, dass es sich bei den auf EgA-reagierenden Zellen (5 reagierende Zellen von 115 gemessenen Zellen) nicht um TRPC4-defiziente Astrozyten, sondern um z.B. Mikroglia oder Oligodendrozyten handelte, die bei der Auswahl der „regions of interest“ (ROIs) markiert wurden.

Die Expression von TRPC4 im Kortex von Maus ist bisher wenig erforscht. Jedoch beschreiben Forschungsgruppen die Expression von TRPC4 in Astrozyten in anderen Hirnregionen: So gelangen Ronco et al. der Nachweis der Expression von TRPC4 in Astrozyten des Hippocampus der Ratte und Song et al. konnten TRPC4 in fetalen humanen Astrozyten nachweisen (Ronco et al., 2014; Song et al., 2005). In unserem Labor ergab eine Transkriptomanalyse von mit fluorescence-activated cell sorting (FACS) sortierten Astrozyten keinen positiven Nachweis von mRNA für TRPC4 (Belkacemi, 2016), während mit Hilfe der RT-PCR in 11 von 13 Fällen Transkripte von TRPC4 in GLAST-positiven Astrozyten des Kortex nachgewiesen werden konnten (Belkacemi et al., 2017). Der fehlende positive Nachweis von TRPC4 im Transkriptom spricht für eine sehr geringe Menge an vorhandener mRNA zum Zeitpunkt der Messung in den Astrozyten. Die Variabilität der Ergebnisse des Ca^{2+} -Imaging Experiments (EgA-induzierte Ca^{2+} -Signale in jeweils 3 von 7 Experimenten) sowie die Reaktion von $\sim 2/3$ ($65 \pm 15,6\%$) der Astrozyten von WT Mäusen auf die Zugabe von EgA, führt zur Annahme, dass nicht alle Astrozyten funktionelle TRPC4 Kanäle

exprimieren. Malarkey et al. beschreiben eine altersabhängige Zunahme der Expression von TRPC4 in Astrozyten des visuellen Kortex der Ratte. So exprimierten aus 24 Stunden alten Ratten gewonnene Astrozyten nur zu 7% TRPC4, während aus 8 Tagen alten Ratten gewonnene Astrozyten zu 56% und aus 55 Tage alten Ratten gewonnene Astrozyten zu 97% TRPC4 exprimierten (Malarkey et al., 2008). Eine entsprechende altersabhängige Zunahme ist auch für die Astrozyten des Kortex von Maus denkbar, sodass eine Wiederholung der Experimente mit aus älteren Mäusen gewonnenen Astrozyten möglicherweise interessant wäre.

In Astrozyten mit *Trpc1*-Defizienz konnte im Zytosol nach Zugabe von EgA eine signifikant erhöhte maximale Ca^{2+} -Amplitude sowie eine signifikant größere Fläche unterhalb der Kurve (AUC) des Ca^{2+} Signals im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (siehe Abbildung 17). In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise darauf, dass TRPC4 und TRPC1 funktionelle heterotetramere Ionenkanäle bilden können, wobei die Anwesenheit von TRPC1 die Ca^{2+} Permeabilität von TRPC4 signifikant reduziert (Ko et al., 2017; Storch et al., 2012). Die vorliegenden Ergebnisse führen zur Annahme, dass TRPC4 in Astrozyten, neben homotetrameren Kanälen, auch in der Lage ist heterotetramere Kanäle mit TRPC1 zu bilden, wobei TRPC1 eine hemmende Funktion im heterotetrameren TRPC1/TRPC4 Kanal auf den Kalziumeinstrom in die Astrozyten hat.

Auch TRPC1 und TRPC3 konnten funktionell in Astrozyten nachgewiesen werden. Die Proteine nehmen Einfluss auf die zytosolische Kalziumkonzentration von Astrozyten und können durch verschiedene Moleküle, wie Bradykinin (Akita and Okada, 2011), ATP (Malarkey et al., 2008), Thrombin (Shirakawa et al., 2010), DAG (Grimaldi et al., 2003) oder OAG (Belkacemi et al., 2017) aktiviert werden. Es wird angenommen, dass TRPC1 und TRPC3 heterotetramere Kanäle bilden (Lintschinger et al., 2000; Schaefer, 2005; Wang et al., 2016; Woo et al., 2014). Auch hier scheint TRPC1 mit TRPC3 zu interagieren und den Ca^{2+} -Einstrom zu modulieren. So konnten in TRPC1-KO Astrozyten im Vergleich zum WT erhöhte OAG-induzierte Ca^{2+} -Signale gemessen werden, während Astrozyten des TRPC3-KOs verminderte Ca^{2+} -Signale aufwiesen (Belkacemi et al., 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Astrozyten aus TRPC3-KO Mäusen eine geringere Proliferationsrate im Vergleich zum WT aufweisen (siehe Abbildung 13). Daher scheint der durch TRPC3 vermittelte Ca^{2+} -Einstrom eine wichtige Rolle für die Proliferation der Astrozyten zu spielen. Astrozyten der Moonwalker (MWK) Maus weisen im TRPC3 Gen eine Punktmutation (T635A) auf, die zu einer erhöhten Öffnungsfrequenz des TRPC3 Kanals mit einem erhöhten basalen zytosolischen Ca^{2+} -Level führt. Auch in TRPC1-defizienten

Astrozyten sind erhöhte Ca^{2+} -Signale beschrieben (Belkacemi et al., 2017). Jedoch konnte jeweils kein Unterschied der Proliferation im Vergleich zum WT festgestellt werden (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15).

Die wichtige Rolle von erhöhten Kalziumkonzentrationen im Prozess der Proliferation ist in der Literatur unumstritten (Borowiec et al., 2014; Capiod, 2013; Durham and Walton, 1982; Mignen et al., 2005). Des Weiteren wird TRPC3 in der Literatur eine wichtige Rolle im Prozess der Proliferation zugeschrieben. Die Ergebnisse des Proliferations Assays der TRPC3-defizienten Astrozyten passen zu den Erkenntnissen von Shirakawa et al. (2010). Die Gruppe um Shirakawa beschrieb eine Thrombin-induzierte vermehrte Proliferation von Astrozyten durch TRPC3-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom (Shirakawa et al., 2010). Ein positiver Einfluss von TRPC3 auf die Proliferation wurde auch in anderen Zellen, wie z.B. in einer humanen Ovarialkarzinomzelllinie (SKOV3), beschrieben. Hier konnte nach Verminderung der Expression von TRPC3 Transkripten eine verminderte Proliferation festgestellt werden. Als Ursache wurde ebenfalls ein reduzierter TRPC3 vermittelter Ca^{2+} -Einstrom angenommen (Yang et al., 2009). Jedoch scheinen erhöhte TRPC3 abhängige zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen die Proliferation kortikaler Astrozyten nicht zu verstärken, denn weder Astrozyten der MWK noch der TRPC1-defizienten Mäuse wiesen in der vorliegenden Arbeit eine veränderte Proliferation auf.

Unabhängig davon wird von verschiedenen Forschungsgruppen eine verminderte Proliferation in TRPC1-defizienten Zellen beschrieben. Hierbei wurde für TRPC1 eine Rolle im store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) angenommen. (Chen et al., 2015; El Hiani et al., 2009; Tajeddine and Gailly, 2012). In kortikalen Astrozyten konnte jedoch gezeigt werden, dass TRPC1 nicht am SOCE beteiligt ist (Belkacemi et al., 2017).

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Astrozyten, isoliert aus MWK Mäusen, eine höhere Migrationsrate im Scratch Assay im Vergleich zum WT aufweisen (siehe Abbildung 16). In unserem Labor wurde zudem eine höhere Migrationsrate von TRPC1-defizienten Astrozyten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt, während Astrozyten aus TRPC3-KO Mäusen eine verminderte Migrationsrate zeigten (Belkacemi et al., 2017). Die Migration kortikaler Astrozyten scheint im Einklang mit der Literatur ebenfalls abhängig von dem über TRPC3 Kanäle vermittelten Ca^{2+} -Einstrom zu sein.

In der Literatur wird transient erhöhten zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentrationen eine Rolle in der Migration zugeschrieben (Deliot and Constantin, 2015; Tsai et al., 2015; Yamada et al., 2019). TRPC3 kann zu einer solchen transienten Erhöhung führen. So konnte bei Patienten

mit Hypertonie eine erhöhte Expression von TRPC3 Kanälen mit einer erhöhten Migrationsrate von Monozyten festgestellt werden (Zhao et al., 2012). Des Weiteren führt eine Blockade von TRPC3 mit Pyr3 zu einer verminderter Migrationsrate von Glioblastomzellen (Chang et al., 2018). Hierbei ist zu beachten, dass Pyr3 außer TRPC3 auch Orai1 und somit den store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) blockieren kann (Schleifer et al., 2012). Die verminderte Migrationsrate der Glioblastomzellen könnte daher auch auf die Blockade des SOCE zurückzuführen sein. TRPC3 ist in Astrozyten jedoch nicht am SOCE beteiligt (Belkacemi et al., 2017).

Im Gegensatz zu der Proliferation war die Migration bei transientem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in den Astrozyten der TRPC1-KO und MWK Mäuse erhöht, konnte also durch zusätzliches Ca^{2+} gesteigert werden. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Gn11-Zellen beobachtet werden. Hier konnte eine erhöhte basale Ca^{2+} -Konzentration in TRPC1-KO Zellen im Vergleich zum WT festgestellt werden. Im Vergleich zum WT wies der TRPC1-KO ebenfalls eine vermehrte Migration auf, während die Proliferation keine Veränderung aufwies (Storch et al., 2012). Migration und Proliferation scheinen also durch verschiedene Signalwege in der Zelle reguliert zu sein.

Das Scratch Assay stellt ein *in vitro* Modell für die Wundheilung dar. Durch den Scratch wird eine zellfreie Fläche (Wunde) erzeugt. Bei einer Wunde im ZNS kommt es zur Extension, Migration und Proliferation der Astrozyten in die erzeugte Wunde (Wundheilung) (Környei et al., 2000; Zhan et al., 2017). *In vitro* wird diese Wundheilung (erhöhte Migrationsrate, s.o.) möglicherweise durch einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom über den TRPC3 Kanal verbessert. Ein *in vivo* verwendetes Experiment zur Wundheilung ist der Stichwunden Versuch. Nach Verletzung des Gehirns kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit Ödembildung sowie zur Astroglie, einem reaktiven Status der Astrozyten mit vermehrter Proliferation, Hypertrophie und Migration bis hin zur Entstehung einer Glianarbe (Silver and Miller, 2004; Sofroniew, 2009). Diese kann protektive aber auch negative Auswirkungen, wie z.B. eine Hemmung der Regeneration von Axonen, aufs Nervengewebe haben (Myer et al., 2006; Silver and Miller, 2004). In den reaktiven Astrozyten kommt es zu einer vermehrten Expression von GFAP, die daher auch als Maß von Astroglie verwendet werden kann.

Belkacemi et al. 2017 konnte zeigen, dass Astroglie und Ödembildung (Vergrößerung der Kortexdicke) in TRPC3-defizienten Mäusen reduziert und in TRPC1-defizienten Mäusen im Vergleich zum WT erhöht war. Der Ca^{2+} -Einstrom über TRPC3 scheint demnach an der Astroglie und Ödembildung beteiligt zu sein (Belkacemi et al., 2017). Die Erkenntnisse aus dem *in vivo* Experiment stehen im Einklang mit den *in vitro* Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und führen zur Annahme, dass TRPC3 in kortikalen Astrozyten von Maus eine

wichtige Rolle im Prozess der Wundheilung spielt, wobei die Wundheilung scheinbar langsamer abläuft, wenn der Ca^{2+} -Einstrom über TRPC3 reduziert ist.

5.3 Rolle von $\text{CaV}\beta 2$ und $\text{CaV}\beta 3$ in kortikalen Astrozyten.

Das Vorkommen von spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanälen (CaVs) in Astrozyten sowie deren Einfluss auf den Kalziumhaushalt, konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Belkacemi, 2016; D'Ascenzo et al., 2004; Daschil et al., 2013; Latour et al., 2003). Die physiologischen Eigenschaften dieser HVA-Kanäle können durch β -Untereinheiten moduliert werden (Dolphin, 2006). So gelang in unserem Labor der Nachweis eines reduzierten spannungsaktivierten Ca^{2+} -Einstroms in $\beta 2$ -defizienten kortikalen Astrozyten im Vergleich zu Astrozyten des WT (siehe Abbildung 18 C). In $\beta 3$ -defizienten kortikalen Astrozyten konnte hingegen kein Einfluss auf den spannungsaktivierten Ca^{2+} -Einstrom festgestellt werden (siehe Abbildung 18 B) (Belkacemi, 2016).

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Astrozyten aus $\beta 3$ -KO Mäusen eine erhöhte Anzahl an spontanen Ca^{2+} -Oszillationen im Vergleich zum WT aufweisen (Abbildung 19). Der fehlende Einfluss der $\beta 3$ -Untereinheit auf den Ca^{2+} -Einstrom von CaVs sowie die in dieser Arbeit gemessene erhöhte Anzahl spontaner Ca^{2+} -Oszillationen weisen auf eine CaV-unabhängige Funktion der $\beta 3$ -Untereinheit in Astrozyten hin.

CaV-unabhängige Funktionen der $\beta 3$ -Untereinheit konnten schon in anderen Zellen festgestellt werden. In β -Zellen des Pankreas wurden in $\beta 3$ -/- Mäusen vermehrte Glukose induzierte Oszillationen im Vergleich zum WT beschrieben. Hierbei wurde angenommen, dass die $\beta 3$ -Untereinheit Cav-unabhängig die Bildung von IP_3 vermindert und, dass dadurch der IP_3 -abhängige Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER negativ beeinflusst wird (Berggren et al., 2004). Belkacemi, A et al. konnten in verschiedenen Zelltypen (HEK, Cos-7 und Fibroblasten) zeigen, dass die $\beta 3$ -Untereinheit mit der Bindung von IP_3 am IP_3 Rezeptor kompetiert und dadurch den IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER vermindert (Belkacemi et al., 2018). Ein solcher Mechanismus wäre auch in den Astrozyten denkbar. Zusammenfassend sind $\text{CaV}\beta 2$ und $\text{CaV}\beta 3$ an Ca^{2+} -Signalen in kortikalen Astrozyten beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Migration in $\beta 2$ - und $\beta 3$ -defizienten Astrozyten reduziert war, während die Proliferation nicht verändert war. Ein

Einfluss auf die Migration und Proliferation von durch CaVs vermittelten Kalziumsignalen in Astrozyten ist bekannt. So konnten Cheli et al. verminderte Ca^{2+} -Signale in CaV1.2 defizienten Astrozyten feststellen. Im Scratch Assay konnte die Gruppe um Cheli eine reduzierte Migration der CaV1.2-KO Astrozyten nachweisen (Cheli et al., 2016). Analog zu den Erkenntnissen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten TRPC Versuche, scheint der reduzierte Ca^{2+} -Einstrom in den $\beta 2^{-/-}$ Astrozyten die Migration kortikaler Astrozyten zu beeinflussen. Im Gegensatz zu $\beta 2^{-/-}$ Astrozyten zeigten CaV1.2-KO Astrozyten auch eine verminderte Proliferation. Einerseits kann dies durch das unterschiedliche Ausmaß an reduziertem Ca^{2+} -Einstrom (-40% $\beta 2^{-/-}$, -85% CaV1.2-KO) in die Astrozyten erklärt werden (Belkacemi, 2016; Cheli et al., 2016). Andererseits wird die Proliferation in der Arbeit von Cheli et al. nach dem erzeugten Scratch, also von reaktiven Astrozyten, gemessen (Cheli et al., 2016), während in der vorliegenden Arbeit die Proliferation von Astrozyten gemessen wird, die nicht durch einen Scratch in der Kultur reaktiv waren. Zur Messung der Proliferation verwendeten Cheli et al. den immunhistochemischen Proliferations-Marker Ki-67. Ki-67 ist ein Protein, welches in allen aktiven (proliferierenden) Phasen des Zellzyklus, aber nicht in ruhenden (nicht proliferierenden Zellen) vertreten ist und sich daher gut als Marker der sich im Proliferationsprozess befindlicher Zellen eignet (Scholzen and Gerdes, 2000). Ein unterschiedliches proliferatives Verhalten von nicht-reaktiven und reaktiven Astrozyten wäre denkbar. Daher wäre eine Wiederholung des Proliferations Assays von reaktiven $\beta 2^{-/-}$ Astrozyten möglicherweise interessant.

Trotz einer erhöhten Anzahl gemessener spontaner Ca^{2+} -Oszillationen in $\beta 3$ -defizienten Astrozyten (siehe 4.4.1), ergaben *in vitro* Migrations Assays der $\beta 3$ -defizienten Astrozyten keine vermehrte, sondern eine verminderte Migration der Astrozyten (siehe 4.4.3.1). Hierbei muss beachtet werden, dass die in den Zellen entstehenden Ca^{2+} -Signale räumlich, zeitlich und in ihrer Amplitude variieren können und so Prozesse der Zellen unterschiedlich beeinflusst werden können (Bootman et al., 2001). Eine erhöhte Frequenz und Amplitude von Ca^{2+} -Oszillationen in Körnerzellen konnte zum Beispiel mit einer erhöhten Migrationsgeschwindigkeit der Körnerzellen in Verbindung gebracht werden (Komuro and Rakic, 1996). In Neuronen lösten jedoch spontane Ca^{2+} -Oszillationen in den Wachstumskegeln der Axone eine verminderte Migrationsrate der Neurone aus (Gomez et al., 1995). Der Einfluss von Ca^{2+} -Oszillationen auf die Migrationsrate von Zellen kann daher sowohl Kontext- als auch Zell-spezifisch sein (Rondé et al., 2000).

Wie in 5.2 beschrieben ist das Scratch Assay ein *in vitro* Modell für die Wundheilung. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete *in vitro* Experiment zur Beurteilung der Wundheilung ist der Stichwunden Versuch. Es konnte gezeigt werden, dass die Astrogliose (Anzahl der reaktiven Astrozyten) nach einer experimentellen Stichverletzung im Kortex von Maus *in vivo* bei $\beta 3$ -KO Mäusen stärker ausfiel. Die Ödembildung im Kortex als Maß für die entstandene Entzündung war jedoch reduziert (siehe Abbildung 24).

Dieses Ergebnis steht auf den ersten Blick nicht in Einklang mit dem Ergebnis des *in vitro* Scratch Assays. Hierbei müssen die unterschiedlichen Bedingungen von *in vitro* und *in vivo* Versuchen sowie das unterschiedliche Alter der Versuchstiere und ein möglicher Einfluss anderer Zellen auf die Astrozyten in Betracht gezogen werden. Dies könnte z.B. zu einer veränderten Frequenz und Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen kortikaler Astrozyten mit einer Variation anschließender zellulärer Prozesse, wie Migration und Proliferation, führen. Zur weiteren Klärung dieser Hypothese sind weitere Versuche denkbar. Zum Beispiel könnte eine Messung von Ca^{2+} -Oszillationen kortikaler Astrozyten *in vivo* mit Hilfe von z.B. genetisch codierten Kalzium Indikatoren (GECIs) (Srinivasan et al., 2015) und anschließendem Vergleich zu der Frequenz und Amplitude von Ca^{2+} -Oszillationen kortikaler Astrozyten *in vitro* durchgeführt werden.

Zudem sind an der Entstehung der Astrogliose verschiedene Prozesse, wie z.B. eine veränderte Gen-Expression, Migration, Proliferation und Hypertrophie beteiligt (Silver and Miller, 2004; Sofroniew, 2009). Eine weitere Erforschung der *in vitro* Proliferation von reaktiven Astrozyten mit Hilfe des immunhistochemischen Proliferations-Markers Ki-67 wäre somit auch bei den Astrozyten mit $\beta 3$ -Defizienz interessant. Eine vermehrte Proliferation bei reaktiven Astrozyten könnte die vermehrte *in vivo* gemessene Astrogliose in Astrozyten mit $\beta 3$ -Defizienz eventuell erklären.

Nichtsdestotrotz scheint die $\text{CaV}\beta 3$ -Untereinheit *in vitro* wie *in vivo* einen CaV -unabhängigen Einfluss auf den Kalziumhaushalt und die Wundheilung von kortikalen Astrozyten zu haben.

In diesem Zusammenhang konnten Belkacemi, A et al. zeigen, dass $\text{CaV}\beta 3$ in Fibroblasten an der Wundheilung nach Verletzungen der Haut von Mäusen beteiligt ist. Hierbei konnte ein verminderter IP_3 -abhängiger Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER durch Konkurrenz von $\text{CaV}\beta 3$ mit IP_3 um die Bindung am IP_3 Rezeptor nachgewiesen werden. Die Wundheilung der Haut lief schneller in Fibroblasten mit $\beta 3$ -Defizienz ab (Belkacemi et al., 2018). Kanemaru et al. beschreiben eine wichtige Rolle von IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Signalen in Astrozyten nach Verletzungen des Neokortex in Bezug auf die Entstehung von Astrogliose. So konnte in IP_3 -Rezeptor-2-defizienten Astrozyten eine verminderte Astrogliose im Vergleich zur Kontrolle

festgestellt werden (Kanemaru et al., 2013). Diese Ergebnisse passen zu der Annahme, dass auch in Astrozyten CaV β 3 eine CaV-unabhängige Funktion hat. Hier könnte es z.B. durch Bindung an den IP $_3$ -Rezeptor zu einem verminderten Ca $^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER kommen. Folglich wäre in CaV β 3-defizienten Astrozyten eine vermehrte Bindung von IP $_3$ an den IP $_3$ -Rezeptor mit daraus resultierendem vermehrten Ca $^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER denkbar.

Nach Verletzungen des Gehirns kommt es unter anderem durch Verletzung der Blutschranke, Freisetzung von Molekülen, reaktiver Astroglie und infiltrierenden Leukozyten zu einer Entzündungsreaktion (Ödem) (Bush et al., 1999; Sofroniew, 2009). Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Stichwunden Versuchs der Astrozyten mit genveränderten TRPC-Kanälen, in denen reduzierte TRPC3-abhängige Ca $^{2+}$ -Signale zu einer Reduzierung des nach der Stichwunde entstandenen Ödems führen, kommt es bei CaV β 3-defizienten Astrozyten bei vermehrten Ca $^{2+}$ -Oszillationen ebenfalls zu einem verminderten Ödem.

Hierbei muss in Betracht gezogen werden, dass an einer Entzündungsreaktion (Ödem) nicht nur Astrozyten, sondern auch weitere Zelltypen, z.B. Leukozyten und Monozyten, beteiligt sind (Burda and Sofroniew, 2014). Die jeweiligen in dieser Arbeit verwendeten Knock-outs der verschiedenen TRPC-Kanäle und CaV β -Untereinheiten sind nicht Astrozyten-spezifisch, sondern betreffen auch andere im Kortex vorkommende Zellen mit unterschiedlicher Auswirkung auf deren Ca $^{2+}$ -abhängige zelluläre Prozesse. So kommt es in Monozyten bei Überexpression von TRPC3 mit vermehrtem transmembranen Ca $^{2+}$ -Einstrom zu einer erhöhten Migrationsrate (Zhao et al., 2012), während in Leukozyten eine Verminderung des Ca $^{2+}$ -Ausstroms aus dem ER zu einer vermehrten Infiltration in das Verletzungsareal einer zugeführten Stichwunde im Hirn führt (Kanemaru et al., 2013).

Die Interpretation der Ergebnisse ist schwierig, da die Entstehung des Ödems multifaktoriell bedingt ist. Um den Einfluss der Astrozyten auf die Entstehung eines Ödems nach zugeführter Verletzung des Kortex besser erforschen zu können, wäre die Durchführung des Stichwunden Versuchs mit Astrozyten-spezifischen Knock-out Mäusen denkbar.

Zusammenfassend konnte ein Einfluss der β 3-Untereinheit auf den Kalziumhaushalt der Astrozyten festgestellt werden. Grundsätzlich ist von einer CaV-unabhängigen Funktion der β 3-Untereinheit in kortikalen Astrozyten auszugehen. Zum weiteren Verständnis der Funktion der β 3-Untereinheit in kortikalen Astrozyten sowie zur Klärung einer möglichen Interaktion mit dem IP $_3$ -Rezeptor wäre der Versuch des Nachweises einer Co-Immünpräzipitation von CaV β 3 und IP $_3$ -Rezeptor interessant.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams, M.E., Myers, R.A., Imperial, J.S., and Olivera, B.M. (1993). Toxotyping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms. *Biochemistry* 32, 12566-12570.
2. Akbulut, Y., Gaunt, H.J., Muraki, K., Ludlow, M.J., Amer, M.S., Bruns, A., Vasudev, N.S., Radtke, L., Willot, M., Hahn, S., *et al.* (2015). (-)-Englerin A is a potent and selective activator of TRPC4 and TRPC5 calcium channels. *Angewandte Chemie (International ed in English)* 54, 3787-3791.
3. Akita, T., and Okada, Y. (2011). Regulation of bradykinin-induced activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels by Ca(2+) nanodomains in mouse astrocytes. *The Journal of physiology* 589, 3909-3927.
4. Alkhani, H., Ase, A.R., Grant, R., O'Donnell, D., Groschner, K., and Seguela, P. (2014). Contribution of TRPC3 to store-operated calcium entry and inflammatory transductions in primary nociceptors. *Mol Pain* 10, 43.
5. Ambudkar, I.S., de Souza, L.B., and Ong, H.L. (2017). TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. *Cell Calcium* 63, 33-39.
6. Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience letters* 0, 23-29.
7. Ariano, P., Dalmazzo, S., Owsianik, G., Nilius, B., and Lovisolo, D. (2011). TRPC channels are involved in calcium-dependent migration and proliferation in immortalized GnRH neurons. *Cell Calcium* 49, 387-394.
8. Balk, S.D. (1971). Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 271-275.
9. Barclay, J., Balaguero, N., Mione, M., Ackerman, S.L., Letts, V.A., Brodbeck, J., Canti, C., Meir, A., Page, K.M., Kusumi, K., *et al.* (2001). Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the *Cacna2d2* gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 21, 6095-6104.
10. Bean, B.P. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 86, 1-30.
11. Beck, A., Gotz, V., Qiao, S., Weissgerber, P., Flockerzi, V., Freichel, M., and Boehm, U. (2017). Functional Characterization of Transient Receptor Potential (TRP) Channel C5 in Female Murine Gonadotropes. *Endocrinology* 158, 887-902.
12. Beck, A., Speicher, T., Stoerger, C., Sell, T., Dettmer, V., Jusoh, S.A., Abdulmughni, A., Cavalié, A., Philipp, S.E., Zhu, M.X., *et al.* (2013). Conserved gating elements in TRPC4 and TRPC5 channels. *The Journal of biological chemistry* 288, 19471-19483.
13. Becker, E.B. (2014). The Moonwalker mouse: new insights into TRPC3 function, cerebellar development, and ataxia. *Cerebellum (London, England)* 13, 628-636.
14. Becker, E.B., Oliver, P.L., Glitsch, M.D., Banks, G.T., Achilli, F., Hardy, A., Nolan, P.M., Fisher, E.M., and Davies, K.E. (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.
15. Belkacemi, A., Hui, X., Wardas, B., Laschke, M.W., Wissenbach, U., Menger, M.D., Lipp, P., Beck, A., and Flockerzi, V. (2018). IP3 Receptor-Dependent Cytoplasmic Ca(2+) Signals Are Tightly Controlled by Cavbeta3. *Cell reports* 22, 1339-1349.
16. Belkacemi, T. (2016). In vitro and in vivo functions of TRPC3, TRPC1 and voltage-gated Ca²⁺ channels (CaVs) in mouse cortical astrocytes. In *Medizinische Fakultät (M*

- Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie: Universität des Saarlandes DOI: 10.22028/D291-22295).
17. Belkacemi, T., Niermann, A., Hofmann, L., Wissenbach, U., Birnbaumer, L., Leidinger, P., Backes, C., Meese, E., Keller, A., Bai, X., *et al.* (2017). TRPC1- and TRPC3-dependent Ca²⁺ signaling in mouse cortical astrocytes affects injury-evoked astrogliosis in vivo. *Glia* 65, 1535-1549.
 18. Berggren, P.O., Yang, S.N., Murakami, M., Efanov, A.M., Uhles, S., Kohler, M., Moede, T., Fernstrom, A., Appelskog, I.B., Aspinwall, C.A., *et al.* (2004). Removal of Ca²⁺ channel beta3 subunit enhances Ca²⁺ oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell* 119, 273-284.
 19. Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Lipp, P. (1998). Calcium - a life and death signal. *Nature* 395, 645.
 20. Beskina, O., Miller, A., Mazzocco-Spezia, A., Pulina, M.V., and Golovina, V.A. (2007). Mechanisms of interleukin-1beta-induced Ca²⁺ signals in mouse cortical astrocytes: roles of store- and receptor-operated Ca²⁺ entry. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1103-1111.
 21. Birnbaumer, L., Campbell, K.P., Catterall, W.A., Harpold, M.M., Hofmann, F., Horne, W.A., Mori, Y., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., *et al.* (1994). The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 13, 505-506.
 22. Bootman, M.D., Lipp, P., and Berridge, M.J. (2001). The organisation and functions of local Ca(2+) signals. *Journal of cell science* 114, 2213-2222.
 23. Borowiec, A.-S., Bidaux, G., Pigat, N., Goffin, V., Bernichtein, S., and Capiod, T. (2014). Calcium channels, external calcium concentration and cell proliferation. *European journal of pharmacology* 739, 19-25.
 24. Broker-Lai, J., Kollwe, A., Schindeldecker, B., Pohle, J., Nguyen Chi, V., Mathar, I., Guzman, R., Schwarz, Y., Lai, A., Weissgerber, P., *et al.* (2017). Heteromeric channels formed by TRPC1, TRPC4 and TRPC5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. *Embo j* 36, 2770-2789.
 25. Burda, J.E., and Sofroniew, M.V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81, 229-248.
 26. Burgess, D.L., Jones, J.M., Meisler, M.H., and Noebels, J.L. (1997). Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell* 88, 385-392.
 27. Burgos, M., Pastor, M.D., Gonzalez, J.C., Martinez-Galan, J.R., Vaquero, C.F., Fradejas, N., Benavides, A., Hernandez-Guijo, J.M., Tranque, P., and Calvo, S. (2007). PKCepsilon upregulates voltage-dependent calcium channels in cultured astrocytes. *Glia* 55, 1437-1448.
 28. Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. *Neuron* 23, 297-308.
 29. Camacho Londono, J.E., Tian, Q., Hammer, K., Schroder, L., Camacho Londono, J., Reil, J.C., He, T., Oberhofer, M., Mannebach, S., Mathar, I., *et al.* (2015). A background Ca²⁺ entry pathway mediated by TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling. *European heart journal* 36, 2257-2266.
 30. Capiod, T. (2013). The need for calcium channels in cell proliferation. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 8, 4-17.
 31. Carson, C., Raman, P., Tullai, J., Xu, L., Henault, M., Thomas, E., Yeola, S., Lao, J., McPate, M., Verkuyl, J.M., *et al.* (2015). Englerin A Agonizes the TRPC4/C5 Cation Channels to Inhibit Tumor Cell Line Proliferation. *PloS one* 10, e0127498.

32. Case, R.M., Eisner, D., Gurney, A., Jones, O., Muallem, S., and Verkhratsky, A. (2007). Evolution of calcium homeostasis: From birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium* 42, 345-350.
33. Catterall, W.A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a003947.
34. Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., and Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57, 411-425.
35. Chang, H.H., Cheng, Y.C., Tsai, W.C., Tsao, M.J., and Chen, Y. (2018). Pyr3 Induces Apoptosis and Inhibits Migration in Human Glioblastoma Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 48, 1694-1702.
36. Cheli, V.T., Santiago Gonzalez, D.A., Smith, J., Spreuer, V., Murphy, G.G., and Paez, P.M. (2016). L-type voltage-operated calcium channels contribute to astrocyte activation In vitro. *Glia* 64, 1396-1415.
37. Chen, H.C., Wang, C.H., Shih, C.P., Chueh, S.H., Liu, S.F., Chen, H.K., and Lin, Y.C. (2015). TRPC1 is required for survival and proliferation of cochlear spiral ganglion stem/progenitor cells. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 79, 2290-2294.
38. Clapham, D.E., Julius, D., Montell, C., and Schultz, G. (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacological Reviews* 57, 427-450.
39. Clapham, D.E., Runnels, L.W., and Strübing, C. (2001). The trp ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 387.
40. Cornec-Le Gall, E., Audrezet, M.P., Le Meur, Y., Chen, J.M., and Ferec, C. (2014). Genetics and pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease: 20 years on. *Human mutation* 35, 1393-1406.
41. Cosens, D.J., and Manning, A. (1969). Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* 224, 285.
42. D'Ascenzo, M., Vairano, M., Andreassi, C., Navarra, P., Azzena, G.B., and Grassi, C. (2004). Electrophysiological and molecular evidence of L-(Cav1), N- (Cav2.2), and R-(Cav2.3) type Ca²⁺ channels in rat cortical astrocytes. *Glia* 45, 354-363.
43. Daschil, N., Obermair, G.J., Flucher, B.E., Stefanova, N., Hutter-Paier, B., Windisch, M., Humpel, C., and Marksteiner, J. (2013). Ca(V)1.2 Calcium Channel Expression in Reactive Astrocytes is associated with the Formation of Amyloid- β Plaques in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 37, 439-451.
44. Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Douglas, L., Nieto-Rostro, M., Bauer, C.S., Pratt, W.S., and Dolphin, A.C. (2010). The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1654-1659.
45. Deliot, N., and Constantin, B. (2015). Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochimica et biophysica acta* 1848, 2512-2522.
46. Dietrich, A., Fahlbusch, M., and Gudermann, T. (2014). Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator? *Cells* 3, 939-962.
47. Dietrich, A., Kalwa, H., Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Salanova, B., Pinkenburg, O., Dubrovska, G., Essin, K., Gollasch, M., Birnbaumer, L., *et al.* (2007). Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch* 455, 465-477.
48. Dolphin, A.C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S56-62.

49. Dolphin, A.C. (2013). The $\alpha 2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828, 1541-1549.
50. Durham, A.C., and Walton, J.M. (1982). Calcium ions and the control of proliferation in normal and cancer cells. *Bioscience reports* 2, 15-30.
51. El Hiani, Y., Ahidouch, A., Lehen'kyi, V., Hague, F., Gouilleux, F., Mentaverri, R., Kamel, S., Lassoued, K., Brule, G., and Ouadid-Ahidouch, H. (2009). Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and TRPC1 channels are required for calcium-sensing receptor-stimulated MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 23, 335-346.
52. Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., *et al.* (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25, 533-535.
53. Fan, D., Grooms, S.Y., Araneda, R.C., Johnson, A.B., Dobrenis, K., Kessler, J.A., and Zukin, R.S. (1999). AMPA receptor protein expression and function in astrocytes cultured from hippocampus. *Journal of neuroscience research* 57, 557-571.
54. Fell, B., Eckrich, S., Blum, K., Eckrich, T., Hecker, D., Obermair, G.J., Munkner, S., Flockerzi, V., Schick, B., and Engel, J. (2016). $\alpha 2\delta 2$ Controls the Function and Trans-Synaptic Coupling of Cav1.3 Channels in Mouse Inner Hair Cells and Is Essential for Normal Hearing. *J Neurosci* 36, 11024-11036.
55. Field, M.J., Cox, P.J., Stott, E., Melrose, H., Offord, J., Su, T.Z., Bramwell, S., Corradini, L., England, S., Winks, J., *et al.* (2006). Identification of the $\alpha 2\delta 1$ subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17537-17542.
56. Flockerzi, V. (2007). An introduction on TRP channels. *Handbook of experimental pharmacology*, 1-19.
57. Flockerzi, V., Oeken, H.-J., Hofmann, F., Pelzer, D., Cavalié, A., and Trautwein, W. (1986). Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* 323, 66.
58. Freichel, M., Suh, S.H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., *et al.* (2001). Lack of an endothelial store-operated Ca^{2+} current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* 3, 121-127.
59. Freichel, M., Tsvilovskyy, V., and Camacho-Londono, J.E. (2014). TRPC4- and TRPC4-containing channels. *Handbook of experimental pharmacology* 222, 85-128.
60. Freise, D., Held, B., Wissenbach, U., Pfeifer, A., Trost, C., Himmerkus, N., Schweig, U., Freichel, M., Biel, M., Hofmann, F., *et al.* (2000). Absence of the gamma subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca^{2+} currents and alters channel inactivation properties. *The Journal of biological chemistry* 275, 14476-14481.
61. Gomez, T.M., Snow, D.M., and Letourneau, P.C. (1995). Characterization of spontaneous calcium transients in nerve growth cones and their effect on growth cone migration. *Neuron* 14, 1233-1246.
62. Gomis, A., Soriano, S., Belmonte, C., and Viana, F. (2008). Hypoosmotic- and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels. *The Journal of physiology* 586, 5633-5649.
63. Goy, J.J., and Fromer, M. (1991). Antiarrhythmic treatment of atrioventricular tachycardias. *Journal of cardiovascular pharmacology* 17 Suppl 6, S36-40.
64. Gregg, R.G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J.A., Coronado, R., *et al.* (1996). Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha

- 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13961-13966.
65. Grimaldi, M., Maratos, M., and Verma, A. (2003). Transient receptor potential channel activation causes a novel form of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and is not involved in capacitative Ca^{2+} entry in glial cells. *J Neurosci* 23, 4737-4745.
66. Gross, S.A., Guzman, G.A., Wissenbach, U., Philipp, S.E., Zhu, M.X., Bruns, D., and Cavalie, A. (2009). TRPC5 is a Ca^{2+} -activated channel functionally coupled to Ca^{2+} -selective ion channels. *The Journal of biological chemistry* 284, 34423-34432.
67. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260, 3440-3450.
68. Harada, M., Luo, X., Qi, X.Y., Tadevosyan, A., Maguy, A., Ordog, B., Ledoux, J., Kato, T., Naud, P., Voigt, N., *et al.* (2012). Transient receptor potential canonical-3 channel-dependent fibroblast regulation in atrial fibrillation. *Circulation* 126, 2051-2064.
69. Hartmann, J., Dragicevic, E., Adelsberger, H., Henning, H.A., Sumser, M., Abramowitz, J., Blum, R., Dietrich, A., Freichel, M., Flockerzi, V., *et al.* (2008). TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron* 59, 392-398.
70. Hermosura, M.C., Cui, A.M., Go, R.C., Davenport, B., Shetler, C.M., Heizer, J.W., Schmitz, C., Mocz, G., Garruto, R.M., and Perraud, A.L. (2008). Altered functional properties of a TRPM2 variant in Guamanian ALS and PD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18029-18034.
71. Heron, S.E., Khosravani, H., Varela, D., Bladen, C., Williams, T.C., Newman, M.R., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Mulley, J.C., and Zamponi, G.W. (2007). Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants. *Annals of neurology* 62, 560-568.
72. Hofmann, F., Belkacemi, A., and Flockerzi, V. (2015). Emerging Alternative Functions for the Auxiliary Subunits of the Voltage-Gated Calcium Channels. *Current molecular pharmacology* 8, 162-168.
73. Hofmann, F., Biel, M., and Flockerzi, V. (1994). Molecular basis for Ca^{2+} channel diversity. *Annual review of neuroscience* 17, 399-418.
74. Hofmann, K., Fiedler, S., Vierkotten, S., Weber, J., Klee, S., Jia, J., Zwickenpflug, W., Flockerzi, V., Storch, U., Yildirim, A.O., *et al.* (2017). Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis. *Biochimica et biophysica acta* 1863, 560-568.
75. Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259-263.
76. Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 7461-7466.
77. Jäkel, S., and Dimou, L. (2017). Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11.
78. James, G., and Butt, A.M. (2002). P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca^{2+} signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *European journal of pharmacology* 447, 247-260.
79. Jeon, D., Song, I., Guido, W., Kim, K., Kim, E., Oh, U., and Shin, H.S. (2008). Ablation of Ca^{2+} channel beta3 subunit leads to enhanced N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long term potentiation and improved long term memory. *The Journal of biological chemistry* 283, 12093-12101.
80. Jungblut, M., Tiveron, M.C., Barral, S., Abrahamsen, B., Knöbel, S., Pennartz, S., Schmitz, J., Perraut, M., Pfrieger, F.W., Stoffel, W., *et al.* (2012). Isolation and

- characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1. *Glia* **60**, 894-907.
81. Kanemaru, K., Kubota, J., Sekiya, H., Hirose, K., Okubo, Y., and Iino, M. (2013). Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 11612-11617.
 82. Katiyar, R., Weissgerber, P., Roth, E., Dorr, J., Sothilingam, V., Garcia Garrido, M., Beck, S.C., Seeliger, M.W., Beck, A., Schmitz, F., *et al.* (2015). Influence of the beta2-Subunit of L-Type Voltage-Gated Cav Channels on the Structural and Functional Development of Photoreceptor Ribbon Synapses. *Investigative ophthalmology & visual science* **56**, 2312-2324.
 83. Kerov, V., Laird, J.G., Joiner, M.L., Knecht, S., Soh, D., Hagen, J., Gardner, S.H., Gutierrez, W., Yoshimatsu, T., Bhattarai, S., *et al.* (2018). alpha2delta-4 Is Required for the Molecular and Structural Organization of Rod and Cone Photoreceptor Synapses. *J Neurosci* **38**, 6145-6160.
 84. Kimelberg, H.K., and Nedergaard, M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* **7**, 338-353.
 85. Kiyonaka, S., Kato, K., Nishida, M., Mio, K., Numaga, T., Sawaguchi, Y., Yoshida, T., Wakamori, M., Mori, E., Numata, T., *et al.* (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.
 86. Ko, J., Myeong, J., Yang, D., and So, I. (2017). Calcium permeability of transient receptor potential canonical (TRPC) 4 channels measured by TRPC4-GCaMP6s. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* **21**, 133-140.
 87. Komuro, H., and Rakic, P. (1996). Intracellular Ca²⁺ Fluctuations Modulate the Rate of Neuronal Migration. *Neuron* **17**, 275-285.
 88. Környei, Z., Czirók, A., Vicsek, T., and Madarász, E. (2000). Proliferative and migratory responses of astrocytes to in vitro injury. *Journal of neuroscience research* **61**, 421-429.
 89. Kurshan, P.T., Oztan, A., and Schwarz, T.L. (2009). Presynaptic alpha2delta-3 is required for synaptic morphogenesis independent of its Ca²⁺-channel functions. *Nature neuroscience* **12**, 1415-1423.
 90. Latour, I., Hamid, J., Beedle, A.M., Zamponi, G.W., and Macvicar, B.A. (2003). Expression of voltage-gated Ca²⁺ channel subtypes in cultured astrocytes. *Glia* **41**, 347-353.
 91. Leypold, B.G., Yu, C.R., Leinders-Zufall, T., Kim, M.M., Zufall, F., and Axel, R. (2002). Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6376-6381.
 92. Li, J., Zhang, X., Song, X., Liu, R., Zhang, J., and Li, Z. (2019). The structure of TRPC ion channels. *Cell Calcium* **80**, 25-28.
 93. Liman, E.R., Corey, D.P., and Dulac, C. (1999). TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5791-5796.
 94. Lintschinger, B., Balzer-Geldsetzer, M., Baskaran, T., Graier, W.F., Romanin, C., Zhu, M.X., and Groschner, K. (2000). Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca²⁺-sensitive cation channels. *The Journal of biological chemistry* **275**, 27799-27805.
 95. Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., and 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.
 96. MacVicar, B.A. (1984). Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science (New York, NY)* **226**, 1345-1347.

97. MacVicar, B.A., and Tse, F.W. (1988). Norepinephrine and cyclic adenosine 3':5'-cyclic monophosphate enhance a nifedipine-sensitive calcium current in cultured rat astrocytes. *Glia* 1, 359-365.
98. Malarkey, E.B., Ni, Y., and Parpura, V. (2008). Ca²⁺ entry through TRPC1 channels contributes to intracellular Ca²⁺ dynamics and consequent glutamate release from rat astrocytes. *Glia* 56, 821-835.
99. McCleskey, E.W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Tsien, R.W., and Yoshikami, D. (1987). Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4327-4331.
100. McQuillin, A., Bass, N.J., Kalsi, G., Lawrence, J., Puri, V., Choudhury, K., Detera-Wadleigh, S.D., Curtis, D., and Gurling, H.M. (2006). Fine mapping of a susceptibility locus for bipolar and genetically related unipolar affective disorders, to a region containing the C21ORF29 and TRPM2 genes on chromosome 21q22.3. *Molecular psychiatry* 11, 134-142.
101. Mignen, O., Brink, C., Enfissi, A., Nadkarni, A., Shuttleworth, T.J., Giovannucci, D.R., and Capiod, T. (2005). Carboxyamidotriazole-induced inhibition of mitochondrial calcium import blocks capacitative calcium entry and cell proliferation in HEK-293 cells. *Journal of cell science* 118, 5615-5623.
102. Miyano, K., Morioka, N., Sugimoto, T., Shiraishi, S., Uezono, Y., and 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. *Neurochemistry International* 57, 923-934.
103. Montell, C., and Rubin, G.M. (1989). Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313-1323.
104. Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kühn, R., and Götz, M. (2006). Inducible gene deletion in astroglia and radial glia—A valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* 54, 21-34.
105. Muller, M.S., Fox, R., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., and Bak, L.K. (2014). Astrocyte glycogenolysis is triggered by store-operated calcium entry and provides metabolic energy for cellular calcium homeostasis. *Glia* 62, 526-534.
106. Murakami, M., Fleischmann, B., De Felipe, C., Freichel, M., Trost, C., Ludwig, A., Wissenbach, U., Schwegler, H., Hofmann, F., Hescheler, J., *et al.* (2002). Pain perception in mice lacking the beta3 subunit of voltage-activated calcium channels. *The Journal of biological chemistry* 277, 40342-40351.
107. Murakami, M., Nakagawasai, O., Yanai, K., Nunoki, K., Tan-No, K., Tadano, T., and Iijima, T. (2007). Modified behavioral characteristics following ablation of the voltage-dependent calcium channel beta3 subunit. *Brain research* 1160, 102-112.
108. Murakami, M., Yamamura, H., Murakami, A., Okamura, T., Nunoki, K., Mitui-Saito, M., Muraki, K., Hano, T., Imaizumi, Y., Flockerzi, T., *et al.* (2000). Conserved smooth muscle contractility and blood pressure increase in response to high-salt diet in mice lacking the beta3 subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Journal of cardiovascular pharmacology* 36 Suppl 2, S69-73.
109. Myer, D.J., Gurkoff, G.G., Lee, S.M., Hovda, D.A., and Sofroniew, M.V. (2006). Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain : a journal of neurology* 129, 2761-2772.
110. Namkung, Y., Smith, S.M., Lee, S.B., Skrypnik, N.V., Kim, H.L., Chin, H., Scheller, R.H., Tsien, R.W., and Shin, H.S. (1998). Targeted disruption of the Ca²⁺ channel beta3 subunit reduces N- and L-type Ca²⁺ channel activity and alters the voltage-dependent activation of P/Q-type Ca²⁺ channels in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12010-12015.

111. Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., *et al.* (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37, 15353-15362.
112. Nilius, B., and Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome biology* 12, 218.
113. Nishiyama, A., Yang, Z., and Butt, A. (2005). Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat* 207, 687-693.
114. Nowycky, M.C., Fox, A.P., and Tsien, R.W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 440.
115. Oda, K., Umemura, M., Nakakaji, R., Tanaka, R., Sato, I., Nagasako, A., Oyamada, C., Baljinnyam, E., Katsumata, M., Xie, L.H., *et al.* (2017). Transient receptor potential cation 3 channel regulates melanoma proliferation and migration. *The journal of physiological sciences : JPS* 67, 497-505.
116. Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., Mori, Y., Ono, K., Iijima, T., and Ito, H. (2007). Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 42, 498-507.
117. Ohmori, I., Ouchida, M., Miki, T., Mimaki, N., Kiyonaka, S., Nishiki, T., Tomizawa, K., Mori, Y., and Matsui, H. (2008). A CACNB4 mutation shows that altered Ca(v)2.1 function may be a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurobiology of disease* 32, 349-354.
118. Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kurosaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., Imoto, K., *et al.* (1999). Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry* 274, 27359-27370.
119. Paez, P.M., Fulton, D., Spreuer, V., Handley, V., and Campagnoni, A.T. (2011). Modulation of canonical transient receptor potential channel 1 in the proliferation of oligodendrocyte precursor cells by the golli products of the myelin basic protein gene. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 3625-3637.
120. Parekh, A.B. (2010). Store-operated CRAC channels: function in health and disease. *Nature reviews Drug discovery* 9, 399-410.
121. Phelan, K.D., Mock, M.M., Kretz, O., Shwe, U.T., Kozhemyakin, M., Greenfield, L.J., Dietrich, A., Birnbaumer, L., Freichel, M., Flockerzi, V., *et al.* (2012). Heteromeric canonical transient receptor potential 1 and 4 channels play a critical role in epileptiform burst firing and seizure-induced neurodegeneration. *Mol Pharmacol* 81, 384-392.
122. Phelan, K.D., Shwe, U.T., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., and 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.
123. Phelan, K.D., Shwe, U.T., Abramowitz, J., Wu, H., Rhee, S.W., Howell, M.D., Gottschall, P.E., Freichel, M., Flockerzi, V., Birnbaumer, L., *et al.* (2013). Canonical transient receptor channel 5 (TRPC5) and TRPC1/4 contribute to seizure and excitotoxicity by distinct cellular mechanisms. *Mol Pharmacol* 83, 429-438.
124. Philipp, S., Cavalie, A., Freichel, M., Wissenbach, U., Zimmer, S., Trost, C., Marquart, A., Murakami, M., and Flockerzi, V. (1996). A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J* 15, 6166-6171.

125. Philipp, S., Hambrecht, J., Braslavski, L., Schroth, G., Freichel, M., Murakami, M., Cavalie, A., and Flockerzi, V. (1998). A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* 17, 4274-4282.
126. Powers, P.A., Liu, S., Hogan, K., and Gregg, R.G. (1992). Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *The Journal of biological chemistry* 267, 22967-22972.
127. Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T.P., and Campbell, K.P. (1994). Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* 368, 67-70.
128. Putney, J.W. (2004). The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels. *Trends in Cell Biology* 14, 282-286.
129. Reiser, J., Polu, K.R., Moller, C.C., Kenlan, P., Altintas, M.M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., *et al.* (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature genetics* 37, 739-744.
130. Riccio, A., Li, Y., Moon, J., Kim, K.S., Smith, K.S., Rudolph, U., Gapon, S., Yao, G.L., Tsvetkov, E., Rodig, S.J., *et al.* (2009). Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. *Cell* 137, 761-772.
131. Riccio, A., Li, Y., Tsvetkov, E., Gapon, S., Yao, G.L., Smith, K.S., Engin, E., Rudolph, U., Bolshakov, V.Y., and Clapham, D.E. (2014). Decreased anxiety-like behavior and Galphaq/11-dependent responses in the amygdala of mice lacking TRPC4 channels. *J Neurosci* 34, 3653-3667.
132. Rima, M., Daghsni, M., Fajloun, Z., M'Rad, R., Bruses, J.L., Ronjat, M., and De Waard, M. (2016). Protein partners of the calcium channel beta subunit highlight new cellular functions. *The Biochemical journal* 473, 1831-1844.
133. Ronco, V., Grolla, A.A., Glasnov, T.N., Canonico, P.L., Verkhratsky, A., Genazzani, A.A., and Lim, D. (2014). Differential deregulation of astrocytic calcium signalling by amyloid-beta, TNFalpha, IL-1beta and LPS. *Cell Calcium* 55, 219-229.
134. Rondé, P., Giannone, G., Gerasymova, I., Stoeckel, H., Takeda, K., and Haiech, J. (2000). Mechanism of calcium oscillations in migrating human astrocytoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1498, 273-280.
135. Rubio, N., Almanza, A., Mercado, F., Arevalo, M.A., Garcia-Segura, L.M., Vega, R., and Soto, E. (2013). Upregulation of voltage-gated Ca²⁺ channels in mouse astrocytes infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). *Neuroscience* 247, 309-318.
136. Ruth, P., Rohrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H.E., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1989). Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science (New York, NY)* 245, 1115-1118.
137. Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., Watanabe, H., Yan, D., Manley, G.T., and Verkman, A.S. (2005). Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *Journal of cell science* 118, 5691-5698.
138. Satoh, S., Tanaka, H., Ueda, Y., Oyama, J., Sugano, M., Sumimoto, H., Mori, Y., and Makino, N. (2007). Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca²⁺ channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry* 294, 205-215.
139. Schaefer, M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflugers Arch* 451, 35-42.
140. Schildge, S., Bohrer, C., Beck, K., and Schachtrup, C. (2013). Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *J Vis Exp* 71, 50079.
141. Schindl, R., Fritsch, R., Jardin, I., Frischauf, I., Kahr, H., Muik, M., Riedl, M.C., Groschner, K., and Romanin, C. (2012). Canonical transient receptor potential

- (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca²⁺ influx. *The Journal of biological chemistry* 287, 35612-35620.
142. Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., and Kirchhoff, F. (2001). Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 1270-1272.
143. Schleifer, H., Doleschal, B., Lichtenegger, M., Oppenrieder, R., Derler, I., Frischauf, I., Glasnov, T.N., Kappe, C.O., Romanin, C., and Groschner, K. (2012). Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca²⁺ entry pathways. *British journal of pharmacology* 167, 1712-1722.
144. Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182, 311-322.
145. Selvaraj, S., Sun, Y., Watt, J.A., Wang, S., Lei, S., Birnbaumer, L., and Singh, B.B. (2012). Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves downregulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling. *The Journal of clinical investigation* 122, 1354-1367.
146. Senadheera, S., Kim, Y., Grayson, T.H., Toemoe, S., Kochukov, M.Y., Abramowitz, J., Housley, G.D., Bertrand, R.L., Chadha, P.S., Bertrand, P.P., *et al.* (2012). Transient receptor potential canonical type 3 channels facilitate endothelium-derived hyperpolarization-mediated resistance artery vasodilator activity. *Cardiovascular research* 95, 439-447.
147. Shimada, I.S., LeComte, M.D., Granger, J.C., Quinlan, N.J., and Spees, J.L. (2012). Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 7926-7940.
148. Shirakawa, H., Sakimoto, S., Nakao, K., Sugishita, A., Konno, M., Iida, S., Kusano, A., Hashimoto, E., Nakagawa, T., and 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.
149. Silver, J., and Miller, J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews Neuroscience* 5, 146-156.
150. Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32, 638-647.
151. Soldatov, N.M. (2015). CACNB2: An Emerging Pharmacological Target for Hypertension, Heart Failure, Arrhythmia and Mental Disorders. *Current molecular pharmacology* 8, 32-42.
152. Song, X., Zhao, Y., Narcisse, L., Duffy, H., Kress, Y., Lee, S., and Brosnan, C.F. (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.
153. Srinivasan, R., Huang, B.S., Venugopal, S., Johnston, A.D., Chai, H., Zeng, H., Golshani, P., and Khakh, B.S. (2015). Ca²⁺ signaling in astrocytes from *Ip3r2* (-/-) mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nature neuroscience* 18, 708-717.
154. Storch, U., Forst, A.L., Philipp, M., Gudermann, T., and Mederos y Schnitzler, M. (2012). Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *The Journal of biological chemistry* 287, 3530-3540.
155. Straub, C., and Tomita, S. (2012). The regulation of glutamate receptor trafficking and function by TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Curr Opin Neurobiol* 22, 488-495.

156. Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29, 645-655.
157. Tajeddine, N., and Gailly, P. (2012). TRPC1 protein channel is major regulator of epidermal growth factor receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 287, 16146-16157.
158. Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313-318.
159. Taylor, J., Pereyra, A., Zhang, T., Messi, M.L., Wang, Z.M., Herenu, C., Kuan, P.F., and Delbono, O. (2014). The Cavbeta1a subunit regulates gene expression and suppresses myogenin in muscle progenitor cells. *The Journal of cell biology* 205, 829-846.
160. Thakur, D.P., Tian, J.B., Jeon, J., Xiong, J., Huang, Y., Flockerzi, V., and Zhu, M.X. (2016). Critical roles of Gi/o proteins and phospholipase C-delta1 in the activation of receptor-operated TRPC4 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 1092-1097.
161. Tiapko, O., and Groschner, K. (2018). TRPC3 as a Target of Novel Therapeutic Interventions. *Cells* 7.
162. Trepel, M. (2008 4. Auflage). *Neuroanatomie: Struktur und Funktion* (Elsevier, Urban & Fischer).
163. Tsai, F.-C., Kuo, G.-H., Chang, S.-W., and Tsai, P.-J. (2015). Ca²⁺ Signaling in Cytoskeletal Reorganization, Cell Migration, and Cancer Metastasis. *BioMed Research International* 2015, 13.
164. Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R., and Fox, A.P. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 11, 431-438.
165. Ursu, D., Schuhmeier, R.P., Freichel, M., Flockerzi, V., and Melzer, W. (2004). Altered inactivation of Ca²⁺ current and Ca²⁺ release in mouse muscle fibers deficient in the DHP receptor gamma1 subunit. *J Gen Physiol* 124, 605-618.
166. Vannier, B., Peyton, M., Boulay, G., Brown, D., Qin, N., Jiang, M., Zhu, X., and Birnbaumer, L. (1999). Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca²⁺ entry channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2060-2064.
167. Vazquez, G., Wedel, B.J., Aziz, O., Trebak, M., and Putney, J.W. (2004). The mammalian TRPC cation channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1742, 21-36.
168. Vecchia, D., Tottene, A., van den Maagdenberg, A.M., and Pietrobon, D. (2015). Abnormal cortical synaptic transmission in CaV2.1 knockin mice with the S218L missense mutation which causes a severe familial hemiplegic migraine syndrome in humans. *Front Cell Neurosci* 9, 8.
169. Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry* 76, 387-417.
170. Verkhratsky, A., Reyes, R.C., and Parpura, V. (2014). TRP channels coordinate ion signalling in astroglia. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 166, 1-22.
171. Voets, T., and Nilius, B. (2007). Modulation of TRPs by PIPs. *The Journal of physiology* 582, 939-944.
172. von Lenhossek, M. (1895). *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen.*, Vol 2 (Berlin: Fischer's medizinische Buchhandlung H.Kornfeld).

173. Wang, Y., Wang, Y., and Li, G.R. (2016). TRPC1/TRPC3 channels mediate lysophosphatidylcholine-induced apoptosis in cultured human coronary artery smooth muscles cells. *Oncotarget* 7, 50937-50951.
174. Weissgerber, P., Held, B., Bloch, W., Kaestner, L., Chien, K.R., Fleischmann, B.K., Lipp, P., Flockerzi, V., and Freichel, M. (2006). Reduced cardiac L-type Ca²⁺ current in Ca(V)beta2^{-/-} embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circ Res* 99, 749-757.
175. Weissmann, N., Dietrich, A., Fuchs, B., Kalwa, H., Ay, M., Dumitrascu, R., Olschewski, A., Storch, U., Mederos y Schnitzler, M., Ghofrani, H.A., *et al.* (2006). Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19093-19098.
176. Wes, P.D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., and Montell, C. (1995). TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9652-9656.
177. Woo, J.S., Lee, K.J., Huang, M., Cho, C.H., and Lee, E.H. (2014). Heteromeric TRPC3 with TRPC1 formed via its ankyrin repeats regulates the resting cytosolic Ca²⁺ levels in skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications* 446, 454-459.
178. Wu, L.J., Sweet, T.B., and Clapham, D.E. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* 62, 381-404.
179. Wycisk, K.A., Zeitz, C., Feil, S., Wittmer, M., Forster, U., Neidhardt, J., Wissinger, B., Zrenner, E., Wilke, R., Kohl, S., *et al.* (2006). Mutation in the auxiliary calcium-channel subunit CACNA2D4 causes autosomal recessive cone dystrophy. *American journal of human genetics* 79, 973-977.
180. Yamada, H., Horigane, S.-i., Ozawa, Y., and Takemoto-Kimura, S. (2019). Calcium signalling: a key regulator of neuronal migration. *The Journal of Biochemistry* 165, 401-409.
181. Yang, S.L., Cao, Q., Zhou, K.C., Feng, Y.J., and Wang, Y.Z. (2009). Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer. *Oncogene* 28, 1320.
182. Zhan, J.S., Gao, K., Chai, R.C., Jia, X.H., Luo, D.P., Ge, G., Jiang, Y.W., Fung, Y.W., Li, L., and Yu, A.C. (2017). Astrocytes in Migration. *Neurochem Res* 42, 272-282.
183. Zhang, X., Hu, M., Yang, Y., and Xu, H. (2018). Organellar TRP channels. *Nature structural & molecular biology* 25, 1009-1018.
184. Zhao, Z., Ni, Y., Chen, J., Zhong, J., Yu, H., Xu, X., He, H., Yan, Z., Scholze, A., Liu, D., *et al.* (2012). Increased migration of monocytes in essential hypertension is associated with increased transient receptor potential channel canonical type 3 channels. *PloS one* 7, e32628-e32628.
185. Zhu, X., Chu, P.B., Peyton, M., and Birnbaumer, L. (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS letters* 373, 193-198.
186. Zimmermann, K., Lennerz, J.K., Hein, A., Link, A.S., Kaczmarek, J.S., Delling, M., Uysal, S., Pfeifer, J.D., Riccio, A., and Clapham, D.E. (2011). Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 18114-18119.

7 Beiträge

Die Daten der Transkriptomanalyse der CaV β -Untereinheiten kortikaler Astrozyten und Abbildungen von Strom-Spannungsabhängigkeit von spannungsaktivierten Ca²⁺-Strömen in Astrozyten aus Wildtyp wurden von Dr. Thabet Belkacemi bereitgestellt.

Das Stichwunden-Wunden Experiment wurde durchgeführt und analysiert von Dr. Thabet Belkacemi.

8 Veröffentlichungen

Publikation:

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 S, Weissgerber P, Flockerzi V, Beck A. *TRPC1- and TRPC3-dependent Ca²⁺ signaling in mouse cortical astrocytes affects injury-evoked astrogliosis in vivo*. *Glia*. 2017 Sep;65(9):1535-1549.

Posterbeitrag:

Belkacemi T, Niermann A, Hofmann L, Fraunhofer N, Wissenbach U, Philipp S, Weißgerber P, Flockerzi V, Beck A. *TRPC3 and its function in astrocytes*. SFB 894 Symposium 2016 "Cutting edge concepts in Calcium signaling", Homburg, Saar.

9 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich in der Zeit der Dissertationsarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi für die Überlassung meines Promotionsthemas, den wertvollen Rat und Hinweise in Bezug auf die Ausarbeitung meines Themas.

Ich möchte mich ebenfalls besonders bei meinen Betreuern Dr. Thabet Belkacemi und Dr. Andreas Beck für die stetige Ansprechbarkeit, wertvolle Hinweise und Hilfestellungen bei Problemen bedanken. Die tägliche Unterstützung im Labor und die Supervision durch Dr. Thabet Belkacemi haben einen großen Anteil zu dem erfolgreichen Abschluss meiner Promotion beigetragen. Des Weiteren möchte ich mich für die Durchführung und Bereitstellung der Ergebnisse des Stichwunden Versuchs bei Dr. Thabet Belkacemi bedanken.

PD Dr. Stephan Phillip möchte ich für die Durchführung der FACS-Analyse danken. Dr. Petra Weißgerber, Tanja Maurer, Tom Janke und ihren Kollegen aus der Versuchstierhaltung danke ich für zahlreiche Gen-Analysen und die Bereitstellung der Versuchstiere.

Für die angenehme Zusammenarbeit im Labor und die Unterstützung möchte ich mich besonders bei Barbara Wardas, Sandra Plant, Anouar Belkacemi, Heidi Löhr, Raza Ashan und Martin Simon-Thomas sowie bei allen Mitarbeitern des Instituts für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie bedanken.

Des Weiteren möchte ich meinem Weggefährten Nicolaus Fraundorfer in der Zeit der Dissertation und des Studiums für die gegenseitige Unterstützung danken.

Ich möchte auch meiner Freundin, Natalia Quiroga, für die gegenseitige Unterstützung und den wertvollen Rat bezüglich der Dissertation danken.

Zudem gilt mein Dank meiner Familie, die mich immer unterstützt haben.

10 Curriculum Vitae

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