

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

# **Funktion von $\text{Ca}_v\beta_3$ , TRPC1 und TRPV2 in Endothelzellen des Mausgehirns**

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

2024

vorgelegt von:

Nicolas Kaiser

geb. am: 13.06.1999 in Ettenheim

Tag der Promotion: 26.08.2024

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

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Anouar Belkacemi

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dieter Bruns

Betreuer der Arbeit: PD Dr. rer. nat. Anouar Belkacemi

*Meiner Familie gewidmet*

# Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle all jenen meinen Dank aussprechen, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Zuerst möchte ich PD Dr. Anouar Belkacemi für die fachliche Anleitung, die wissenschaftliche Begleitung und ausgiebige wissenschaftliche Diskussion aufrichtig danken. Ebenso danke ich Prof. Dr. Veit Flockerzi für das Einbringen seiner Expertise und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchzuführen. Mein Dank gilt auch Dr. Andreas Beck für die wissenschaftliche Diskussion verschiedener Aspekte meiner Arbeit. Den Kolleginnen und Kollegen, welche zu dieser Arbeit beigetragen haben (s.u.), danke ich für die gewinnbringende Zusammenarbeit.

Für die finanzielle Förderung danke ich dem Sonderforschungsbereich 894 („Ca<sup>2+</sup>-Signale: Molekulare Mechanismen und Integrative Funktionen“) und der DFG Forschergruppe 2289 („Kalzium-Homöostase bei Neuroinflammation und -degeneration: Neue Ansatzpunkte für die Therapie der multiplen Sklerose“).

Ebenso dankbar bin ich meinen Kollegen Houssein Salah, Damian Martus und Oliver Glaser für die gute Zusammenarbeit im Labor. Dem gesamten Team der Pharmakologie danke ich für praktische Ratschläge und fruchtbare Diskussionen meiner und anderer wissenschaftlicher Arbeiten. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, meiner Partnerin und meinen Freunden für die wertvolle Unterstützung.

## **Beiträge zu dieser Arbeit**

Hiermit würdige ich die Mitarbeit der folgenden Kolleginnen und Kollegen an dieser Arbeit:

PD Dr. Anouar Belkacemi: Western Blot  $Ca_v\beta_3$ , Teile von Calcium Imaging  $Ca_v\beta_3$  (Abb. 4.2 A, B und Abb. 4.3)

Stefanie Buchholz: PCR (Abb. 4.1 B-D)

Dr. Claudia Fecher-Trost: Durchführung der Massenspektrometrie-Messungen (Abb. 4.9)

Dr. Joel Mailliet (Firma BioTek): Programmierung der Ibidi- $\mu$ -Slides im Programm Gen5

Dr. Barbara Wardas: Patch Clamp Experimente (Abb. 4.2 C)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Zusammenfassung.....	1
1.2	Abstract .....	2
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
2.1	Rolle von Calcium in der intrazellulären Signaltransduktion .....	3
2.2	Calciumsignale in zerebralen Endothelzellen .....	4
2.3	Spannungsabhängige Calciumkanäle – Proteinkomplexe aus mehreren Untereinheiten.....	5
2.3.1	Hilfs-Untereinheiten spannungsabhängiger Calciumkanäle.....	7
2.3.2	Ca <sub>v</sub> -Kanal-unabhängige Funktionen von Ca <sub>v</sub> β und Ca <sub>v</sub> α <sub>2</sub> δ .....	9
2.3.3	β <sub>3</sub> -Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle (Ca <sub>v</sub> β <sub>3</sub> ) .....	11
2.4	Transient Receptor Potential Kanäle .....	12
2.4.1	Transient Receptor Potential Canonical 1 (TRPC1).....	14
2.4.2	Transient Receptor Potential Vanilloid 2 (TRPV2).....	15
2.5	Ziele der Arbeit .....	17
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
3.1	Material .....	18
3.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	18
3.1.2	Geräte .....	19
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien .....	20
3.1.4	Puffer und Lösungen .....	22
3.1.5	Medien.....	26
3.1.6	Antikörper.....	27
3.1.7	Mäuse .....	29
3.1.8	Software.....	29

3.2	Isolierung und Kultur primärer MBMECs .....	30
3.3	Western Blot.....	32
3.4	Calcium Imaging mit Fura-2 .....	33
3.5	Migrationsassay.....	34
3.6	Tube Formation Assay .....	35
3.7	Immunfärbung .....	35
3.8	Permeabilitäts-Assay .....	36
3.9	Statistische Auswertung .....	37
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>38</b>
4.1	MBMECs exprimieren <i>Cacnb3</i> , <i>Trpc1</i> und <i>Trpv2</i> .....	38
4.2	Funktion von $Ca_v\beta_3$ in MBMECs.....	40
4.2.1	$Ca_v\beta_3$ ist in MBMECs vorhanden, aber $Ca_v$ -Ströme wurden nicht nachgewiesen ..	40
4.2.2	$Ca_v\beta_3$ hemmt die Thrombin-vermittelte Calciumfreisetzung in MBMECs .....	41
4.2.3	Die genetische Ausschaltung von <i>Cacnb3</i> beschleunigt die Migration von MBMECs.....	44
4.2.4	$Ca_v\beta_3$ hat keinen Einfluss auf die <i>in-vitro</i> -Angiogenese von MBMECs .....	45
4.2.5	Vergleichendes Proteinprofil von WT und $Ca_v\beta_3$ KO MBMECs.....	47
4.3	Funktion von TRPC1 in MBMECs .....	51
4.3.1	Die Entfernung von TRPC1 verstärkt den speicherabhängigen Calciumeinstrom..	51
4.3.2	Migration und <i>in-vitro</i> -Angiogenese in MBMECs sind unabhängig von TRPC1 ..	53
4.4	Funktion von TRPV2 in MBMECs.....	56
4.4.1	TRPV2 vermittelt das 2-APB- und VEGF-induzierte Calciumsignal in MBMECs .....	56
4.4.2	Die Migration von MBMECs ist beim Fehlen von TRPV2 nicht beeinträchtigt ....	58
4.4.3	Verringerte <i>in-vitro</i> -Angiogenese in <i>Trpv2</i> KO MBMECs.....	59
4.4.4	Expression von Schlüsselproteinen der Angiogenese in <i>Trpv2</i> KO MBMECs.....	61

4.4.5	TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ und IL-1 $\beta$ erhöhen die Permeabilität von MBMECs unabhängig von TRPV2.....	64
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>66</b>
5.1	Kultivierung und Charakterisierung der MBMECs .....	66
5.2	Funktion von Ca $\nu$ $\beta$ <sub>3</sub> .....	67
5.3	Funktion von TRPC1 .....	72
5.4	Funktion von TRPV2 .....	74
5.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	78
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>99</b>
7.1	Publizierte Abstracts.....	99
7.2	Veröffentlichungen.....	99
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>100</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	100
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>102</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Spannungsabhängige Calciumkanäle und deren Untereinheiten.....	6
Abb. 2.2 Aufbau von TRP-Kanälen .....	13
Abb. 3.1 Präparation von MBMECs aus Gehirnen von C57BL/6N und 129S6/SvEvTac Mäusen .....	31
Abb. 4.1 MBMECs wurden in reiner Kultur präpariert und exprimieren <i>Cacnb3</i> , <i>Trpc1</i> und <i>Trpv2</i> ...	39
Abb. 4.2 MBMECs exprimieren das $Ca_v\beta_3$ -Protein, aber keine funktionsfähigen $Ca_v$ -Kanäle .....	41
Abb. 4.3 Erhöhte Thrombin-induzierte Calciumfreisetzung in $Ca_v\beta_3$ KO MBMECs.....	42
Abb. 4.4 Die Thapsigargin-induzierte Calciumfreisetzung aus dem ER und der speicherabhängige $Ca^{2+}$ -Einstrom sind unabhängig von $Ca_v\beta_3$ .....	43
Abb. 4.5 $Ca_v\beta_3$ KO MBMECs migrieren in Anwesenheit von 20% FCS schneller als WT MBMECs	45
Abb. 4.6 Tube Formation Assays zeigen keinen Einfluss von $Ca_v\beta_3$ auf die <i>in-vitro</i> -Angiogenese .....	46
Abb. 4.7 Immunmarkierung mit CD31 und fluoreszenzmarkiertem Phalloidin .....	48
Abb. 4.8 MBMECs exprimieren Schlüsselproteine der Zellmigration .....	49
Abb. 4.9 Vergleichendes Proteinprofil von WT und $Ca_v\beta_3$ KO MBMECs.....	50
Abb. 4.10 Der speicherabhängige $Ca^{2+}$ -Einstrom in <i>Trpc1</i> KO MBMECs ist erhöht.....	52
Abb. 4.11 Die Migration von <i>Trpc1</i> KO MBMECs unterscheidet sich nicht von WT MBMECs.....	54
Abb. 4.12 TRPC1 beeinflusst die <i>in-vitro</i> -Angiogenese von MBMECs nicht .....	55
Abb. 4.13 Das durch 2-APB und VEGF ausgelöste Calciumsignal ist in <i>Trpv2</i> KO MBMECs reduziert .....	57
Abb. 4.14 TRPV2 hat keinen Einfluss auf die Migration von MBMECs .....	59
Abb. 4.15 Verminderte <i>in-vitro</i> -Angiogenese in Anwesenheit von VEGF bei Fehlen von TRPV2.....	60
Abb. 4.16 <i>Trpv2</i> KO MBMECs exprimieren Integrin- $\beta_1$ , Vinculin, p-FAK und p-Src .....	62
Abb. 4.17 <i>Trpv2</i> KO MBMECs exprimieren ZO-1, VE-Cadherin und CD31.....	63
Abb. 4.18 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ und IL-1 $\beta$ erhöhen die Permeabilität von MBMECs unabhängig von TRPV2 .....	65
Abb. 5.1 Modell der Wirkung von $Ca_v\beta_3$ auf den IP <sub>3</sub> -Rezeptor in MBMECs .....	69
Abb. 5.2 Wirkung von $Ca_v\beta_3$ , TRPC1 und TRPV2 auf Calciumsignale in MBMECs .....	78

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Liste der Verbrauchsmaterialien .....	18
Tabelle 3.2: Liste der Geräte .....	19
Tabelle 3.3: Liste der Chemikalien und Reagenzien.....	20
Tabelle 3.4: Liste der Stammlösungen .....	22
Tabelle 3.5: 10x SDS-Puffer .....	22
Tabelle 3.6: 10% (w/v) SDS-Puffer .....	23
Tabelle 3.7: 10x TBS-Puffer .....	23
Tabelle 3.8: 0,1% (w/v) TBST-Puffer.....	23
Tabelle 3.9: 10x PBS-Puffer .....	23
Tabelle 3.10: 0,2% (w/v) PBST-Puffer .....	23
Tabelle 3.11: 2x SDS-Denaturierungs-Puffer .....	24
Tabelle 3.12: Blotting-Puffer .....	24
Tabelle 3.13: Stripping-Puffer.....	24
Tabelle 3.14: 0,5 mmol/l EGTA-Puffer .....	24
Tabelle 3.15: 0 mmol/l Ca <sup>2+</sup> -Puffer.....	25
Tabelle 3.16: 2 mmol/l Ca <sup>2+</sup> -Puffer.....	25
Tabelle 3.17: 4 mmol/l Ca <sup>2+</sup> -Puffer.....	25
Tabelle 3.18: 10 mmol/l Ca <sup>2+</sup> -Puffer.....	26
Tabelle 3.19: 96 mmol/l K <sup>+</sup> -Puffer.....	26
Tabelle 3.20: 4% (w/v) PFA-Lösung .....	26
Tabelle 3.21: 20% (w/v) BSA-Lösung.....	26
Tabelle 3.22: Wachstumsmedium .....	27
Tabelle 3.23: Wachstumsmedium mit Puromycin .....	27
Tabelle 3.24: Medium mit 2% FCS.....	27
Tabelle 3.25: Ersatzmedium.....	27
Tabelle 3.26: Liste der Primär-Antikörper .....	27

Tabelle 3.27: Liste der Sekundär-Antikörper .....	28
Tabelle 3.28: Liste der fluoreszierenden Substanzen .....	28
Tabelle 3.29: Liste der verwendeten Software .....	29
Formel 3.1 Formel zur Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten .....	37

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ist ein entscheidendes Signal-Ion, das an der Aufrechterhaltung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) beteiligt ist, die den Blutkreislauf vom zentralen Nervensystem trennt. Die Endothelzellen der zerebralen Kapillaren sind durch Tight Junctions miteinander verbunden und stellen die Hauptkomponente der BHS dar. In primären mikrovaskulären Endothelzellen des Mausgehirns (MBMECs) identifizierten wir Transkripte mehrerer  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kanäle, darunter die  $\beta_3$ -Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle ( $\text{Ca}_v\beta_3$ ), den Transient Receptor Potential (TRP) Canonical 1 (TRPC1) und den TRP Vanilloid 2 (TRPV2) Kanal. Um die Rolle von **(i)**  $\text{Ca}_v\beta_3$ , **(ii)** TRPC1 und **(iii)** TRPV2 bei der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in MBMECs zu untersuchen, verwendeten wir *Cacnb3* KO ( $\text{Ca}_v\beta_3$  KO), *Trpc1* KO und *Trpv2* KO Mäuse als Kontrolle. **(i)** Elektrophysiologische Aufzeichnungen von Ganzzell-Strömen und Depolarisation mit hohem Kalium ergaben keinen signifikanten  $\text{Ca}_v$ -Strom bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in MBMECs. Die Deletion des *Cacnb3*-Gens führte jedoch zu einer signifikant verstärkten, Thrombin-vermittelten Calciumfreisetzung, ohne den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des endoplasmatischen Retikulums zu beeinflussen. Um die Rolle der  $\text{Ca}_v\beta_3$ -abhängigen Calcium-Signalgebung bei der Migration von Endothelzellen und der Angiogenese zu bewerten, führten wir *in-vitro*-Migrations- und -Angiogenese-Assays durch. Die Deletion von *Cacnb3* beschleunigte die Migration von MBMECs signifikant, ohne Einfluss auf die Angiogenese *in vitro*. **(ii)** In *Trpc1* KO MBMECs war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach Depletion der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch Thapsigargin signifikant erhöht, was auf eine hemmende Wirkung von TRPC1 auf den speicherabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom hinweist. Die Deletion von *Trpc1* beeinflusste jedoch nicht die Migration und Angiogenese von MBMECs *in vitro*. **(iii)** Der durch 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) und vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) ausgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom war bei MBMECs, die aus *Trpv2* KO Mäusen isoliert wurden, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant reduziert. Unter basalen Bedingungen war die *in-vitro*-Angiogenese von MBMECs durch das Fehlen von TRPV2 nicht beeinflusst. Die VEGF-induzierte *in-vitro*-Angiogenese war jedoch in MBMECs, die aus *Trpv2* KO Mäusen isoliert wurden, signifikant beeinträchtigt, passend zu den Ergebnissen des Calcium-Imagings. Um zu untersuchen, ob TRPV2 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität der BHS *in vitro* spielt, evaluierten wir die Barrierefunktion von MBMECs durch Messung ihrer Permeabilität für mit Fluorescein-Isothiocyanat konjugiertem Albumin (FITC-Albumin) oder mit Tetramethylrhodamin konjugiertem Dextran (TRITC-Dextran). Die Durchlässigkeit für FITC-Albumin und TRITC-Dextran bei *Trpv2* KO MBMECs war im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nicht verändert. In Anwesenheit der proinflammatorischen Zytokine Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) war die Durchlässigkeit für Albumin sig-

nifikant erhöht, aber zwischen beiden Genotypen nicht unterschiedlich. Zusammenfassend demonstrieren diese Daten eine bedeutende Rolle von  $\text{Ca}_v\beta_3$ , TRPC1 und TRPV2 bei der Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung in MBMECs und dadurch der Funktion von Endothelzellen.

## 1.2 Abstract

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) is a key signaling ion involved in maintaining the integrity of the blood-brain-barrier (BBB), which separates the bloodstream from the central nervous system. Brain capillary endothelial cells are interconnected by tight junctions and represent the main component of the BBB. We identified in primary mouse brain microvascular endothelial cells (MBMECs) transcripts of several calcium conducting channels including the  $\beta_3$  auxiliary subunit of voltage-gated calcium channels ( $\text{Ca}_v\beta_3$ ), the transient receptor potential (TRP) canonical 1 (TRPC1) and the TRP vanilloid 2 (TRPV2) channel. To investigate the role of (i)  $\text{Ca}_v\beta_3$ , (ii) TRPC1 and (iii) TRPV2 in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling in MBMECs, we used *Cacnb3* KO ( $\text{Ca}_v\beta_3$  KO), *Trpc1* KO and *Trpv2* KO mice as a control. (i) Electrophysiological recordings of whole-cell-currents and high potassium depolarization did not reveal a significant  $\text{Ca}_v$  current or  $\text{Ca}^{2+}$  influx in MBMECs. However, deletion of the *Cacnb3* gene significantly enhanced thrombin-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release without affecting  $\text{Ca}^{2+}$  content of the endoplasmic reticulum. To assess the role of  $\text{Ca}_v\beta_3$ -dependent calcium signaling in endothelial cell migration and angiogenesis, we performed scratch migration and endothelial tube formation assays *in vitro*. Deletion of *Cacnb3* significantly accelerated migration of MBMECs without affecting angiogenesis *in vitro*. (ii) In *Trpc1* KO MBMECs,  $\text{Ca}^{2+}$  influx following  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion in the presence of thapsigargin was significantly increased, indicating an inhibitory effect of TRPC1 on store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. However, deletion of *Trpc1* did not impair MBMECs migration and angiogenesis *in vitro*. (iii) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)- and vascular endothelial growth factor (VEGF)-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  influx was markedly reduced in MBMECs isolated from *Trpv2* KO mice compared with wild-type. Under basal conditions, MBMECs tube formation was not affected in the absence of TRPV2. However, in agreement with the  $\text{Ca}^{2+}$  imaging results, VEGF-induced endothelial cell tube formation was significantly impaired in MBMECs isolated from *Trpv2* KO mice. To investigate, whether TRPV2 plays a role in maintaining the integrity of the BBB *in vitro*, we evaluated the barrier function of MBMECs by measuring its permeability to albumin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC-albumin), or dextran conjugated to tetramethylrhodamine (TRITC-dextran). The leakage rate of FITC-albumin and TRITC-dextran across *Trpv2* KO MBMECs was not changed compared with wild-type cells. In the presence of proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), the leakage rates for albumin were significantly augmented but not different in both genotypes. In summary, these data demonstrate a significant role of  $\text{Ca}_v\beta_3$ , TRPC1 and TRPV2 in the regulation of MBMECs intracellular calcium signaling and thereby endothelial cell function.

## 2 Einleitung

### 2.1 Rolle von Calcium in der intrazellulären Signaltransduktion

Wenn sich die Umgebung verändert, ist schnelles Handeln gefragt. Auf zellulärer Ebene bedeutet das die Notwendigkeit zur schnellen und effektiven Signaltransduktion. Im Laufe der Evolution bekamen Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) hierbei eine wesentliche Rolle. Sie besitzen die Fähigkeit, Proteine zu binden und deren Ladung und Form – essenzielle Aspekte der Proteinfunktion – zu verändern.

Ungefähr die Hälfte der 2,5 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  im Blutplasma ist an Proteine gebunden, hauptsächlich an Albumin (Franclin C. Mclean, 1934). Die Konzentration des nicht an Proteine gebundenen, freien  $\text{Ca}^{2+}$  beträgt im Blutplasma, wie auch im extrazellulären Raum, etwa 1,2 mmol/l. Deutlich niedriger ist hingegen die Konzentration des freien  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytoplasma, sie liegt zwischen 50 und 100 nmol/l (Übersichtsarbeit siehe Bronner, 2001). Im Wesentlichen sind für diesen Gradienten zwischen extrazellulärem Raum und Zytoplasma drei Transportsysteme verantwortlich: Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher transportiert 1  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion im Austausch für 1  $\text{Na}^+$ -Ion aus dem Zytoplasma nach extrazellulär; die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) transportiert  $\text{Ca}^{2+}$  direkt ATP-abhängig aus dem Zytoplasma nach extrazellulär; die ebenfalls direkt ATP-abhängige Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) pumpt  $\text{Ca}^{2+}$  vom Zytoplasma in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (Übersichtsarbeit siehe Berridge et al., 2003).

Der bestehende Gradient ermöglicht gezielte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme in das Zytoplasma entweder aus dem extrazellulären Raum oder aus intrazellulären Speichern. An letzterem hat der Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) Rezeptor einen wesentlichen Anteil. Die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ( $\text{G}\alpha_q$ ) bzw. bestimmter Rezeptortyrosinkinasen in der Zellmembran führt durch Aktivierung der Phospholipase C zu einer Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Diacylglycerol und das hydrophile  $\text{IP}_3$ . Letzteres aktiviert den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), welcher als  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kationenkanal einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom vom endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma vermittelt (Berridge, Irvine, 1984; Burgess et al., 1984; Streb et al., 1983). Ebenfalls in der Membran des ER befinden sich die Calciumsensoren Stromales Interaktionsmolekül (STIM) 1 und 2 (Liou et al., 2005). Nach Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher des ER bewirken STIM 1 und 2 einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär über den Calciumfreisetzung-aktivierten Calcium-Modulator (Orai) 1 (Feske et al., 2006) und über Kanäle der TRPC-Familie (Freichel et al., 2001; Zeng et al., 2008), der sogenannte speicherabhängige Calciumeinstrom. Der Calciumeinstrom von extrazellulär wird in erregbaren Zellen zu wesentlichen Teilen von spannungsabhängigen Calciumkanälen vermittelt, sie bewirken einen schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom infolge einer Depolarisation der Zellmembran. Weitere Kanäle, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme von extrazellulär vermitteln, sind Rezeptor-gesteuerte (z.B. NMDA-Rezeptor), Second-

Messenger-gesteuerte (z.B. CNG-Kanäle) oder durch verschiedene Stimuli wie Temperatur oder Dehnung aktivierte Kanäle, welche häufig zur Familie der TRP-Kanäle gehören (Übersichtsarbeit siehe Berridge et al., 2003).

Die gezielten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme spielen eine Rolle bei diversen Prozessen im Organismus. Dazu gehören unter anderem Kontraktionen des Skelettmuskels durch Bindung an Troponin (Ebashi et al., 1967) oder die Exozytose synaptischer Transmitter wie Acetylcholin an synaptischen Endknöpfchen (Katz, Miledi, 1965).  $\text{Ca}^{2+}$  sorgt für die Exozytose von Gonadotropinen aus Vesikeln gonadotroper Zellen in der Hypophyse (Tse et al., 1993) und für die Exozytose von Insulin-Vesikeln in  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Gilon et al., 1993). Außerdem bindet  $\text{Ca}^{2+}$  intrazellulär an Calmodulin und bildet einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex, der zur Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase und dadurch zur Kontraktion der glatten Muskulatur führt (Cheung, 1980).  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin verstärkt die Aktivität der NO-Synthase in Endothelzellen (Forstermann et al., 1991), NO diffundiert in die glatten Muskelzellen der Gefäßwände und bewirkt dort die Bildung des vasorelaxierenden Signalstoffs zyklisches Guanosinmonophosphat (Palmer et al., 1987).

## 2.2 Calciumsignale in zerebralen Endothelzellen

Im Gehirn bilden Endothelzellen in den Kapillaren, gemeinsam mit Perizyten und Astrozyten, die sogenannte Blut-Hirn-Schranke. Endothelzellen formen dabei die innerste Schicht und sind durch Tight Junctions zu hoher Resistenz abgedichtet (Crone, Olesen, 1982; Reese, Karnovsky, 1967). Die Endothelzellen werden außen von einer Basalmembran überzogen, welche sich aus einer inneren, von Endothelzellen und Perizyten sezernierten Schicht, und einer äußeren, von Astrozyten sezernierten Schicht zusammensetzt (Brightman, Reese, 1969). Perizyten werden von dieser Basalmembran eingeschlossen und halten die Integrität der Blut-Hirn-Schranke aufrecht (Armulik et al., 2010). Außen liegen Endfüßchen von Astrozyten an, welche beispielsweise den Gefäßtonus durch Sekretion von vasodilatatorischem Prostaglandin  $\text{E}_2$  regulieren (Mishra et al., 2016). In ihrer Gesamtheit bildet die Blut-Hirn-Schranke eine dichte Schicht zwischen Gefäßlumen und Gehirn und sorgt somit für einen Schutz des Gehirns vor dem Übertritt potentiell schädlicher Substanzen (Übersichtsarbeit siehe Profaci et al., 2020).

Endothelzellen werden typischerweise als nicht-erregbare Zellen betrachtet. Zwar konnten spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ - (Bossu et al., 1992; Bossu et al., 1989; Vinet, Vargas, 1999) und auch  $\text{Na}^+$ -Kanäle (Walsh et al., 1998) in Endothelzellen nachgewiesen werden, deren physiologische Relevanz scheint jedoch gering zu sein (Bossu et al., 1992). Trotz der geringen Relevanz spannungsabhängiger Calciumkanäle spielen Calciumsignale in Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Prozessen wie Barrierefunktion (Mayhan, Joyner, 1984), Zellmigration (Naito et al., 1989) und Angiogenese (Kohn et al., 1995). Leukozyten können in Endothelzellen Calciumsignale auslösen und damit deren Permeabilität erhöhen, was eine transzelluläre Migration der Leukozyten über die Endothelzellschicht ermöglicht (Huang et al., 1993). Die proinflammatorische Substanz Thrombin wird bei akuten Entzün-

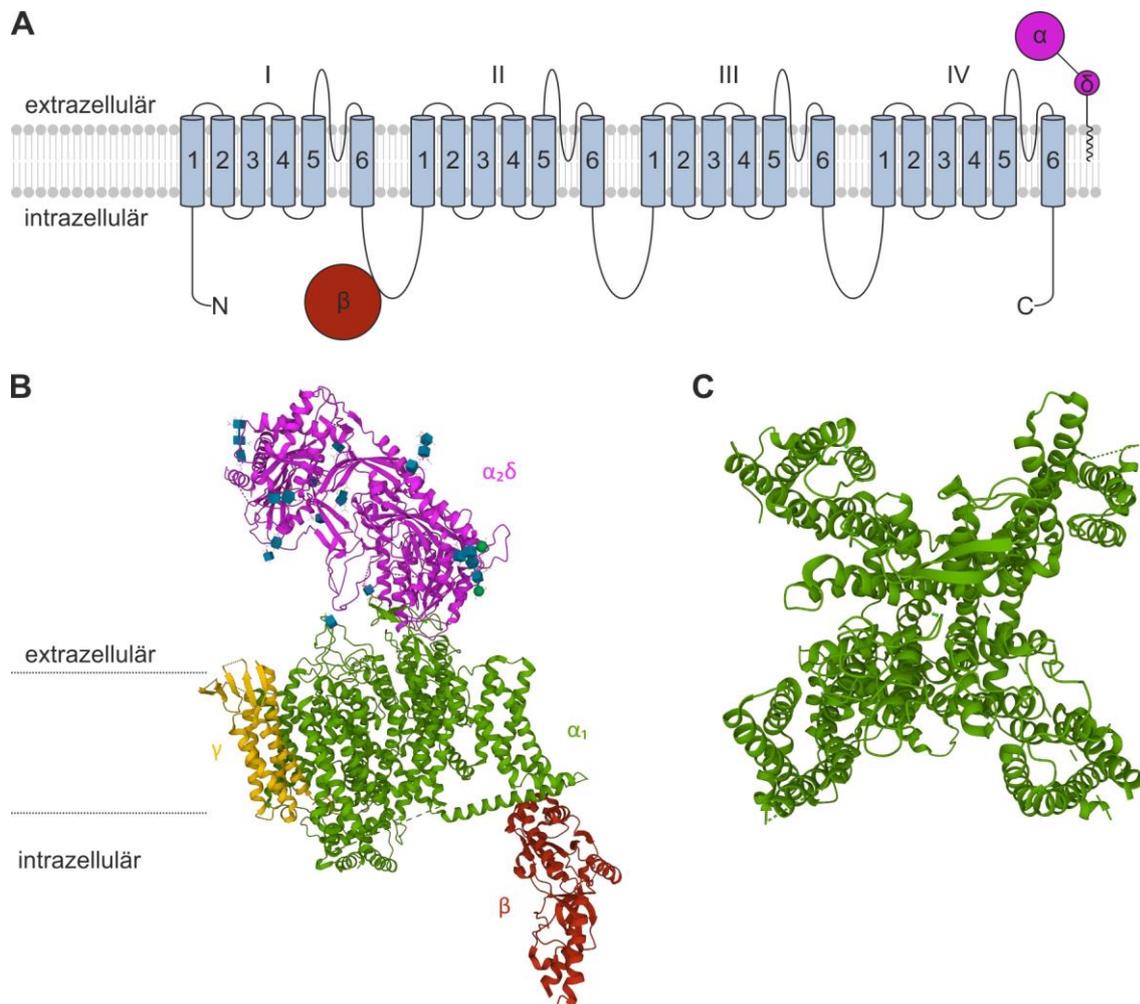
dungen freigesetzt und aktiviert in Endothelzellen Calcium-abhängige Signalwege, wodurch die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke erhöht wird (Garcia et al., 1986; Kim et al., 2004). Werden Endothelzellen mit Thrombin stimuliert, führt dies zur Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aus der Familie der Protease-aktivierten-Rezeptoren (PAR). Diese führen über Aktivierung der Phospholipase C zur Entstehung von IP<sub>3</sub>, welches über den IP<sub>3</sub>-Rezeptor eine Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem ER verursacht (Bartha et al., 2000; Vogel et al., 2000).

## 2.3 Spannungsabhängige Calciumkanäle – Proteinkomplexe aus mehreren Untereinheiten

Calcium gelangt als Folge einer Membrandepolarisation über spannungsabhängige Calciumkanäle (Ca<sub>v</sub>) von extrazellulär in das Zytoplasma. Die erste Aufreinigung, Klonierung und funktionelle Rekonstitution gelang bei dem heute als Ca<sub>v</sub>1.1 bekannten und von *Cacnals* codierten L-Typ Ca<sub>v</sub>-Kanal aus den T-Tubuli der Skelettmuskulatur (Curtis, Catterall, 1984, 1986; Flockerzi et al., 1986). Später konnten weitere L-Typ-Ca<sub>v</sub>-Kanäle rekonstruiert werden: aus dem *Cacnalc*-Gen der mittlerweile Ca<sub>v</sub>1.2 genannte kardiale L-Typ Ca<sub>v</sub>-Kanal (Mikami et al., 1989), aus dem Gehirn der von *Cacnald* codierte Ca<sub>v</sub>1.3 (Williams et al., 1992) und aus dem Gen *Cacnalf* der unter anderem bei einer genetischen Form der Nachtblindheit relevante Ca<sub>v</sub>1.4 (Bech-Hansen et al., 1998; Strom et al., 1998). Es folgten die Rekonstitution von Gehirn-Ca<sub>v</sub>-Kanälen vom N- und P/Q-Typ aus den Genen *Cacnala* bzw. *Cacnalb* (Mori et al., 1991; Snutch et al., 1990; Starr et al., 1991) und eines weiteren Ca<sub>v</sub>-Kanals aus dem Gehirn vom R-Typ mit dem Gen *Cacnale* (Soong et al., 1993). Die drei später entdeckten T-Typ-Ca<sub>v</sub>-Kanäle werden von den Genen *Cacnalg* (Perez-Reyes et al., 1998), *Cacnalh* (Cribbs et al., 1998) und *Cacnali* (Lee et al., 1999) codiert.

Die Namen beziehen sich auf die aktuelle Nomenklatur (Ertel et al., 2000), welche die genannten zehn, im Säugetiergenom vorkommenden Ca<sub>v</sub>-Isoformen, in drei Gruppen einteilt. Die erste bilden Ca<sub>v</sub>-Kanäle vom L-Typ mit langsamer Inaktivierung (Ca<sub>v</sub>1.1-1.4); die zweite Gruppe setzt sich aus N- (Ca<sub>v</sub>2.1), P/Q- (Ca<sub>v</sub>2.2) und R-Typ (Ca<sub>v</sub>2.3) Ca<sub>v</sub>-Kanälen zusammen. T-Typ-Ca<sub>v</sub>-Kanäle (Ca<sub>v</sub>3.1-3.3) bilden die dritte Gruppe und werden durch niedrige Spannung aktiviert, öffnen nur kurzzeitig (Nilius et al., 1985) und scheinen im Gegensatz zu Ca<sub>v</sub>1 und Ca<sub>v</sub>2 keine obligatorische Hilfs-Untereinheit zu besitzen. Die Einteilung in die genannten Gruppen von Ca<sub>v</sub>-Kanälen ist abhängig von der Pore-bildenden α<sub>1</sub>-Untereinheit. Diese bestimmt die generellen Eigenschaften der Ca<sub>v</sub>-Kanäle, die Kinetik und die Spannungsabhängigkeit (Übersichtsarbeit siehe Dolphin, 2018). Die Strukturelle Basis dafür bilden die vier homologen Domänen von Ca<sub>v</sub>α<sub>1</sub> (I-IV), welche jeweils sechs α-helikale Transmembransegmente (S1-S6) besitzen (Tanabe et al., 1987). Die Pore wird durch die Segmente S5 und S6 der Domänen I-IV gebildet, der Spannungssensor durch Segmente S1-S4 (Sehnel et al., 2021; Wu et al., 2016; Wu et al., 2015); (Abb. 2.1). Die Aufreinigung des ersten Ca<sub>v</sub>-Kanals (Curtis, Catterall, 1984, 1986; Flockerzi et al., 1986) demonstrierte die in etwa äquimolare Zusammensetzung der Ca<sub>v</sub>-Kanäle aus mehreren Polypeptiden. Ne-

ben der Poren-bildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit sind dies die intrazelluläre  $\beta$ -Untereinheit und die transmembranäre  $\gamma$ -Untereinheit. Durch Spaltung von Disulfidbrücken mittels Dithiothreitol wurde das Vorhandensein zweier weiterer Untereinheiten gezeigt:  $\alpha_2$  und  $\delta$  (Abb. 2.1); (Takahashi et al., 1987).



**Abb. 2.1 Spannungsabhängige Calciumkanäle und deren Untereinheiten**

(A) Schematische Darstellung der Struktur spannungsabhängiger Calciumkanäle und deren Untereinheiten. Sie bestehen aus vier homologen Domänen mit jeweils sechs Transmembransegmenten, die Pore befindet sich zwischen Transmembransegment 5 und 6. Die  $\beta$ -Untereinheiten binden intrazellulär an die  $\alpha$ -interaction domain (AID) am Verbindungsstück zwischen Domäne I und II. Die über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker der  $\delta$ -Untereinheit in der Zellmembran verankerte  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit interagiert von extrazellulär mit der  $\alpha_1$ -Untereinheit. (B, C) Kristallstruktur des spannungsabhängigen Calciumkanals  $Ca_v 1.1$  in der Seitenansicht (B) und Aufsicht (C) mit der intrazellulären  $\beta$ -Untereinheit (rot), der membranständigen  $\gamma$ - (gelb) und  $\alpha_1$ -Untereinheit (grün), sowie der größtenteils extrazellulären  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit (lila). Die mit dem Protein verbundenen blauen Würfel stellen Glykosylierungsstellen dar, von welchen sich 15 an der  $\alpha_2\delta$ - und 1 an der  $\alpha_1$ -Untereinheit befinden (nach Wu et al., 2016; Sehnal et al., 2021; PDB: 5GJV).

## 2.3.1 Hilfs-Untereinheiten spannungsabhängiger Calciumkanäle

### 2.3.1.1 Funktion der $\alpha_2$ - und $\delta$ -Untereinheiten

Die  $\alpha_2$ - und  $\delta$ -Untereinheiten werden durch ein gemeinsames Gen codiert und bleiben nach Prozessierung über Disulfid-Brücken miteinander verbunden (De Jongh et al., 1990). Eine von-Willebrand-Faktor-Typ-A-(vWA)-Domäne, sowie vier Cache-Domänen bilden die extrazelluläre  $\alpha_2$ -Untereinheit. Die  $\delta$ -Untereinheit trägt lediglich drei  $\beta$ -Stränge zur vierten Cache-Domäne bei und ist via Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker in der Zellmembran verankert (Davies et al., 2010; Wu et al., 2016). Die Pore-bildende  $\alpha_1$ -Untereinheit interagiert mit der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit über die zwischen S5 und der Pore gelegenen L5-Schleifen der Domänen I-III, sowie mutmaßlich über gemeinsame Chelatierung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions durch eine metallionenabhängige Adhäsionsstelle (MIDAS) der vWA-Domäne und eines Aspartat-Rests der L1-2-Schleife von Domäne I (Wu et al., 2016; Wu et al., 2015). Insgesamt gibt es vier  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten.  $\alpha_2\delta_1$  wird in verschiedenen Zelltypen exprimiert und durch das *Cacna2d1*-Gen codiert (De Jongh et al., 1990). Die Untereinheiten  $\alpha_2\delta_2$  (Gao et al., 2000) und  $\alpha_2\delta_3$  (Klugbauer et al., 1999) wurden aus dem *Cacna2d2*- bzw. *Cacna2d3*-Gen rekonstituiert. Aus dem *Cacna2d4*-Gen erfolgte schließlich die Rekonstitution von  $\alpha_2\delta_4$  (Qin et al., 2002).  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten steigern die Inaktivierungs-Rate (Wakamori et al., 1999; Yasuda et al., 2004) und erhöhen die Öffnungswahrscheinlichkeit, sowie die Membranexpression von  $\text{Ca}_v\alpha_1$  (Canti et al., 2005; Shistik et al., 1995; Yasuda et al., 2004). Beispielsweise ist die MIDAS-Stelle der vWA-Domäne entscheidend für die Membranexpression von  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v2.1$  und  $\text{Ca}_v2.2$  (Canti et al., 2005).

### 2.3.1.2 Funktion der $\gamma$ -Untereinheit

Aus dem Skelettmuskel von Hasen gelang die erste Klonierung des *Cacng1*-Gens mit der zugehörigen  $\gamma_1$ -Untereinheit (Bosse et al., 1990; Jay et al., 1990). Sie besitzt vier Transmembrandomänen und interagiert über die Transmembrandomänen 2 und 3 mit dem Spannungssensor von Domäne IV der  $\alpha_1$ -Untereinheit (Wu et al., 2015). Experimente mit  $\gamma_1$ -Knockout-Mäusen zeigten, dass die  $\gamma_1$ -Untereinheit im Skelettmuskel die Inaktivierung der  $\text{Ca}_v$ -Kanäle beschleunigt (Freise et al., 2000). Insgesamt sind acht von den Genen *Cacng1-8* codierte  $\gamma$ -Untereinheiten bekannt. Als  $\text{Ca}_v$ -Kanal-Untereinheit werden jedoch nur  $\gamma_1$  und  $\gamma_6$  angesehen. Die Untereinheiten  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\gamma_5$ ,  $\gamma_7$  und  $\gamma_8$  werden mittlerweile als TARPs, transmembrane AMPA-Rezeptor regulierende Proteine, angesehen (Kato et al., 2007; Schwenk et al., 2012; Soto et al., 2009; Tomita et al., 2003).

### 2.3.1.3 Funktion der $\beta$ -Untereinheit

Die erste Klonierung des Gens einer  $\beta$ -Untereinheit, heute  $\beta_{1a}$  genannt, gelang aus dem Skelettmuskel von Hasen (Ruth et al., 1989). Später wurde aus einer Rattengehirn-Genbibliothek die  $\beta_{1b}$ -Untereinheit rekonstituiert, welche wie die  $\beta_{1a}$ -Untereinheit vom *Cacnb1*-Gen codiert wird (Powers et al., 1992; Pragnell et al., 1991). Das später klonierte *Cacnb2*-Gen besitzt drei Spleißvarianten:  $\beta_{2a}$  (Perez-Reyes et al., 1992),  $\beta_{2b}$  und  $\beta_{2c}$  (Hullin et al., 1992). Die Klonierung des *Cacnb3*-Gens, welches für die  $\beta_3$ -

Untereinheit codiert, gelang aus dem Gehirn von Ratten (Castellano et al., 1993a) und dem Herz von Hasen (Hullin et al., 1992). Ebenfalls aus dem Rattengehirn wurde das *Cacnb4*-Gen kloniert, dieses codiert für die  $\beta_4$ -Untereinheit (Castellano et al., 1993b). Heute sind diverse Spleißvarianten von  $\text{Ca}_v\beta_{1-4}$  und damit eine große Vielfalt an  $\beta$ -Untereinheiten bekannt (Übersichtsarbeiten siehe Buraei, Yang, 2013; Hofmann et al., 2014).

$\beta$ -Untereinheiten besitzen eine Kernregion, bestehend aus einer katalytisch inaktiven und konservierten Guanylatkinase (GK), einer HOOK und einer Src Homologie 3 (SH3) Region. Die variable HOOK-Region trennt die letzten beiden der insgesamt fünf  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen der konservierten SH3-Region. N- und C-Termini sind in ihrer Struktur ebenfalls variabel (Chen et al., 2004; Van Petegem et al., 2004). Die  $\alpha_1$ -Untereinheit interagiert mit der  $\beta$ -Untereinheit über eine 18 Aminosäuren lange  $\alpha_1$ -Interaktions-Domäne (AID, Sequenz bei  $\text{Ca}_v1.2$ : QQLEEDLKG YLDWITQAE), welche sich an der zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne I und II der  $\alpha_1$ -Untereinheit befindet. Diese AID bindet hochaffin an eine hydrophobe Furche der GK-Domäne der  $\beta$ -Untereinheit (Chen et al., 2004; De Waard et al., 1995; Pragnell et al., 1994; Van Petegem et al., 2004).

Klassischerweise liegt die Funktion der  $\beta$ -Untereinheiten darin, die Pore-bildende  $\alpha_1$ -Untereinheit zur Zellmembran zu transportieren und die biophysikalischen Eigenschaften des  $\text{Ca}_v$ -Kanals zu modifizieren. Es konnte sowohl in heterologen Expressionssystemen wie COS-7-Zellen (Brice et al., 1997) und HEK-Zellen (Kamp et al., 1996), als auch in endogenen Zelltypen wie Herzmuskelzellen (Wei et al., 2000) oder Neuronen (Waithe et al., 2011) gezeigt werden, dass  $\beta$ -Untereinheiten die Membranexpression der  $\alpha_1$ -Untereinheit deutlich erhöhen.

Eine gemeinsame Eigenschaft der  $\beta$ -Untereinheiten ist die Erhöhung der  $\text{Ca}_v$ -Kanal-Öffnungswahrscheinlichkeit durch Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu mehr hyperpolarisierten Werten (De Waard, Campbell, 1995; Hullin et al., 2003). Des Weiteren steigern  $\beta$ -Untereinheiten auch die Inaktivierungskinetik der  $\text{Ca}_v$ -Kanäle (Varadi et al., 1991). Ausnahmen bilden hierbei die palmitoylierte  $\text{Ca}_v\beta_2\text{-N3}$ , sowie  $\text{Ca}_v\beta_2\text{-N5}$  (früher  $\text{Cav}\beta_2\text{a}$  und  $\text{Cav}\beta_2\text{e}$ , Nomenklatur siehe Hofmann et al., 2014), welche in der Plasmamembran lokalisiert sind und die Strominaktivierungskinetik verlangsamen (Kim et al., 2015; Miranda-Laferte et al., 2014; Qin et al., 1998).

Bislang wurden einige Berichte zu Mäusen mit Fehlen oder Mutation eines der Gene der  $\beta$ -Untereinheiten publiziert.  $\beta_1$ -Knockout-Mäuse sterben bei ihrer Geburt an Asphyxie, sind bewegungslos und elektrische Stimulation der Muskeln bewirkt keine Kontraktion. Aus diesen Mäusen isolierte Myotuben zeigen eine erhebliche Abnahme der Membranexpression der Pore-bildenden Untereinheit von  $\text{Ca}_v1.1$ , sowie eine mehr als 10-fache Verringerung der  $\text{Ca}_v$ -Stromdichte in elektrophysiologischen Messungen (Gregg et al., 1996).

$\beta_2$ -Knockout-Mäuse sterben bereits in der Embryonalphase und zeigen keine kardialen Kontraktionen aufgrund verminderter L-Typ- $\text{Ca}_v$ -Kanal-Ströme in Kardiomyozyten (Ball et al., 2002; Weissgerber et al., 2006). Durch eine kardiale Expression der Ratten- $\beta_2\text{-N3}$ -Untereinheit (Ball et al., 2002) bzw. der  $\beta_2$ -

N4-Untereinheit (Katiyar et al., 2015) in  $\beta_2$ -Knockout-Mäusen über den Herzmuskel-spezifischen  $\alpha$ -Myosin-schwere-Kette-Promotor konnten überlebensfähige Mäuse generiert werden. Diese weisen jedoch eine morphologisch veränderte Retina und eine Sehbeeinträchtigung auf, im Elektoretinogramm fehlt die b-Welle (Ball et al., 2002). Später konnte ein Fehlen des spannungsabhängigen Calcium-einstroms in Stäbchenzellen der Retina, sowie eine schwere Beeinträchtigung der Synapsen der Stäbchenzellen gezeigt werden (Katiyar et al., 2015). Ebenfalls befindet sich in der Zellmembran von inneren Haarzellen dieser Mäuse deutlich weniger  $Ca_v1.3$ , was eine verminderte Exozytose präsynaptischer Vesikel und eine konsekutive Hörbeeinträchtigung zur Folge hat (Neef et al., 2009).

Eine Frameshift-Mutation im *Cacnb4*-Gen mit verfrühtem Stoppcodon ist Ursache für den Phänotyp der natürlicherweise vorkommenden lethargischen Mäuse (Burgess et al., 1997). Neben Ataxie und Epilepsie zeigen diese Mäuse Nierenzysten, eine Rückbildung der Milz, sowie eine vermutlich auf eine Übersekretion von Kortikosteron zurückzuführende Rückbildung des Thymus (Dung, 1976). Sie besitzen defekte T-Zellen mit verminderter T-Zell-Rezeptor-getriggerte Zytokinproduktion (Badou et al., 2006). Auf die Eigenschaften der  $\beta_3$ -defizienten Mäuse wird in Abschnitt 2.3.3 eingegangen.

### 2.3.2 $Ca_v$ -Kanal-unabhängige Funktionen von $Ca_v\beta$ und $Ca_v\alpha_2\delta$

Ogleich primär als akzessorische Untereinheiten bekannt, wurden später weitere Funktionen der  $\alpha_2\delta$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, welche von  $Ca_v$ -Kanälen unabhängig sein können (Übersichtsarbeit siehe Hofmann et al., 2015). Für die  $\beta$ -Untereinheiten  $Ca_v\beta_1$  (Taylor et al., 2014; Traore et al., 2019),  $Ca_v\beta_2$  (Pickel et al., 2021),  $Ca_v\beta_3$  (Zhang et al., 2010) und  $Ca_v\beta_4$  (Etemad et al., 2014b; Hibino et al., 2003; Tadmouri et al., 2012) wurde nachgewiesen, dass sie in den Zellkern gelangen und dort unabhängig von der  $Ca_v$ -Kanal-Aktivität die Expression verschiedener Gene beeinflussen können. Beispielsweise reguliert  $Ca_v\beta_{1e}$  den Promotor des Growth Differentiation Factor 5 und kann auf diese Weise Muskelschwund nach Denervierung verhindern (Traore et al., 2019).  $Ca_v\beta_3$  fungiert als Regulator von Pax6(S), einer Isoform des Transkriptionsfaktors Pax6. Koexpression von Pax6(S) mit einem  $Ca_v\beta_3$  beinhaltenden  $Ca_v$ -Kanal-Komplex in *Xenopus*-Oozyten führt zur Translokation von  $Ca_v\beta_3$  in den Zellkern, was eine Hemmung von Pax6(S) zur Folge hat (Zhang et al., 2010). Ein weiteres Beispiel ist die durch Membrandepolarisation getriggerte Assoziation von  $Ca_v\beta_4$  mit einer regulatorischen Untereinheit der PP2A-Phosphatase (Ppp2r5). Der Komplex aus  $Ca_v\beta_4$ , PP2A und Ppp2r5 gelangt in den Zellkern und hemmt dort die Expression des Tyrosinhydroxylase-Gens. Bei Patienten mit juveniler myoklonischer Epilepsie wurde im *Cacnb4*-Gen die Mutation R482X nachgewiesen, welche für ein verfrühtes Stopp-Codon sorgt. Entsprechende Experimente mit einem gentechnisch um 38 Aminosäuren verkürzten  $Ca_v\beta_4$ -Protein in CHO-Zellen und hippocampalen Neuronen zeigten, dass dieses den Komplex mit Ppp2r5 nicht mehr ausbildet und fast keine Translokation in den Nukleus mehr stattfindet, was die Funktion als Transkriptionsfaktor verhindert (Escayg et al., 2000; Tadmouri et al., 2012). Experimente einer anderen Arbeitsgruppe widersprechen diesen Resultaten, da sie keine Veränderung der nukleären Translokation

des verkürzten  $\text{Ca}_v\beta_4$  in hippocampalen Neuronen, Skelettmuskel-Myotuben und tsA-201-Zellen nachweisen konnten (Etemad et al., 2014a).

Auch über die Gentranskription hinaus gibt es Beispiele für  $\text{Ca}_v$ -Kanal-unabhängige Funktionen der  $\beta$ -Untereinheiten, so im Immunsystem und im Muskel. Humane und murine T-Zellen exprimieren zwar die mRNA verschiedener  $\text{Ca}_v\alpha_1$ -Untereinheiten, jedoch fehlt die Transkription der 5'-Termini, was zu fehlender Messbarkeit eines spannungsabhängigen Calciumeinstroms mittels Patch Clamp oder Calcium-Imaging führt, sodass von einem Fehlen funktionierender  $\text{Ca}_v$ -Kanäle auszugehen ist. Dennoch konnte ein Effekt von  $\text{Ca}_v\beta_1$  in CD4-positiven T-Zellen gezeigt werden: Die Deletion von  $\text{Ca}_v\beta_1$  führt zu einer gesteigerten Apoptose und hemmt die klonale Expansion nach Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus, ohne den Calciumeinstrom in T-Zellen via T-Zell-Rezeptor zu beeinflussen. Der genaue molekulare Mechanismus ist jedoch noch ungeklärt (Erdogmus et al., 2022).

Eine entscheidende Rolle in der Transmission des molekularen Signals von  $\text{Ca}_v1.1$  zum Ryanodinrezeptor RyR1 spielt die  $\beta_{1a}$ -Untereinheit im Skelettmuskel.  $\beta_1$ -Knockout-Mäuse sterben aufgrund fehlender Muskelkontraktionen bei Geburt (Gregg et al., 1996), das Fehlen des  $\beta_{1a}$ -Proteins im Zebrafisch bewirkt eine komplette Paralyse der Skelettmuskulatur aufgrund fehlender Assoziation der  $\text{Ca}_v1.1$ -Kanäle mit RyR1 (Schredelseker et al., 2005). Mittels *in-vitro*-Bindungsexperimenten konnte eine Gruppe positiv geladener Aminosäurereste als Bindungsstelle von  $\text{Ca}_v\beta_1$  am RyR1 identifiziert werden. Mutationen, die zu einer Neutralisierung dieser positiven Ladung führen, sowie Deletionen in diesem Bereich, reduzierten die Geschwindigkeit und Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über RyR1 in isolierten Maus-Myotuben, was für eine direkte Interaktion zwischen  $\text{Ca}_v\beta_{1a}$  und dem Ryanodinrezeptor spricht (Cheng et al., 2005).

Unabhängig von funktionellen  $\text{Ca}_v$ -Kanälen ist die weitgehend extrazellulär lokalisierte  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit in verschiedenen Geweben an der Bildung von Synapsen beteiligt. Die  $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit spielt eine wichtige Rolle in der Thrombospondin-induzierten Formierung von zerebralen Synapsen, die Überexpression der  $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit sorgt für eine Verstärkung der Synaptogenese (Eroglu et al., 2009). In Motoneuronen von Embryonen der Fliege *Drosophila* ist die  $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit für die Genese der synaptischen Endknöpfchen essenziell (Kurshan et al., 2009). Fehlen alle  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten in hippocampalen Neuronen, so kommt es zu einer Störung der präsynaptischen Differenzierung und der Bildung glutamaterger Synapsen (Schopf et al., 2021). In inneren Haarzellen der murinen Cochlea beeinflusst die  $\alpha_2\delta_2$ -Untereinheit nicht nur die elektrophysiologischen Eigenschaften von  $\text{Ca}_v1.3$ , sondern vermittelt auch die Anlagerung präsynaptischer  $\text{Ca}_v1.3$ -Cluster an postsynaptische Glutamat-Rezeptor-Cluster. In  $\alpha_2\delta_2$ -Knockout-Mäusen kommt es dadurch zu einer Erhöhung der Hörschwelle (Fell et al., 2016). Calcineurin-Inhibitoren bewirken im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus eine Steigerung der synaptischen Expression des NMDA-Rezeptors (NMDAR), was mit einer gesteigerten Sympathikus-Aktivität und arterieller Hypertonie einhergeht. Durch Inhibition von  $\alpha_2\delta_1$  konnte die Überexpression des NMDAR an diesen Synapsen vermindert werden, was zeigt, dass die Interaktion mit  $\alpha_2\delta_1$  für eine gesteigerte NMDAR-Expression erforderlich ist (Zhou et al., 2023).

Die  $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit ist der mutmaßliche Angriffspunkt der wichtigen neuropathischen Schmerztherapeutika Gabapentin und Pregabalin. Purifikation des  $^3\text{H}$ -Gabapentin-bindenden Proteins ergab, dass es sich um die  $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit handelt, Transfektion von  $\alpha_2\delta_1$  in COS-7-Zellen erhöhte die  $^3\text{H}$ -Gabapentin-Bindung um mehr als das 10-fache (Gee et al., 1996). Das strukturell verwandte Pregabalin besitzt bei Mäusen mit der Punktmutation Arginin 217 zu Alanin der  $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit eine erheblich niedrigere Bindungsaffinität und hat keinen Effekt auf neuropathische Schmerzen mehr. Dies demonstriert die funktionelle Wichtigkeit der  $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit für den therapeutischen Effekt von Pregabalin (Field et al., 2006).

### 2.3.3 $\beta_3$ -Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle ( $\text{Ca}_v\beta_3$ )

$\text{Ca}_v\beta_3$  konnte in verschiedenen Zellen und Geweben nachgewiesen werden, darunter in pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Berggren et al., 2004), in glatter Muskulatur im Ileum (Held et al., 2007), in Fibroblasten (Belkacemi et al., 2018), in  $\text{CD4}^+$ - und  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen (Badou et al., 2006; Jha et al., 2009), in der Arteria mesenterica superior (Kharade et al., 2013) und im Gehirn, dort insbesondere im Bulbus olfactorius, im Kortex, im Hippocampus und in den Habenulae (Ludwig et al., 1997).  $\text{Ca}_v\beta_3$  besitzt eine bevorzugte Assoziation zu L- und N-Typ- $\text{Ca}_v$ -Kanälen (Muller et al., 2010; Murakami et al., 2002; Namkung et al., 1998).

Bislang wurden zwei verschiedene *Cacnb3* Knockout-Mauslinien ( $\text{Ca}_v\beta_3$  KO) generiert, eine im Labor von Hee-Sup Shin in Südkorea und eine in unserem Labor. Unter physiologischen Bedingungen zeigen sie normales Wachstum, sind fruchtbar und besitzen keine offensichtlichen Auffälligkeiten in Bezug auf Morphologie oder Verhalten (Murakami et al., 2002; Namkung et al., 1998). Insbesondere unter Stressbedingungen weisen sie jedoch diverse Anomalien auf: im zentralen Nervensystem (Cork et al., 2001; Jeon et al., 2008), in der Schmerzwahrnehmung (Murakami et al., 2002), im kardiovaskulären System (Kharade et al., 2013; Murakami et al., 2000; Murakami et al., 2003), im Immunsystem (Badou et al., 2006; Jha et al., 2009), im endokrinen System (Becker et al., 2021; Berggren et al., 2004; Ohta et al., 2010) und in der Heilung von Hautwunden (Belkacemi et al., 2018).

Exemplarisch kann die erhöhte Insulinsekretion nach Glucosegabe, einhergehend mit einer erhöhten Frequenz Glucose-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen genannt werden (Berggren et al., 2004). In Ins-1-Zellen, einer pankreatischen  $\beta$ -Zelllinie aus der Ratte, führt  $\text{Ca}_v\beta_3$  über eine von  $\text{Ca}_v\alpha_1$  unabhängige Interaktion mit dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor zu einer dosisabhängigen Hemmung der  $\text{IP}_3$ -vermittelten Calciumfreisetzung. Nach genetischer Ablation von  $\text{Ca}_v\beta_3$  mithilfe der CRISPR/Cas9-Methode waren Calciumfreisetzung und die Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen erhöht. Dies führte zu einer erhöhten Glucose-induzierten Insulinsekretion, einer Hochregulation der Insulin-Transkripte *Ins1* und *Ins2* und einer Erhöhung des Insulingehaltes der  $\beta$ -Zellen. Zudem waren für die Insulin-Transkription wichtige Proteine wie die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase 4 (CaMK4) und die Transkriptionsfaktoren phosphoryliertes CREB und MAFA hochreguliert (Becker et al., 2021).

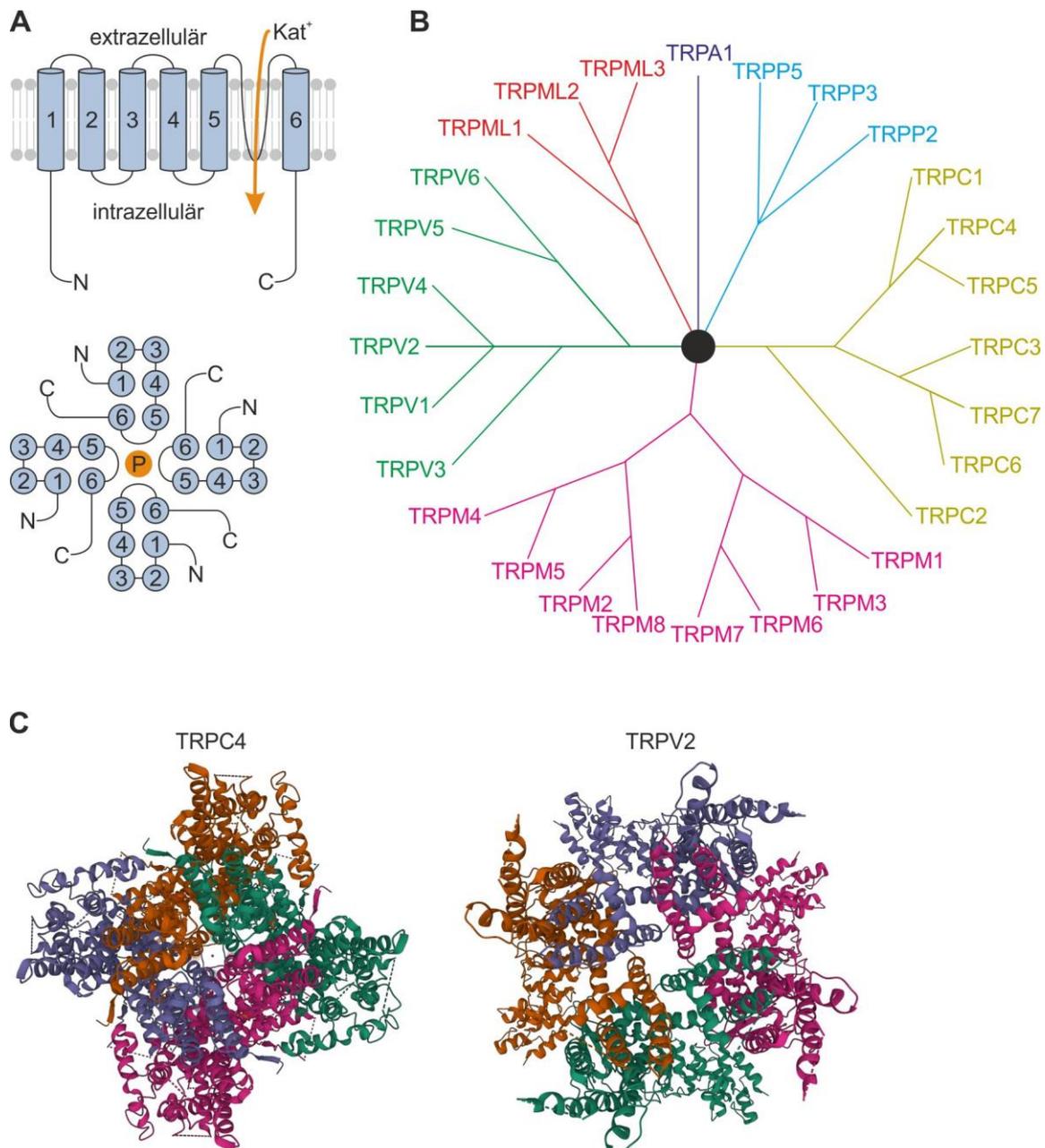
Ein ebenfalls relevanter Phänotyp in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO Mäusen ist die Beschleunigung der *in-vitro*-Migration von Fibroblasten und der *in-vivo*-Wundheilung (Belkacemi et al., 2018). Auch hierfür wurde die Desensibilisierung des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors für niedrige  $\text{IP}_3$ -Konzentrationen verantwortlich gemacht, welche somit in unterschiedlichen erregbaren und nicht-erregbaren Zelltypen demonstriert wurde (Becker et al., 2021; Belkacemi et al., 2018), zudem spezifisch für die  $\beta_3$ -Untereinheit ist und durch die anderen  $\beta$ -Untereinheiten nicht geteilt wird (Belkacemi et al., 2022). Kürzlich konnte  $\text{Ca}_v\beta_3$  in migrierenden dendritischen Zellen nachgewiesen werden und zeigte einen Einfluss auf die ATP-induzierte Calciumfreisetzung und die Migration dieser Zellen (Woo et al., 2023).

## 2.4 Transient Receptor Potential Kanäle

Mit der Erstbeschreibung eines Mutanten-Stammes von *Drosophila melanogaster*, welcher phänotypisch Blindheit bei starker Helligkeit aufwies (Cosens, Manning, 1969) und der Klonierung des verantwortlichen Transient Receptor Potential (TRP) Gens (Montell, Rubin, 1989), wurde der Grundstein für die Familie der TRP-Kanäle gelegt. Das menschliche Genom enthält 27 für TRP-Kanäle codierende Gene, welche aufgrund von Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz in sechs Familien eingeteilt werden: TRPC („canonical“), TRPA („ankyrin“), TRPM („melastatin“), TRPML („mucolipin“), TRPP („polycystin“) und TRPV („vanilloid“; Abb. 2.2). Beim menschlichen *Trpc2* handelt es sich um ein Pseudogen, in der Maus hingegen codiert *Trpc2* für einen funktionsfähigen Kationenkanal (Vannier et al., 1999).

Die erste molekulare Struktur eines TRP-Kanals wurde durch Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) aufgeklärt und stammt von TRPV1 (Liao et al., 2013). Es folgten weitere Strukturen für jede der sechs TRP-Familien (Übersichtsarbeit siehe Madej, Ziegler, 2018). Diese Experimente bestätigten den tetrameren Aufbau der TRP-Kanäle mit vier identischen oder nicht-identischen TRP-Protein-Untereinheiten. Jede der Untereinheiten besteht aus sechs Transmembrandomänen mit einer Kationen-permeablen Pore zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne und zytoplasmatischen N- und C-Termini (Abb. 2.2); (Liao et al., 2013).

Sowohl in der Plasmamembran (Vangeel, Voets, 2019), als auch in Membranen intrazellulärer Kompartimente (Zhang et al., 2018) werden Kationenkanäle durch Proteine der TRP-Familie gebildet. Bei den meisten TRP-Kanälen handelt es sich um schwach spannungssensible, nicht-selektive Kationenkanäle mit einem Permeabilitätsverhältnis für  $\text{Ca}^{2+}$  relativ zu  $\text{Na}^+$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ ) von unter 10 (Wu et al., 2010). Ausnahmen bilden einerseits TRPM4 (Launay et al., 2002) und TRPM5 (Prawitt et al., 2003), die zwar durch den Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert werden, selbst aber nicht für  $\text{Ca}^{2+}$ , sondern nur für monovalente Kationen durchlässig sind. Andererseits besitzen TRPV5 (Vennekens et al., 2000) und TRPV6 (Wissenbach et al., 2001) eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität (Wu et al., 2010).



**Abb. 2.2 Aufbau von TRP-Kanälen**

(A) Schematische Darstellung des allgemeinen Aufbaus von TRP-Kanälen in der Plasmamembran mit sechs hydrophoben Transmembrandomänen, der für Kationen durchlässigen Pore zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne und den zytoplasmatischen N- und C-Termini (oberer Teil). Durch Bildung von Homo- oder Heterotetrameren entsteht ein funktioneller Kanal mit Pore in der Mitte, hier als Homotetramer in der Aufsicht dargestellt (unterer Teil). (B) Phylogenetische Einteilung der TRP-Kanäle aus Wirbeltieren mit den Unterfamilien TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPML und TRPP, *Trpc2* ist beim Menschen ein Pseudogen (nach Nilius und Flockerzi, 2014). (C) Kristallstruktur von TRPC4 (PDB: 5Z96; linker Teil) und TRPV2 (PDB: 5HI9; rechter Teil) in der Aufsicht im Status ohne Bindung von Liganden, jeder der jeweils vier Teile des Homotetramers ist in einer anderen Farbe dargestellt, im Zentrum der TRPC4-Kristallstruktur befindet sich ein Natrium-Ion. Auffällig ist im direkten Vergleich die deutlich weitere Pore von TRPV2, welche vermutlich für partiell hydrierte  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen, sowie große organische Kationen durchlässig ist (Huynh et al., 2016; Duan et al., 2018; Sehnal et al., 2021).

In den letzten Jahren konnten diverse Agonisten und Antagonisten von TRP-Kanälen identifiziert werden, einige davon sind derzeit Gegenstand intensiver präklinischer und klinischer Arzneimittelforschung (Übersichtsarbeit siehe Koivisto et al., 2022). Beispielsweise kann der für die Schmerzempfindung

bedeutende Kanal TRPV1 durch hohe Temperaturen und Capsaicin aktiviert werden (Caterina et al., 1997). Naturstoffe wie Zimtöl, Wintergrünöl, Nelkenöl, Senföl und Ingwer enthalten TRPA1-aktivierende Substanzen (Bandell et al., 2004). Endogene und exogene Cannabinoide sind Aktivatoren diverser TRP-Kanäle, darunter TRPV1 (Bisogno et al., 2001), TRPV2 (Neeper et al., 2007), TRPV3 (De Petrocellis et al., 2012), TRPV4 (Watanabe et al., 2003) und TRPA1 (Jordt et al., 2004). Bei TRPM8 hingegen sind antagonistische Wirkungen diverser Cannabinoide beschrieben (De Petrocellis et al., 2008). Passend zur steigenden wissenschaftlichen Bedeutung der TRP-Kanäle wurde im Jahre 2021 der Nobelpreis für die Entdeckung von TRPV1 und seiner Funktion in der Schmerzwahrnehmung an David Julius verliehen.

### 2.4.1 Transient Receptor Potential Canonical 1 (TRPC1)

Die Familie der TRPC-Kanäle beinhaltet sieben Mitglieder, welche aufgrund von Sequenzhomologien in vier Gruppen aufgeteilt werden können: (1.) TRPC1; (2.) TRPC2; (3.) TRPC3, TRPC6, TRPC7; (4.) TRPC4 und TRPC5 (Abb. 2.2 B). Gemeinsam ist den TRPC-Kanälen, zusätzlich zu den genannten strukturellen Eigenschaften aller TRP-Kanäle, das Vorhandensein von drei bis vier Ankyrin-Repeats am N-Terminus (Wedel et al., 2003), Coiled-Coil-Domänen am N- und C-Terminus (Funayama et al., 1996), einer Prolin-reichen Region am C-Terminus (Vaca et al., 1994), einer Calmodulin/IP<sub>3</sub>-bindenden Region am C-Terminus (Chevesich et al., 1997) und des TRP-Motivs am C-Terminus (Übersichtsarbeit siehe Samanta et al., 2018).

Von TRPC1 wurde noch keine Kristallstruktur publiziert, jedoch vom phylogenetisch ähnlichen TRPC4 (Duan et al., 2018). Es zeigte sich die symmetrische, homotetramere Struktur mit je sechs Transmembrandomänen und der Pore zwischen S5 und S6. Die lange Poren-Schleife wird durch eine von zwei, auch in der Primärstruktur von TRPC1 vorkommenden Cysteinen gebildete Disulfidbrücke zwischen S5 und der Poren-Helix stabilisiert (Abb. 2.2 C).

Obleich es sich bei TRPC1 um den ersten humanen TRP-Kanal handelt, dessen cDNA nachgebildet wurde (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1995), ist seine Rolle als eigenständiger Ionenkanal Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion (Übersichtsarbeit siehe Dietrich et al., 2014). TRPC1 kann Heterotetramere mit anderen TRP-Kanälen bilden: TRPC3 (Lintschinger et al., 2000; Storch et al., 2012), TRPC4 und TRPC5 (Hofmann et al., 2002; Strubing et al., 2001), TRPC6 und TRPC7 (Storch et al., 2012), TRPP1 (Tsiokas et al., 1999), TRPV4 (Ma et al., 2011) und TRPV6 (Schindl et al., 2012). Die Bildung von TRPC1-Heterotetrameren mit TRPC3-7 in HEK-Zellen führt zu einer Verminderung der Ca<sup>2+</sup>-Permeation im Vergleich zu den Homomeren (Storch et al., 2012). Im Maus-Gehirn zeigte sich, dass TRPC1/C4/C5-Heterotetramere mit anderen Proteinen Komplexe von etwa 1 MDa Größe bilden. Kopurifikation identifizierte unter anderem den metabotropen Glutamatrezeptor mGluR1 als Interaktionspartner (Kollewe et al., 2022). Eine Rolle von TRPC1 im speicherabhängigen Calciumeinstrom wurde bereits bei den ersten Klonierungen genannt (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1995). Mittlerweile wurde von

Interaktionen mit den dafür relevanten Proteinen Orai1 (Liao et al., 2009) und STIM (Lee et al., 2010) berichtet.

Eine Folge davon ist beispielsweise, dass beim Fehlen von TRPC1 in Azinuszellen der Speicheldrüsen der speicherabhängige Calciumstrom abgeschwächt ist, wodurch *Trpc1* KO Mäuse eine verminderte Speichelproduktion aufweisen (Liu et al., 2007). Generell sind *Trpc1* KO Mäuse lebens- und fortpflanzungsfähig, zeigen jedoch diverse Abnormalitäten, wie beispielsweise ein erhöhtes Körpergewicht (Dietrich et al., 2007). Physiologisch relevante Funktionen wie die *in-vitro*-Zellmigration und -Angiogenese endothelialer Progenitorzellen, sowie die *in-vivo*-Angiogenese sind beim Fehlen von TRPC1 eingeschränkt (Du et al., 2018). Auch an pathologischen Prozessen ist TRPC1 beteiligt, so entwickeln *Trpc1* KO Mäuse keine pulmonale Hypertonie in Reaktion auf chronische Hypoxie (Malczyk et al., 2013), haben jedoch mehr neurologische Schäden nach Ischämie und Reperfusion (Xu et al., 2018), sowie eine schlechtere Genesung nach einem Myokardinfarkt (Wen et al., 2022).

### 2.4.2 Transient Receptor Potential Vanilloid 2 (TRPV2)

TRPV2 gehört zur Unterfamilie der Vanilloid-TRP-Kanäle, deren Name aufgrund der Aktivierung des ersten Mitglieds TRPV1 durch Capsaicin – ein Vanilloid – entstand (Caterina et al., 1997). Die Familie wird aufgeteilt in die unselektiven Kationenkanäle TRPV1-4 und die  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven TRPV5 und TRPV6 (Abb. 2.2 B). Die TRPV-Unterfamilie zeichnet sich strukturell durch einen großen zytoplasmatischen N-Terminus mit sechs Ankyrin-Repeats und einem kürzeren zytoplasmatischen C-Terminus aus (Übersichtsarbeit siehe Sasase et al., 2022).

Die Sequenzhomologie von TRPV2 mit TRPV1 beträgt ca. 50%, insbesondere im Bereich der Pore ist die Homologie hoch. Dennoch unterscheidet sich die Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$  zwischen den beiden Kanälen deutlich, TRPV2 besitzt mit  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \approx 3$  eine deutlich geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität als TRPV1 mit  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \approx 10$  (Caterina et al., 1999; Caterina et al., 1997). Die später geklärten Kryo-EM-Strukturen zeigten Unterschiede im Aufbau der Pore zwischen TRPV2 und TRPV1: Die Pore von TRPV2 besitzt zwei Engstellen, die deutlich weiter sind als die zwei Engstellen von TRPV1. Die strukturellen Unterschiede im Aufbau der Pore könnten eine Erklärung für die unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität sein (Huynh et al., 2016; Liao et al., 2013). Kryo-EM-Untersuchungen mit Kaninchen-TRPV2 ergaben, dass es durch Bindung von Resiniferatoxin zu einer weiten Öffnung der Pore kommt. In diesem Status können dann große organische Kationen die Pore von TRPV2 durchdringen (Zubcevic et al., 2018). Resiniferatoxin ist ein TRPV1-Agonist, dessen intraartikuläre Injektion Erfolge in der Schmerztherapie bei Kniegelenksarthrose von Hunden zeigte (Iadarola et al., 2018) und mittlerweile in Phase-3-Studien am Menschen untersucht wird.

Ursprünglich wurde beschrieben, dass TRPV2 unter Ruhebedingungen intrazellulär verweilt und durch Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) über einen Phosphatidyl-Inositol-3-(PI3-)-Kinase abhängigen Signalweg in die Plasmamembran gebracht werden kann (Kanzaki et al., 1999). Auch in pankreatischen  $\beta$ -

Zellen bewirkt Insulin über den PI3-Kinase-Signalweg eine Translokation von TRPV2 in die Plasmamembran (Aoyagi et al., 2010). Eine andere Studie kam jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen und konnte mittels monoklonaler TRPV2-Antikörper keinen Effekt von IGF-1 auf die Translokation von TRPV2 in die Plasmamembran von CHO-K1- und F11-Zellen zeigen (Cohen et al., 2013). Trotz der Sequenzhomologie mit dem durch Hitze und Vanilloide aktivierten TRPV1 reagiert TRPV2 weder auf Vanilloide, noch auf moderat ansteigende Temperaturen, sondern benötigt hohe Temperaturschwellen von mehr als 52 °C, um aktiviert zu werden (Caterina et al., 1999). Zudem kann TRPV2 durch den unspezifischen Agonisten 2-APB (Hu et al., 2004) aktiviert und durch den ebenfalls unspezifischen Antagonisten Rutheniumrot (Neeper et al., 2007) inhibiert werden. Weitere Aktivatoren sind Lysophosphatidylcholin (Monet et al., 2009), Cannabinoide wie  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol und Cannabidiol (De Petrocellis et al., 2011) und Probenecid (Bang et al., 2007). Jüngst zeigten strukturelle Daten, dass 2-APB und Cannabidiol simultan an TRPV2 binden können und diesen synergistisch aktivieren (Gochman et al., 2023; Pumroy et al., 2022). Cannabidiol kann an zwei verschiedene Stellen am TRPV2-Kanal binden und bewirkt eine Sensibilisierung für eine Aktivierung durch 2-APB (Gochman et al., 2023).

TRPV2 Knockout-Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar, jedoch haben sie ein verringertes Körpergewicht und eine erhöhte perinatale Mortalität (Park et al., 2011). Sie zeigen im Gegensatz zu TRPV1-Knockout-Mäusen keine Beeinträchtigung der Reaktion auf mechanische und thermische Schmerzreize (Caterina et al., 2000; Park et al., 2011). Defekte ergeben sich jedoch beispielsweise im Immunsystem. In Makrophagen bewirkt die Aktivierung des  $Fc\gamma$ -Rezeptors durch IgG einen Kationeneinstrom über TRPV2 und dadurch eine Membrandepolarisation, welche für die Clusterbildung um die IgG-gebundenen Partikel essenziell ist. Fehlt TRPV2, ist die Phagozytose der IgG-gebundenen Partikel gestört, so dass *Trpv2* KO Mäuse eine deutlich höhere Mortalität nach Infektionen mit *Listeria monocytogenes* besitzen (Link et al., 2010). Eine Untersuchung von Knochenmarks-Dendritischen Zellen und -Makrophagen zeigte, dass das Herpes-simplex-Virus-1 (HSV-1) über TRPV2 einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom auslöst, welcher HSV-1 die Penetration der Zellmembran erleichtert. Folge davon ist, dass in Mäusen mit einem Knockout von TRPV2 in myeloiden Zellen die HSV-1-Penetration erheblich vermindert ist und die Mäuse eine Infektion mit HSV-1 deutlich länger überleben (Guo et al., 2022).

TRPV2 wurde in den Glanzstreifen, der Region zwischen angrenzenden Herzmuskelzellen, identifiziert. Dort scheint TRPV2 für die Bildung und Aufrechterhaltung der normalen Strukturen und für die Funktionen der Herzmuskelzellen verantwortlich zu sein (Katanosaka et al., 2014). Unsere Arbeitsgruppe konnte TRPV2 in humanen und murinen Erythrozyten identifizieren. Die Aktivierung von TRPV2 mittels  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) ging mit einer höheren Resistenz gegen hypotone Lösungen einher. TRPV2 vermittelt einen Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$ , was zur Aktivierung des Kaliumkanals  $KCa3.1$  mit konsekutivem Kaliumausstrom führt, welcher wiederum vor Hämolyse der Erythrozyten durch hypotone Lösungen schützt (Belkacemi et al., 2021). Auch in anderen Zellen weist TRPV2 eine breite funktionelle Expression auf, so in aortalen Myozyten (Muraki et al., 2003) pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Aoyagi et al., 2010) und braunem Fettgewebe (Sun et al., 2016). Die Über- oder Unterexpression

von TRPV2 in malignen Neoplasien wie Urothelkarzinomen (Caprodossi et al., 2008) und malignen Gliomen (Nabissi et al., 2010) unterstreicht die Rolle als potentiell Ziel neuer Therapeutika (Übersichtsarbeit siehe Santoni et al., 2020).

## 2.5 Ziele der Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit sind:

1. In MBMECs, welche im Allgemeinen als nicht-erregbare Zellen gelten, identifizierten wir das  $\text{Ca}_v\beta_3$ -Protein. Die Funktion von  $\text{Ca}_v\beta_3$  in diesen Zellen ist noch nicht bekannt. Ein Ziel meiner Doktorarbeit war es, die  $\text{Ca}_v$ -unabhängige Rolle von  $\text{Ca}_v\beta_3$  in diesen Zellen und seine Auswirkungen auf die Endothelzellmigration und Angiogenese zu untersuchen. Primäre MBMECs von  $\text{Ca}_v\beta_3$ -KO-Mäusen wurden als Kontrollen verwendet.
2. In nicht-erregbaren Zellen erfolgt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch andere Ionenkanäle in der Plasmamembran, unter anderem durch Mitglieder der Familie der „Transient Receptor Potential“ (TRP)-Kanäle. Wir identifizierten in primären MBMECs mehrere Gene, die für Mitglieder der TRP-Kanalfamilie codieren, unter anderem die *Trpc1*- und *Trpv2*-Gene. Die genaue Rolle von TRPC1 und TRPV2 bei der Regulation der Calciumsignale und der Integrität der Blut-Hirn-Schranke ist noch nicht vollständig geklärt. Das zweite Ziel meiner Arbeit war die Untersuchung der Funktion von TRPC1- und TRPV2-Kanälen bei der Regulierung der Calciumsignale, der Zellmigration, der Angiogenese, sowie der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke. Als Kontrolle wurden primäre MBMECs aus *Trpc1* KO und *Trpv2* KO Mäusen verwendet.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3.1: Liste der Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller	Bestellnummer
24-Well-Platten	Falcon (Corning Incorporated, Durham, USA)	353047
96-Well-Platten	Falcon (Corning Incorporated, Durham, USA)	353072
CellCarrier™-96 ultra	PerkinElmer (Waltham, USA)	6055302
Deckgläser 12mm: Menzel™ Mikroskop-Deckelgläser	Thermo Scientific Menzel (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)	11708701
Gel für Western Blot: NUPage-Bolt, 10 Well, 4-12% Bis-Tris Plus	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA)	NW04120BOX
Neubauer improved Zählkammer (Tiefe 0,1 mm)	Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)	0640030
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad (Feldkirchen, Deutschland)	1620112
Objektträger: SuperFrost®-Objektträger, Mattrand weiß	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)	03-0040
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	70.760.012
Pipettenspitzen 1 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	70.762.010
Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere 0,1-10 µl	Fisherbrand (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)	11913466
Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere 2-20 µl	Fisherbrand (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)	11943466
Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere 20-200 µl	Fisherbrand (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)	11963466
Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere 100-1000 µl	Fisherbrand (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)	11973466
Polypropylen-Nadeln	BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland)	1750006
Reaktionskammer: Quick Change Chamber For 12 mm	Warner Instruments (Hamden, USA)	RP-48LP
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	72.690.001
Röhren 15 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	62.554.502
Röhren 50 ml	Cellstar (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)	227261
Schälchen Falcon® 35 mm TC-treated Easy-Grip Style Cell Culture Dish	Falcon (Corning Incorporated, Durham, USA)	353001
Serologische Pipetten 1 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	86.1251.025
Serologische Pipetten 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	86.1252.025
Serologische Pipetten 5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	86.1253.025
Serologische Pipetten 10 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	86.1254.025

## Material und Methoden

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Serologische Pipetten 25 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	86.1685.020
Spritzen: Braun Injekt Luer Solo	B. Braun (Melsungen, Deutschland)	4606205V
µ-Slide Angiogenesis, ibiTreat	Ibidi (Gräfelfing, Deutschland)	81506
Spritzenvorsatzfilter Sarstedt Filtropur (Porengröße 0,2 µm)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	83.1826.001
Whatman Papier	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)	02912031
Zellkultur-Einätze	Falcon (Corning Incorporated, Durham, USA)	353495

### 3.1.2 Geräte

**Tabelle 3.2: Liste der Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav Systec VX-95	Systec (Linden, Deutschland)
Automatisches Mikroskop: Lionheart FX	BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland)
AutoScratch™	BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Beleuchtungseinrichtung Zeiss HXP 120 C	Carl Zeiss AB (Stockholm, Schweden)
CO <sub>2</sub> -Gaskontrolleinheit für automatisches Mikroskop: CO <sub>2</sub> -only gas Controller	BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Filter für Axio Observer.Z1	AHF Analysetechnik (Tübingen, Deutschland)
Fura-Filter CHROMA (> 440 nm)	Chroma Technology Corporation (Bellows Falls, USA)
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.Z1	Carl Zeiss AB (Stockholm, Schweden)
Fluoreszenzmikroskop für Calcium Imaging Axiovert 200M	Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland)
Heizblock HTMR-133	HLC (Bovenden, Deutschland)
Kontrolleinheit für Polychrome V Control Unit 1103	Till Photonics (Kaufbeuren, Deutschland)
Kamera für Calcium Imaging Andor iXon DV885JC-VP	Quantum Design (Darmstadt, Deutschland)
Kamera für Axio Observer.Z1: ZEISS AxioCam MRm	Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland)
Lichtmikroskop Wilovert S	Helmut Hund (Wetzlar, Deutschland)
Lumineszenzbild-Analysegerät: FUJIFILM Luminescent Image Analyzer LAS-3000 IDX4	Fuji Photo Film (Tokyo, Japan)
Mikrotiterplatten-Lesegerät: Tecan Infinite 200	Tecan Austria (Grödig, Österreich)
Monochromator Polychrome V	Till Photonics (Kaufbeuren, Deutschland)
Objektiv Fluar 20x/0,75	Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland)
Schüttler Kombischüttler KL 2	Edmund Bühler (Hechingen, Deutschland)
Ultraschall-Homogenisator SONOPLUS UW2200	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Werkbank Köttermann 8511	Köttermann (Uetze, Deutschland)
Wasserbad WB 14	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Zellkultur-Inkubator CB-150	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)

Gerät	Hersteller
Zentrifuge Sigma 1-14	Sigma Laborzentrifugen (Osterode am Harz, Deutschland)

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3.3: Liste der Chemikalien und Reagenzien**

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
2-Aminoethoxydiphenyl-Borat (2-APB)	Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	D9754
2-Mercaptoethanol	Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	M3148-100ml
Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF)	PeproTech (Rocky Hill, USA)	100-18B
Bolt MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA)	B0001
Bradykinin	Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	B3259
Bromphenolblau	Cytiva (Little Chalfont, Vereinigtes Königreich)	17-1329-01
CaCl <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	A1873,1000
Carbachol	Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	C4382
Collagen Typ 4	Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	C5533-5mg
Collagenase/Dispase	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)	102 696 38 001
D-(+)-Glucose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	X997.2
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	276855
DNase	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)	101 041 59 001
Eindeckmedium: Fluoromount-G	Southern Biotech (Birmingham, USA)	0100-01
Ethylenbis-(oxyethylen-nitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	A0878,0025
Ethanol, 99% vergällt mit 1% Methyllethylketon	Biesterfeld Spezialchemie (Hamburg, Deutschland)	5330451200
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco (Life Technologies, Paisley, Vereinigtes Königreich)	10270
Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM)	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA)	F1221
	AnaSpec (Fremont, USA)	AS-84017
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	0079.3
Glyzerin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	3783.1
Heparin	Merck (Darmstadt, Deutschland)	H3393
Hoechst 33258 -Lösung	Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	94403-1ML

## Material und Methoden

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	9015.4
Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	PeproTech (Rocky Hill, USA)	300-02
Interleukin-1- $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	PeproTech (Rocky Hill, USA)	211-11B
KCl	Grüssing (Filsum, Deutschland)	120081000U
Magermilchpulver Sucofin	TSI (Zeven, Deutschland)	
Matrigel	Gibco (Life Technologies, Paisley, Vereinigtes Königreich)	A14132-02
Methanol, 98% zur Synthese	Biesterfeld Spezialchemie (Hamburg, Deutschland)	50426012
MgCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	2189.1
NaCl	Grüssing (Filsum, Deutschland)	121221000U
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	A1112,0100
Normales Eseserum (NDS)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	017-000-121
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	P6148-500G
Pluronic F-127	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA)	P3000MP
Puromycin	Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	P8833
Reinigungsmittel Alconox	Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	242985
Rinder-Serumalbumin (BSA)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	A1391,0100
Thapsigargin	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA)	T7459
Thrombin	Enzyme Research (South Bend, USA)	HT 5444L
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	4855.2
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) Hydrochlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	9090.3
Triton X 100	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	6683.1
Trypsin-EDTA Lösung	Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	T4174
Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	PeproTech (Rocky Hill, USA)	300-01A
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	9127.1
Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)	PeproTech (Rocky Hill, USA)	450-32-2UG
Western Blot Protein Standards: Dual Color Marker	Bio-Rad (Feldkirchen, Deutschland)	1610374
Western Lightning Plus ECL	PerkinElmer (Groningen, Niederlande)	ORT2655 ORT2755

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Zellkultur-Medium: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 31966	Gibco (Life Technologies, Paisley, Vereinigtes Königreich)	31966-021

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

#### Stammlösungen

Tabelle 3.4: Liste der Stammlösungen

Stammlösung	Konzentration	Lösungsmittel	Lagerung
2-APB	400 mmol/l	Methanol	-20 °C
Alconox®	10 g/l	Bidest. Wasser	4 °C
bFGF	20 µg/ml	Bidest. Wasser	-20 °C
Bradykinin	10 mmol/l	Bidest. Wasser	-20 °C
Carbachol	1 mol/l	Bidest. Wasser	-20 °C
Collagen	1 mg/ml	Bidest. Wasser	-20 °C
Collagenase/Dispase	100 mg/ml	Bidest. Wasser	-20 °C
DNase	10 mg/ml	Bidest. Wasser	-20 °C
Ethanol	70% (v/v)	Bidest. Wasser	Raumtemperatur
FITC-Albumin	10 mg/ml	Bidest. Wasser + 0,2% (w/v) BSA	4 °C
Fura-2AM	1 mmol/l	DMSO	4 °C
Heparin	100 µg/ml	DMEM	-20 °C
IFN-γ	20 µg/ml	Bidest. Wasser	-20 °C
IL-1β	20 µg/ml	Bidest. Wasser	-20 °C
Puromycin	4 mg/ml	Bidest. Wasser	-20 °C
Thapsigargin	1 mmol/l	DMSO	-20 °C
Thrombin	5 U/µl	Bidest. Wasser	-80 °C
TNF-α	20 µg/ml	Bidest. Wasser	-20
TRITC-Dextran	10 mg/ml	Bidest. Wasser + 0,2% (w/v) BSA	4 °C
Trypsin	5 g/l	PBS	-20 °C
VEGF	2 µg/ml	Bidest. Wasser + 0,1% (w/v) BSA	-80 °C

#### Pufferlösungen

Tabelle 3.5: 10x SDS-Puffer

10x SDS-Puffer	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
Tris	121,14 g/mol	250 mmol/l	30,29 g
Glycin	75,07 g/mol	1920 mmol/l	144,1 g
SDS	288,38 g/mol	34,68 mmol/l	10 g
Bidest. Wasser			Ad 1000 ml pH = 8,3

Lagerung bei Raumtemperatur.

**Tabelle 3.6: 10% (w/v) SDS-Puffer**

<b>10% (w/v) SDS-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
SDS	288,38 g/mol	346,8 mmol/l	10 g
Bidest. Wasser			Ad 100 ml
Lagerung bei Raumtemperatur.			

**Tabelle 3.7: 10x TBS-Puffer**

<b>10x TBS-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
NaCl	58,44 g/mol	1500 mmol/l	87,66 g
Tris	121,14 g/mol	200 mmol/l	24,23 g
Bidest. Wasser			Ad 1000 ml
pH = 7,4			
Lagerung bei Raumtemperatur.			

**Tabelle 3.8: 0,1% (w/v) TBST-Puffer**

<b>0,1% (w/v) TBST-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
Tween 20	1227,54 g/mol	0,814 mmol/l	0,1 g
TBS-Puffer			Ad 100 ml
Lagerung bei Raumtemperatur.			

**Tabelle 3.9: 10x PBS-Puffer**

<b>10x PBS-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
NaCl	58,44 g/mol	1370 mmol/l	80,06 g
KCl	74,55 g/mol	27 mmol/l	2,013 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09 g/mol	18 mmol/l	2,45 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	177,99 g/mol	100 mmol/l	17,8 g
Bidest. Wasser			Ad 1000 ml
pH = 7,4			
Nach dem Ansetzen wurde der Puffer autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.			

**Tabelle 3.10: 0,2% (w/v) PBST-Puffer**

<b>0,2% (w/v) PBST-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
Triton X 100	624 g/mol	3,205 mmol/l	0,2 g
PBS-Puffer			Ad 100 ml
Lagerung bei 4 °C.			

**Tabelle 3.11: 2x SDS-Denaturierungs-Puffer**

<b>2x SDS-Denaturierungs-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
SDS	288,38 g/mol	277,4 mmol/l	8 g
Tris	121,14 g/mol	120 mmol/l	1,454 g
Bromphenolblau	669,99 g/mol	0,01% (w/v)	0,01 g
Glycerin	92,09 g/mol	20% (v/v)	20 ml
2-Mercaptoethanol	78,13 g/mol	10% (v/v)	10 ml
Bidest. Wasser			Ad 100 ml
			pH = 6,8

Lagerung bei -20 °C.

**Tabelle 3.12: Blotting-Puffer**

<b>Blotting-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Volumen
10x SDS-Puffer		10% (v/v)	200 ml
Methanol	32,04 g/mol	20% (v/v)	400 ml
Bidest. Wasser			Ad 2000 ml

Frisch zubereitet vor dem Versuch.

**Tabelle 3.13: Stripping-Puffer**

<b>Stripping-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
10% (w/v) SDS		20% (v/v)	20 ml
Tris-HCl	157,60 g/mol	6,25% (v/v)	6,25 ml
2-Mercaptoethanol	78,13 g/mol	0,7% (v/v)	700 µl
Bidest. Wasser			Ad 100 ml

Frisch zubereitet vor dem Versuch.

**Tabelle 3.14: 0,5 mmol/l EGTA-Puffer**

<b>0,5 mmol/l EGTA-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
NaCl	58,44 g/mol	140 mmol/l	2,045 g
KCl	74,55 g/mol	4 mmol/l	0,07455 g
MgCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	203,3 g/mol	3 mmol/l	0,1525 g
HEPES	238,31 g/mol	10 mmol/l	0,5958 g
Glucose	180,16 g/mol	10 mmol/l	0,4504 g
EGTA	380,35 g/mol	0,5 mmol/l	0,04754 g
Bidest. Wasser			Ad 250 ml
			pH = 7,35

Lagerung bei 4 °C.

**Tabelle 3.15: 0 mmol/l Ca<sup>2+</sup>-Puffer**

<b>0 mmol/l Ca<sup>2+</sup>-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
NaCl	58,44 g/mol	140 mmol/l	2,045 g
KCl	74,55 g/mol	4 mmol/l	0,07455 g
MgCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	203,3 g/mol	3 mmol/l	0,1525 g
HEPES	238,31 g/mol	10 mmol/l	0,5958 g
Glucose	180,16 g/mol	10 mmol/l	0,4504 g
Bidest. Wasser			Ad 250 ml pH = 7,35

Lagerung bei 4 °C.

**Tabelle 3.16: 2 mmol/l Ca<sup>2+</sup>-Puffer**

<b>2 mmol/l Ca<sup>2+</sup>-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
NaCl	58,44 g/mol	140 mmol/l	2,045 g
KCl	74,55 g/mol	4 mmol/l	0,07455 g
MgCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	203,3 g/mol	2 mmol/l	0,1017 g
HEPES	238,31 g/mol	10 mmol/l	0,5958 g
Glucose	180,16 g/mol	10 mmol/l	0,4504 g
CaCl <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	147,02 g/mol	2 mmol/l	0,07351 g
Bidest. Wasser			Ad 250 ml pH = 7,35

Lagerung bei 4 °C.

**Tabelle 3.17: 4 mmol/l Ca<sup>2+</sup>-Puffer**

<b>4 mmol/l Ca<sup>2+</sup>-Puffer</b>	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
NaCl	58,44 g/mol	140 mmol/l	2,045 g
KCl	74,55 g/mol	4 mmol/l	0,07455 g
MgCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	203,3 g/mol	1 mmol/l	0,05082 g
HEPES	238,31 g/mol	10 mmol/l	0,5958 g
Glucose	180,16 g/mol	10 mmol/l	0,4504 g
CaCl <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	147,02 g/mol	4 mmol/l	0,147 g
Bidest. Wasser			Ad 250 ml pH = 7,35

Lagerung bei 4 °C.

**Tabelle 3.18: 10 mmol/l Ca<sup>2+</sup>-Puffer**

10 mmol/l Ca <sup>2+</sup> -Puffer	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
NaCl	58,44 g/mol	140 mmol/l	2,045 g
KCl	74,55 g/mol	4 mmol/l	0,07455 g
MgCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	203,3 g/mol	1 mmol/l	0,05082 g
HEPES	238,31 g/mol	10 mmol/l	0,5958 g
Glucose	180,16 g/mol	10 mmol/l	0,4504 g
CaCl <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	147,02 g/mol	10 mmol/l	0,3676 g
Bidest. Wasser			Ad 250 ml pH = 7,35

Lagerung bei 4 °C.

**Tabelle 3.19: 96 mmol/l K<sup>+</sup>-Puffer**

96 mmol/l K <sup>+</sup> -Puffer	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
NaCl	58,44 g/mol	48 mmol/l	0,7013 g
KCl	74,55 g/mol	96 mmol/l	1,7892 g
MgCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	203,3 g/mol	2 mmol/l	0,1017 g
HEPES	238,31 g/mol	10 mmol/l	0,5958 g
Glucose	180,16 g/mol	10 mmol/l	0,4504 g
CaCl <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	147,02 g/mol	2 mmol/l	0,07351 g
Bidest. Wasser			Ad 250 ml pH = 7,35

Lagerung bei 4 °C.

### Fixierlösung

**Tabelle 3.20: 4% (w/v) PFA-Lösung**

4% (w/v) PFA-Lösung	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
PFA	30,03 g/mol	4% (w/v)	20 g
PBS			Ad 500 ml pH = 6,9

Lagerung bei 4 °C.

### 20% (w/v) BSA-Lösung

**Tabelle 3.21: 20% (w/v) BSA-Lösung**

20% (w/v) BSA-Lösung	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
BSA	68.000 g/mol	20% (w/v)	5 g
PBS			Ad 50 ml

BSA wurde für mehrere Stunden bei Raumtemperatur in DMEM gelöst und mithilfe des Spritzenvorsatzfilters mit Porengröße 0,2 µm steril filtriert.

## 3.1.5 Medien

Sämtliche der hier gezeigten Medien wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt.

**Tabelle 3.22: Wachstumsmedium**

Wachstumsmedium	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
FCS		20% (v/v)	40 ml
Heparin		100 ng/ml	200 µl
bFGF	17.200 g/mol	10 ng/ml	100 µl
DMEM 31966			Ad 200 ml

Lagerung bei 4 °C für maximal drei Wochen, für Migrationsassays immer neu angesetzt.

**Tabelle 3.23: Wachstumsmedium mit Puromycin**

Wachstumsmedium mit Puromycin	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
FCS		20% (v/v)	10 ml
Heparin		100 ng/ml	50 µl
bFGF	17.200 g/mol	10 ng/ml	25 µl
Puromycin	544,43 g/mol	4 µg/ml	50 µl
DMEM 31966			Ad 50 ml

Lagerung bei 4 °C für maximal drei Wochen.

**Tabelle 3.24: Medium mit 2% FCS**

Medium mit 2% FCS	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
FCS		2% (v/v)	1 ml
Heparin		100 ng/ml	50 µl
bFGF	17.200 g/mol	10 ng/ml	25 µl
DMEM 31966			Ad 50 ml

Immer vor den Experimenten neu angesetzt.

**Tabelle 3.25: Ersatzmedium**

Ersatzmedium	Molekulargewicht	Konzentration	Gewicht
TRITC-Dextran	4400 g/mol	0,1% (w/v)	100 µl
FITC-Albumin	66.000 g/mol	0,025% (w/v)	25 µl
PBS+0,2% (w/v) BSA			875 µl

Frisch zubereitet vor dem Versuch.

### 3.1.6 Antikörper

**Tabelle 3.26: Liste der Primär-Antikörper**

Primär-Antikörper	Spezies, Klonalität	Verdünnung (Verwendung)	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Ca <sub>v</sub> β <sub>3</sub> 828	Hase, polyklonal	1:500 (Western Blot)	Herstellung in unserem Labor (Berggren et al., 2004)	
Anti-Integrin β <sub>1</sub> , TS2/16	Maus, monoklonal	1:50 (Immunfärbung)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	sc-53711
Anti-PECAM-1 (CD31) M-20	Kaninchen, polyklonal	1:200 (Western Blot, Immunfärbung)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	sc1506-R

## Material und Methoden

<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Spezies, Klonalität</b>	<b>Verdünnung (Verwendung)</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Anti-p-FAK Ser 732	Hase, polyklonal	1:100 (Immunfärbung)	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA)	44-590G
Anti-p-Src pTyr419	Hase, polyklonal	1:100 (Immunfärbung)	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA)	44-660G
Anti-VE-Cadherin	Ziege, polyklonal	1:80 (Immunfärbung)	R&D Systems (Minneapolis, USA)	AF1002
Anti-Vinculin (H-10)	Maus, monoklonal	1:50 (Immunfärbung)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	sc-25336
Anti-ZO-1	Hase, polyklonal	1:1000 (Immunfärbung)	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA)	40-2300

**Tabelle 3.27: Liste der Sekundär-Antikörper**

<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Spezies Ziel/Host, Klonalität</b>	<b>Verdünnung (Verwendung)</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Alexa Fluor donkey anti-goat IgG (H+L)	Ziege/Esel, polyklonal	1:1000 (Immunfärbung)	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA)	A-11055
Alexa Flour goat anti-mouse IgG (H+L)	Maus/Ziege, polyklonal	1:1000 (Immunfärbung)	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA)	A-11029
Cy5 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Maus/Esel, polyklonal	1:1000 (Immunfärbung)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	715-175-151
Cy <sup>TM</sup> 5 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Hase/Esel, polyklonal	1:1000 (Immunfärbung)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	711-175-152
ECL Anti-mouse IgG, Horseradish	Maus/Schaf, monoklonal	1:20.000 (Western Blot)	GE Healthcare UK Limited (Amersham, Vereinigtes Königreich)	NA9310V
ECL Anti-rabbit IgG	Hase/Esel, monoklonal	1:40.000 (Western Blot)	GE Healthcare UK Limited (Amersham, Vereinigtes Königreich)	NA9340V

**Tabelle 3.28: Liste der fluoreszierenden Substanzen**

<b>Fluoreszenzmarkierte Substanzen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Albumin-Fluoreszein-Isothiocyanat Konjugat (FITC-Albumin)	Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	A9771-1G

Fluoreszenzmarkierte Substanzen	Hersteller	Bestellnummer
Alexa Fluor 350 phalloidin	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA)	A22281
Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat–Dextran (TRITC-Dextran)	Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)	T1037

### 3.1.7 Mäuse

Alle Experimente wurden tierschutzgerecht und mit Einverständnis des Tierschutzausschusses der Universität des Saarlandes, sowie des Bundeslandes Saarland durchgeführt. Jede Prozedur war in Einklang mit den gesetzlichen Bestimmungen der Bundesrepublik Deutschland. Jegliche Bemühungen wurden unternommen, um das Leiden der Tiere und die Anzahl der verwendeten Tiere zu reduzieren. Mäuse aller Genotypen wurden in einer spezifiziert pathogenfreien Umgebung gehalten. Sie hatten Zugang zu Futter und Trinkwasser *ad libitum* und wurden in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Wir konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede feststellen, daher wurden die Geschlechter zusammen dargestellt.

#### *Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO Mäuse*

Die globalen Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO Mäuse wurden von A. Belkacemi, S. Mannebach und V. Flockerzi in unserem Labor hergestellt (noch nicht publiziert). Als Kontrolle wurden C57BL/6N Mäuse verwendet (Wildtyp (WT), Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland).

#### *Trpc1 KO Mäuse und ihre WT Kontrollen*

Die *Trpc1* KO Mäuse wurden von Dr. Ashan Raza in unserem Labor hergestellt (A. Raza, V. Flockerzi, noch nicht publiziert). Als Kontrolle wurden C57BL/6N Mäuse verwendet (WT, Charles River Laboratories).

#### *Trpv2 KO Mäuse und ihre WT Kontrollen*

Die Herstellung der *Trpv2* KO Mäuse wurde durch Park et al. beschrieben (Park et al., 2011). Die *Trpv2* KO Mäuse wurden uns von Prof. Dr. Michael J. Caterina, der Johns Hopkins University (Baltimore, USA) und der University of California San Francisco (UCSF) zur Verfügung gestellt. Ihre Kontrollen waren 129S6/SvEvTac wild-type Mäuse (WT, Taconic Biosciences, Rensselaer, USA).

### 3.1.8 Software

**Tabelle 3.29: Liste der verwendeten Software**

Software	Hersteller	Version
Aida Advanced Image Data Analyzer	Elysia-raytest (Straubenhardt, Deutschland)	4.27.039
AxioVision	Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland)	4.8.2.0

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Version</b>
CorelDraw X7	Corel (Ottawa, Kanada)	17.0.0.491
EndNote	PDFTron Systems (Vancouver, Kanada)	X8.2
Gen5	BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland)	3.09
Igor Pro	WaveMetrics (Lake Oswego, USA)	6.3.7.2
ImageJ	National Institutes of Health (Bethesda, USA)	1.52a
Live Acquisition	FEI Munich (Gräfelfing, Deutschland)	2.7.0.16
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft (Redmond, USA)	16.0.5305.1000
Offline Analysis	FEI Munich (Gräfelfing, Deutschland)	2.7.0.16
Prism	GraphPad Software (San Diego, USA)	8.0.1
VSDC Video Editor	Multilab (Newcastle Upon Tyne, Vereinigtes Königreich)	6.3.9.49

### 3.2 Isolierung und Kultur primärer MBMECs

MBMECs wurden wie zuvor beschrieben isoliert und kultiviert (Ruck et al., 2014). Jeweils vier Mäuse im Alter zwischen 8 und 14 Wochen wurden durch zervikale Dislokation getötet und das Gehirn präpariert. Mithilfe eines Spatels wurden Kleinhirn, Hirnstamm und Thalamus entfernt und die Großhirne anschließend auf zuvor autoklaviertem Whatman® Filterpapier gerollt, um die Meningen zu entfernen. Danach wurde das Großhirn in ein 50-ml-Röhrchen mit eisgekühltem Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) gegeben.

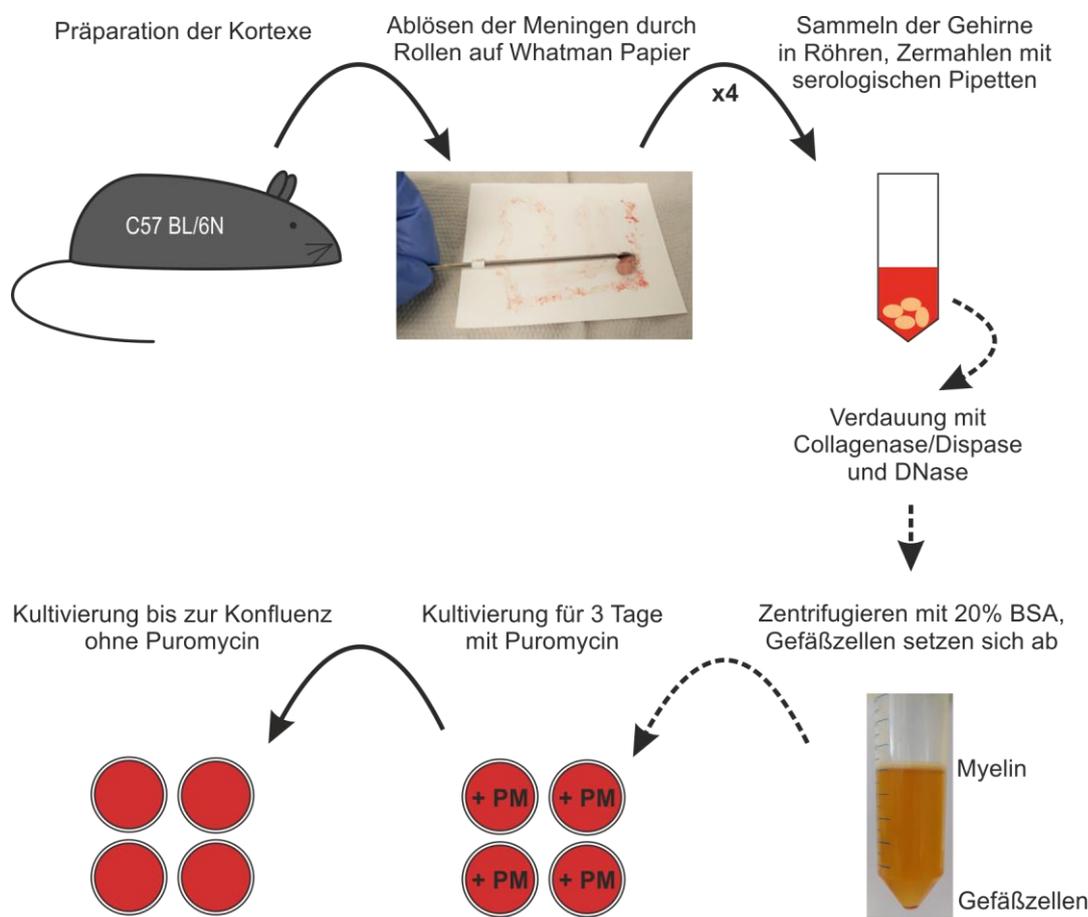
Die Gehirne wurden durch 25-maliges Hoch- und Runterpipettieren mit einer 25-ml- und anschließend einer 10-ml-Serologiepipette zerkleinert. Daraufhin wurde die Gewebesuspension bei 600 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 10 ml DMEM mit Collagenase/Dispase (1 mg/ml) und DNase (100 µg/ml) resuspendiert und für 45 min bei 37 °C unter Schütteln mit 500 rpm im Heizblock inkubiert.

Anschließend wurden 10 ml DMEM zur Gewebesuspension gegeben und bei 600 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das verbliebene Pellet in 25 ml 20% (w/v) BSA-Lösung resuspendiert, um die Gefäßzellen von Myelin-Bestandteilen zu trennen. Die Suspension wurde für 20 min bei 600 x g und 4 °C zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation oben in der Zellsuspension schwimmenden Myelin-Bestandteile wurden abgesaugt. Die Gefäßzellen blieben als kleiner, roter Rückstand am Boden des Röhrchens zurück (Abb. 3.1).

Das Gefäßzellen-Pellet wurde anschließend zwei Mal durch Zugabe von 10 ml DMEM und Zentrifugation für 5 min bei 600 x g und 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 8 ml Wachstumsmedium mit FCS (20% (v/v)), Heparin (100 ng/ml), bFGF (10 ng/ml) und Puromycin

(4 µg/ml) resuspendiert. Diese Suspension, die Zellen aus Gehirnen von vier Mäusen enthielt, wurde auf vier mit Kollagen Typ IV (0,4 mg/ml) beschichtete Schälchen (35 mm) ausplattiert und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkultur-Inkubator kultiviert. Drei Tage später wurde das Medium gewechselt und Kulturmedium ohne Puromycin verwendet.

Puromycin dient als Selektionsfaktor für MBMEC-Zellen. Es handelt sich um ein Purin-Analogon, welches als falscher Baustein in mRNA eingebaut wird und für einen Abbruch der Proteinbiosynthese am Ribosom sorgt, wodurch es zytotoxisch wirkt (Darken, 1964). MBMECs exprimieren im Vergleich zu anderen Zelltypen eine außergewöhnlich große Menge an P-Glykoprotein (Hegmann et al., 1992), welches der Ausschleusung von Puromycin aus der Zelle dient. Andere Zelltypen im präparierten Gewebe können Puromycin nicht in dieser Menge ausschleusen und sterben ab.



**Abb. 3.1 Präparation von MBMECs aus Gehirnen von C57BL/6N und 129S6/SvEvTac Mäusen**

Die Kortexe von jeweils vier Mäusen (Alter 8-14 Wochen) wurden nach zervikaler Dislokation präpariert, Hirnstamm und Kleinhirn entfernt. Durch Rollen auf sterilem Whatman-Papier wurden die Meningen abgelöst. Vier Gehirne wurden in einem 50 ml Röhrchen mit DMEM gesammelt und durch Hoch- und Runterpipettieren mit serologischen Pipetten zermahlen. Es erfolgte die Verdauung mit Collagenase/Dispase und DNase für 45 min bei 37 °C. Nach Zentrifugation mit DMEM mit 20% BSA (20 min, 600 x g, 4 °C) separierten sich die Gefäßzellen vom Myelin, welches als Überstand abgesaugt wurde. Die Ausplattierung erfolgte auf vier 35 mm Schälchen. Durch Kultivierung mit Puromycin, einem Selektionsfaktor für Hirn-Endothelzellen, für drei Tage bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C wurde eine reine Endothelzellkultur erreicht. Die anschließende Kultivierung erfolgte bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C ohne Antibiotika bis zur Konfluenz. Die gestrichelten Linien zeigen zwischengeschaltete Waschschritte an.

Konfluente Zellen wurden nach Entfernen des Mediums durch Zugabe von 300 µl Trypsin-Lösung (5 g/l) und Inkubation für 20 min bei 37 °C vom Boden des Schälchens gelöst. Nach Beendigung der Trypsin-Wirkung durch Zugabe von 700 µl Wachstumsmedium wurde die Zellsuspension mehrerer Schälchen gesammelt und je 2 ml in ein mit Kollagen Typ 4 beschichtetes Schälchen gegeben. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer improved Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt und lag pro Schälchen bei ca. 500.000 Zellen.

### 3.3 Western Blot

MBMECs der 2. Passage wurden in Kollagen-beschichteten 24-Well-Platten mit 1 ml Wachstumsmedium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgte ein einmaliges Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Daraufhin wurden 180 µl Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Denaturierungs-Puffer verwendet, um aus sechs Wells ein Zelllysate herzustellen. Hierfür wurden die 180 µl SDS-Denaturierungs-Puffer in ein Well gegeben, die Zellen für 1 min unter Ausführung von kreisenden Bewegungen mit der Pipettenspitze lysiert und die entstehende Lösung nacheinander für die verbliebenen fünf Wells verwendet. Die Zelllysate wurden in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben und mithilfe des Ultraschall-Homogenisators SONOPLUS UW2200 für 2 s homogenisiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit den enthaltenen Zelllysaten für 20 min bei 60 °C inkubiert und bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

Die Zelllysate wurden vor Verwendung für 5 s mit einer Drehzahl von 1000 min<sup>-1</sup> mit der Zentrifuge Sigma 1-14 zentrifugiert. Es wurde das Gel NUPage-Bolt 10 Well, 4-12% Bis-Tris Plus verwendet. In jede leere Tasche wurden 15 µl SDS-Denaturierungs-Puffer gegeben. Die Auftrennung erfolgte in MOPS Bolt-Pufferlösung zuerst für 15 min bei 80 V und anschließend bei 200 V. Nach Auftrennung der Zelllysate wurde das Gel gemeinsam mit der Nitrozellulosemembran in Blotting-Puffer gegeben und bei 4 °C und 350 mA für 1,5 h geblottet.

Im Anschluss an das Blotting wurden freie Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran für 1 h in 30 ml Magermilchpulver Sucofin (5% w/v in TBS) blockiert. Danach wurde die Nitrozellulosemembran einmal mit TBS gewaschen und mit 10 ml der Primär-Antikörper-Lösung (79% (v/v) TBS, 20% (v/v) einer 5% BSA-Lösung in TBS, 1% (v/v) NaN<sub>3</sub>, Antikörper in jeweiliger Verdünnung, siehe Tabelle 3.26) über Nacht bei 4 °C unter leichter Schüttelbewegung inkubiert.

Die Primär-Antikörper-Lösung wurde entfernt und die Nitrozellulosemembran drei Mal für 10 min mit TBS gewaschen. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in 30 ml Meerrettich-Peroxidase Sekundäntikörper-Lösung (5% w/v Milchpulver in TBS, Sekundär-Antikörper in jeweiliger Verdünnung, siehe Tabelle 3.27) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Sekundär-Antikörper-Lösung wurde erneut drei Mal für 10 min mit TBS gewaschen.

Um die gebunden Meerrettich-Peroxidase Sekundärantikörper zu visualisieren, wurde die Nitrozellulosemembran für 1 min mit dem Chemilumineszenz-Reagenz Western Lightning Plus ECL inkubiert. Direkt nach Entfernen des Reagenzes wurde die Membran in das Lumineszenz-Bild-Analysegerät LAS-3000 gelegt. Zunächst wurde ein Weißbild aufgenommen, gefolgt von Lumineszenzbildern nach 15 s, 1 min, 5 min und 60 min Belichtungszeit. Die Bilder wurden mit Aida Image Analyzer der Version 4.27.039 und CorelDraw X7 bearbeitet.

Das „Stripping“ einer Blotting-Membran dient der Entfernung der gebundenen Primär- und Sekundärantikörper. Die Membran wurde hierfür vier Mal für 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und für 30 min bei 50 °C im Wasserbad WB 14 in Stripping-Puffer inkubiert. Nach erneutem, 6-maligen Waschen mit TBST wurde die Membran erneut zur Entwicklung mit Primär- und Sekundärantikörpern verwendet.

### 3.4 Calcium Imaging mit Fura-2

Beim Calcium-Imaging ermöglicht der Chelator Fura-2 die Messung der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unter dem Fluoreszenzmikroskop (Grynkiewicz et al., 1985). Mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verschiebt sich das Fluoreszenzanregungsspektrum von Fura-2 hin zu niedrigeren Wellenlängen. In Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  wird die maximale Emission durch Anregung mit einer Wellenlänge von ca. 380 nm erreicht, bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen hingegen mit ca. 340 nm. Das Verhältnis der Emission bei Anregung mit 340 und 380 nm lässt auf die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration schließen. Durch Verwendung von zwei Anregungswellenlängen und Bildung des Verhältnisses der Emissionen heben sich die Effekte von unterschiedlicher Konzentration von Fura-2, Zelldicke und weiterer Bedingungen während der Experimente größtenteils auf (Tsien et al., 1985).

Durch Veresterung der vier Carboxylgruppen zu Fura-2-Acetoxy-methylester (Fura-2-AM) kann Fura-2 die Zellmembran durchdringen. Intrazellulär erfolgt die Hydrolyse der Acetyl-Ester-Verbindung und die spontane Freisetzung und Abdiffusion von Formaldehyd, wodurch Fura-2 in der Zelle gefangen bleibt (Tsien, 1981). Pluronic F-127, ein nichtionisches Dispergiermittel, verbessert die Solubilisierung großer Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle in physiologischen Medien und somit deren Aufnahme in die Zellen (Cohen et al., 1974).

MBMECs der 1. Passage wurden auf Kollagen-beschichtete Glas-Deckgläser mit 12 mm Durchmesser ausplattiert und in 24-Well-Platten bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  für zwei bis vier Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen mit 5  $\mu\text{mol/l}$  Fura-2-AM und 16  $\mu\text{mol/l}$  Pluronic F-127 für 60 min lichtgeschützt inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Calcium-Imaging-Puffer wurden die Deckgläser in eine Messkammer mit offener Unterseite platziert, 50  $\mu\text{l}$  Calcium-Imaging-Puffer hinzugegeben und unter das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M gestellt.

Das Mikroskop war mit dem Objektiv Fluor 20x/0,75 ausgestattet. Es wurden der Monochromator Polychrome V und die Kontrolleinheit für Polychrome V Control Unit 1103 verwendet. Die Anregung von Fura-2 erfolgte mit monochromatischem Licht im zwei-Sekunden-Rhythmus: mit 340 nm für 50 ms,

einer Pause von 150 ms, mit 380 nm für 50 ms und einer erneuten Pause von 1750 ms. Die Erfassung der Fluoreszenzbilder erfolgte mit dem Fura-Filter CHROMA (>440 nm) und der Kamera für Calcium Imaging Andor iXon DV885JC-VP. Zur Bedienung wurde die Software AxioVision der Version 4.8.2.0 und Live Acquisition der Version 2.7.0.16 verwendet. Nach Hintergrund-Korrektur und manueller Markierung der Zellen wurde das Verhältnis der Emission bei Anregung mit 340 nm zu 380 nm (F340/380) bestimmt und im zeitlichen Verlauf abgebildet. Es wurden Microsoft Office Excel 2016 und Igor Pro Version 6.3.7.2 zur Bestimmung von Peak-Amplitude ( $\Delta F_{340/380}$ ), Fläche unter der Kurve ( $F_{340/380} \times s$ ) und basaler  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $F_{340/380}$ ) verwendet. Negative Werte der Fläche unter der Kurve wurden auf 0 gesetzt, die Graphen wurden mithilfe von Igor Pro und CorelDraw X7 erstellt.

### 3.5 Migrationsassay

24-Well-Platten wurden für 2 h mit 100  $\mu$ l Collagen-Lösung der Konzentration 0,4 mg/ml beschichtet. Anschließend wurde die Collagen-Lösung abgesaugt, MBMECs der 1. Passage in die Wells ausgesät (ca. 25.000 Zellen pro Well) und bis zur Konfluenz kultiviert. In der konfluenten Zellschicht erfolgte das „Scratching“: Mithilfe der AutoScratch-Maschine unter Verwendung von Polypropylen-Nadeln wurde in der Mitte jedes Wells eine künstliche Wunde mit einer Breite von etwa 800  $\mu$ m angefertigt. Die Nadeln wurden vor und nach dem Scratching nacheinander mit Alconox® und 70% Ethanol gewaschen, sowie zwischen der Anfertigung der einzelnen Wunden mit doppelt destilliertem Wasser.

Nach dem „Scratching“ wurden die Platten zur Entfernung von abgestorbenen Zellen und Zelltrümmern drei Mal mit PBS gewaschen und neues Zellkultur-Medium hinzugegeben. MBMECs wurden entweder in Wachstumsmedium (20% FCS) oder in Wachstumsmedium mit reduzierter FCS-Konzentration (2% FCS) kultiviert. Ein Medium mit 0% FCS wurde nicht verwendet, da eine andere Studie an Endothelzellen der Ratten-Aorta in Abwesenheit von FCS nach 8 h keinerlei Migration zeigte (Ikeda et al., 1995).

Nach Erstellung der künstlichen Wunde wurde die 24-Well-Platte unter dem automatischen Mikroskop Lionheart FX platziert, welches mit einem 4 x Phasenkontrast-Objektiv, einer Sony CMOS 16-bit Graustufen-Kamera und einer CO<sub>2</sub>-Gaskontrolleinheit ausgestattet war. Die Umgebungstemperatur betrug 37 °C bei einem Gradienten (Oberseite zu Unterseite der Platte) von 2 K, der CO<sub>2</sub>-Anteil 5%. Das Schließen der Wunde, bzw. die Wiederbesiedelung der Wundfläche durch migrierende Endothelzellen, wurde durch Bildaufnahme aus der Wundfläche alle 10 min bis zum kompletten Schließen der Wunde nach 96 h beobachtet.

Die Quantifizierung der Zellmigration erfolgte mithilfe des Programms Gen5 der Version 3.09. Nach Transformation mittels „Image Preprocessing“ zur Beseitigung von Hintergrundsignalen wurden die Bilder mithilfe der „Cellular Analysis“ analysiert. Dabei wird die Fläche detektiert, welche in einem Bild von allen Zellen eingenommen wird und als zugehöriger Parameter die „object sum area“ ausgegeben. Dieser Parameter korreliert mit dem Schluss der Wunde: Wird die Wunde kleiner, steigt entsprechend die von den Zellen eingenommene Fläche. Bei jedem Well wurde der Anfangswert der „object

sum area“ direkt nach Erstellung der Wunde von dem entsprechenden Wert nach 24 h subtrahiert und als von Endothelzellen wiederbesiedelte Fläche nach 24 h angegeben. In der Auswertung wurden Werte von Wells als Ausreißer betrachtet und nicht berücksichtigt, wenn deren „object sum area“ zu Beginn nicht zwischen 1 mm<sup>2</sup> und 2 mm<sup>2</sup> lag oder sich nach 96 h unter 2,5 mm<sup>2</sup> befand. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte in CorelDraw X7, Videos zum Vergleich des Migrationsverhaltens wurden mithilfe des VSDC Video Editor der Version 6.3.9.49 erstellt.

### 3.6 Tube Formation Assay

Für die Untersuchung der Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) wurde ein Tube Formation Assay mit Basalmembran-Matrix angewendet. Die gefrorene Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basalmembran-Matrix wurde über Nacht bei 4 °C aufgetaut. Die aufgetaute Basalmembran-Matrix wurde in die inneren Wells der Ibidi µ-Slide angiogenesis (10 µl pro Well) pipettiert. Anschließend erfolgte zur Verfestigung der Basalmembran-Matrix die Inkubation der µ-Slides für 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Danach wurden in jedes Well des µ-Slides 15.000 MBMECs in 50 µl Kulturmedium in An- oder Abwesenheit von VEGF (2 ng/ml) gegeben. Direkt im Anschluss wurden die µ-Slides unter dem automatischen Mikroskop Lionheart FX, ausgestattet mit einem 4 x Phasenkontrast-Objektiv, einer Sony CMOS 16-bit Graustufen-Kamera und einer CO<sub>2</sub>-Gaskontrolleinheit, in einer Umgebung von 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>, platziert. Von jedem Well wurden für 6 h alle 30 min neun Bilder mit dem 4 x Phasenkontrast-Objektiv aufgenommen. Diese Bilder waren in einem Raster mit drei Reihen und drei Spalten angeordnet.

Die Auswertung wurde mit ImageJ der Version 1.52a (Schindelin et al., 2012) und einem Tool zur Analyse von Tube Formation Assays (Carpentier, 2012) vorgenommen. Dabei wurde von den neun pro Well aufgenommenen Bildern ausschließlich das in der Mitte liegende Bild analysiert. Es erfolgte die Bestimmung der Parameter „number of meshes“ (Anzahl der Maschen im Bildausschnitt) und „total branching length“ (Gesamtlänge der Zweige im Bildausschnitt). Eine Masche ist eine Fläche, welche komplett von Endothelzellen und ihren Fortsätzen umschlossen ist. Diese Fortsätze werden als Zweige bezeichnet, die Summe ihrer Länge ergibt die Gesamtlänge der Zweige.

### 3.7 Immunfärbung

MBMECs der 1. Passage wurden in 24-Well-Platten auf mit Kollagen Typ IV (0,4 mg/ml) beschichteten Deckgläsern (Durchmesser 12 mm) bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden sie zur Fixierung für 15 min bei 21 °C in PBS mit 4% (w/v) Paraformaldehyd inkubiert. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und 15 min lang mit PBST (0,2% (w/v) Triton X100 in PBS) permeabilisiert. Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation in einer Blockierlösung (0,2% (w/v) Triton X 100 und 5% (v/v) Normal Donkey Serum in PBS) für 1 h bei 21 °C unter leichtem Schütteln. Die Deckgläser wurden dann mit den in Tabelle 3.26 aufgeführten Primär-

Antikörpern in der angegebenen Verdünnung in Blockierlösung über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen auf den Deckgläsern dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit der entsprechenden sekundären Antikörperlösung (Tabelle 3.27) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS für 1 h bei 21 °C lichtgeschützt unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen und für die Kernfärbung mit einer 1:1000 in PBS verdünnten Hoechst 33258-Lösung für 20 min bei 21 °C lichtgeschützt geschüttelt. Für die Färbung von Aktinfilamenten wurden die Zellen anstelle von Antikörpern mit Alexa Fluor 350 Phalloidin (1:40 verdünnt) in PBS für 20 min bei 21 °C inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit Fluoromount-G auf SuperFrost-Objektträgern fixiert und bei 4 °C lichtgeschützt verwahrt.

Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.Z1 abgebildet, welches mit einem 20 x Objektiv von Zeiss, einer Beleuchtungseinrichtung HXP 120 C, sowie einer Kamera (ZEISS AxioCam MRm) ausgestattet war. Alle Bilder wurden mit einem 20 x Objektiv unter Zuhilfenahme von Filtern der Firma AHF Analysetechnik und folgenden Wellenlängen bei Exposition/Emission aufgenommen: Alexa Fluor 488 (489/509 nm), Cy5 (646/664 nm), DAPI und Alexa Fluor 350 (358/463 nm). Die Bildaufnahme erfolgte im Programm AxioVision der Version 4.8.2.0.

### 3.8 Permeabilitäts-Assay

Zellkultur-Einsätze mit einer Polyethylenterephthalat-(PET)-Membran (Porengröße 0,4 µm, Fläche 0,3 cm<sup>2</sup>, 10<sup>8</sup> Poren/cm<sup>2</sup>) wurden mit Collagen-Lösung (0,4 mg/ml) für 3 h beschichtet und in 24-Well-Platten gesetzt, sodass sich eine obere Kammer (Zellkultur-Einsätze) und eine untere Kammer (Wells der 24-Well-Platte) ergaben (Abb. 4.18 A). In die oberen Kammern wurden jeweils 100.000 MBMECs der 1. Passage gegeben, in die unteren Kammern jeweils 600 µl Wachstumsmedium. Zum Abgleich wurden zwei Inserts nur mit Wachstumsmedium ohne Zellen befüllt. Es folgte die Inkubation für fünf Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz. Anschließend wurde das Wachstumsmedium in den oberen Kammern durch Wachstumsmedium mit TNF-α (20 ng/ml), IFN-γ (20 ng/ml) und IL-1β (20 ng/ml) ersetzt. Wachstumsmedium ohne Zusätze diente als Kontrolle. Anschließend erfolgte die Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>.

Zur Durchführung der Permeabilitätsmessungen wurde das Wachstumsmedium der oberen und unteren Kammern durch 600 bzw. 100 µl 0,2% (w/v) BSA in PBS (Ersatzmedium) ersetzt. Dem Ersatzmedium der oberen Kammer wurden die fluoreszenzmarkierten Substanzen Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-Albumin (0,25 mg/ml, 66 kDa) und Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat-(TRITC)-Dextran (1 mg/ml, 4,4 kDa) zugegeben, gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 3 h. Danach wurden je 20 µl Ersatzmedium aus den oberen und unteren Kammern abpipettiert, mit 180 µl PBS gemischt und in die 96-Well-Platte CellCarrier<sup>TM</sup>-96 ultra gegeben. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten im Plattenlesegerät Tecan Infinite 200. Für Albumin erfolgte die Anregung bei 485 nm und die Messung der

Emission bei 535 nm, für Dextran lagen die entsprechenden Werte bei 540 nm und 590 nm. Mithilfe einer Eichgeraden wurde aus den Werten einer Verdünnungsreihe die Konzentration  $\beta$  [mg/ml] von FITC-Albumin und TRITC-Dextran in der oberen und unteren Kammer bestimmt und die Permeabilitätskoeffizienten  $P_{\text{Albumin}}$  und  $P_{\text{Dextran}}$  mit der Formel 3.1 berechnet (Mcmillin et al., 2015).

$$P_{\text{Albumin/Dextran}} = \frac{\beta_{\text{untere Kammer}} * V}{\beta_{\text{obere Kammer}} * t * A}$$

**Formel 3.1 Formel zur Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten**

$\beta$  stellt die Konzentration von FITC-Albumin bzw. TRITC-Dextran im Insert bzw. im Well dar.  $V$  entspricht dem Volumen der unteren Kammer (600  $\mu$ l),  $t$  der Zeit zur Diffusion (180 min) und  $A$  der Fläche des Bodens der oberen Kammer (0,33  $\text{cm}^2$ ).

### 3.9 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism der Version 8.0.1 vorgenommen. Zuerst erfolgte eine Testung der Ergebnisse auf Normalverteilung mithilfe des Kolmogorow-Smirnow-, des D'Agostino-Pearson- und des Shapiro-Wilk-Tests. Zum Vergleich zweier unverbundener Wertegruppen, die nicht ausschließlich normalverteilt waren, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt, bei Normalverteilung der Student's t-Test. Beim Vergleich mehrerer unverbundener, nicht normalverteilter Wertegruppen gegeneinander wurde der Kruskal-Wallis-Test mit dem Post-hoc-Test Dunn's Test verwendet. Zum Vergleich mehrerer unverbundener, normalverteilter Wertegruppen gegeneinander wurde die einfache Varianzanalyse mit dem Post-hoc-Test Holm-Sidak's Test verwendet. Der Vergleich mehrerer, verbundener und normalverteilter Wertegruppen gegeneinander wurde mithilfe der doppelten Varianzanalyse mit dem Post-hoc Test Tukey-Test durchgeführt. Normalverteilte Daten sind als Säulendiagramme mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Für nicht-normalverteilte Daten wurden Darstellungen mit Box und Whiskers verwendet. Die Box zeigt den Interquartilsabstand (IQR) und die Whiskers reichen von Minimum bis Maximum, Ausreißer sind als Punkte dargestellt, wenn ihr Abstand mehr als 1,5 Mal den IQR von der Box beträgt.

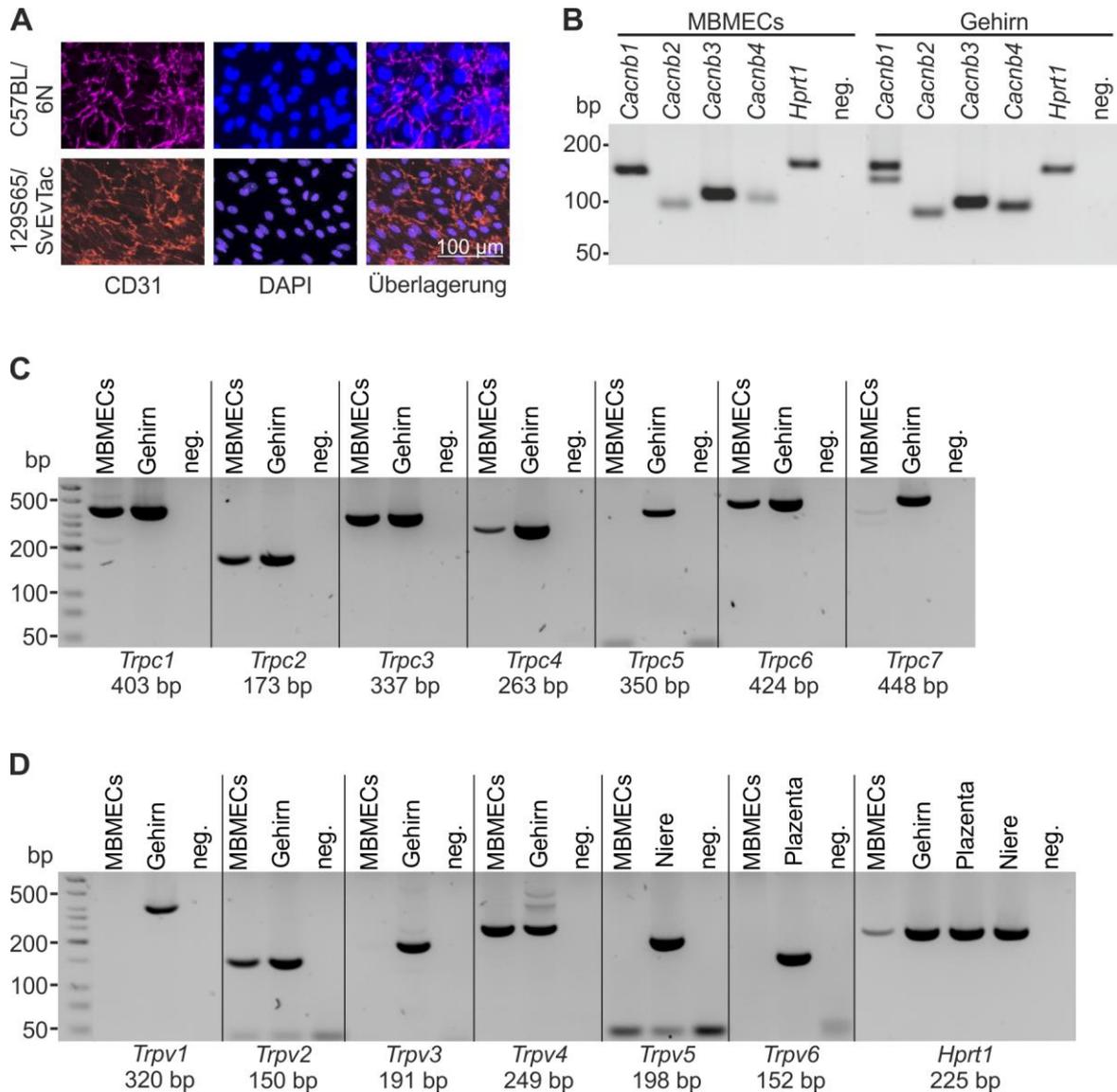
## 4 Ergebnisse

### 4.1 MBMECs exprimieren *Cacnb3*, *Trpc1* und *Trpv2*

Um die Funktion von  $\text{Ca}_v\beta_3$ , TRPC1 und TRPV2 bei der Regulation der Calcium-Signalübertragung in MBMECs zu untersuchen, etablierten wir die Isolierung von primären MBMECs und charakterisierten diese Zellen. Wir isolierten MBMECs von Wildtyp (WT) Mäusen zweier unterschiedlicher Mauslinien (C57BL/6N und 129S6/SvEvTac). Entscheidend hierbei war die Kultivierung der MBMECs für drei Tage mit Puromycin. Dieses ist für andere Zellen toxisch (Darken, 1964), MBMECs exprimieren jedoch reichlich P-Glykoprotein (Hegmann et al., 1992), welches das toxische Puromycin aus der Zelle ausschleust. Dieser Mechanismus ermöglicht das Erreichen einer reinen MBMEC-Kultur. Dies wurde durch Färbung des Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1 (PECAM-1), auch bekannt als Cluster of Differentiation 31 (CD31), mithilfe eines spezifischen Antikörpers evaluiert. MBMECs aus beiden Mauslinien zeigten eine deutliche Färbung mit Anti-CD31 an Zell-Zell-Verbindungen und wir konnten keine Zellen ohne CD31-Signal feststellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass das MBMEC-Präparat nicht durch andere Gehirn-Zellen kontaminiert war und eine hohe Reinheit aufwies (Abb. 4.1 A).

Als nächstes isolierten wir die Gesamt-RNA aus WT MBMECs von C57BL/6N Mäusen und untersuchten die Anwesenheit von Transkripten der *Cacnb*-, *Trpc*- und *Trpv*-Gene. Die PCR-Ergebnisse zeigten, dass *Cacnb1-4*-, *Trpc1-4*-, *Trpc6*-, *Trpv2*- und *Trpv4*-Transkripte vorhanden und andere *Trpc*- und *Trpv*-Transkripte nicht detektierbar waren (Abb. 4.1 B-D).

Zusammenfassend konnten wir die Präparation primärer MBMECs etablieren, welche eine reine Kultur dieser Zellen ergab. Verschiedene *Cacnb*-, *Trpc*- und *Trpv*-Transkripte wurden in MBMECs nachgewiesen. Die weiteren Experimente in dieser Arbeit legen den Fokus auf die Funktion von  $\text{Ca}_v\beta_3$ , TRPC1 und TRPV2 in MBMECs.



**Abb. 4.1 MBMECs wurden in reiner Kultur präpariert und exprimieren *Cacnb3*, *Trpc1* und *Trpv2***

(A) Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder von MBMECs der 1. Passage zehn Tage nach Präparation. Die obere Zeile zeigt MBMECs von WT Mäusen der Linie C57BL/6N, die untere von WT Mäusen der Linie 129S6/SvEvTac. In der linken Spalte ist die Färbung mit dem Anti-CD31-Antikörper als Marker für Endothelzellen (lila bzw. orange), in der mittleren Spalte die Färbung mit DAPI (blau) zur Markierung des Zellkerns dargestellt. Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung beider Färbungen. (B-D) RT-PCR von *Cacnb*- (B), *Trpc*- (C) und *Trpv*- (D) Transkripten mit aus C57BL/6N WT MBMECs isolierter Gesamt-RNA; RNA aus Gehirn, Niere oder Plazenta dienten als Kontrolle; die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1-RNA (*Hprt1*) wurde als Positivkontrolle amplifiziert und Wasser als Negativkontrolle (neg.) verwendet. Transkripte von *Cacnb1-4*, *Trpc1-4* und *Trpc6*, sowie von *Trpv2* und *Trpv4* konnten nachgewiesen werden. Bp = Basenpaare. Die Durchführung der PCR erfolgte durch Stefanie Buchholz.

## 4.2 Funktion von $\text{Ca}_v\beta_3$ in MBMECs

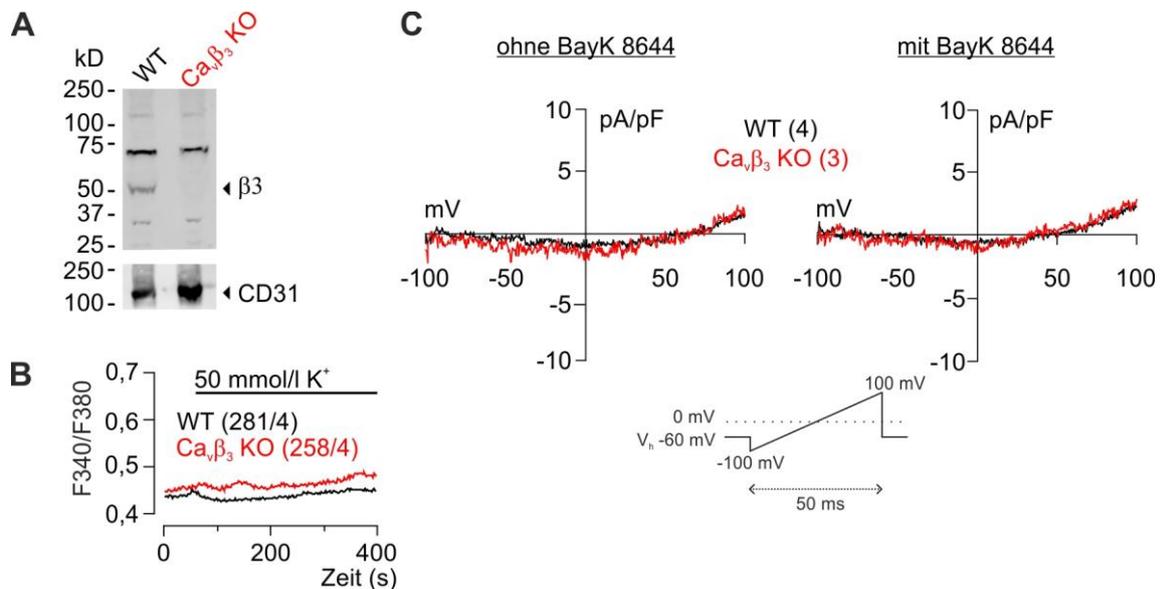
### 4.2.1 $\text{Ca}_v\beta_3$ ist in MBMECs vorhanden, aber $\text{Ca}_v$ -Ströme wurden nicht nachgewiesen

Bei Endothelzellen wird typischerweise davon ausgegangen, dass es sich um nicht erregbare Zellen ohne funktionelle spannungsabhängige Calciumkanäle handelt. In RNA, die aus primären MBMECs von Wildtyp-Mäusen isoliert wurde, identifizierten wir jedoch *Cacnb3* als Transkript für die  $\beta_3$ -Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle ( $\text{Ca}_v\beta_3$ , Abb. 4.1 D). Um die Funktion von  $\text{Ca}_v\beta_3$  in MBMECs zu untersuchen, isolierten wir primäre MBMECs aus  $\text{Ca}_v\beta_3$ -defizienten Mäusen und verwendeten diese Zellen als Kontrolle.

Zum Nachweis des  $\text{Ca}_v\beta_3$  Proteins in WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs wurden Proteinlysate aus beiden Genotypen mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit einem Antikörper gegen das  $\text{Ca}_v\beta_3$ -Protein (HOM-828) inkubiert. Als Ladekontrolle wurde ein Anti-CD31-Antikörper verwendet. Der Western Blot (Abb. 4.2 A) zeigte die Anwesenheit des  $\text{Ca}_v\beta_3$ -Proteins mit ca. 55 kDa in Lysaten von WT MBMECs und sein Fehlen in Lysaten von  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs. Die übrigen, bei WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO Lysaten vorhandenen Banden, waren unabhängig von  $\text{Ca}_v\beta_3$  und auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zuvor  $\text{Ca}_v\beta_3$  in Fibroblasten (Belkacemi et al., 2018),  $\text{CD4}^+$ - und  $\text{CD8}^+$ -T-Lymphozyten (Badou et al., 2006; Jha et al., 2009), neonatalen und adulten Fibroblasten, Osteoklasten (A. Belkacemi, noch nicht publizierte Daten) und dendritischen Zellen (Woo et al., 2023) identifizieren. Diese Zellen werden üblicherweise ebenfalls als nicht-erregbare Zellen angesehen und weisen keine funktionellen spannungsabhängigen Calciumkanäle auf.

Als nächstes untersuchten wir die Funktion von spannungsabhängigen Calciumkanälen in primären MBMECs von WT Mäusen und verwendeten  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO Mäuse als Kontrollen. Es wurden Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV innerhalb von 50 ms mit einer Wiederholung alle 2 s von einem Haltepotential ( $V_h$ ) von -60 mV aus appliziert. Diese elektrophysiologischen Messungen von WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs zeigten einen winzigen ( $< 1$  pA/pF)  $\text{Ca}_v$ -Strom (Abb. 4.2 C). Dieser kleine Strom unterschied sich nicht in seiner Amplitude zwischen WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO und war unempfindlich gegenüber dem L-Typ-Calciumkanal-Aktivator Bay K8644 (10  $\mu\text{mol/l}$ ). Ebenfalls führte die Depolarisation durch Zugabe einer hohen Konzentration von Kalium (50 mmol/l) in Anwesenheit von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  nicht zu einer signifikanten Erhöhung der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration [ $\text{Ca}^{2+}$ ] in MBMECs von WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO Mäusen (Abb. 4.2 B). Diese Experimente zeigen, dass MBMECs  $\text{Ca}_v\beta_3$  exprimieren, aber keine funktionellen  $\text{Ca}_v$ -Kanäle besitzen.



**Abb. 4.2 MBMECs exprimieren das  $\text{Ca}_v\beta_3$ -Protein, aber keine funktionsfähigen  $\text{Ca}_v$ -Kanäle**

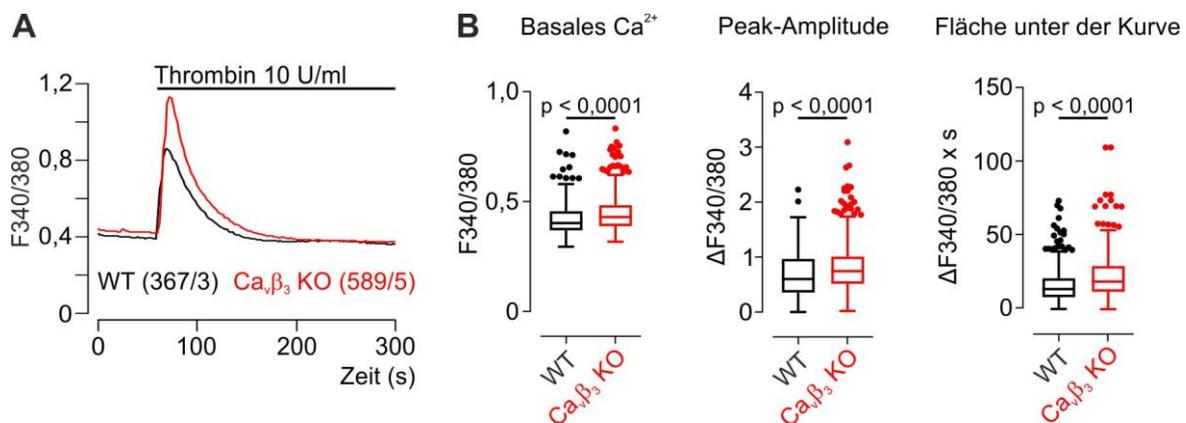
(A) Western Blot mit Proteinlysaten aus Wildtyp- und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs. MBMECs wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Es erfolgte die Inkubation mit dem  $\text{Ca}_v\beta_3$ -spezifischen Antikörper HOM-828 und zur Ladekontrolle mit dem Anti-CD31-Antikörper. Es zeigte sich eine Bande bei ca. 55 kDa bei WT MBMECs, nicht jedoch bei  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs, was das Vorhandensein des 55 kDa großen Proteins  $\text{Ca}_v\beta_3$  in WT MBMECs und seine Abwesenheit in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs anzeigt. Die anderen, in beiden Genotypen vorhandenen Banden, sind unabhängig vom  $\text{Ca}_v\beta_3$ -Protein und weisen darauf hin, dass der Antikörper unspezifisch andere Proteine bindet. (B) Fura-2-(F340/380)-ratiometrische Mittelwertkurven zeigen die zyttoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vor und nach Zugabe von Kalium (50 mmol/l) in Anwesenheit von 2 mmol/l extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in WT (schwarz) oder  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO (rot) MBMECs. In Klammern ist die Anzahl der gemessenen Zellen (x) aus verschiedenen Schälchen (y) angegeben (x/y). (C) Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven) von primären MBMECs von WT (schwarz) und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO (rot) Mäusen, erhalten durch Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV (mit 10 mV Stufen) von einem Haltepotential von -60 mV über 50 ms in Abwesenheit (links) oder in Anwesenheit (rechts) von Bay K8644 (10  $\mu\text{mol/l}$ ). In Klammern ist die Anzahl der gemessenen Zellen angegeben. Die Experimente (A) und (B) wurden von Anouar Belkacemi durchgeführt, Experiment (C) von Barbara Wardas.

#### 4.2.2 $\text{Ca}_v\beta_3$ hemmt die Thrombin-vermittelte Calciumfreisetzung in MBMECs

Um die Funktion von  $\text{Ca}_v\beta_3$  in Endothelzellen, welche keine funktionellen  $\text{Ca}_v$ -Ströme aufweisen, zu untersuchen, begannen wir, Calciumsignale in primären WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs zu messen. Unsere Arbeitsgruppe konnte vor Kurzem in erregbaren Zellen ( $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas) und nicht-erregbaren Zellen (HEK293, COS-7 und Fibroblasten) zeigen, dass  $\text{Ca}_v\beta_3$  Inositol-1,4,5-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) Rezeptoren auf niedrige Konzentrationen von  $\text{IP}_3$  desensibilisiert. In Abwesenheit von  $\text{Ca}_v\beta_3$  war die Agonisten-induzierte Calciumfreisetzung signifikant erhöht (Becker et al., 2021; Belkacemi et al., 2022; Belkacemi et al., 2018). Als Agonist zur Vermittlung der  $\text{IP}_3$ -abhängigen Calciumfreisetzung in Endothelzellen verwendeten wir Thrombin. Thrombin ist ein proinflammatorischer Mediator und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der transendothelialen Permeabilität (Garcia et al., 1986). Die N-terminale, extrazelluläre Domäne des Protease-aktivierten Rezeptors 1 (PAR1) wird durch Thrombin gespalten. Dadurch wird der N-Terminus freigesetzt und bindet als Aktivator an den PAR1-

Rezeptor, einen  $G_{\alpha_q/11}$ -gekoppelten Rezeptor, der anschließend die Phospholipase C aktiviert, was zur Bildung von  $IP_3$  führt.  $IP_3$  bindet an den  $IP_3$ -Rezeptor und induziert die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum (Coughlin, 2000).

Zunächst untersuchten wir Veränderungen der zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration in MBMECs von WT und  $Ca_v\beta_3$  KO Mäusen vor und nach Zugabe von Thrombin (Abb. 4.3). Calcium-Imaging Experimente wurden mit MBMECs aus Passage 1, die für 60 min mit dem Calciumindikator Fura-2-AM in Anwesenheit von Pluronic F-127 beladen wurden, durchgeführt. Die extrazelluläre Lösung war frei von  $Ca^{2+}$  und enthielt 0,5 mmol/l EGTA (Tabelle 3.14), um einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum auszuschließen. Die Zugabe von Thrombin löste ein schnelles Calciumsignal aus, das dann auf das Ausgangsniveau zurückging. Vor der Thrombin-Applikation waren die basalen  $Ca^{2+}$ -Werte in  $Ca_v\beta_3$  KO MBMECs im Vergleich zu WT Zellen signifikant erhöht (Abb. 4.3 B). Die Peak-Amplitude und die Fläche unter der Kurve der Thrombin-vermittelten Calciumfreisetzung waren in Abwesenheit des  $Ca_v\beta_3$ -Proteins ebenfalls signifikant erhöht (Abb. 4.3 B).



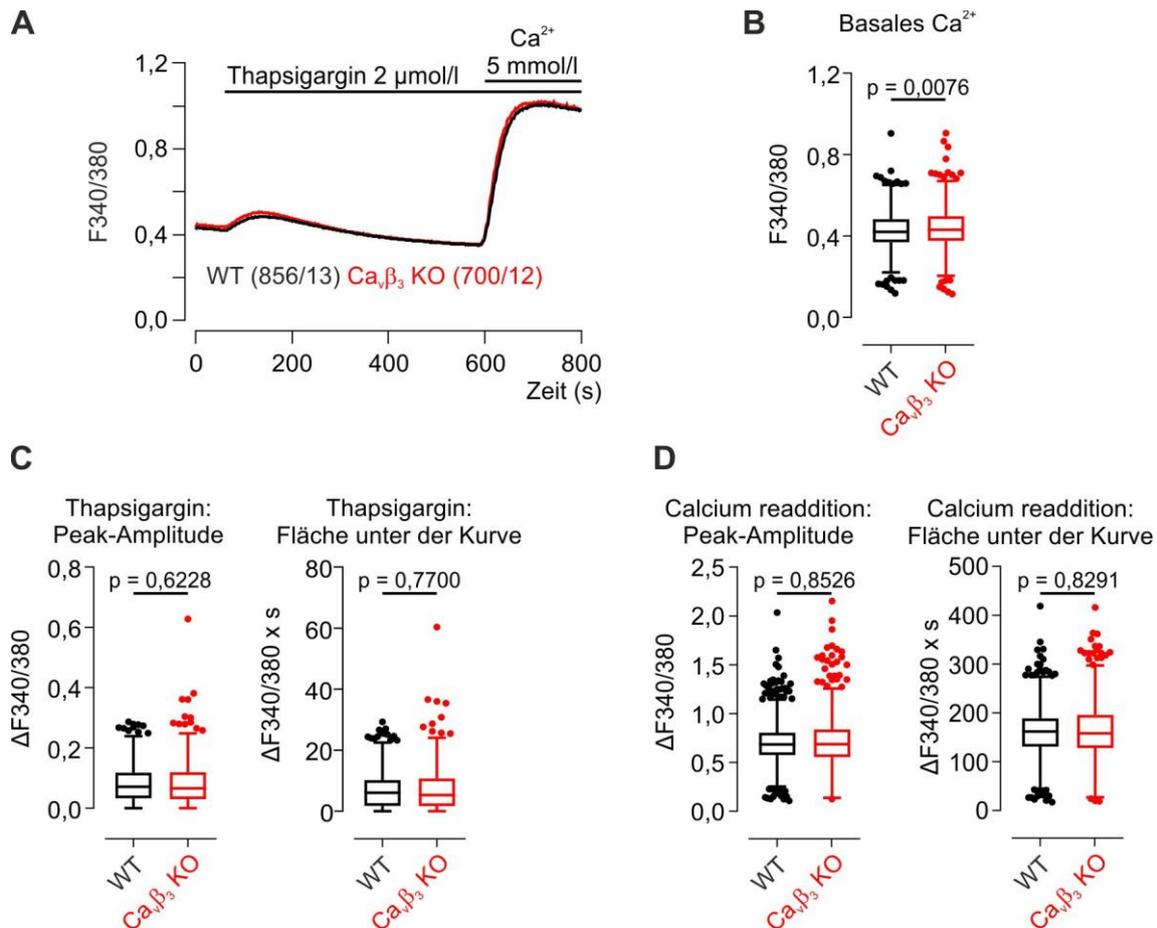
**Abb. 4.3 Erhöhte Thrombin-induzierte Calciumfreisetzung in  $Ca_v\beta_3$  KO MBMECs**

(A) Veränderungen der zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration, dargestellt als Fura-2 (F340/380) Mittelwertskurven von WT (schwarz) und  $Ca_v\beta_3$  KO (rot) MBMECs in Abwesenheit extrazellulären  $Ca^{2+}$  vor und nach Zugabe von Thrombin (10 U/ml). In Klammern ist die Anzahl der gemessenen Zellen (x) aus verschiedenen Schälchen (y) angegeben (x/y). (B) Basales  $Ca^{2+}$ , Peak-Amplitude und Fläche unter der Thrombin-induzierten Calciumfreisetzungskurve aus dem Experiment in (A). Die Box zeigt Median und Interquartilsabstand (IQR), die Whiskers reichen von Minimum bis Maximum, Ausreißer sind als Punkte dargestellt, wenn ihr Abstand größer als 1,5 Mal den IQR von der Box beträgt. Die p-Werte wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Experiment und Auswertung wurden von Anouar Belkacemi durchgeführt.

Ein erhöhter Calciumgehalt in den intrazellulären Speichern könnte der Grund für die erhöhte  $IP_3$ -abhängige Calciumfreisetzung in Endothelzellen aus  $Ca_v\beta_3$  KO Mäusen sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, erfolgte die Messung des Calciumgehaltes des endoplasmatischen Retikulums in WT und  $Ca_v\beta_3$  KO MBMECs. Dazu verwendeten wir Thapsigargin, welches an die Calcium-ATPasen des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) bindet und diese irreversibel hemmt (Thastrup et al., 1990).

Durch Inhibition der SERCA mittels der Zugabe von Thapsigargin in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium kommt es zu einem passiven Ausstrom von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum.

Dieser zeigte sich in unserem Experiment als Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration (Abb. 4.4 A). Nach Depletion der intrazellulären Speicher wurden 5 mmol/l extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  zugegeben (Calcium readdition), um den speicherabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in MBMECs zu messen. Auch in diesem Experiment waren die basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs signifikant erhöht (Abb. 4.4 B). Allerdings unterschieden sich die Peak-Amplitude und die Fläche unter der Thapsigargin-induzierten, passiven Calciumfreisetzungskurve nicht zwischen beiden Genotypen. Ebenso unterschieden sich die Peak-Amplitude und die Fläche unter der Kurve nach Wiedergabe von extrazellulärem Calcium nicht zwischen WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs (Abb. 4.4 C, D).



**Abb. 4.4 Die Thapsigargin-induzierte Calciumfreisetzung aus dem ER und der speicherabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom sind unabhängig von  $\text{Ca}_v\beta_3$**

(A) Veränderungen der zytosmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, dargestellt als Fura-2 (F340/380) Mittelwertskurven von WT (schwarz) und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO (rot) MBMECs in Abwesenheit extrazellulären Calciums vor und nach Zugabe von Thapsigargin (2  $\mu\text{mol/l}$ ) und nachfolgend  $\text{Ca}^{2+}$  (5 mmol/l; Calcium readdition). In Klammern ist die Anzahl der gemessenen Zellen (x) aus verschiedenen Schälchen (y) angegeben (x/y). (B-D) Basales  $\text{Ca}^{2+}$  (B), Peak-Amplitude und Fläche unter der Thapsigargin-induzierten, passiven Calciumfreisetzungskurve (C), sowie Peak-Amplitude und Fläche unter der Kurve nach Wiedergabe von extrazellulärem Calcium (5 mmol/l, D) aus dem Experiment in (A). Die Box zeigt Median und Interquartilsabstand (IQR), die Whiskers reichen von Minimum bis Maximum, Ausreißer sind als Punkte dargestellt, wenn ihr Abstand größer als 1,5 Mal den IQR von der Box beträgt. Die p-Werte wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Ergebnisse stammen aus drei biologischen Replikaten.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die basalen Calciumspiegel in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO Endothelzellen im Vergleich zu WT Zellen signifikant erhöht waren. Die Thrombin-induzierte Calciumfreisetzung

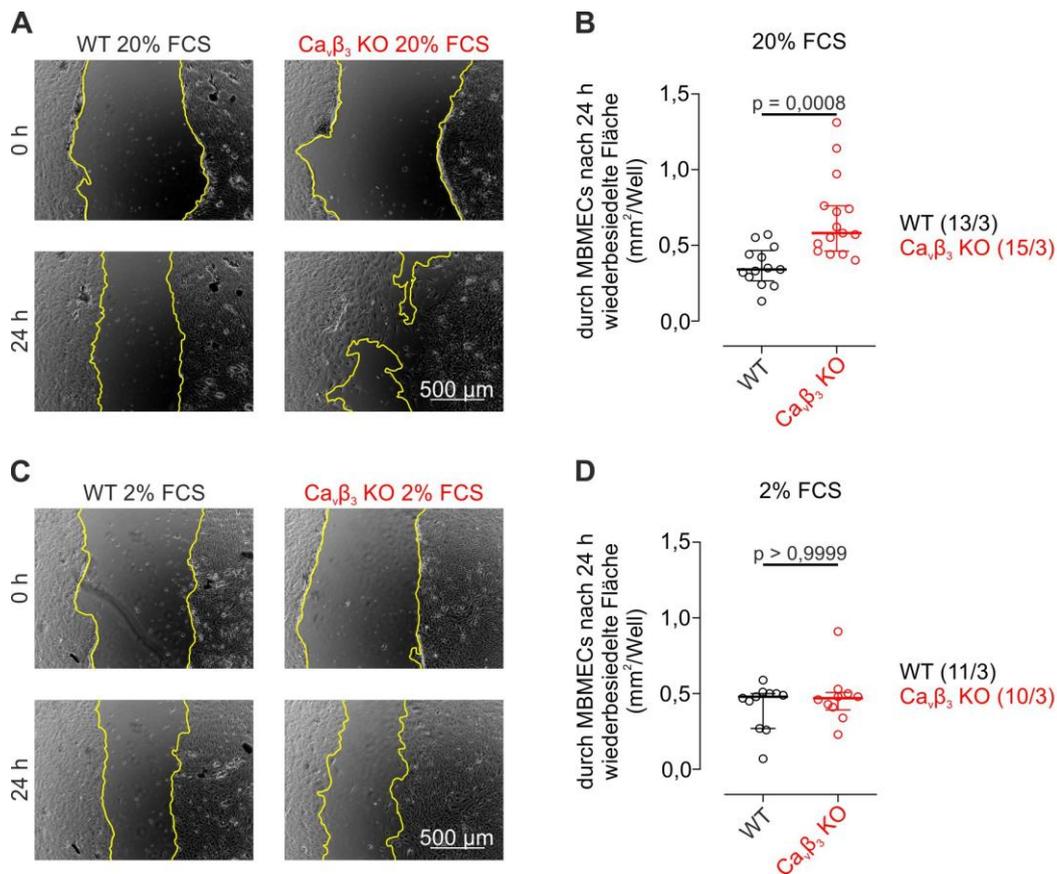
war in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs ebenfalls signifikant erhöht, ohne Einfluss auf den Calciumgehalt intrazellulärer Speicher oder den speicherabhängigen Calciumeinstrom. Diese Daten weisen darauf hin, dass  $\text{Ca}_v\beta_3$  die  $\text{IP}_3$ -abhängige Calciumfreisetzung hemmt, und zwar unabhängig von der Aktivität spannungsabhängiger Calciumkanäle.

### **4.2.3 Die genetische Ausschaltung von *Cacnb3* beschleunigt die Migration von MBMECs**

Intrazelluläres Calcium ist für Endothelzellen ein wichtiger Second-Messenger und hat Einfluss auf Prozesse wie Zellmigration (Ehring et al., 2000) und Angiogenese (Kohn et al., 1995). Die Migration von Endothelzellen bildet dabei eine wichtige Grundlage für Angiogenese, wird aber auch bei der Reparatur beschädigter Blutgefäße benötigt (Michaelis, 2014). Da die Entfernung des  $\text{Ca}_v\beta_3$ -codierenden Gens *Cacnb3* die basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die Thrombin-vermittelte Calciumfreisetzung veränderte, untersuchten wir die Wirkung von  $\text{Ca}_v\beta_3$  auf die Migration von Endothelzellen.

Zur Untersuchung der Migration führten wir einen sogenannten *in vitro* Scratch Migrations-Versuch durch. MBMECs von WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO Mäusen der 1. Passage wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde mit der AutoScratch-Maschine unter Verwendung von Polypropylen-Nadeln eine künstliche Wunde in die Zellschicht gekratzt. Die Endothelzellen wurden für 72 h unter dem automatischen Mikroskop Lionheart FX in Zellkulturmedium in Anwesenheit von 20% FCS und 2% FCS beim Schließen der Wunde fotografiert. FCS ist reich an wachstumsfördernden Faktoren, enthält aber auch wachstumshemmende Faktoren und darüber hinaus auch Moleküle, welche zur Anheftung und Verbreitung von Zellen essenziell sind (Gstraunthaler, 2003). In einer vorherigen Arbeit zeigte FCS eine dosisabhängige Stimulation der Endothelzellmigration (Ikeda et al., 1995).

In Anwesenheit von 20% FCS schlossen  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs nach 24 h die zellfreie Stelle signifikant schneller als Wildtyp-Zellen (Abb. 4.5). Hingegen war in Anwesenheit einer niedrigen FCS-Konzentration (2%) zwischen den Genotypen kein Unterschied zu erkennen. WT MBMECs schlossen die zellfreie Stelle in Anwesenheit von 20% FCS nicht schneller als in Anwesenheit von 2% FCS. Durch sorgfältige Beobachtung der Endothelzellen während ihrer Migration zur zellfreien Stelle konnten wir in einer Videoaufzeichnung außerdem beobachten, dass  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs in Anwesenheit von 20% FCS ein deutlich ungeordneteres und zielloses Bewegungsverhalten aufwiesen als WT MBMECs. Zudem war im Video klar erkennbar, dass für den Schluss der zellfreien Stelle im Wesentlichen Zellmigration und nicht Zellteilung verantwortlich war. Die Resultate suggerieren, dass das Fehlen von  $\text{Ca}_v\beta_3$  die Migration von Endothelzellen beschleunigt, dies jedoch nur durch Stimulation mit FCS in hoher Konzentration.

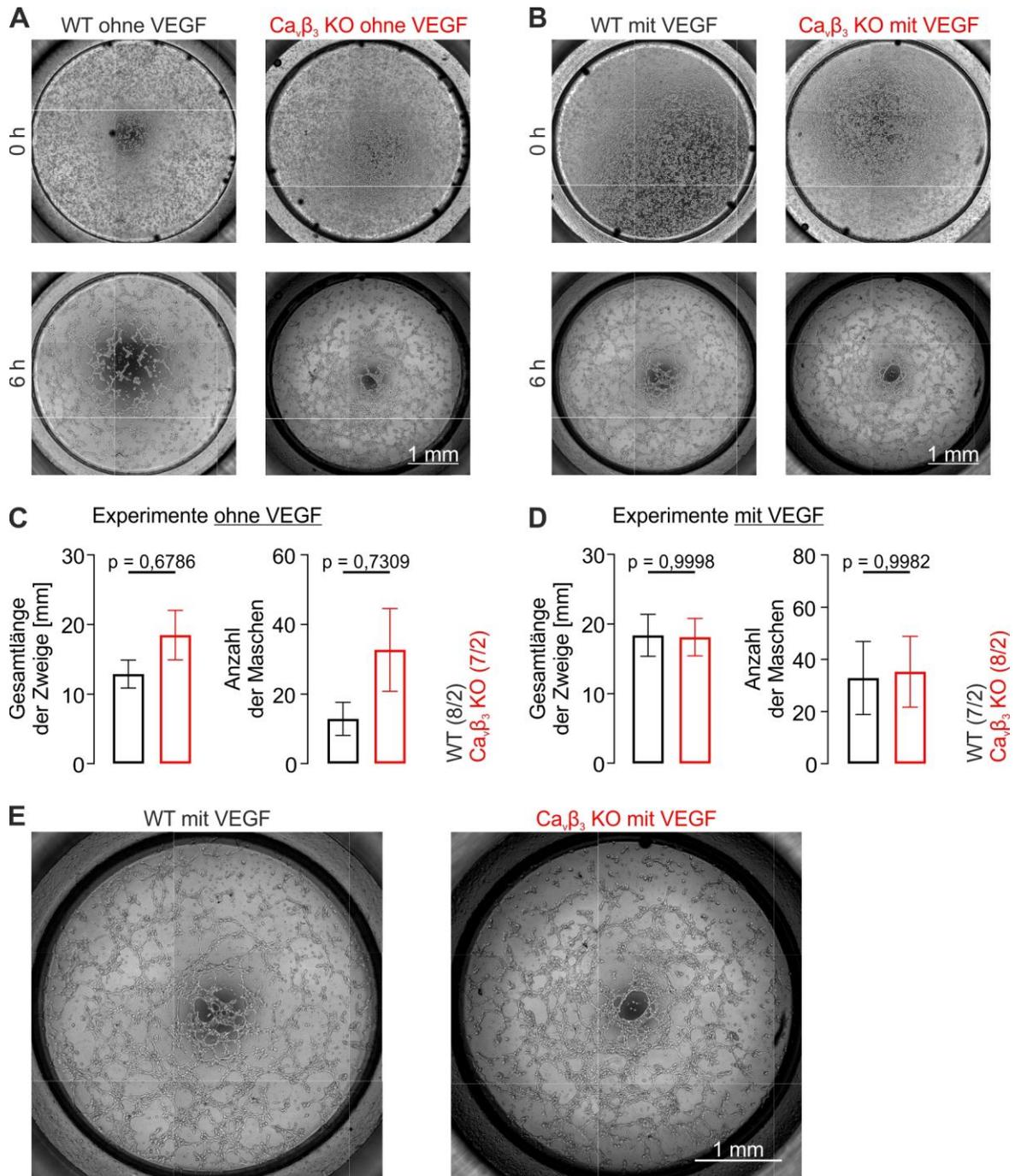


**Abb. 4.5 Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs migrieren in Anwesenheit von 20% FCS schneller als WT MBMECs**

MBMECs wurden in mit Kollagen Typ 4 beschichtete 24-Well-Platten ausgesät und mit Wachstumsmedium bis zur Konfluenz kultiviert. Mit dem AutoScratch-Instrument applizierten wir einen definierten Kratzer auf die kontinuierliche MBMEC-Schicht. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium in Anwesenheit von 20% FCS (**A, B**) oder 2% FCS (**C, D**) inkubiert. Nach Anfertigung der Wunde wurden für 72 h alle 10 min Bilder vom Wundbereich (zellfreie Stellen) durch das automatische Mikroskop Lionheart FX aufgenommen. (**A, C**) Dargestellt sind exemplarische Bilder der Wunde unmittelbar nach Anfertigung (jeweils obere Zeile) und Bilder desselben Bereiches nach 24 h (jeweils untere Zeile), die linke Spalte zeigt WT MBMECs, die rechte Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs. (**B, D**) Fläche, die durch migrierende MBMECs von WT (schwarz) und Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO (rot) Mäusen wiederbesiedelt wird, gemessen 24 h nach der Scratch-Applikation in Anwesenheit von 20% (**B**) oder 2% (**D**) FCS. Die Daten sind als Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand (IQR) dargestellt. Die p-Werte wurden mithilfe des Dunn's Tests berechnet. In Klammern ist die Anzahl der ausgewerteten Wells (x) aus (y) biologischen Replikaten angegeben (x/y).

#### 4.2.4 Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> hat keinen Einfluss auf die *in-vitro*-Angiogenese von MBMECs

Zellmigration ist ein grundlegender Prozess, welcher in Endothelzellen insbesondere für die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) benötigt wird (Michaelis, 2014). Eine veränderte Zellmigration kann somit auch eine Änderung der Angiogenese zur Folge haben. Wir führten zur Analyse der Angiogenese *in-vitro*-Tubusbildungstests (Tube Formation Assays) durch. Ibidi μ-Slides wurden für 30 min mit Basalmembran-Matrix beschichtet und pro Well 15.000 WT bzw. Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs der 2. Passage in An- und Abwesenheit von VEGF (2 ng/ml) ausplattiert. VEGF beeinflusst synergistisch mit bFGF die Angiogenese (Pepper et al., 1992). Die μ-Slides wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Nach 6 h wurden neun Bilder pro Well mit dem automatischen Mikroskop Lionheart FX aufgenommen.



**Abb. 4.6 Tube Formation Assays zeigen keinen Einfluss von Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> auf die *in-vitro*-Angiogenese**

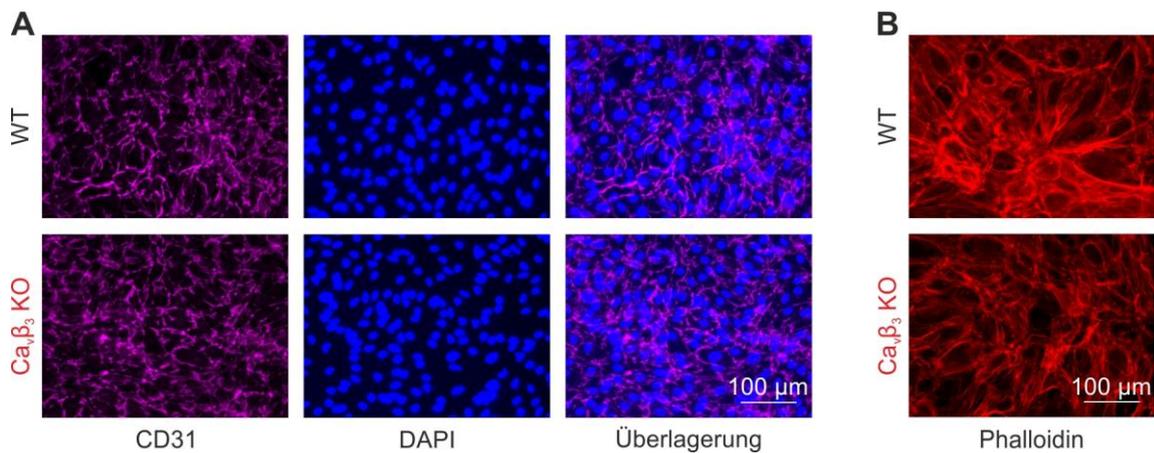
Ibidi-μ-Slides wurden für 30 min mit Basalmembran-Matrix beschichtet und anschließend pro Well 15.000 WT bzw. Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs der 2. Passage hinzugegeben. Pro Well wurden neun Bilder mit dem Lionheart FX angefertigt, die im Anschluss im Programm CorelDraw X7 zusammengefügt und mit ImageJ ausgewertet wurden. **(A, B)** Die jeweils obere Zeile zeigt exemplarisch mikroskopische Bilder der Wells direkt nach Hinzugabe der Zellen (0 h), die untere Zeile denselben Bildausschnitt 6 h später; die linke und rechte Spalte zeigen jeweils Bilder mit WT bzw. Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs in Abwesenheit **(A)** und Anwesenheit **(B)** von VEGF (2 ng/ml). **(E)** Vergrößerte Darstellung der 2. Zeile aus **(B)**. **(C, D)** Gesamtlänge der Zweige in mm (links) und Anzahl der Maschen (rechts) in WT (schwarz) und Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO (rot) MBMECs in Abwesenheit **(C)** und Anwesenheit **(D)** von VEGF, dargestellt als Säulendiagramm mit Mittelwert ± Standardfehler. Die p-Werte wurden mithilfe des Holm-Sidak's Tests berechnet. In Klammern ist die Anzahl der ausgewerteten Wells (x) aus (y) biologischen Replikaten angegeben (x/y).

Sowohl  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs, als auch WT MBMECs bildeten in Anwesenheit, aber auch in Abwesenheit von VEGF nach 6 h die für diesen Assay typischen, röhrenförmigen Strukturen (Abb. 4.6 A, B). Die *in-vitro*-Angiogenese wurde als Gesamtlänge der Zweige und Anzahl der Maschen mit einem Tool für ImageJ (Carpentier, 2012) quantifiziert. In Abwesenheit von VEGF waren beide Parameter bei  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs leicht erhöht, aber nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Genotypen (Abb. 4.6 C). Die Zugabe von VEGF führte zu keiner signifikanten Veränderung der analysierten Parameter Gesamtlänge der Zweige und Anzahl der Maschen. Die Parameter unterschieden sich auch nicht zwischen WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO (Abb. 4.6 D). Obwohl die Entfernung von  $\text{Ca}_v\beta_3$  die endotheliale Migration deutlich beschleunigte, hatte dies keinen Einfluss auf die *in-vitro*-Angiogenese von MBMECs.

#### 4.2.5 Vergleichendes Proteinprofil von WT und $\text{Ca}_v\beta_3$ KO MBMECs

Um die molekularen Mechanismen, welche für die verstärkte Zellmigration in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs verantwortlich sind, weiter zu entschlüsseln, analysierten wir die Expression verschiedener Proteine, von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle bei der Zellmigration spielen. Vereinfacht wurden hierfür MBMECs der 1. Passage aus WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO Mäusen isoliert, bis zur Konfluenz auf Deckgläsern kultiviert, fixiert, die Membran solubilisiert und mit spezifischen Primär-Antikörpern (Tabelle 3.26) und fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpern (Tabelle 3.27) angefärbt.

Bei der Immunfärbung konnten wir  $\beta_1$ -Integrin, Vinculin, an Serin 732 phosphorylierte fokale Adhäsionskinase (p-FAK), an Tyrosin 419 phosphorylierte Src (p-Src) und CD31 (auch PECAM-1 oder Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül genannt) in primären MBMECs nachweisen. An Zell-Zell-Kontaktstellen wurde die Immunmarkierung von CD31 gefunden (Abb. 4.7 A).  $\beta_1$ -Integrin und Vinculin waren über die gesamte Endothelzelle verteilt, p-Src und p-FAK fanden sich ebenfalls in der gesamten Zelle, jedoch präferentiell im Bereich des Zellkerns (Abb. 4.8). Es ergab sich kein klarer Unterschied in der Intensität und Verteilung der Immunmarkierungen zwischen WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs. Phalloidin bindet an F-Aktin und ermöglicht durch Fluoreszenzmarkierung die Visualisierung dieser Aktinfilamente (Wulf et al., 1979). Aktinfilamente waren in WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO Endothelzellen deutlich erkennbar, unterschieden sich aber nicht eindeutig in ihrer Struktur und Fluoreszenzintensität zwischen den beiden Genotypen (Abb. 4.7 B).



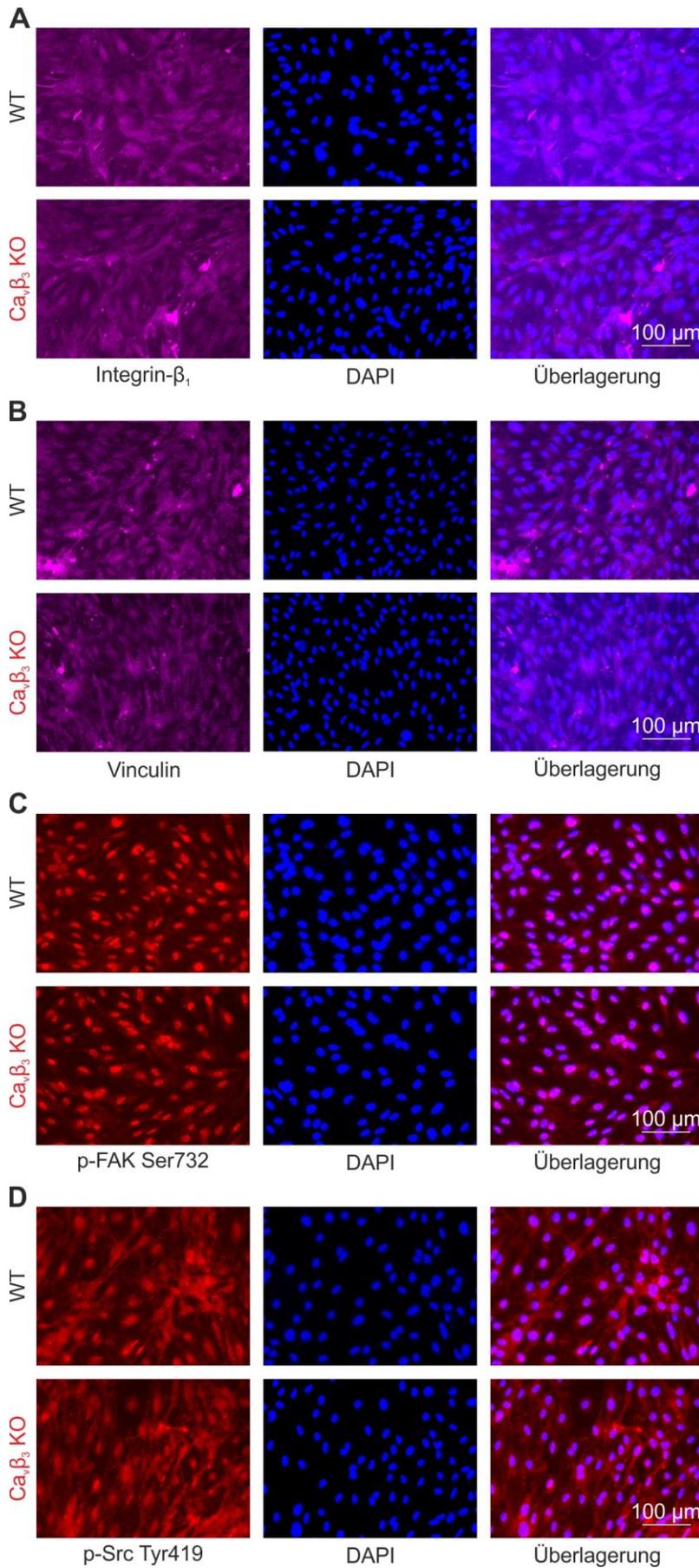
**Abb. 4.7 Immunmarkierung mit CD31 und fluoreszenzmarkiertem Phalloidin**

MBMECs der 1. Passage wurden bis zur Konfluenz kultiviert, fixiert, die Membran solubilisiert und mit spezifischen Primär-Antikörpern und fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpern angefärbt. Abgebildet sind repräsentative Bilder der Immunfärbung von WT (schwarz) und Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO (rot) MBMECs, gefärbt mit dem Primär-Antikörper (linke Spalte) gegen CD31 (A); DAPI zur Färbung der Zellkerne (jeweils mittlere Spalte); die rechte Spalte zeigt die Überlagerung beider Färbungen. (B) Repräsentative Bilder der Färbung von Aktinfilamenten mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin von WT (schwarz) und Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO (rot) MBMECs.

Um ein umfassendes Proteinprofil von MBMECs zu erhalten, führten wir eine vergleichende Proteomanalyse von WT und Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs mittels Nano-Flüssigkeitschromatografie-HR-Massenspektrometrie (Nano-LC-MS/MS) durch. Gleiche Proteinmengen von lysierten WT und Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, Abschnitte des Gels getrennt aufbereitet und dabei mit Trypsin verdaut. Anschließend erfolgte die flüssigkeitschromatografische Auftrennung der Peptide durch Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (UHPLC). Bei der folgenden Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) wurde in einem ersten Schritt eine vorläufige Masse des Peptids bestimmt, dieses im Anschluss in kleinere Fragmente aufgespalten und erneut deren Masse bestimmt (Fecher-Trost et al., 2021).

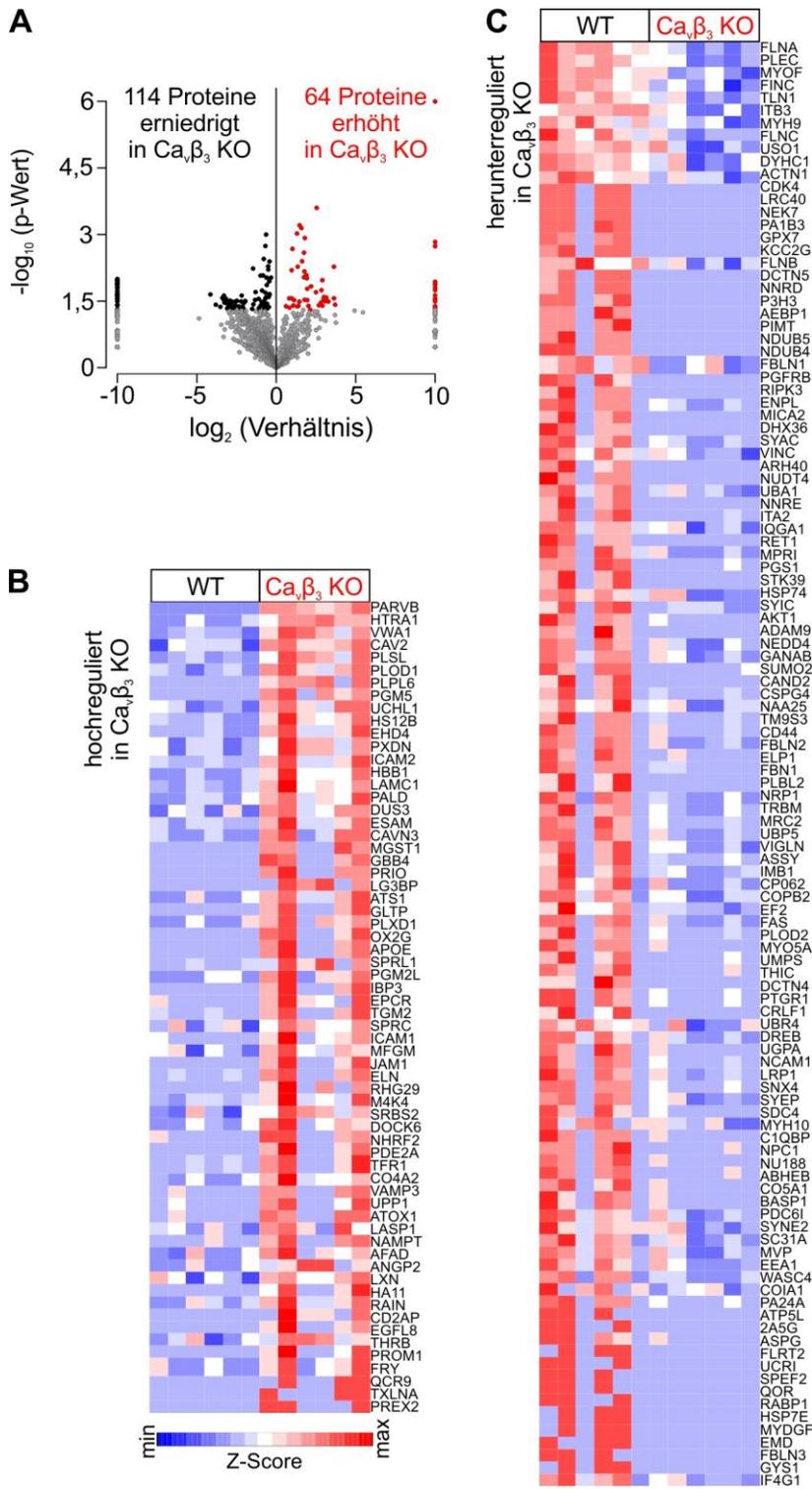
In Lysaten von WT MBMECs wurden 2446 Proteine und in Lysaten von Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs 2193 Proteine identifiziert, insgesamt konnten 2694 verschiedene Proteine detektiert werden. 872 der identifizierten Proteine wurden ausschließlich oder mit mehr als 2-facher Erhöhung in Proben von WT MBMECs nachgewiesen, 381 ausschließlich oder mit mehr als 2-facher Erhöhung in Proben von Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs. Bei 178 Proteinen zeigte sich ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied zwischen WT und Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs (Abb. 4.9 A). Hiervon waren 64 Proteine in Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs signifikant hochreguliert (Abb. 4.9 B) und 114 Proteine signifikant herunterreguliert (Abb. 4.9 C).

Insgesamt konnten wir zeigen, dass Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> die basale, sowie die durch Thrombin induzierte Calciumfreisetzung in primären MBMECs streng kontrolliert. Das Fehlen von Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> bewirkte eine Enthemmung der Calciumfreisetzung und eine Beschleunigung der Endothelzellmigration, beeinflusste jedoch nicht die *in-vitro*-Angiogenese. Zudem sorgte die Feinregulierung der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> für eine Veränderung der Expression verschiedener Proteine in MBMECs.



**Abb. 4.8 MBMECs exprimieren Schlüsselproteine der Zellmigration**

MBMECs der 1. Passage wurden bis zur Konfluenz kultiviert, fixiert, die Membran solubilisiert und mit spezifischen Primär-Antikörpern und fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpern angefärbt. Abgebildet sind repräsentative Bilder der Immunfärbung von WT (schwarz) und Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO (rot) MBMECs, gefärbt mit Primär-Antikörpern (jeweils linke Spalte) gegen Integrin-β<sub>1</sub> (**A**), Vinculin (**B**), p-FAK Ser732 (**C**) und p-Src Tyr419 (**D**); DAPI zur Markierung der Zellkerne (jeweils mittlere Spalte); die jeweils rechte Spalte zeigt die Überlagerung beider Färbungen.



**Abb. 4.9 Vergleichendes Proteinprofil von WT und  $Ca_v\beta_3$  KO MBMECs**

Drei voneinander unabhängig erstellte Proteinlysate mit je zwei technischen Replikaten von WT und  $Ca_v\beta_3$  KO MBMECs wurden denaturiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Nano-LC-MS/MS analysiert. (A) Im Volcano-Plot ist der binäre Logarithmus der Veränderung gegen den dekadischen Logarithmus des p-Wertes der in Ly-saten von WT und  $Ca_v\beta_3$  KO MBMECs identifizierten Proteine aufgetragen. Rote und schwarze Punkte zeigen in Lysaten von  $Ca_v\beta_3$  KO MBMECs signifikant (ungepaarter t-Test  $p < 0,05$ ) hoch- bzw. herunterregulierte Proteine, graue Punkte zeigen nicht signifikant veränderte Proteine. (B; C) Die Heatmaps zeigen den z-Score der emPAI-Werte in  $Ca_v\beta_3$  KO MBMECs identifizierter, signifikant (ungepaarter t-Test  $p < 0,05$ ) hoch- (B) bzw. herunterregulierter (C) Proteine. Rote Felder zeigen ein reichliches Vorhandensein eines Proteins in einer Probe an, blaue Felder ein vermindertes Vorkommen.

## 4.3 Funktion von TRPC1 in MBMECs

### 4.3.1 Die Entfernung von TRPC1 verstärkt den speicherabhängigen Calciumeinstrom

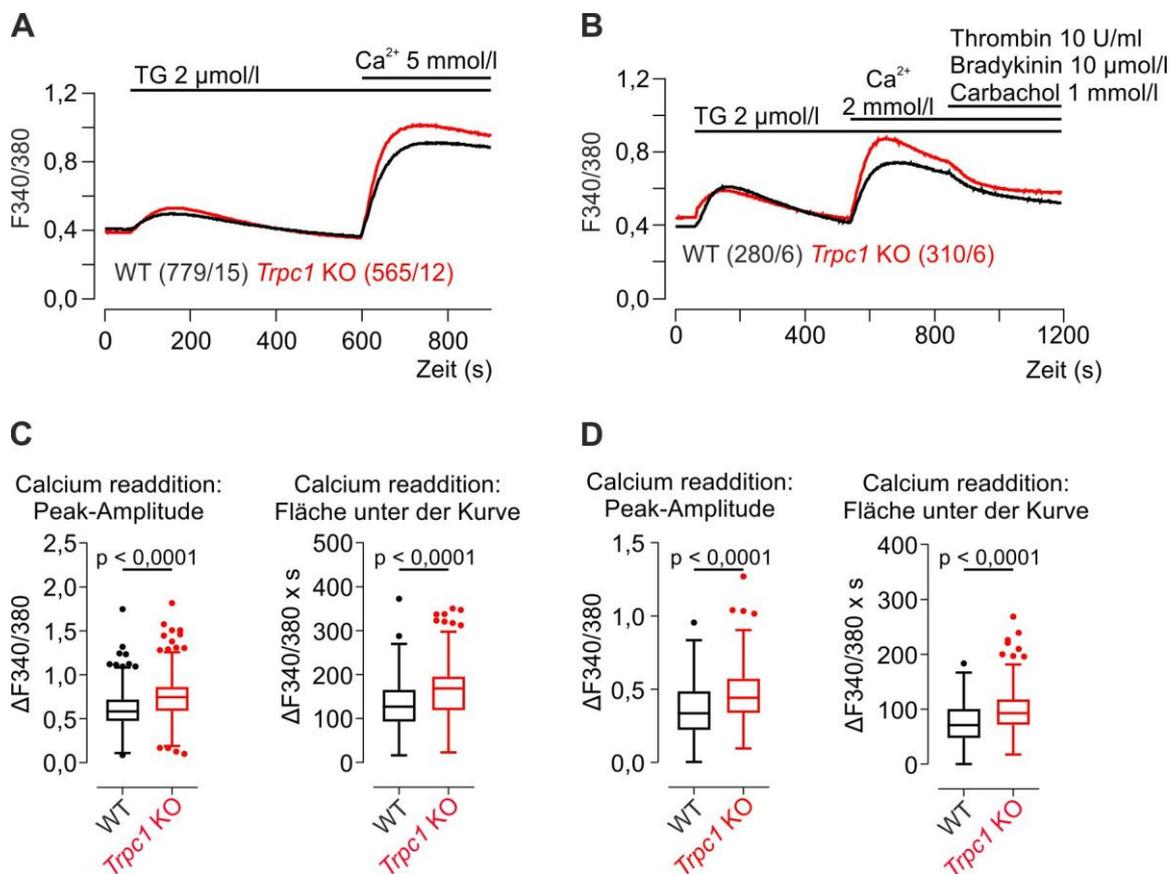
Für TRPC-Kanäle wurden in Endothelzellen wichtige Funktionen nachgewiesen, beispielsweise für TRPC4 bei der Acetylcholin-induzierten Vasorelaxation der murinen Aorta (Freichel et al., 2001) oder für TRPC1 bei der Dehnungs-induzierten Schädigung muriner Hirnendothelzellen (Berrout et al., 2012). Wir identifizierten *Trpc1-4* und *Trpc6* in WT MBMECs (Abb. 4.1). Um die Funktion von TRPC1 in diesen Zellen zu untersuchen, verwendeten wir MBMECs aus *Trpc1* KO Mäusen als Kontrolle.

TRPC1 fungiert als ein nicht-selektiver Kationenkanal und beeinflusst den speicherabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Store-Operated Calcium Entry, SOCE; Wes et al., 1995). Um den Einfluss von TRPC1 auf den SOCE in MBMECs zu untersuchen, wurden WT und *Trpc1* KO MBMECs der 1. Passage mit dem Calciumindikator Fura-2 beladen und Calciumsignale untersucht. Zur Bestimmung des SOCE wurden die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch Zugabe des SERCA-Pumpen-Inhibitors Thapsigargin (2  $\mu\text{mol/l}$ ) in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Pufferlösung mit 0,5 mmol/l EGTA (Tabelle 3.14) entleert. Anschließend wurde extrazellulär eine  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige Lösung (5 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$ ) hinzugegeben, um den speicherabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu bestimmen (Abb. 4.10 A). Die Auswertung der Peak-Amplitude und der Fläche unter der Kurve zeigte signifikant höhere Werte in *Trpc1* KO MBMECs nach Zugabe der  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Lösung im Vergleich zu Wildtypzellen (Abb. 4.10 C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der speicherabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in MBMECs durch das TRPC1-Protein negativ beeinflusst wird.

MBMECs exprimieren nicht nur RNA von TRPC1, sondern auch von TRPC2, TRPC3, TRPC4 und TRPC6 (Abb. 4.1). Ob diese weiteren TRPC-Kanäle einen Einfluss auf die Veränderungen des speicherabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms haben, wurde im Folgenden untersucht. Diacylglycerol (DAG) ist ein bekannter Aktivator von TRPC2 (Lucas et al., 2003), TRPC3 und TRPC6 (Hofmann et al., 1999). Storch et al. konnten demonstrieren, dass auch TRPC4 durch DAG aktiviert wird, wenn von TRPC4 die Gerüstproteine  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger regulatory factor (NHERF) 1 und 2 infolge Proteinkinase-C-Inaktivierung abgespalten wurden (Storch et al., 2017). Wir applizierten zeitgleich Thrombin, Bradykinin und Carbachol, welche über verschiedene Rezeptoren die Bildung von DAG bewirken. Thrombin führt durch Spaltung des extrazellulären N-Terminus des PAR1-Rezeptors zur Rezeptor-Aktivierung durch den abgespaltenen N-Terminus. Dies führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) mit darauffolgender Bildung von DAG (Coughlin, 2000). Auch Bradykinin (Lambert et al., 1986) und Carbachol (Saternos et al., 2018) bewirken eine Aktivierung der Phospholipase C mit konsekutiver Bildung von DAG.

Wir untersuchten die Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Depletion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher mit Thapsigargin in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung (Tabelle 3.15). Der speicherabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wurde durch anschließende Zugabe von 2 mmol/l extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  gemessen. Die Auswertung von

Peak-Amplitude und Fläche unter der Kurve ergab, dass auch in diesem Experiment der speicherabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in *Trpc1* KO MBMECs signifikant erhöht war (Abb. 4.10 B, D). Danach applizierten wir zur Aktivierung weiterer TRPC-Kanäle eine Lösung mit Thrombin (10 U/ml), Bradykinin (10  $\mu\text{mol/l}$ ) und Carbachol (1 mmol/l). Aufgrund der Anwesenheit von Thapsigargin waren die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher depletiert, sodass eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern ausgeschlossen werden konnte. Das Calciumsignal zeigte einen geringfügigen Abfall, ohne relevanten Unterschied zwischen WT und *Trpc1* KO MBMECs. Zusammenfassend fanden wir in *Trpc1* KO MBMECs einen vermehrten speicherabhängigen Calciumeinstrom. Die Zugabe von Thrombin, Bradykinin und Carbachol mit konsekutiver Bildung von DAG, welches bekanntermaßen TRPC-Kanäle aktiviert, bewirkte keinen zusätzlichen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Abb. 4.10 Der speicherabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in *Trpc1* KO MBMECs ist erhöht**

(A, B) Veränderungen der zyttoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, dargestellt als Fura-2 (F340/380) Mittelwertskurven von WT (schwarz) und *Trpc1* KO (rot) MBMECs in Abwesenheit extrazellulären Calciums vor und nach sequentieller Zugabe von Thapsigargin (TG, 2  $\mu\text{mol/l}$ ) und  $\text{Ca}^{2+}$  (5 mmol/l; A) bzw. Thapsigargin (2  $\mu\text{mol/l}$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mmol/l) und Thrombin (10 U/ml), Bradykinin (10  $\mu\text{mol/l}$ ) und Carbachol (1 mmol/l; B). In Klammern ist die Anzahl der gemessenen Zellen (x) aus verschiedenen Schälchen (y) angegeben. (C) Peak-Amplitude und Fläche unter der Kurve nach Wiedergabe von extrazellulärem Calcium (5 mmol/l) aus dem Experiment in (A). (D) Peak-Amplitude und Fläche unter der Kurve nach Wiedergabe von extrazellulärem Calcium (2 mmol/l) aus dem Experiment in (B). Die Box zeigt Median und Interquartilsabstand (IQR), die Whiskers reichen von Minimum bis Maximum, Ausreißer sind als Punkte dargestellt, wenn ihr Abstand größer als 1,5 Mal den IQR von der Box beträgt. Die p-Werte wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Ergebnisse stammen aus drei biologischen Replikaten (A) bzw. aus einem einzelnen, von den Replikaten in (A) unabhängigen Replikat (B).

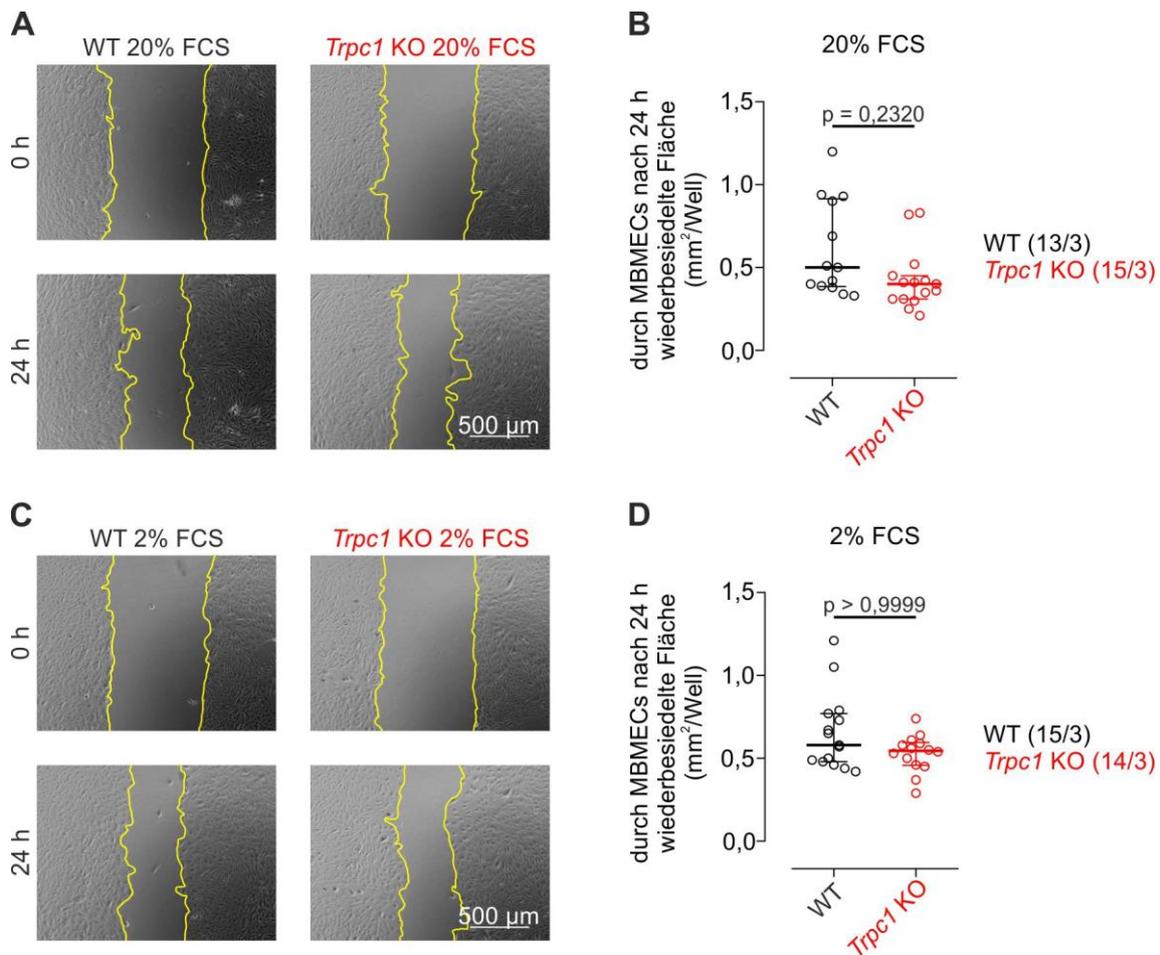
### 4.3.2 Migration und *in-vitro*-Angiogenese in MBMECs sind unabhängig von TRPC1

Veränderungen des speicherabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms können Zellmigration und Angiogenese beeinflussen. Beispielsweise führt eine pharmakologische Inhibition des speicherabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch Carboxyamidotriazol zu verminderter Endothelzellmigration und Angiogenese (Lodola et al., 2012). TRPC1 beeinflusst die Migration und Angiogenese koronarer Endothelzellen (Wen et al., 2022).

Um die Rolle von TRPC1 bei der Migration zerebraler Endothelzellen zu untersuchen, führten wir einen *in-vitro* Scratch Migrations-Versuch an MBMECs der 1. Passage von WT und *Trpc1* KO Mäusen durch. Wenn die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurde mit der AutoScratch-Maschine, welche mit Polypropylen-Nadeln ausgestattet war, eine künstliche Wunde in die Zellschicht gekratzt und das Kulturmedium durch frisches Kulturmedium mit 20% oder 2% FCS ersetzt. Die Migration der Endothelzellen wurde durch die Aufnahme mikroskopischer Bilder für 72 h alle 10 min mit einem automatischen Mikroskop bis zum vollständigen Schließen der Wunde verfolgt. Die Analyse der Größe der durch MBMECs wiederbesiedelten Fläche nach 24 h ergab tendenziell niedrigere, aber nicht signifikant unterschiedliche Werte für *Trpc1* KO MBMECs im Vergleich zum Wildtyp, sowohl in Anwesenheit von 20%, als auch von 2% FCS (Abb. 4.11).

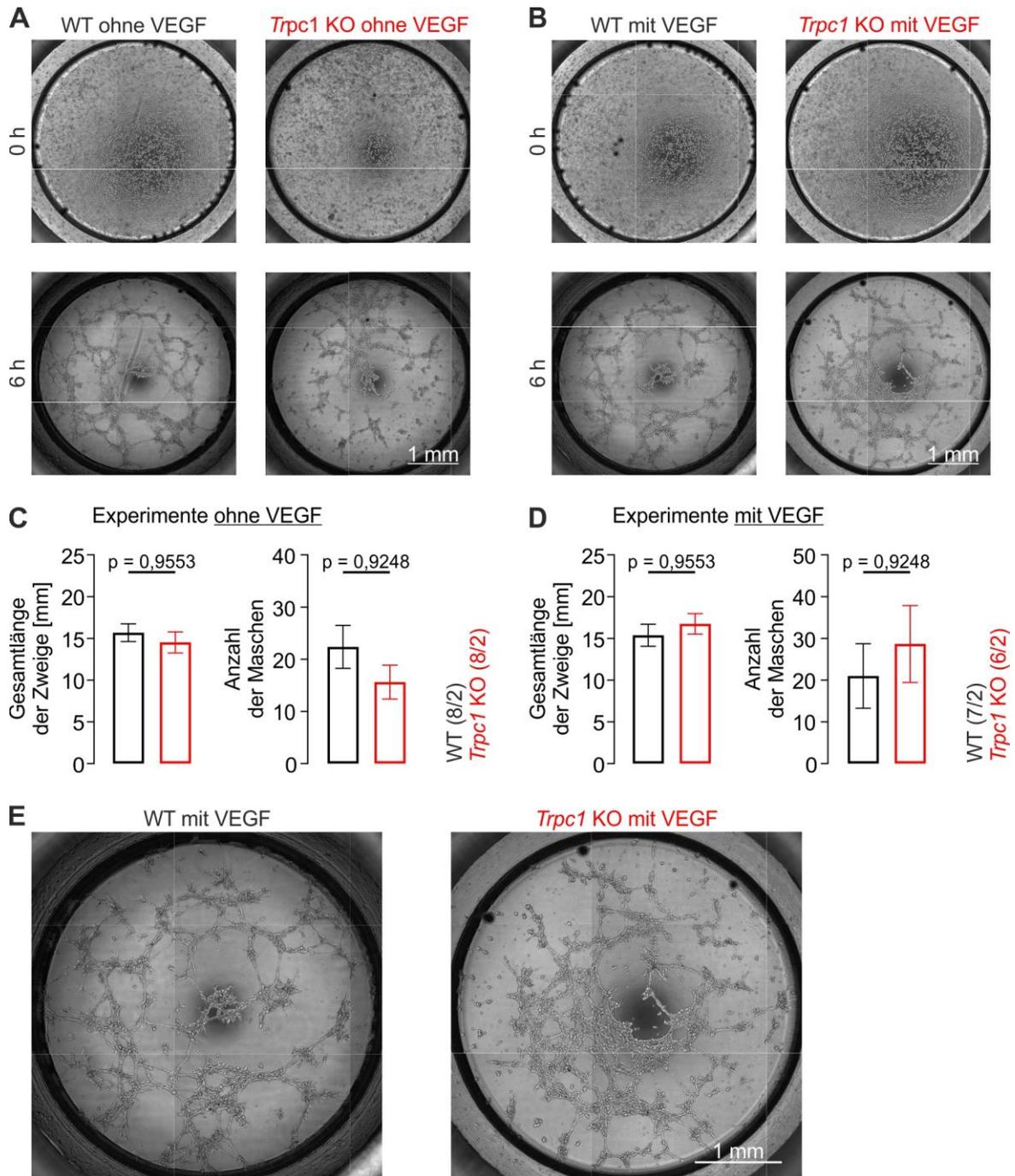
Hiernach evaluierten wir die *in-vitro*-Angiogenese in *Trpc1* KO MBMECs mit einem Tube Formation Assay. Wir gaben MBMECs der 2. Passage von *Trpc1* KO und WT Mäusen in Matrigel-beschichtete Ibidi  $\mu$ -Slides und nahmen nach 6 h Bilder mithilfe eines automatischen Mikroskops auf. Teilweise gaben wir in die Wells zusätzlich VEGF (2 ng/ml). MBMECs aus WT und aus *Trpc1* KO Mäusen zeigten nach 6 h die typische Bildung röhrenförmiger Strukturen. Wir werteten die mit ImageJ errechneten Kenngrößen Gesamtlänge der Zweige und Anzahl der Maschen aus. Sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von VEGF waren diese Kenngrößen zwischen *Trpc1* KO und WT MBMECs nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 4.12).

Insgesamt konnten wir nachweisen, dass die Entfernung von TRPC1 den speicherabhängigen Calcium-einstrom (SOCE) in MBMECs deutlich verstärkt. Allerdings zeigten sich *in-vitro*-Migration und *in-vitro*-Angiogenese in Abwesenheit von TRPC1 nicht verändert.



**Abb. 4.11 Die Migration von *Trpc1* KO MBMECs unterscheidet sich nicht von WT MBMECs**

MBMECs wurden in mit Kollagen Typ 4 beschichtete 24-Well-Platten ausgesät und mit Wachstumsmedium bis zur Konfluenz kultiviert. Mit dem AutoScratch-Instrument applizierten wir einen definierten Kratzer auf die kontinuierliche MBMEC-Schicht. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium in Anwesenheit von 20% FCS (**A, B**) oder 2% FCS (**C, D**) inkubiert. Nach Anfertigung der Wunde wurden für 72 h alle 10 min Bilder vom Wundbereich (zellfreie Stellen) durch das automatische Mikroskop Lionheart FX aufgenommen. (**A, C**) Dargestellt sind exemplarische Bilder der Wunde unmittelbar nach Anfertigung (jeweils obere Zeile) und Bilder desselben Bereiches nach 24 h (jeweils untere Zeile), die linke Spalte zeigt WT MBMECs, die rechte *Trpc1* KO MBMECs. (**B, D**) Fläche, die durch migrierende MBMECs von WT (schwarz) und *Trpc1* KO (rot) Mäusen wiederbesiedelt wird, gemessen 24 h nach der Scratch-Applikation in Anwesenheit von 20% (**B**) oder 2% (**D**) FCS. Die Daten sind als Einzelwerte mit Median und Interquartilsabstand (IQR) dargestellt. Die p-Werte wurden mithilfe des Dunn's Tests berechnet. In Klammern ist die Anzahl der ausgewerteten Wells (x) aus (y) biologischen Replikaten angegeben (x/y).



**Abb. 4.12 TRPC1 beeinflusst die *in-vitro*-Angiogenese von MBMECs nicht**

Ibidi- $\mu$ -Slides wurden für 30 min mit Basalmembran-Matrix beschichtet und anschließend pro Well 15.000 WT bzw. *Trpc1* KO MBMECs der 2. Passage hinzugegeben. Pro Well wurden neun Bilder mit dem Lionheart FX angefertigt, die im Anschluss im Programm CorelDraw X7 zusammengefügt und mit ImageJ ausgewertet wurden. (**A**, **B**) Die jeweils obere Zeile zeigt exemplarisch mikroskopische Bilder der Wells direkt nach Hinzugabe der Zellen (0 h), die untere Zeile denselben Bildausschnitt 6 h später; die linke und rechte Spalte zeigen jeweils Bilder mit WT bzw. *Trpc1* KO MBMECs in Abwesenheit (**A**) und Anwesenheit (**B**) von VEGF (2 ng/ml). (**E**) Vergrößerte Darstellung der 2. Zeile aus (**B**). (**C**, **D**) Gesamtlänge der Zweige in mm (links) und Anzahl der Maschen (rechts) in WT (schwarz) und *Trpc1* KO (rot) MBMECs in Abwesenheit (**C**) und Anwesenheit (**D**) von VEGF, dargestellt als Säulendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Die p-Werte wurden mithilfe des Holm-Sidak's Tests berechnet. In Klammern ist die Anzahl der ausgewerteten Wells (x) aus (y) biologischen Replikaten angegeben (x/y).

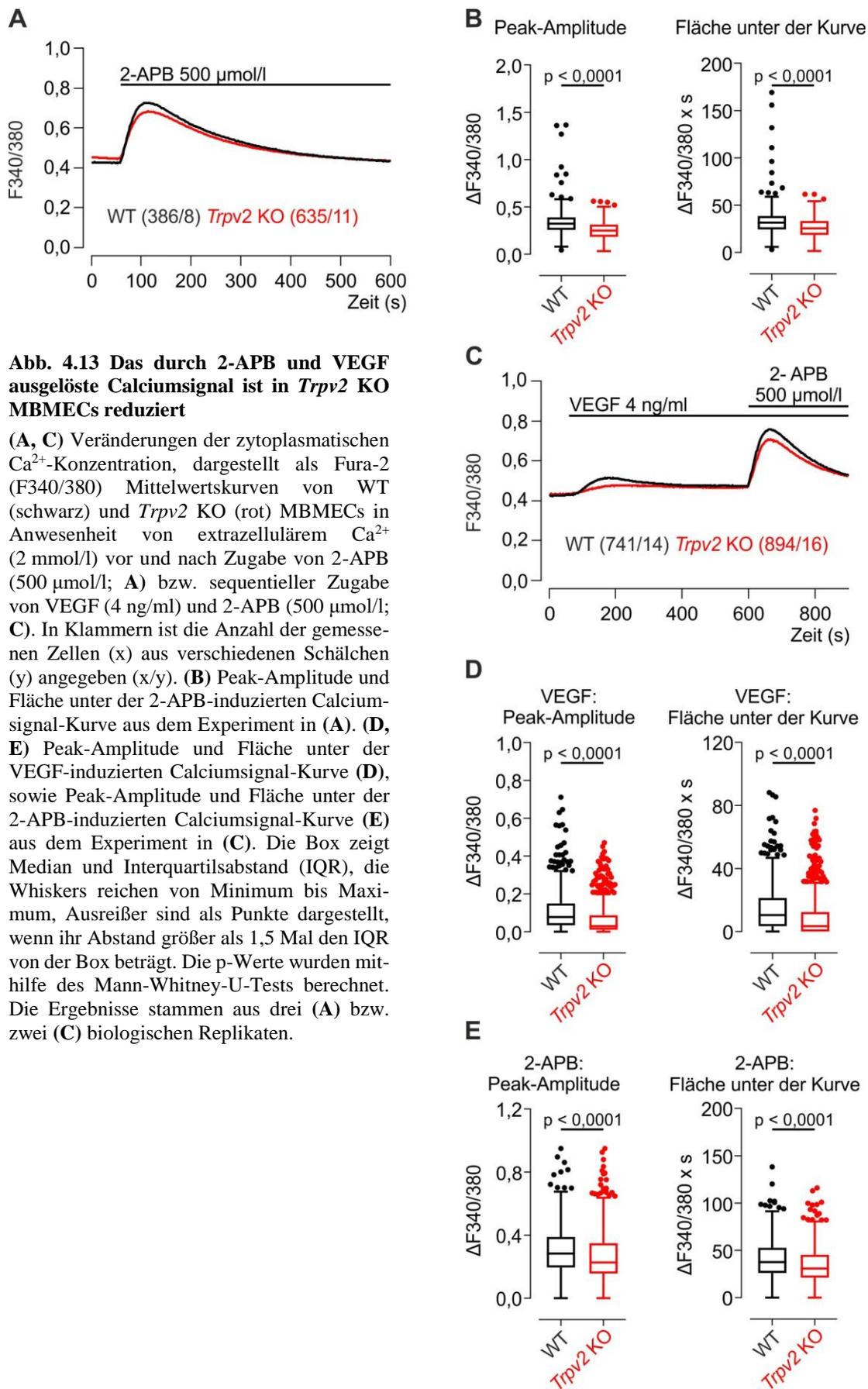
## 4.4 Funktion von TRPV2 in MBMECs

### 4.4.1 TRPV2 vermittelt das 2-APB- und VEGF-induzierte Calciumsignal in MBMECs

Es wurde gezeigt, dass Mitglieder der TRPV-Familie eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse in Endothelzellen spielen, beispielsweise TRPV2 in der Angiogenese humaner Hirn-Endothelzellen (Luo et al., 2019). Mittels PCR fanden wir in WT MBMECs Transkripte von *Trpv2* und *Trpv4* (Abb. 4.1). TRPV2 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kationenkanal (Caterina et al., 1999). Wir untersuchten die Funktion des TRPV2-Kanals in mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns und verwendeten aus *Trpv2* KO Mäusen isolierte Endothelzellen als Kontrollen.

Um die Funktion des TRPV2-Kanals in MBMECs zu untersuchen, wurden zunächst Calciumsignale in diesen Zellen gemessen. MBMECs von WT und *Trpv2* KO Mäusen wurden mit dem Calciumindikator Fura-2 beladen. Nach Zugabe des unspezifischen TRPV2-Agonisten 2-APB (500  $\mu\text{mol/l}$ ; Neeper et al., 2007) in Anwesenheit von 2  $\text{mmol/l}$  extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabelle 3.16) konnten wir einen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  in Endothelzellen messen (Abb. 4.13 A). Die Analyse der Peak-Amplitude und Fläche unter der Kurve zeigte eine signifikante Verminderung des 2-APB-vermittelten Calciumsignals in *Trpv2* KO MBMECs im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.13 B). Dies deutet darauf hin, dass in MBMECs ein Teil des 2-APB-vermittelten Calciumsignals über das TRPV2-Protein, höchstwahrscheinlich als  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, vermittelt wird.

Für TRPV2 wurde beschrieben, dass sich unter Ruhebedingungen ein Großteil des Kanals im endoplasmatischen Retikulum befindet und eine PI3-Kinase-Aktivierung eine Translokation in die Plasmamembran bewirkt (Kanzaki et al., 1999). Auch eine direkte Aktivierung von TRPV2 via PI3-Kinase ist beschrieben. So führt der Wachstumsfaktor IGF-1 in Zellen des retinalen Pigmentepithels via PI3-Kinase sowohl zur Aktivierung von TRPV2, als auch zu dessen Translokation in die Plasmamembran (Reichhart et al., 2015). Wir verwendeten rekombinanten murinen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) A<sub>165</sub>, eine 165 Aminosäuren lange Spleißvariante des VEGF-Proteins, welcher an die Rezeptortyrosinkinasen VEGF-Rezeptor (VEGFR) 1 und 2 bindet. Diese Bindung führt zur Aktivierung durch Bildung von Homo- oder Heterodimeren und Autophosphorylierung. Daraufhin bewirkt VEGFR-2 eine Aktivierung der PI3-Kinase. Zudem sorgen aktivierter VEGFR-1 und -2 für eine Aktivierung der Phospholipase- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), wodurch es zur  $\text{IP}_3$ -vermittelten Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum kommt (Olsson et al., 2006).



**Abb. 4.13** Das durch 2-APB und VEGF ausgelöste Calciumsignal ist in *Trpv2* KO MBMECs reduziert

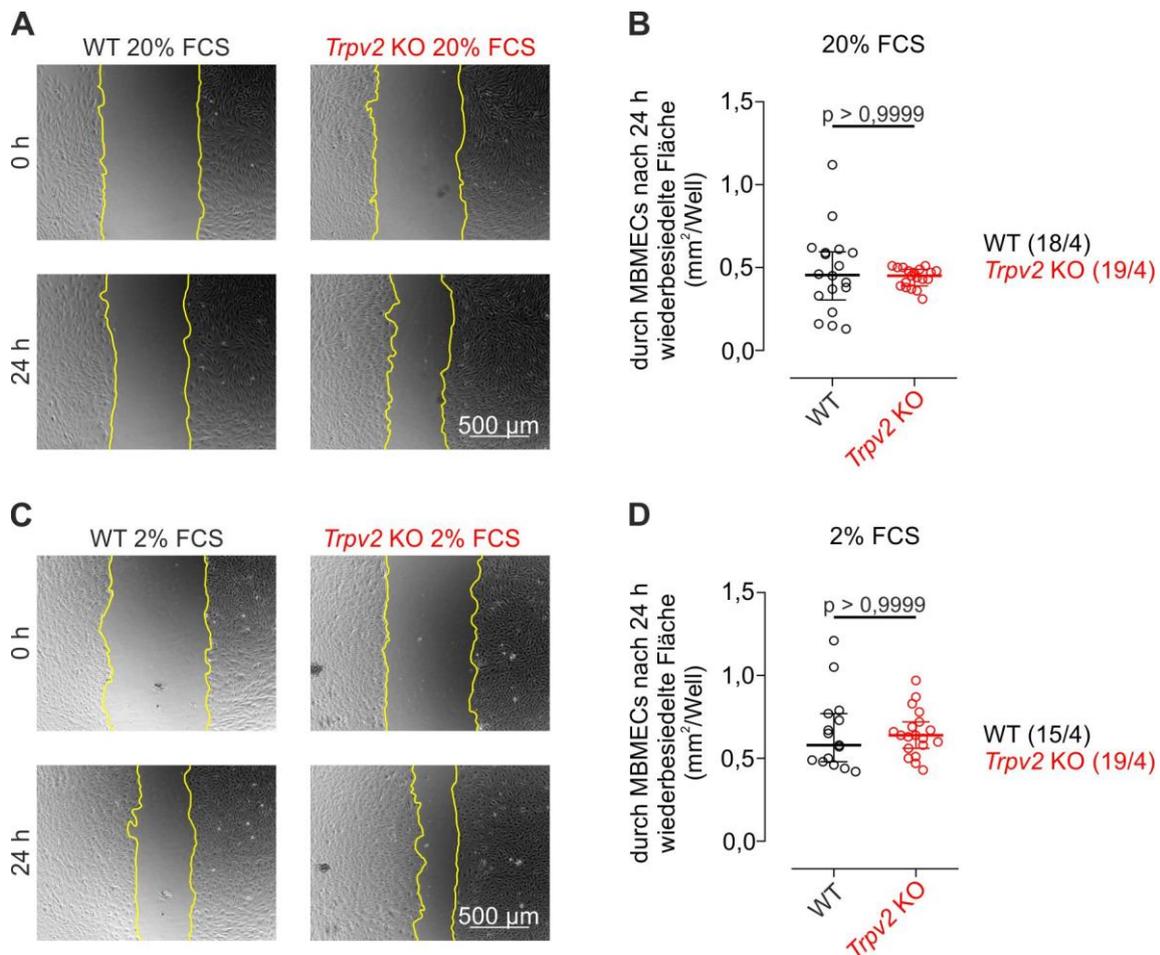
(**A**, **C**) Veränderungen der zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration, dargestellt als Fura-2 (F340/380) Mittelwertskurven von WT (schwarz) und *Trpv2* KO (rot) MBMECs in Anwesenheit von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  (2 mmol/l) vor und nach Zugabe von 2-APB (500  $\mu$ mol/l; **A**) bzw. sequentieller Zugabe von VEGF (4 ng/ml) und 2-APB (500  $\mu$ mol/l; **C**). In Klammern ist die Anzahl der gemessenen Zellen (x) aus verschiedenen Schälchen (y) angegeben (x/y). (**B**) Peak-Amplitude und Fläche unter der 2-APB-induzierten Calciumsignal-Kurve aus dem Experiment in (**A**). (**D**, **E**) Peak-Amplitude und Fläche unter der VEGF-induzierten Calciumsignal-Kurve (**D**), sowie Peak-Amplitude und Fläche unter der 2-APB-induzierten Calciumsignal-Kurve (**E**) aus dem Experiment in (**C**). Die Box zeigt Median und Interquartilsabstand (IQR), die Whiskers reichen von Minimum bis Maximum, Ausreißer sind als Punkte dargestellt, wenn ihr Abstand größer als 1,5 Mal den IQR von der Box beträgt. Die p-Werte wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Ergebnisse stammen aus drei (**A**) bzw. zwei (**C**) biologischen Replikaten.

In Anwesenheit von 2 mmol/l extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabelle 3.16) gaben wir VEGF (4 ng/ml) und anschließend 2-APB (500  $\mu\text{mol/l}$ ) hinzu und maßen die Calciumsignale von WT und *Trpv2* KO MBMECs (Abb. 4.13 C). Die Auswertung der Peak-Amplitude und Fläche unter der Kurve für VEGF zeigte ein signifikant reduziertes Calciumsignal in *Trpv2* KO MBMECs (Abb. 4.13 D). Dieses Experiment deutet darauf hin, dass auch das VEGF-induzierte intrazelluläre Calciumsignal in MBMECs in Teilen über TRPV2 vermittelt wird. Auch in diesem Experiment ergab die Auswertung der Peak-Amplitude und der Fläche unter der 2-APB-vermittelten Calciumkurve signifikant niedrigere Werte für *Trpv2* KO MBMECs (Abb. 4.13 E). Die Amplitude des 2-APB-induzierten Calciumsignals war, sowohl in WT, als auch in *Trpv2* KO MBMECs, in Anwesenheit von VEGF (Abb. 4.13 C), verglichen mit dem vorherigen Experiment ohne VEGF (Abb. 4.13 A), nicht erhöht. Somit ergab sich durch diese Ergebnisse kein Hinweis darauf, dass durch VEGF eine Translokation von TRPV2 in die Plasmamembran erfolgt.

#### **4.4.2 Die Migration von MBMECs ist beim Fehlen von TRPV2 nicht beeinträchtigt**

Wir untersuchten den Einfluss des von TRPV2 abhängigen Calciumsignals auf die Migration von MBMECs und führten hierfür einen *in-vitro* Scratch Migrations-Versuch durch. Es konnte ein Einfluss von TRPV2 auf die Migration beispielsweise von Endothelzellen (Luo et al., 2019) oder Prostatakarzinom-Zellen (Monet et al., 2009) in vorherigen Arbeiten gezeigt werden.

In eine Zellschicht aus konfluenten WT und *Trpv2* KO MBMECs der 1. Passage wurde eine künstliche Wunde gekratzt. In Anwesenheit von Kulturmedium mit 2 oder 20% FCS wurden mit dem automatischen Mikroskop Lionheart FX für 72 h alle 10 min mikroskopische Bilder des Wundbereiches aufgenommen (Abb. 4.14 A, C). Wir analysierten die von MBMECs wiederbesiedelte Fläche nach 24 h. Es zeigte sich weder im Medium mit 20%, noch im Medium mit 2% FCS ein signifikanter Unterschied zwischen WT und *Trpv2* KO MBMECs (Abb. 4.14 B, D). Dieses Experiment konnte somit keinen Einfluss des TRPV2-vermittelten zyttoplasmatischen Calciumanstiegs auf die Migration von MBMECs aufzeigen.

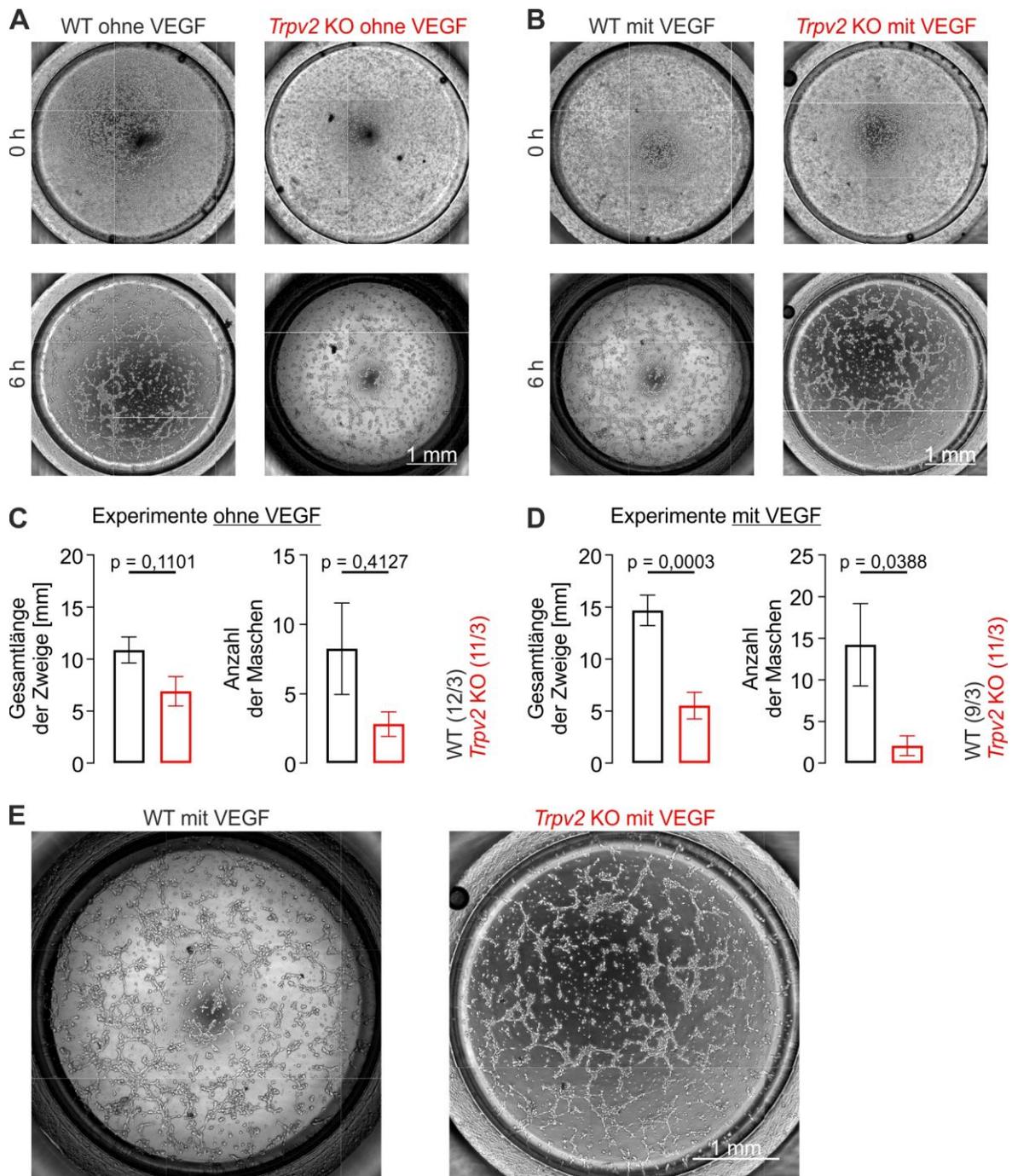


**Abb. 4.14 TRPV2 hat keinen Einfluss auf die Migration von MBMECs**

MBMECs wurden in mit Kollagen Typ 4 beschichtete 24-Well-Platten ausgesät und mit Wachstumsmedium bis zur Konfluenz kultiviert. Mit dem AutoScratch-Instrument applizierten wir einen definierten Kratzer auf die kontinuierliche MBMEC-Schicht. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium in Anwesenheit von 20% FCS (**A, B**) oder 2% FCS (**C, D**) inkubiert. Nach Anfertigung der Wunde wurden für 72 h alle 10 min Bilder vom Wundbereich (zellfreie Stellen) durch das automatische Mikroskop Lionheart FX aufgenommen. (**A, C**) Dargestellt sind exemplarische Bilder der Wunde unmittelbar nach Anfertigung (jeweils obere Zeile) und Bilder desselben Bereiches nach 24 h (jeweils untere Zeile), die linke Spalte zeigt WT MBMECs, die rechte *Trpv2* KO MBMECs. (**B, D**) Fläche, die durch migrierende MBMECs von WT (schwarz) und *Trpv2* KO (rot) Mäusen wiederbesiedelt wird, gemessen 24 h nach der Scratch-Applikation in Anwesenheit von 20% (**B**) oder 2% (**D**) FCS. Die Daten sind als Einzelwerte mit Median mit Interquartilsabstand (IQR) dargestellt. Die p-Werte wurden mithilfe des Dunn's Tests berechnet. In Klammern ist die Anzahl der ausgewerteten Wells (x) aus (y) biologischen Replikaten angegeben (x/y).

#### 4.4.3 Verringerte *in-vitro*-Angiogenese in *Trpv2* KO MBMECs

Zur Evaluation des Einflusses des TRPV2-abhängigen Calciumsignals auf die *in-vitro*-Angiogenese führten wir einen Tube Formation Assay mit WT und *Trpv2* KO MBMECs der 2. Passage durch. Wir verwendeten mit Basalmembran-Matrix beschichtete Ibidi- $\mu$ -Slides und gaben pro Well 15.000 Zellen hinzu. In einen Teil der Wells gaben wir VEGF (2 ng/ml), welches die Angiogenese zusätzlich stimuliert. Nach 6 h wurden neun mikroskopische Bilder pro Well mit dem automatischen Mikroskop Lionheart FX aufgenommen.



**Abb. 4.15 Verminderte *in-vitro*-Angiogenese in Anwesenheit von VEGF bei Fehlen von TRPV2**

Ibidi- $\mu$ -Slides wurden für 30 min mit Basalmembran-Matrix beschichtet und anschließend pro Well 15.000 WT bzw. *Trpv2* KO MBMECs der 2. Passage hinzugegeben. Pro Well wurden neun Bilder mit dem Lionheart FX angefertigt, die im Anschluss im Programm CorelDraw X7 zusammengefügt und mit ImageJ ausgewertet wurden. (**A**, **B**) Die jeweils obere Zeile zeigt exemplarisch mikroskopische Bilder der Wells direkt nach Hinzugabe der Zellen (0 h), die untere Zeile denselben Bildausschnitt 6 h später; die linke und rechte Spalte zeigen jeweils Bilder mit WT bzw. *Trpv2* KO MBMECs in Abwesenheit (**A**) und Anwesenheit (**B**) von VEGF (2 ng/ml). (**E**) Vergrößerte Darstellung der 2. Zeile aus (**B**). (**C**, **D**) Gesamtlänge der Zweige in mm (links) und Anzahl der Maschen (rechts) in WT (schwarz) und *Trpv2* KO (rot) MBMECs in Abwesenheit (**C**) und Anwesenheit (**D**) von VEGF, dargestellt als Säulendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Die p-Werte wurden mithilfe des Holm-Sidak's Tests berechnet. In Klammern ist die Anzahl der ausgewerteten Wells (x) aus (y) biologischen Replikaten angegeben (x/y).

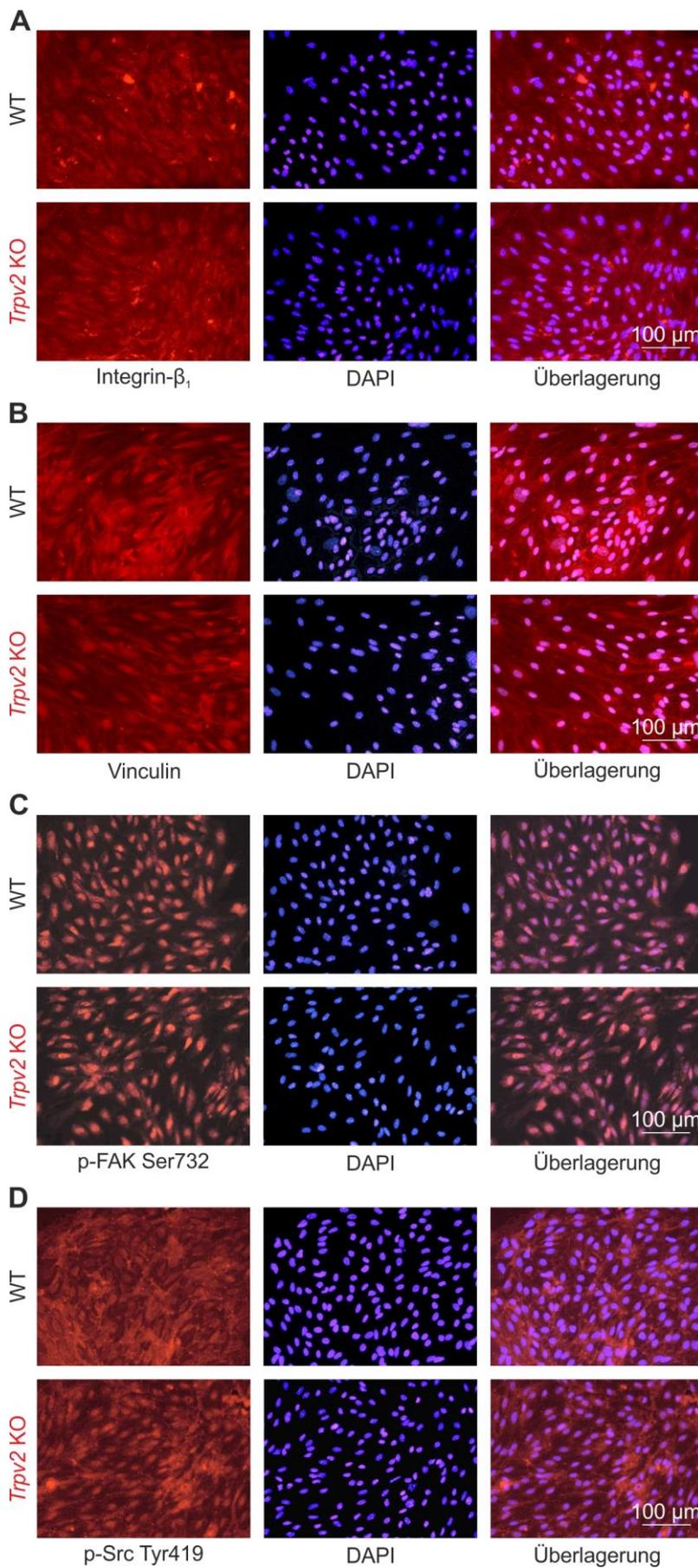
Wir quantifizierten die *in-vitro*-Angiogenese mithilfe von ImageJ und bestimmten die Parameter Gesamtlänge der Zweige und Anzahl der Maschen. Beide Parameter waren Abwesenheit von VEGF in

*Trpv2* KO MBMECs im Vergleich zum Wildtyp vermindert, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 4.15 A, C). In Anwesenheit von VEGF war die Anzahl der Maschen und die Gesamtlänge der Zweige in *Trpv2* KO MBMECs verglichen mit dem Wildtyp signifikant vermindert (Abb. 4.15 B, D). Wir konnten mit diesem Experiment eine Rolle von TRPV2 in der *in-vitro*-Angiogenese von MBMECs in Anwesenheit von VEGF demonstrieren.

#### **4.4.4 Expression von Schlüsselproteinen der Angiogenese in *Trpv2* KO MBMECs**

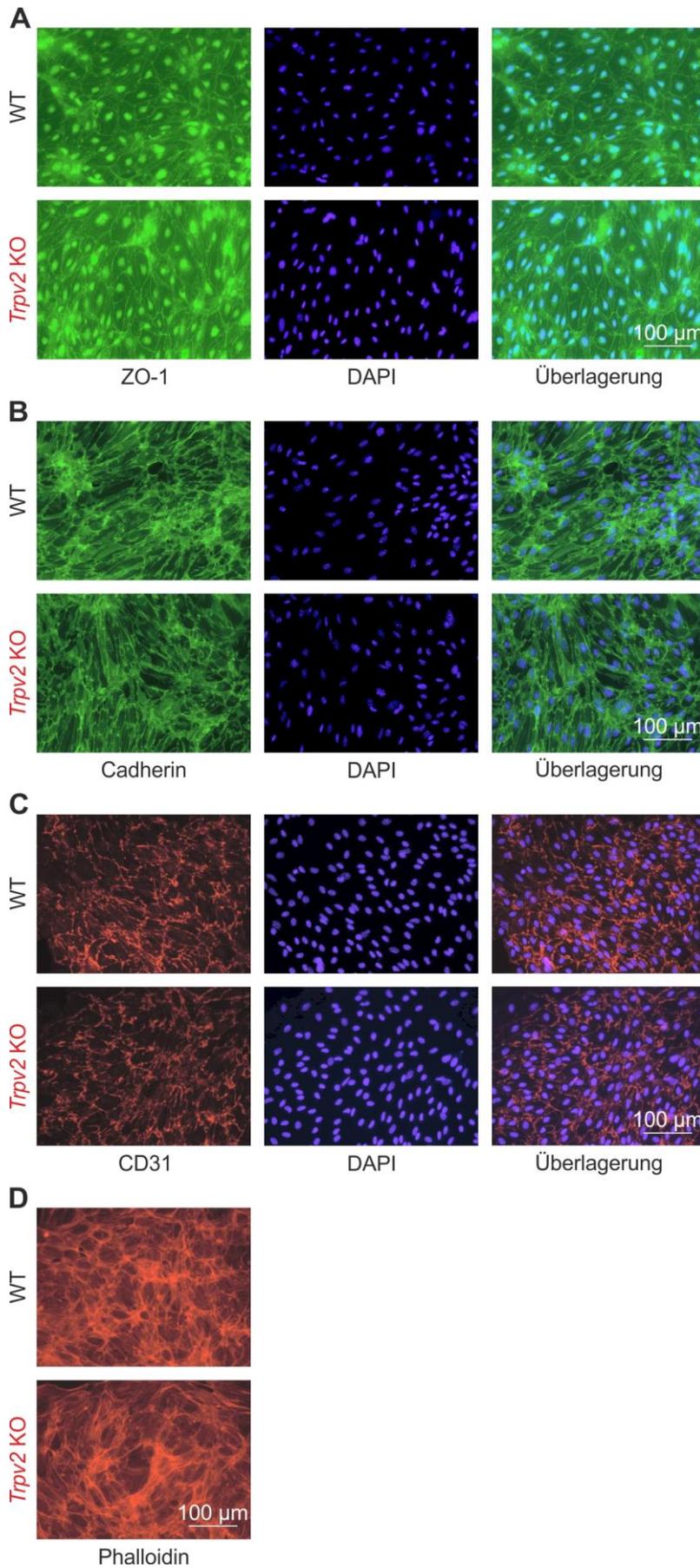
Als nächstes eruierten wir mögliche Mechanismen auf molekularer Ebene, welche für die verminderte *in-vitro*-Angiogenese in *Trpv2* KO MBMECs verantwortlich sein könnten. Hierfür untersuchten wir mit Immunfärbungen die Expression von Proteinen mit bekannter Rolle in der Zellmigration und Angiogenese in MBMECs. Wir isolierten MBMECs aus WT und *Trpv2* KO Mäusen und kultivierten diese in der 1. Passage auf Deckgläsern bis zur Konfluenz. Die Zellen wurden fixiert, die Membran solubilisiert und Immunfärbungen mit spezifischen Primär-Antikörpern (Tabelle 3.26) und mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sekundär-Antikörpern (Tabelle 3.27) durchgeführt.

Wir identifizierten in MBMECs Integrin- $\beta_1$ , Vinculin, p-FAK, p-Src, ZO-1, VE-Cadherin, und CD31. Integrin- $\beta_1$  und Vinculin wurden über der gesamten Zelle detektiert, p-Src und p-FAK zudem besonders im Bereich des Zellkerns (Abb. 4.16). ZO-1, VE-Cadherin und CD31 konnten insbesondere an interzellulären Verbindungen aufgezeigt werden (Abb. 4.17). Eindeutige Unterschiede zwischen WT und *Trpv2* KO MBMECs in der Färbeintensität oder der Verteilung der Immunmarkierung über die Zelle zeigten sich nicht. Die Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin ermöglichte eine Darstellung des Aktin-Skeletts der MBMECs. Es zeigte sich kein klarer Unterschied in der Färbeintensität oder Anordnung der Aktinfilamente zwischen WT und *Trpv2* KO MBMECs. Somit konnten wir zeigen, dass die Expression der genannten Proteine in MBMECs nicht vom Vorhandensein von TRPV2 abhängig ist.



**Abb. 4.16** *Trpv2* KO MBMECs exprimieren Integrin-β<sub>1</sub>, Vinculin, p-FAK und p-Src

MBMECs der 1. Passage wurden bis zur Konfluenz kultiviert, fixiert, die Membran solubilisiert und mit spezifischen Primär-Antikörpern und fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpern angefärbt. Abgebildet sind repräsentative Bilder der Immunfärbung von WT (schwarz) und *Trpv2* KO (rot) MBMECs, gefärbt mit Primär-Antikörpern (jeweils linke Spalte) gegen Integrin-β<sub>1</sub> (A), Vinculin (B), p-FAK Ser732 (C) und p-Src Tyr419 (D); DAPI zur Markierung der Zellkerne (jeweils mittlere Spalte); die jeweils rechte Spalte zeigt die Überlagerung beider Färbungen.



**Abb. 4.17 *Trpv2* KO MBMECs exprimieren ZO-1, VE-Cadherin und CD31**

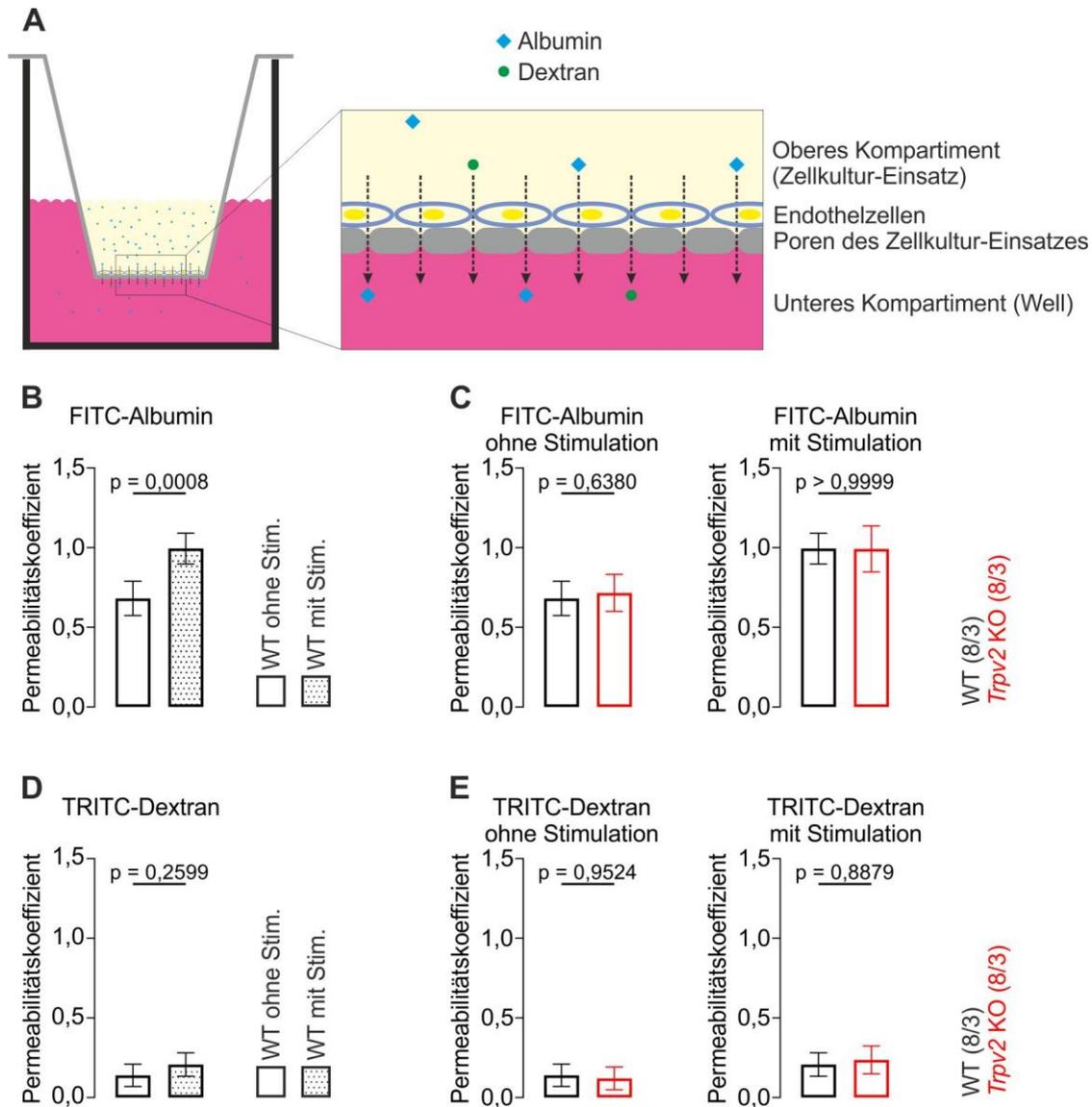
MBMECs der 1. Passage wurden bis zur Konfluenz kultiviert, fixiert, die Membran solubilisiert und mit spezifischen Primär-Antikörpern und fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpern angefärbt. Abgebildet sind repräsentative Bilder der Immunfärbung von WT (schwarz) und *Trpv2* KO (rot) MBMECs, gefärbt mit Primär-Antikörpern (jeweils linke Spalte) gegen ZO-1 (**A**), VE-Cadherin (**B**) und CD31 (**C**); DAPI zur Markierung der Zellkerne (jeweils mittlere Spalte); die jeweils rechte Spalte zeigt die Überlagerung beider Färbungen. (**D**) Repräsentative Bilder der Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin von WT (schwarz) und *Trpv2* KO (rot) MBMECs.

#### 4.4.5 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ und IL-1 $\beta$ erhöhen die Permeabilität von MBMECs unabhängig von TRPV2

Kultivierte MBMECs bilden eine Barriere bestehend aus einem einschichtigen Zellrasen und dicht abschließenden Zell-Zell-Verbindungen (Tight Junctions). Wir konnten in WT und *Trpv2* KO MBMECs mittels Immunfärbungen das Verbindungsprotein Zonula-occludens-1 (ZO-1) nachweisen. Dieses ist für den Aufbau der Tight junctions und damit die Abdichtung der Blut-Hirn-Schranke essenziell und kann die Permeabilität von Endothelzellen beeinflussen (Bian et al., 2009). Zunächst untersuchten wir den Einfluss von TRPV2 auf die Barrierefunktion von MBMECs. Hierfür wurde die Durchlässigkeit für Albumin, das mit Fluorescein-Isothiocyanat konjugiert war (FITC-Albumin, 66 kDa) und von Dextran, das mit Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat konjugiert war (TRITC-Dextran, 4,4 kDa), gemessen. Albumin kommt physiologischerweise im Blut vor und wird via Transzytose über die Endothelzellmembran transportiert (Gawdi, Emmady, 2021). Dextran kommt normalerweise nicht im Blut vor und wird parazellulär transportiert (Frost et al., 2019; Hashida et al., 1986). Wir untersuchten zudem den Einfluss der Entzündungsmediatoren Tumornekrosefaktor-(TNF)- $\alpha$  (20 ng/ml), Interferon-(IFN)- $\gamma$  (20 ng/ml) und Interleukin-(IL)-1- $\beta$  (20 ng/ml) auf die Barrierefunktion von *Trpv2* KO und WT MBMECs.

WT und *Trpv2* KO MBMECs der 1. Passage (100.000 Zellen pro Zellkultur-Einsatz) wurden auf kollagenbeschichtete Transwell-Kulturplatteneinsätze (Polyethylenterephthalat (PET)-Membran, Porengröße 0,4  $\mu\text{m}$ ) ausgesät und für sechs Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurden die Zellen für 24 h mit einem TNF- $\alpha$ -, IFN- $\gamma$ - und IL-1- $\beta$ -haltigen Medium (mit Stimulation) und einem Kontrollmedium (ohne Stimulation) behandelt und im Anschluss der Permeabilitätsassay durchgeführt (Abb. 4.18 A). In Anwesenheit von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1- $\beta$  war die Durchlässigkeit von FITC-Albumin durch die Endothel-Zellschicht deutlich erhöht, während die generell deutlich niedrigere Durchlässigkeit von TRITC-Dextran nur geringfügig beeinträchtigt war (Abb. 4.18 B, D). Es bestand kein Unterschied in der Permeabilität von FITC-Albumin und TRITC-Dextran zwischen WT und *Trpv2* KO MBMECs, weder in Abwesenheit, noch in Anwesenheit von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1- $\beta$  (Abb. 4.18 C, E).

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass der endotheliale TRPV2-Kanal einen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg nach Zugabe von 2-APB und VEGF vermittelt. Die Entfernung von TRPV2 reduzierte signifikant die VEGF-induzierte Angiogenese, beeinflusste jedoch nicht die Endothelzellmigration und Permeabilität der MBMECs.



**Abb. 4.18** TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  erhöhen die Permeabilität von MBMECs unabhängig von TRPV2

(A) Schematische Darstellung des Permeabilitäts-Assays. MBMECs der 1. Passage wurden für sechs Tage in Zellkultur-Einsätzen (oberes Kompartiment) kultiviert. In die Einsätze erfolgte anschließend die Zugabe der fluoreszenzmarkierten Substanzen FITC-Albumin und TRITC-Dextran, welche durch Transzytose (Albumin) bzw. parazellulär (Dextran) die Endothelzellschicht passieren. Nach 3 h wurde durch photometrische Konzentrationsbestimmung in beiden Kompartimenten der Permeabilitätskoeffizient mit folgender Formel bestimmt:  $P = (\beta_{UK} \times V) / (\beta_{OK} \times t \times A)$ , wobei  $\beta$  der Konzentration im oberen (OK) bzw. unteren (UK) Kompartiment entspricht, V dem Volumen des unteren Kompartimentes, t der Zeit zur Diffusion und A der Bodenfläche des Inserts. (B, D) Permeabilitätskoeffizient für FITC-Albumin (B) und TRITC-Dextran (D) in WT MBMECs, dargestellt als Säulendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. In der jeweils linken Säule sind die Werte für WT MBMECs ohne Stimulation, in der rechten mit Stimulation durch TNF- $\alpha$  (20 ng/ml), IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (20 ng/ml) gezeigt. (C, E) Permeabilitätskoeffizient für FITC-Albumin (C) und TRITC-Dextran (E) ohne und mit Stimulation durch TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$ , dargestellt als Säulendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. In der jeweils linken Säule sind die Werte für WT MBMECs, in der rechten Säule die Werte für *Trpv2* KO MBMECs abgebildet. Die p-Werte wurden mithilfe des Tukey-Tests errechnet. In Klammern ist die Anzahl der ausgewerteten Wells (x) aus (y) biologischen Replikaten angegeben (x/y).

## 5 Diskussion

### 5.1 Kultivierung und Charakterisierung der MBMECs

Austausch lebenswichtiger Substanzen und zugleich Aufrechterhaltung einer adäquaten Barriere zur Umgebung – dieser Aufgabe werden im Körper von Säugetieren Kapillaren gerecht, die kleinsten Aufzweigungen der Blutgefäße. Im Gehirn setzen sich Kapillaren aus Zellen der neurovaskulären Einheit zusammen: aus vaskulären Astrozyten, perivaskulären Zellen und ganz innen Endothelzellen. Letztere sind über spezialisierte Tight Junctions miteinander verbunden und damit der entscheidende Faktor für die besondere Dichtigkeit der *Blut-Hirn-Schranke* genannten Barriere. Um ihre Funktionen beispielsweise auch nach Schädigungen aufrechterhalten zu können, sind Endothelzellen im Gehirn zu zellulären Prozessen wie Endothelzellmigration und Angiogenese befähigt (Übersichtsarbeit siehe Profaci et al., 2020). Calciumsignale können in diesen Zellen Modulator dieser wichtigen Funktionen sein und zudem die Barrierefunktion beeinflussen (Übersichtsarbeit siehe Dalal et al., 2020).

Als Modell zur Untersuchung von Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke hat sich die Präparierung primärer mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Mausgehirn (MBMECs) bewährt (Ruck et al., 2014). Es handelt sich um ein *ex-vivo*-Modell, d.h. die Zellen wurden aus einem lebenden Organismus (Maus) entnommen und außerhalb des Organismus kultiviert und untersucht. Wir konnten die Isolierung und Kultivierung dieser Zellen aus Mäusen der Linien C57BL/6N und 129S6/SvEvTac in unserem Labor etablieren. Eine Qualitätskontrolle zum Nachweis der Reinheit unserer Kultur basierte auf der Morphologie der Endothelzellen, sowie dem für Endothelzellen typischen Nachweis des CD31-Proteins an interzellulären Kontaktstellen durch Immunfärbung (Abb. 4.1); (Newman et al., 1990).

Wir entschieden uns dafür, die Experimente an primären Endothelzellen und nicht an immortalisierten Zelllinien durchzuführen, da hiermit die Verwendung bereits vorhandener Knockout-Modelle ermöglicht wurde. Zudem besitzen immortalisierte Endothelzelllinien wie beispielsweise die murinen b.End3 im Vergleich zu Primärzellen eine teilweise deutlich erhöhte parazelluläre Permeabilität (Watanabe et al., 2013) und einen erniedrigten transendothelialen elektrischen Widerstand (Omidi et al., 2003). In Einklang damit weisen die Zelllinien eine veränderte Expression von Claudin, Occludin und ZO-1 auf, welche für die Ausbildung von Tight Junctions von großer Relevanz sind (Watanabe et al., 2013). Eine noch bessere Annäherung an die Realität könnte durch eine Ko-Kultivierung der Endothelzellen mit Astrozyten erreicht werden. Die Ko-Kultivierung von b.End3-Zellen mit der astrozytären Zelllinie C6 ergab eine signifikante Erhöhung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (Omidi et al., 2003). Darüber hinaus könnte durch Kultivierung der Endothelzellen unter pulsatilem Fluss des Zellkulturmediums, vergleichbar mit dem Blutfluss im Blutgefäß *in vivo*, eine weitere Annäherung an die Bedingungen der Endothelzellen *in vivo* erreicht werden. Hierdurch lässt sich die Überlebenszeit der Endothelzellen verlängern (Stanness et al., 1996).

In Endothelzellen besitzt  $\text{Ca}^{2+}$  eine bedeutende Rolle in der intrazellulären Signalgebung und beeinflusst Prozesse wie Zellmigration (Naito et al., 1989), Angiogenese (Kohn et al., 1995) und Barrierefunktion (Mayhan, Joyner, 1984). Unsere weiteren Experimente fokussierten wir auf die Aufklärung von Calcium-Signalwegen in MBMECs, sodass wir MBMECs auf Transkripte  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kationenkanäle untersuchten.

Wir identifizierten in MBMECs die Transkripte von *Trpc1-4*, *Trpc6*, *Trpv2* und *Trpv4* (Abb. 4.1). Auch andere Arbeiten zeigten das Vorhandensein von *Trpc1*, *Trpc2*, *Trpv2* und *Trpv4* Transkripten in zerebralen Endothelzellen (Brown et al., 2008; Chang et al., 2018; Luo et al., 2019). Chang et al. verwendeten MBMECs der 6. Passage und fanden zusätzlich Transkripte von *Trpc5* und *Trpc7*, konnten hingegen *Trpc3*, *Trpc4* und *Trpc6* nicht nachweisen (Chang et al., 2018). Brown et al. konnten in der Zelllinie b.End3 Transkripte von *Trpc4* und *Trpc7*, nicht jedoch von *Trpc3*, *Trpc5* und *Trpc6* nachweisen. In frisch isolierten murinen Hirn-Mikrogefäßen wurden die Transkripte aller TRPC-Kanäle (*Trpc1-7*) nachgewiesen (Brown et al., 2008). Eine Erklärung für die Unterschiede in den detektierten Transkripten könnte die Verwendung verschiedener Passagen von MBMECs bzw. die Verwendung von Zelllinien sein. Weiterhin ist trotz der hohen Reinheit unserer Kultur methodisch eine Verunreinigung durch weitere Gefäßzellen nicht auszuschließen.

Obwohl MBMECs nicht-erregbare Zellen sind, konnten wir Transkripte von *Cacnb1-4* (Abb. 4.1), sowie das  $\text{Ca}_v\beta_3$ -Protein mittels Western Blot detektieren (Abb. 4.2). Ziel der Arbeit war es, die bislang ungeklärte Funktion des  $\text{Ca}_v\beta_3$ -Proteins in MBMECs unabhängig von funktionsfähigen  $\text{Ca}_v$ -Kanälen aufzuzeigen. Des Weiteren sollte in dieser Arbeit die Funktion von TRPC1 und TRPV2, deren Transkripte wir in MBMECs nachweisen konnten, in diesen Zellen geklärt werden.

## 5.2 Funktion von $\text{Ca}_v\beta_3$

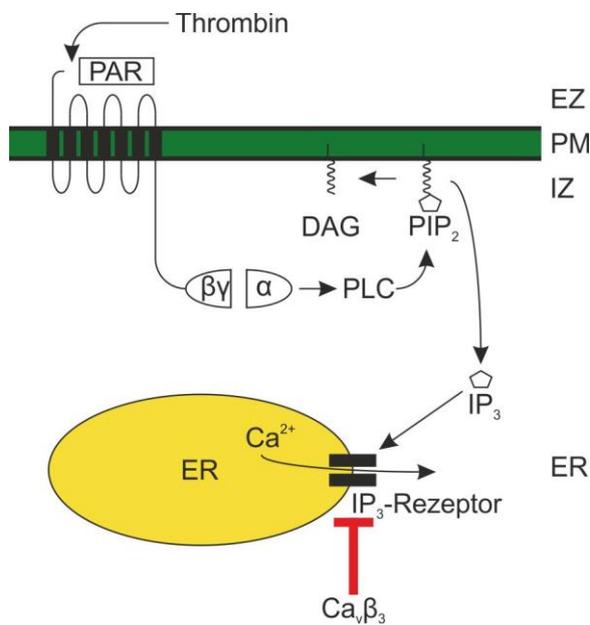
Im Allgemeinen gelten Endothelzellen als nicht-erregbare Zellen. Um dies zu verifizieren, untersuchten wir MBMECs mittels zweier unabhängiger Ansätze: Calcium-Imaging nach Depolarisation mit hohem Kalium, sowie elektrophysiologische Aufzeichnungen des Calciumstroms (Abb. 4.2). Nach  $\text{K}^+$ -abhängiger Depolarisation kam es nicht zu einem Anstieg des zytoplasmatischen Calciumsignals. Die elektrophysiologischen Messungen des Ganzzellstroms ergaben allenfalls einen minimalen ( $< 1 \text{ pA/pF}$ ) spannungsabhängigen Einwärtsstrom mit einem Maximum bei etwa 0 mV. Dieser war zudem unabhängig von der Anwesenheit des L-Typ- $\text{Ca}_v$ -Kanal-Aktivators Bay K8644 (Thomas et al., 1985). Bossu et al. konnten hingegen an einzelnen, bovinen Endothelzellen aus dem Nebennierenmark durch Depolarisation mit kaliumreicher Lösung einen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  erreichen. Elektrophysiologische Experimente ergaben den Nachweis eines spannungsabhängigen Calciumeinstroms mit einem Maximum von ca. 35 pA bei Depolarisation zwischen -30 und -10 mV (Bossu et al., 1989). Ebenso konnten Vinet et al. mit elektrophysiologischen Experimenten T- und L-Typ- $\text{Ca}_v$ -Ströme in einzelnen Endothelzellen des bovinen Nebennierenmarks nachweisen (Vinet, Vargas, 1999). An konfluenten bovinen Endothelzellen konnten  $\text{Ca}_v$ -Ströme hingegen nur durch eine starke Membrandepolarisation über +40 mV

ausgelöst werden konnten (Bossu et al., 1992). In Endothelzellen aus dem Ratten-Gehirn konnten T-Typ- $\text{Ca}_v$ -Ströme gemessen werden (Delpiano, Altura, 1996); in humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVECs; Vargas et al., 1994) und aortalen Endothelzellen aus Rindern (Takeda et al., 1987) wurde hingegen kein spannungsabhängiger Calciumeinstrom nachgewiesen. Das Vorhandensein eines spannungsabhängigen Calciumeinstroms scheint somit vom Subtyp der Endothelzellen und der Spezies abzuhängen. In MBMECs konnten wir allenfalls einen minimalen spannungsabhängigen Calciumeinstrom nachweisen, dessen physiologische Relevanz wir als gering ansehen und von einem Fehlen relevanter Mengen spannungsabhängiger Calciumkanäle ausgehen. Zudem waren die winzigen Calciumeinströme unabhängig von der Anwesenheit des  $\text{Ca}_v\beta_3$  Proteins. Hierdurch eignen sich MBMECs als Modell, um  $\text{Ca}_v$ -Kanal-unabhängige Funktionen von  $\text{Ca}_v\beta_3$  zu untersuchen.

Eine Calciumfreisetzung, die unabhängig von  $\text{Ca}_v$ -Kanälen ist, erfolgt durch einen Calciumstrom aus intrazellulären Speichern in das Zytoplasma. Werden  $G_q$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Zellmembran aktiviert, kommt es zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in DAG und  $\text{IP}_3$ . Letzteres aktiviert den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (Berridge, Irvine, 1984; Burgess et al., 1984; Streb et al., 1983). Dieser sorgt für eine Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum, welches einen Großteil der intrazellulären Speicherkapazität für  $\text{Ca}^{2+}$  besitzt (Wood, Gillespie, 1998). Um die Rolle von  $\text{Ca}_v\beta_3$  bei der Regulierung der  $\text{IP}_3$ -abhängigen Calciumfreisetzung zu untersuchen, entschieden wir uns für Thrombin. Thrombin spielt bei Entzündungen eine wichtige Rolle, indem es auf Endothelzellen wirkt und deren Durchlässigkeit reguliert (Vogel et al., 2000). Thrombin aktiviert den  $G_{\alpha q/11}$ -Protein-gekoppelten Rezeptor PAR1 in der Plasmamembran, welcher über die genannte Kaskade zur Calciumfreisetzung über den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor aus dem endoplasmatischen Retikulum führt (Coughlin, 2000).

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Thrombin-induzierte Calciumfreisetzung in mikrovaskulären Endothelzellen des Mausgehirns, die aus  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO Mäusen isoliert wurden, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich erhöht war (Abb. 4.3). Dabei blieben der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des endoplasmatischen Retikulums und der speicherabhängige Calciumeinstrom in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs unverändert (Abb. 4.4). Unsere Arbeitsgruppe konnte zuvor in nicht-erregbaren Zellen (Fibroblasten, Dendritischen Zellen, COS-7- und HEK293-Zellen), sowie in erregbaren Zellen ( $\beta$ -Zellen des Pankreas) zeigen, dass  $\text{Ca}_v\beta_3$  an den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor bindet, dessen Empfindlichkeit für  $\text{IP}_3$  reduziert und somit die Calciumfreisetzung unabhängig von der Funktion des  $\text{Ca}_v$ -Kanals kontrolliert (Becker et al., 2021; Belkacemi et al., 2018; Berggren et al., 2004; Woo et al., 2023). Wir gehen davon aus, dass  $\text{Ca}_v\beta_3$  in MBMECs in ähnlicher Weise wirkt, indem es direkt mit dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor interagiert und seine Empfindlichkeit für  $\text{IP}_3$  reduziert (Abb. 5.1). Ein Co-Immunpräzipitationsexperiment zum Nachweis der Bindung von  $\text{Ca}_v\beta_3$  an den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor steht jedoch noch aus. Auch die Messung der  $\text{IP}_3$ -Konzentration unter basalen Bedingungen und im Anschluss an die Thrombin-Applikation, um einen Einfluss von  $\text{Ca}_v\beta_3$  auf den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor aufzuzeigen, fehlt in dieser Arbeit noch. Wir erbrachten den Nachweis der Transkripte der anderen  $\beta$ -

Untereinheiten spannungsabhängiger Calciumkanäle *Cacnb1*, *Cacnb2*, und *Cacnb4* in MBMECs. Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch in einer vorherigen Publikation zeigen, dass diese keinen Einfluss auf die IP<sub>3</sub>-abhängige Calciumfreisetzung besitzen (Belkacemi et al., 2022).



**Abb. 5.1 Modell der Wirkung von Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> auf den IP<sub>3</sub>-Rezeptor in MBMECs**

Die Serinprotease Thrombin spaltet das N-terminale Ende des PAR-Rezeptors in Endothelzellen ab. Dieses N-terminale Fragment aktiviert den PAR-Rezeptor. Daraufhin spaltet das intrazelluläre G-Protein seine α-Untereinheit ab. Diese aktiviert die Phospholipase C (PLC), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) spaltet. IP<sub>3</sub> aktiviert den in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gelegenen IP<sub>3</sub>-Rezeptor. Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> hemmt diesen IP<sub>3</sub>-Rezeptor, was eine verminderte Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem Endoplasmatischen Retikulum zur Folge hat. EZ = Extrazellulärraum, PM = Plasmamembran, IZ = Intrazellulärraum (nach Belkacemi et al., 2018).

Über die Veränderung der Thrombin-induzierten Calciumfreisetzung hinaus konnten wir mit unseren Calcium Imaging Experimenten (Abb. 4.2; Abb. 4.3; Abb. 4.4) darlegen, dass die basale zytoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in Abwesenheit von Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> signifikant erhöht war. Bislang veröffentlichte Arbeiten zur basalen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in Endothelzellen beschränken sich auf die Linie der spontan hypertensiven Ratten, deren primäre Endothelzellen aus Aorta (Wang et al., 1995b) und Schwanz (Wang et al., 1995a) im Vergleich zu normotensiven Ratten ein erniedrigtes basales zytoplasmatisches Ca<sup>2+</sup> besitzen. Auch die Endothelzellen der spontan hypertensiven Ratten zeigten eine verminderten Agonisten-induzierten Anstieg des zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup> nach Applikation von Bradykinin, welches ebenfalls einen IP<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelten Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> vermittelt (Lambert et al., 1986). Eine mögliche Ursache für die Erhöhung des basalen zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup> in Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs können Ca<sup>2+</sup>-Leckströme aus dem endoplasmatischen Retikulum sein, welche die zytoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beeinflussen können (Übersichtsarbeit siehe Lemos et al., 2021). Der IP<sub>3</sub>-Rezeptor wurde als Vermittler eines Leckstroms beschrieben, der bereits unter Ruhebedingungen einen Calciumstrom vom endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma bewirken kann (Wakai, Fissore, 2019). Seine verminderte Hemmung in Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> KO MBMECs könnte zu einem erhöhten Leckstrom und dadurch zu einer erhöhten zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führen. Des Weiteren ist eine hemmende Wirkung von Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> auf weitere Leckstrom-Kanäle denkbar, beispielsweise Orai2 (Bandara et al., 2013) oder TRPC6 (Albarran et al., 2014). Gegen eine Beeinflussung der Ca<sup>2+</sup>-Leckströme aus dem endoplasmati-

schen Retikulum spricht jedoch der in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs unveränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des endoplasmatischen Retikulums (Abb. 4.4). Ob und wie  $\text{Ca}_v\beta_3$  mit diesen Proteinen interagiert und dadurch die basale zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst, bedarf weiterer Untersuchungen.

In Endothelzellen werden physiologische Prozesse wie Zellmigration und Angiogenese durch Calciumsignale reguliert (Kohn et al., 1995; Naito et al., 1989). Diese Signale sind in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs verändert, es kommt zur Enthemmung des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors und zur Erhöhung des basalen  $\text{Ca}^{2+}$ . Wir untersuchten die Zellmigration von MBMECs aus  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO Mäusen. Beim Fehlen von  $\text{Ca}_v\beta_3$  kam es zu einer beschleunigten *in-vitro*-Migration (Abb. 4.5), jedoch nur in Anwesenheit von 20% FCS, während in Anwesenheit von 2% FCS kein Effekt von  $\text{Ca}_v\beta_3$  gezeigt werden konnte. FCS enthält viele wachstumsfördernde Faktoren (Gstraunthaler, 2003), deren Effekte in Endothelzellen häufig über Calcium-Signalwege wie den Phospholipase-C- $\text{IP}_3$ -Signalweg vermittelt werden (Tiruppathi et al., 2006).  $\text{Ca}_v\beta_3$  wirkt hemmend auf diesen Signalweg und blockiert eine überschießende Stimulation durch die Wachstumsfaktoren. Fehlt  $\text{Ca}_v\beta_3$ , können die Wachstumsfaktoren ungehindert die Endothelzellen stimulieren. Im Medium mit wenig FCS kommt dieser Effekt aufgrund deutlich weniger vorhandener Wachstumsfaktoren nicht zustande, was eine mögliche Erklärung dafür ist, dass wir unter diesen Bedingungen keinen Effekt von  $\text{Ca}_v\beta_3$  zeigen konnten. In Fibroblasten hingegen konnte unsere Arbeitsgruppe einen hemmenden Effekt von  $\text{Ca}_v\beta_3$  auf die Zellmigration sowohl in Anwesenheit von 10%, als auch in Anwesenheit von 1% FCS zeigen (Belkacemi et al., 2018). Im Gegensatz zu einer vorherigen Publikation (Ikeda et al., 1995) konnten wir keine dosisabhängige Beschleunigung der Zellmigration durch FCS feststellen. Eine Erklärung hierfür kann sein, dass unserem Zellmedium weitere Wachstumsfaktoren zugegeben wurden, welche den Effekt der höheren FCS-Konzentration überdecken.

Wir konnten trotz der veränderten *in-vitro*-Migration keine Effekte von  $\text{Ca}_v\beta_3$  auf die *in-vitro*-Angiogenese von MBMECs demonstrieren (Abb. 4.6). Zur Stimulation der Angiogenese verwendeten wir zusätzlich VEGF, für welches eine Förderung der Angiogenese sowohl *in vitro* (Pepper et al., 1992), als auch *in vivo* (Connolly et al., 1989) dokumentiert ist. Monoklonale Anti-VEGF-Antikörper schwächen die Wirkung von VEGF ab, vermindern dadurch die Angiogenese in Tumoren und werden in der Tumorthherapie seit Jahren erfolgreich angewendet (Perren et al., 2011; Reck et al., 2009). Wir verwendeten VEGF nach Herstellerangaben in der Dosierung 2 ng/ml und konnten in vergleichbarer Dosierung Einflüsse auf Calciumsignale dokumentieren (Abb. 4.13). Dennoch wurde durch Stimulation mit VEGF keine Veränderung der *in-vitro*-Angiogenese in WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs erreicht. Teilweise wurden in der genannten Literatur für Effekte von VEGF auf die *in-vitro*-Angiogenese deutlich höhere Dosierungen benötigt. Zukünftig könnten in diesem Experiment höhere Dosierungen von VEGF verwendet werden, um einen Effekt auf die *in-vitro*-Angiogenese zu erzielen. Weitergehende Untersuchungen könnten sich auf die Auswirkungen der veränderten Zellmigration unter pathologischen Bedingungen, beispielsweise an Schlaganfall-Modellen beziehen. Hierbei wird am Mausmodell durch vorübergehenden Verschluss der Arteria cerebri media eine zerebrale Ischämie ausgelöst (Pleines et al., 2012). Das

Fehlen von  $\text{Ca}_v\beta_3$  könnte durch eine beschleunigte Endothelzellmigration zu einer schnelleren Reparatur der entstehenden Gefäßläsionen und damit zu einer Begrenzung der neuronalen Schädigung führen.

Durch Immunfärbungen konnten wir in WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs das Vorhandensein von  $\beta_1$ -Integrin, Vinculin, p-FAK, p-Src, CD31 nachweisen (Abb. 4.7; Abb. 4.8).  $\beta_1$ -Integrin verbindet die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett und spielt eine Rolle in der Migration von Endothelzellen des Mausgehirns (Lathia et al., 2010), zuvor konnten auch Shastry et al.  $\beta_1$ -Integrin in diesen Zellen nachweisen (Shastry, Tyagi, 2004). Vinculin verbindet in Endothelzellen das Aktin-Zytoskelett mit fokalen Adhäsionen und Adhärenzverbindungen der Endothelzellen; die Verteilung über die gesamte Endothelzelle entspricht Beobachtungen aus anderen Studien (Birukova et al., 2016). Src ist für Zellvermehrung wichtig und wird u.a. durch Autophosphorylierung an der Stelle Tyrosin 419 in einen aktivierten Zustand überführt (Aleshin, Finn, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass bei Endothelzellen, die in sich bewegendem Zellkulturmedium wuchsen, die Neubildung von Kapillaren insbesondere in Regionen mit phosphorylierter Src stattfindet (Hernandez Vera et al., 2009). Wir konnten Src über die gesamte Endothelzelle verteilt und insbesondere im Bereich des Zellkerns nachweisen. Das Glykoprotein CD31 ist ein Marker für Endothelzellen und wird, wie wir in dieser Arbeit ebenfalls zeigen konnten, insbesondere an interzellulären Kontaktstellen angereichert (Lampugnani et al., 1992; Newman et al., 1990). Wir konnten an Serin 732 phosphorylierte FAK (Fokale Adhäsionskinase) in MBMECs insbesondere im Bereich des Zellkerns nachweisen. Die Phosphorylierung von FAK an Serin 732 ist beispielsweise für die VEGF-induzierte Migration von Endothelzellen (Le Boeuf et al., 2006) wichtig. Uns gelang auch eine Anfärbung der Aktinfilamente mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin. Klare Unterschiede in der Fluoreszenzmarkierung oder der Verteilung der markierten Proteine über die Zelle zwischen WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs ergaben sich nicht.

Wir führten eine vergleichende Proteomanalyse von WT und  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs mittels nano-LC-MS/MS durch, welche die Hoch- und Herunterregulierung verschiedener Proteine in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs ergab (Abb. 4.9). Die Menge an  $\beta$ -Parvin (PARVB) war in der massenspektrometrischen Analyse in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs erhöht. Eine vorherige Arbeit konnte zeigen, dass eine Herunterregulation von  $\beta$ -Parvin durch siRNA zu einer Verminderung der Endothelzellmigration und der *in-vitro*-Angiogenese humaner Endothelzellen der Linie hCMEC/D3 führte (Javerzat et al., 2009). Dies suggeriert, dass  $\beta$ -Parvin ein möglicher Mediator der gesteigerten Endothelzellmigration in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs sein könnte, was durch zukünftige Arbeiten geklärt werden muss. Weiterhin konnten wir eine Hochregulation von Neuroathy Target Esterase (PLPL6) in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs zeigen. Die Überexpression dieses Proteins in HUVECs bewirkte eine Steigerung von Zellmigration und *in-vitro*-Angiogenese (Li et al., 2020), passend zur gesteigerten Zellmigration in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isoenzyme L1 (UCHL1) zeigte sich ebenfalls in  $\text{Ca}_v\beta_3$  KO MBMECs hochreguliert. Ein Gen-Silencing des für dieses Protein codierenden Gens in HUVECs sorgte für eine verminderte Angiogenese (Song et al., 2018), ein Knockdown in den Glioblastom-Zelllinien SF188 und SJ-

GBM2 verminderte deren Proliferation (Sanchez-Diaz et al., 2017). Die Inhibition der Calcium-Calmodulin-abhängigen Kinase 2 (KCC2G) mit KN93 bewirkt eine Verminderung der VEGF-induzierten Endothelzellmigration und *in-vitro*-Angiogenese (Banumathi et al., 2011), die Inhibition mit KN93 blockiert zudem die durch Thrombin und Fibronectin induzierte Beschleunigung der Zellmigration (Meoli, White, 2009). In  $Ca_v\beta_3$  KO MBMECs ist die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase 2 ebenfalls herunterreguliert, die Endothelzellmigration jedoch beschleunigt. Eine Möglichkeit für diesen Effekt kann sein, dass die vermehrte Endothelzellmigration bei Fehlen von  $Ca_v\beta_3$  über andere Signalwege als den VEGF-Signalweg geschieht und der VEGF-Signalweg konsekutiv herunterreguliert ist.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das Fehlen von  $Ca_v\beta_3$  in mikrovaskulären Endothelzellen des Mausgehirns die  $IP_3$ -abhängige Calciumfreisetzung enthemmt und zu einer erhöhten basalen  $Ca^{2+}$ -Konzentration in diesen Zellen führt. Die Enthemmung der Calciumfreisetzung geht mit einer Beschleunigung der Endothelzellmigration einher. Zukünftige Experimente sollen die physiologischen Auswirkungen dieser Veränderungen weiter untersuchen. Bereits gezeigt werden konnte von unserer Arbeitsgruppe, dass  $Ca_v\beta_3$  KO Mäuse im Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) Mausmodell, welches für Untersuchungen zur Multiplen Sklerose (MS) verwendet wird, einen höheren klinischen Score, also eine stärkere Auswirkung der MS zeigten (Belkacemi, Flockerzi, Diem, nicht publizierte Daten). Zerebrale Endothelzellen sind bekanntermaßen an der Pathophysiologie der Multiplen Sklerose beteiligt (Nishihara et al., 2022; Zhang et al., 2022). Mit der erhöhten Agonisten-induzierten Calciumfreisetzung und der Veränderung der Endothelzellmigration konnten wir Mechanismen aufzeigen, welche pathophysiologisch relevant sein könnten. Zur Klärung der genauen pathophysiologischen Mechanismen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Induktoren von  $Ca_v\beta_3$  in Hirn-Endothelzellen könnten bei der Therapie der Multiplen Sklerose nützlich sein, zumal für deren Wirkung auf die Endothelzellen keine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke nötig wäre. Unsere Erkenntnisse über die Beteiligung von  $Ca_v\beta_3$  an intrazellulären Calcium-Signalwegen und Endothelzellmigration könnten zur Entwicklung neuer Medikamente bei Erkrankungen wie z.B. der Multiplen Sklerose beitragen.

### 5.3 Funktion von TRPC1

Nach Depletion der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher werden diese über den speicherabhängigen Calcium-einstrom wieder aufgefüllt. Infolge der Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher des endoplasmatischen Retikulums lösen sich  $Ca^{2+}$ -Ionen von STIM1, ein Calciumsensor in der Membran des ER, woraufhin es zur Gruppierung von STIM1 kommt. Der STIM1-Verbund verlagert sich in die Nähe der Plasmamembran und aktiviert einen dort gelegenen Orai1-Kanal, welcher einen Calciumeinstrom von extrazellulär in die Zelle vermittelt (Abdullaev et al., 2008; Shen et al., 2021). STIM1 aktiviert über eine C-terminale Domäne auch TRPC1 (Zeng et al., 2008), welcher sich dann ebenfalls am speicherabhängigen Calcium-einstrom beteiligt (Liu et al., 2007). In Endothelzellen wurde neben TRPC1 (Ma et al., 2011; Qu et al., 2017) auch eine Beteiligung von TRPC3 (Antigny et al., 2011) und TRPC4 (Freichel et al., 2001;

Tiruppathi et al., 2002) am speicherabhängigen Calciumeinstrom demonstriert. In den von uns präparierten Endothelzellen wurde auch TRPC6 nachgewiesen, welcher in anderen Zelltypen ebenfalls eine Beteiligung am speicherabhängigen Calciumeinstrom zeigte (Jardin et al., 2021; Tedeschi et al., 2022).

Wir konnten einen Einfluss von TRPC1 auf den speicherabhängigen Calciumeinstrom nachweisen (Abb. 4.10). Das Fehlen von TRPC1 in MBMECs war mit einem erhöhten speicherabhängigen Calciumeinstrom verbunden, was im Gegensatz zu den genannten Publikationen einen inhibitorischen Effekt von TRPC1 auf den speicherabhängigen Calciumeinstrom vermuten lässt. Dies könnte auf Unterschiede in den verwendeten Zelltypen, HUVECs (Qu et al., 2017) bzw. Endothelzellen der Aorta (Ma et al., 2011) zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärung kann sein, dass der speicherabhängige Calciumeinstrom in MBMECs in Teilen durch weitere Kanäle der TRPC-Familie wie TRPC3 oder TRPC4 vermittelt sein könnte. TRPC1 kann mit diesen Kanälen Heterotetramere bilden, wodurch sich die  $Ca^{2+}$ -Permeation verringert (Storch et al., 2012), was eine Reduktion des speicherabhängigen Calciumeinstroms zur Folge haben könnte. Diese Hypothese könnte durch elektrophysiologische Experimente verifiziert werden, in welchen in MBMECs Ganzzellströme beispielsweise nach Aktivierung von TRPC4 durch den Agonisten Englerin A (Carson et al., 2015) in An- und Abwesenheit von TRPC1 gemessen werden.

Innerhalb der Familie der TRP-Kanäle kann es bei Herunterregulation eines TRP-Kanals zur Hochregulation eines anderen TRP-Kanals kommen (Kusudo et al., 2012; Sel et al., 2008; Selli et al., 2009). Der in *Trpc1* KO MBMECs erhöhte speicherabhängige Calciumeinstrom könnte durch eine kompensatorische Hochregulation anderer TRP-Kanäle erklärt werden. Selli et al. beschreiben, dass es nach Herunterregulation von TRPC1 durch RNA-Interferenz in Gefäßmuskelzellen zu einer kompensatorischen Hochregulation von TRPC6 und dadurch zu einer Erhöhung des speicherabhängigen Calciumeinstroms kommt (Selli et al., 2009). Wir führten ein Calcium-Imaging-Experiment mit Bildung von Diacylglycerol durch, welches bekanntermaßen TRPC-Kanäle aktiviert (Hofmann et al., 1999; Lucas et al., 2003; Storch et al., 2017). Hierfür verwendeten wir Thrombin, Carbachol und Bradykinin, welche zur Bildung von Diacylglycerol führen (Coughlin, 2000; Lambert et al., 1986; Saternos et al., 2018). Zuvor erfolgte eine irreversible Entleerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher durch Thapsigargin, wodurch eine Calciumfreisetzung von intrazellulär ausgeschlossen werden konnte. Es kam nach Zugabe der drei Substanzen nicht zu einem Anstieg des intrazellulären Calciumsignals (Abb. 4.10), was darauf hindeutet, dass wir mit diesem Ansatz keinen weiteren Calciumeinstrom von extrazellulär über TRPC-Kanäle erreichen konnten. Eine vorherige Arbeit konnte hingegen in Experimenten an heterolog TRPC4-überexprimierenden Zellen eine Aktivierung von TRPC4 durch Carbachol in Anschluss an die Entleerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher durch Thapsigargin zeigen (Zimmermann et al., 2014). Experimente an Zellen, die TRPC4 nicht überexprimieren, zeigten in dieser Arbeit einen Abfall des Calciumsignals nach Zugabe von Carbachol. Auch in unserem Experiment zeigte sich ein Abfall des Calciumsignals, wobei die Ursache hierfür unklar bleibt. Um eine mögliche Hochregulation anderer TRP-Kanäle in *Trpc1* KO MBMECs und deren Einfluss auf den speicherabhängigen Calciumeinstrom zu klären,

könnte eine Bestimmung der Transkript- und Proteinlevel dieser TRP-Kanäle, sowie Calcium-imaging-Experimente mit spezifischer Aktivierung beispielsweise von TRPC4 (Carson et al., 2015) oder TRPC6 (Zernov et al., 2022) und deren spezifische Antagonisierung (Lin et al., 2019; Miller et al., 2011) erfolgen.

Veränderungen des speicherabhängigen Calciumeinstroms können sich auf die endotheliale Zellmigration und Angiogenese auswirken (Lodola et al., 2012). Für TRPC1 konnte eine Beteiligung an der *in-vitro*- (Wen et al., 2022) und *in-vivo*- (Yu et al., 2010) Angiogenese gezeigt werden. Sein Fehlen in murinen Koronargefäßen führte zu einer schlechteren Genesung nach einem Myokardinfarkt (Wen et al., 2022). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich die Endothelzellmigration in *Trpc1* KO MBMECs passend zu den genannten Arbeiten tendenziell verringert (Abb. 4.11), signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nicht. Ursächlich können die im Vergleich zu anderen Publikationen generell langsamere Migration der hier verwendeten primären Zellen oder Zelltyp-spezifische Effekte von TRPC1 sein. Ein Effekt des Fehlens von TRPC1 auf die *in-vitro*-Angiogenese konnte in unseren Experimenten nicht aufgezeigt werden (Abb. 4.12). Eine Hochregulation anderer TRP-Kanäle, welche das Fehlen von TRPC1 kompensieren, kann eine Erklärung für fehlende Veränderungen von Endothelzellmigration und Angiogenese in *Trpc1* KO MBMECs sein und könnte zudem, wie oben erläutert, den erhöhten speicherabhängigen Calciumeinstrom beim Fehlen von TRPC1 erklären.

Bislang sind nur wenige Funktionen von TRPC1 in Hirn-Endothelzellen bekannt, beispielsweise vermittelt TRPC1 in b.End3-Zellen einen durch Dehnung induzierten Calciumeinstrom (Berrout et al., 2012). Zusätzlich zu den bekannten Funktionen von TRPC1 konnten wir in dieser Arbeit darlegen, dass beim Fehlen von TRPC1 der speicherabhängige Calciumeinstrom erhöht war. Obgleich die Endothelzellmigration tendenziell verringert war, zeigten sich keine signifikanten Effekte des Fehlens von TRPC1 auf die Migration und Angiogenese von MBMECs. Weitere Arbeiten sind nötig, um den genauen Mechanismus der Erhöhung des speicherabhängigen Calciumeinstroms beim Fehlen von TRPC1 und dadurch bedingte physiologische Auswirkungen zu klären.

## 5.4 Funktion von TRPV2

TRPV2 ist ein membranständiger Kationenkanal (Caterina et al., 1999) und vermittelt einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von extrazellulär. Es konnte ein Einfluss von Cannabidiol via TRPV2 auf Proliferation, Migration, *in-vitro*-Angiogenese und transendotheliale elektrische Resistenz humaner Hirnendothelzellen gezeigt werden (Luo et al., 2019). Jedoch basieren die Ergebnisse dieser Publikation im Wesentlichen auf Experimenten an endothelialen Zelllinien. Dies führt zu einer Einschränkung der Aussagekraft dieser Experimente. Einerseits besitzen endotheliale Zelllinien im Vergleich zu Primärzellen unterschiedliche Eigenschaften wie beispielsweise eine verminderte Barrierefunktion (Gericke et al., 2020; Veszelka et al., 2018). Andererseits fehlen spezifische Agonisten und Antagonisten von TRPV2

(Übersichtsarbeit siehe Iwata et al., 2020), was die Ergebnisse weniger zuverlässig macht und die Untersuchung spezifischer Effekte von TRPV2 erschwert. Deshalb entschlossen wir uns, Untersuchungen an primären MBMECs von WT und *Trpv2* KO Mäusen durchzuführen.

Um die Funktion des TRPV2 Kanals in der Plasmamembran zu untersuchen, führten wir Messungen der zyttoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Reaktion auf die Applikation des nicht-selektiven TRPV2-Agonisten 2-APB (Hu et al., 2004; Neeper et al., 2007) durch. 2-APB löste sowohl in WT, als auch in *Trpv2* KO MBMECs ein Calciumsignal aus. Das Signal zeigte sich in *Trpv2* KO MBMECs signifikant reduziert (Abb. 4.13). Diese Daten deuten darauf hin, dass das durch 2-APB ausgelöste Calciumsignal in Teilen durch TRPV2 vermittelt wird. Das auch bei Fehlen von TRPV2 vorhandene Calciumsignal führen wir auf die Aktivierung weiterer  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kanäle wie beispielsweise TRPM6 durch 2-APB zurück (Li et al., 2006). Von einer relevanten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern gehen wir nicht aus, da für 2-APB gezeigt wurde, dass es die Calciumfreisetzung über  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren inhibiert (Maruyama et al., 1997).

Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass VEGF in MBMECs einen Anstieg des zyttoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  bewirkt (Abb. 4.13). Wir gehen davon aus, dass dieser Anstieg im Wesentlichen auf einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran via TRPV2 zurückzuführen ist. Passend dazu war das Calciumsignal beim Fehlen von TRPV2 erheblich vermindert. Der für den VEGF-induzierten Anstieg des zyttoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  verantwortliche Mechanismus könnte eine Aktivierung von TRPV2 über den PI3-Kinase-Signalweg sein. IGF-1 bewirkt in retinalen Pigmentepithelzellen über diesen Signalweg eine Aktivierung von TRPV2 (Reichhart et al., 2015), VEGF aktiviert ebenfalls den PI3-Kinase-Signalweg (Olsson et al., 2006; Ruan, Kazlauskas, 2012). Zur Klärung dieser Hypothese könnten Calcium-Imaging-Experimente mit spezifischen PI3-Kinase-Inhibitoren wie LY294002 erfolgen (Vlahos et al., 1994), zum Ausschluss einer Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern auch Experimente nach deren Depletion mit Thapsigargin. Es wurde berichtet, dass sich TRPV2 unter Ruhebedingungen im Wesentlichen intrazellulär befindet und beispielsweise nach Zugabe von IGF-1 in einer pankreatischen  $\beta$ -Zelllinie oder dem chemotaktisch wirkenden Peptid fMetLeuPhe in Makrophagen in die Plasmamembran transloziert wird. Beide Substanzen wirken, wie VEGF, über den PI3-Kinase-Signalweg (Kanzaki et al., 1999; Nagasawa et al., 2007). In unserem Experiment müsste bei einer Translokation von TRPV2 in die Plasmamembran nach Applikation von VEGF die Amplitude des 2-APB-induzierten Calciumsignals erhöht sein, und sich die Differenz zwischen WT und *Trpv2* KO MBMECs vergrößern. Da beides nicht der Fall war, ergeben sich basierend auf unseren Ergebnissen keine Hinweise auf eine Translokation von TRPV2 in die Plasmamembran durch VEGF, dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Die Geschwindigkeit der Zellmigration ergab keinen Unterschied zwischen *Trpv2* KO und WT MBMECs (Abb. 4.14). Wir gehen daher im Gegensatz zu Luo et al. davon aus, dass TRPV2 keinen bedeutenden Einfluss auf die Migration von Hirn-Endothelzellen besitzt (Luo et al., 2019). In unserer Arbeit verwendeten wir primäre Endothelzellen von Wildtyp- und Knockout-Mäusen, während Luo et al. humane hCMEC/D3 Zellen verwendeten. In diesen Zellen beobachteten sie eine Beschleunigung der

Zellmigration durch den unspezifischen TRPV2-Agonisten Cannabidiol und eine Verlangsamung der Zellmigration durch Herunterregulation von TRPV2 mittels siRNA. Der durch Cannabidiol verursachte Effekt auf die Endothelzellmigration kann durch unspezifische Effekte von Cannabidiol z.B. auf die Cannabinoid-Rezeptoren CB1 und CB2 (Stanley et al., 2015; Thomas et al., 2007) bedingt sein. Die unterschiedlichen Resultate können auch auf die verwendeten Zelltypen zurückzuführen sein, die von uns verwendeten primären Endothelzellen migrieren deutlich langsamer als hCMEC/D3 Zellen. Zudem gibt es Unterschiede in der Expression von Vanilloid-TRP-Kanälen in den zwischen den Zelltypen: TRPV2 scheint in humanen Endothelzellen der überwiegend exprimierte Vanilloid-TRP-Kanal zu sein, während TRPV4 in Nagetier-Endothelzellen eine etwas größere Rolle zu spielen scheint (Luo et al., 2020).

Die *in-vitro*-Angiogenese von *Trpv2* KO MBMECs zeigte sich in Abwesenheit von VEGF im Vergleich zum Wildtyp nicht unterschiedlich. In Anwesenheit von VEGF war die *in-vitro*-Angiogenese in *Trpv2* KO MBMECs vermindert (Abb. 4.15). Diese Ergebnisse legen nahe, dass VEGF die *in-vitro*-Angiogenese über einen TRPV2-abhängigen Mechanismus fördert. Eine Hypothese ist, dass VEGF einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär über TRPV2 auslöst, welcher wiederum eine erhöhte *in-vitro*-Angiogenese bewirkt. Es ist bekannt, dass VEGF in Endothelzellen beispielsweise TRPC6 aktivieren kann (Turker et al., 2018). Die vorliegende Arbeit demonstriert für einen weiteren TRP-Kanal, TRPV2, eine Beteiligung am durch VEGF ausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und eine dadurch ausgelöste Steigerung der *in-vitro*-Angiogenese in MBMECs.

Passend zur Rolle von TRPV2 in der VEGF-induzierten Angiogenese ist der Kanal in Endothelzellen aus Prostatakarzinom-Gewebe hochreguliert (Bernardini et al., 2019). Auch in der Tumormikroumgebung von Glioblastom-Gewebe, insbesondere im Bereich mikrovaskulärer Proliferationen, ist eine Hochregulation von TRPV2 im Endothel bekannt (Conde et al., 2021; Zhang et al., 2016). Diese Proliferationen und die Tumor-Angiogenese in Glioblastomen werden zu wesentlichen Teilen durch die Wirkung von VEGF auf Tumor-Endothelzellen vermittelt (Folkins et al., 2009). Ein möglicher Zusammenhang zu unseren Resultaten besteht darin, dass VEGF in diesen Endothelzellen TRPV2 aktiviert, welcher anschließend zur erhöhten Tumor-Angiogenese beiträgt. Entsprechend zeigte der allosterische TRPV2-Antagonist Piperlongumin hemmende Wirkungen auf das Glioblastom-Wachstum *in vivo* (Conde et al., 2021). Hierdurch wird dargelegt, dass eine pharmakologische Inhibition von TRPV2 ein vielversprechendes Ziel in der medikamentösen Therapie beispielsweise von Glioblastomen sein kann.

Basierend auf den Veränderungen der *in-vitro*-Angiogenese führten wir Immunfärbungen zum Nachweis verschiedener, an der Angiogenese beteiligter Proteine durch. Wir konnten in *Trpv2* KO und WT MBMECs  $\beta_1$ -Integrin, Vinculin, p-FAK, p-Src, ZO-1, VE-Cadherin und CD31 nachweisen (Abb. 4.16, Abb. 4.17). Die Färbungen ergaben keine klaren Unterschiede in der Intensität oder der Verteilung der Immunmarkierung über die Zelle zwischen WT und *Trpv2* KO MBMECs, ebenso war die Anordnung der Aktinfilamente nicht unterschiedlich. VE-Cadherin und ZO-1 fanden sich insbesondere an Zell-Zell-

Kontaktstellen. VE-Cadherin sorgt dort für die Anhaftung gegenüberliegender Endothelzellen aneinander (Ali et al., 1997). ZO-1 ist entscheidender Bestandteil der Tight Junctions, welche den parazellulären Durchtritt von Substanzen in MBMECs regulieren (Stevenson et al., 1986).

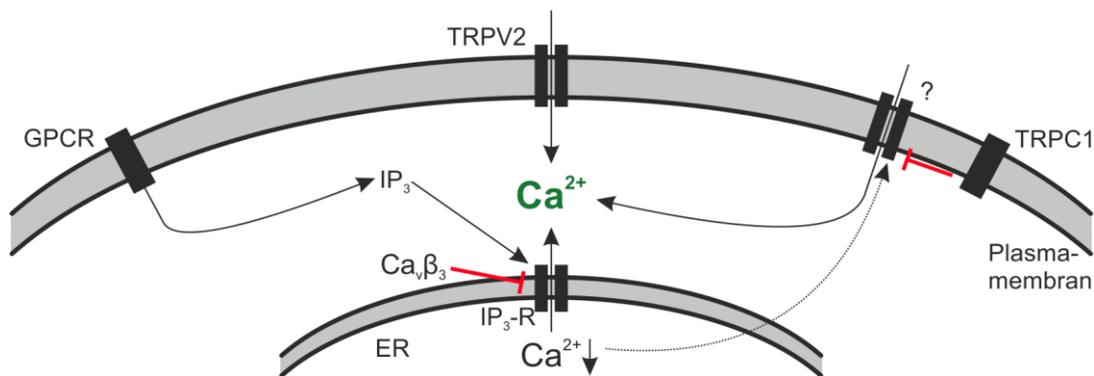
Die trans- und parazelluläre Durchlässigkeit untersuchten wir anschließend an einer konfluenten MBMEC-Schicht für Albumin und Dextran. Hierdurch wollten wir herausfinden, ob TRPV2 und die Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  die Integrität der Blut-Hirn-Schranke beeinflussen. Eine Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke, beispielsweise im Rahmen von Entzündungsreaktionen, führt zu einer vermehrten Permeabilität von Albumin (Di Pardo et al., 2017). Der *in-vitro*-Permeabilitäts-Assay in dieser Arbeit ergab passend dazu eine Erhöhung der Permeabilität für Albumin (66 kDa) in Anwesenheit der Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  (Abb. 4.18). Zwischen *Trpv2* KO und WT MBMECs zeigte sich kein Unterschied. Dieses Experiment demonstriert, dass die Integrität der Blut-Hirn-Schranke durch die Kombination von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  unabhängig von TRPV2 gestört wird. Effekte der Einzelsubstanzen auf die Permeabilität sind bekannt, jedoch in höherer Dosierung (Dewi et al., 2004). Wir gehen von einer synergistischen Wirkung der drei Substanzen aus, wodurch sie auch bei niedrigerer Konzentration eine Wirkung zeigten. Ein Effekt von TRPV-Kanälen auf die Durchlässigkeit von MBMECs wurde beschrieben (Brown et al., 2008). Durch Aktivierung von TRPV2 mit den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen 2-APB und VEGF oder auch mit Cannabinoiden, welche bekannte TRPV2-Agonisten sind (De Petrocellis et al., 2011), könnte ein Effekt von TRPV2 auf die endotheliale Permeabilität nachgewiesen werden. Bei der Anwendung von Cannabinoiden ist zu beachten, dass beispielsweise das Cannabinoid Cannabidiol als Agonist an TRPV2 wirkt (Gochman et al., 2023), jedoch gleichzeitig eine Verminderung der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  bewirkt und dadurch die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke verringern kann (Jiang et al., 2021).

Dextran (4,4 kDa) passierte unter unstimulierten Bedingungen die Endothelzellmembran kaum (Abb. 4.18), was sich mit den Ergebnissen anderer Autoren deckt (Natarajan et al., 2017; Tervo et al., 1979). Auch Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  bewirkte keine signifikante Erhöhung der Permeabilität. Ein Unterschied zwischen *Trpv2* KO und WT MBMECs bestand nicht. Dextran gelangt im Gegensatz zu Albumin parazellulär durch die Endothelzellschicht (Frost et al., 2019; Hashida et al., 1986). Eine Erklärung für die niedrigere Permeabilität von Dextran im Vergleich zu Albumin könnte sein, dass der parazelluläre Transport in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke durch Tight Junctions stark limitiert ist (Dalal et al., 2020).

In Übereinstimmung mit der zu Beginn genannten Arbeit (Luo et al., 2019) konnten wir demonstrieren, dass der membranständige Kationenkanal TRPV2 unter Ruhebedingungen in murinen Hirn-Endothelzellen aktiviert werden kann, wir verwendeten hierfür 2-APB und VEGF. Passend dazu wird TRPV2 für die VEGF-induzierte *in-vitro*-Angiogenese dieser Zellen benötigt, beeinflusst jedoch nicht die Endothelzellmigration. Durch Zugabe der Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  kann die Permeabilität von MBMECs für Albumin erhöht werden, dieser Effekt ist von TRPV2 unabhängig.

## 5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten wir Transkripte von  $\text{Ca}_v\beta_3$ , TRPC1 und TRPV2 in murinen Hirn-Endothelzellen nachweisen. Wir konnten einen Einfluss dieser Proteine auf die Calciumsignale in MBMECs darlegen. Infolge einer Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAR1 durch Thrombin kommt es zu einer Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern. Diese Calciumfreisetzung wird durch  $\text{Ca}_v\beta_3$  gehemmt. Die Wiederauffüllung dieser Speicher wird durch TRPC1 negativ beeinflusst. TRPV2 vermittelt nach Aktivierung in MBMECs ein Calciumsignal, mutmaßlich durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär (Abb. 5.2). Die Entthemmung der Calciumsignale über den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor beim Fehlen von  $\text{Ca}_v\beta_3$  bewirkt eine Steigerung der Endothelzellmigration ohne Auswirkung auf die Angiogenese *in vitro*. Im Gegenzug ist beim Fehlen der Calciumsignale über TRPV2 die VEGF-stimulierte Angiogenese vermindert.



**Abb. 5.2 Wirkung von  $\text{Ca}_v\beta_3$ , TRPC1 und TRPV2 auf Calciumsignale in MBMECs**

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sorgen für die Bildung von  $\text{IP}_3$ , welches im ER an den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor ( $\text{IP}_3$ -R) bindet und zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung führt. In unserer Arbeit zeigte sich eine Hemmung des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors durch  $\text{Ca}_v\beta_3$ . Wenn nach der Calcium-Freisetzung über den  $\text{IP}_3$ -R die Calciumspeicher des ER entleert sind, werden membranständige,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kanäle, darunter Orai1 und Kanäle der TRPC-Familie aktiviert. Wir konnten eine Erhöhung dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms beim Fehlen von TRPC1 zeigen, was z.B. durch eine Hemmung dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch TRPC1 bedingt sein könnte. TRPV2 sorgt in MBMECs nach seiner Aktivierung, z.B. durch 2-APB oder VEGF, für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum.

Die durch  $\text{Ca}_v\beta_3$ , TRPC1 und TRPV2 beeinflussten Calciumströme in das Zytoplasma spielen unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle bei der Funktion von Hirn-Endothelzellen und der Blut-Hirn-Schranke als Ganzem. Auch die Reaktion auf pathologische Einflüsse könnte von diesen Proteinen abhängig sein, was sie zu potentiellen Zielen für eine pharmakologische Modulation macht. Eine Reparatur endothelialer Defekte, beispielsweise nach Schlaganfällen, könnte durch Hemmung von  $\text{Ca}_v\beta_3$  beschleunigt werden, jedoch sind *in-vivo*-Untersuchungen an Mausmodellen erforderlich, um diese Hypothese zu belegen. Auch eine Aktivierung von TRPV2 könnte die Neubildung von Gefäßen, beispielsweise nach Schlaganfällen, beschleunigen, während die Gefäßneubildung in Hirntumoren durch Hemmung von TRPV2 gestört werden könnte. Hierfür wären ebenfalls weitere *in-vivo*-Experimente, beispielsweise an Maus-Modellen für Schlaganfälle (Pleines et al., 2012) oder Hirntumore (Sahu et al., 2022), erforderlich. Die Entwicklung spezifischer pharmakologischer Modulatoren dieser Proteine sollte eine Zielsetzung künftiger Arbeiten sein, um das therapeutische Potential nutzen zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abdullaev IF, Bisailon JM, Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Trebak M (2008) Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res* 103:1289-1299
2. Albarran L, Berna-Erro A, Dionisio N, Redondo PC, Lopez E, Lopez JJ, Salido GM, Brull Sabate JM, Rosado JA (2014) TRPC6 participates in the regulation of cytosolic basal calcium concentration in murine resting platelets. *Biochim Biophys Acta* 1843:789-796
3. Aleshin A, Finn RS (2010) SRC: a century of science brought to the clinic. *Neoplasia* 12:599-607
4. Ali J, Liao F, Martens E, Muller WA (1997) Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin): cloning and role in endothelial cell-cell adhesion. *Microcirculation* 4:267-277
5. Antigny F, Jousset H, Konig S, Frieden M (2011) Thapsigargin activates Ca(2)+ entry both by store-dependent, STIM1/Orai1-mediated, and store-independent, TRPC3/PLC/PKC-mediated pathways in human endothelial cells. *Cell Calcium* 49:115-127
6. Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Nagamatsu S (2010) Insulin/phosphoinositide 3-kinase pathway accelerates the glucose-induced first-phase insulin secretion through TrpV2 recruitment in pancreatic beta-cells. *Biochem J* 432:375-386
7. Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C (2010) Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468:557-561
8. Badou A, Jha MK, Matza D, Mehal WZ, Freichel M, Flockerzi V, Flavell RA (2006) Critical role for the beta regulatory subunits of Cav channels in T lymphocyte function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15529-15534
9. Ball SL, Powers PA, Shin HS, Morgans CW, Peachey NS, Gregg RG (2002) Role of the beta(2) subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1595-1603
10. Bandara S, Malmersjo S, Meyer T (2013) Regulators of calcium homeostasis identified by inference of kinetic model parameters from live single cells perturbed by siRNA. *Sci Signal* 6:ra56
11. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41:849-857
12. Bang S, Kim KY, Yoo S, Lee SH, Hwang SW (2007) Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neurosci Lett* 425:120-125
13. Banumathi E, O'Connor A, Gurunathan S, Simpson DA, McGeown JG, Curtis TM (2011) VEGF-induced retinal angiogenic signaling is critically dependent on Ca(2)(+) signaling by Ca(2)(+)/calmodulin-dependent protein kinase II. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:3103-3111
14. Bartha K, Domotor E, Lanza F, Adam-Vizi V, Machovich R (2000) Identification of thrombin receptors in rat brain capillary endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:175-182
15. Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, Mets M, Musarella MA, Boycott KM (1998) Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 19:264-267
16. Becker A, Wardas B, Salah H, Amini M, Fecher-Trost C, Sen Q, Martus D, Beck A, Philipp SE, Flockerzi V, Belkacemi A (2021) Cavbeta3 Regulates Ca(2+) Signaling and Insulin Expression in Pancreatic beta-Cells in a Cell-Autonomous Manner. *Diabetes* 70:2532-2544

17. Belkacemi A, Hui X, Wardas B, Laschke MW, Wissenbach U, Menger MD, Lipp P, Beck A, Flockerzi V (2018) IP3 Receptor-Dependent Cytoplasmic Ca(2+) Signals Are Tightly Controlled by Cavbeta3. *Cell Rep* 22:1339-1349
18. Belkacemi A, Trost CF, Tinschert R, Flormann D, Malihpour M, Wagner C, Meyer MR, Beck A, Flockerzi V (2021) The TRPV2 channel mediates Ca2+ influx and the Delta9-THC-dependent decrease in osmotic fragility in red blood cells. *Haematologica* 106:2246-2250
19. Belkacemi A, Beck A, Wardas B, Weissgerber P, Flockerzi V (2022) IP3-dependent Ca(2+) signals are tightly controlled by Cavbeta3, but not by Cavbeta1, 2 and 4. *Cell Calcium* 104:102573
20. Berggren PO, Yang SN, Murakami M, Efanov AM, Uhles S, Kohler M, Moede T, Fernstrom A, Appelskog IB, Aspinwall CA, Zaitsev SV, Larsson O, de Vargas LM, Fecher-Trost C, Weissgerber P, Ludwig A, Leibiger B, Juntti-Berggren L, Barker CJ, Gromada J, Freichel M, Leibiger IB, Flockerzi V (2004) Removal of Ca2+ channel beta3 subunit enhances Ca2+ oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell* 119:273-284
21. Bernardini M, Brossa A, Chinigo G, Grolez GP, Trimaglio G, Allart L, Hulot A, Marot G, Genova T, Joshi A, Mattot V, Fromont G, Munaron L, Bussolati B, Prevarskaya N, Fiorio Pla A, Gkika D (2019) Transient Receptor Potential Channel Expression Signatures in Tumor-Derived Endothelial Cells: Functional Roles in Prostate Cancer Angiogenesis. *Cancers (Basel)* 11
22. Berridge MJ, Irvine RF (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315-321
23. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529
24. Berrout J, Jin M, O'Neil RG (2012) Critical role of TRPP2 and TRPC1 channels in stretch-induced injury of blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Res* 1436:1-12
25. Bian C, Wu Y, Chen P (2009) Telmisartan increases the permeability of endothelial cells through zonula occludens-1. *Biol Pharm Bull* 32:416-420
26. Birukova AA, Shah AS, Tian Y, Moldobaeva N, Birukov KG (2016) Dual role of vinculin in barrier-disruptive and barrier-enhancing endothelial cell responses. *Cell Signal* 28:541-551
27. Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 134:845-852
28. Bosse E, Regulla S, Biel M, Ruth P, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F (1990) The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 267:153-156
29. Bossu JL, Feltz A, Rodeau JL, Tanzi F (1989) Voltage-dependent transient calcium currents in freshly dissociated capillary endothelial cells. *FEBS Lett* 255:377-380
30. Bossu JL, Elhamdani A, Feltz A (1992) Voltage-dependent calcium entry in confluent bovine capillary endothelial cells. *FEBS Lett* 299:239-242
31. Brice NL, Berrow NS, Campbell V, Page KM, Brickley K, Tedder I, Dolphin AC (1997) Importance of the different beta subunits in the membrane expression of the alpha1A and alpha2 calcium channel subunits: studies using a depolarization-sensitive alpha1A antibody. *Eur J Neurosci* 9:749-759
32. Brightman MW, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40:648-677
33. Bronner F (2001) Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *ScientificWorldJournal* 1:919-925

34. Brown RC, Wu L, Hicks K, O'Neil R G (2008) Regulation of blood-brain barrier permeability by transient receptor potential type C and type v calcium-permeable channels. *Microcirculation* 15:359-371
35. Buraei Z, Yang J (2013) Structure and function of the beta subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup>(+) channels. *Biochim Biophys Acta* 1828:1530-1540
36. Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL (1997) Mutation of the Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell* 88:385-392
37. Burgess GM, Godfrey PP, McKinney JS, Berridge MJ, Irvine RF, Putney JW, Jr. (1984) The second messenger linking receptor activation to internal Ca release in liver. *Nature* 309:63-66
38. Canti C, Nieto-Rostro M, Foucault I, Heblich F, Wratten J, Richards MW, Hendrich J, Douglas L, Page KM, Davies A, Dolphin AC (2005) The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11230-11235
39. Caprodossi S, Lucciarini R, Amantini C, Nabissi M, Canesin G, Ballarini P, Di Spilimbergo A, Cardarelli MA, Servi L, Mammanna G, Santoni G (2008) Transient receptor potential vanilloid type 2 (TRPV2) expression in normal urothelium and in urothelial carcinoma of human bladder: correlation with the pathologic stage. *Eur Urol* 54:612-620
40. Carpentier G (2012) ImageJ contribution: Angiogenesis Analyzer. *ImageJ News*
41. Carson C, Raman P, Tullai J, Xu L, Henault M, Thomas E, Yeola S, Lao J, McPate M, Verkuyl JM, Marsh G, Sarber J, Amaral A, Bailey S, Lubicka D, Pham H, Miranda N, Ding J, Tang HM, Ju H, Tranter P, Ji N, Krastel P, Jain RK, Schumacher AM, Loureiro JJ, George E, Berellini G, Ross NT, Bushell SM, Erdemli G, Solomon JM (2015) Englerin A Agonizes the TRPC4/C5 Cation Channels to Inhibit Tumor Cell Line Proliferation. *PLoS One* 10:e0127498
42. Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, Perez-Reyes E (1993a) Cloning and expression of a third calcium channel beta subunit. *J Biol Chem* 268:3450-3455
43. Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, Perez-Reyes E (1993b) Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit. *J Biol Chem* 268:12359-12366
44. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824
45. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436-441
46. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313
47. Chang SL, Huang W, Mao X, Mack ML (2018) Ethanol's Effects on Transient Receptor Potential Channel Expression in Brain Microvascular Endothelial Cells. *J Neuroimmune Pharmacol* 13:498-508
48. Chen YH, Li MH, Zhang Y, He LL, Yamada Y, Fitzmaurice A, Shen Y, Zhang H, Tong L, Yang J (2004) Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 429:675-680
49. Cheng W, Altafaj X, Ronjat M, Coronado R (2005) Interaction between the dihydropyridine receptor Ca<sup>2+</sup> channel beta-subunit and ryanodine receptor type 1 strengthens excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19225-19230
50. Cheung WY (1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207:19-27
51. Chevesich J, Kreuz AJ, Montell C (1997) Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex. *Neuron* 18:95-105

52. Cohen LB, Salzberg BM, Davila HV, Ross WN, Landowne D, Waggoner AS, Wang CH (1974) Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential. *J Membr Biol* 19:1-36
53. Cohen MR, Huynh KW, Cawley D, Moiseenkova-Bell VY (2013) Understanding the cellular function of TRPV2 channel through generation of specific monoclonal antibodies. *PLoS One* 8:e85392
54. Conde J, Pumroy RA, Baker C, Rodrigues T, Guerreiro A, Sousa BB, Marques MC, de Almeida BP, Lee S, Leites EP, Picard D, Samanta A, Vaz SH, Sieglitz F, Langini M, Remke M, Roque R, Weiss T, Weller M, Liu Y, Han S, Corzana F, Morais VA, Faria CC, Carvalho T, Filippakopoulos P, Snijder B, Barbosa-Morais NL, Moiseenkova-Bell VY, Bernardes GJL (2021) Allosteric Antagonist Modulation of TRPV2 by Piperlongumine Impairs Glioblastoma Progression. *ACS Cent Sci* 7:868-881
55. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84:1470-1478
56. Cork RJ, Namkung Y, Shin HS, Mize RR (2001) Development of the visual pathway is disrupted in mice with a targeted disruption of the calcium channel beta(3)-subunit gene. *J Comp Neurol* 440:177-191
57. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285-287
58. Coughlin SR (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258-264
59. Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E (1998) Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ Res* 83:103-109
60. Crone C, Olesen SP (1982) Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res* 241:49-55
61. Curtis BM, Catterall WA (1984) Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23:2113-2118
62. Curtis BM, Catterall WA (1986) Reconstitution of the voltage-sensitive calcium channel purified from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 25:3077-3083
63. Dalal PJ, Muller WA, Sullivan DP (2020) Endothelial Cell Calcium Signaling during Barrier Function and Inflammation. *Am J Pathol* 190:535-542
64. Darken MA (1964) Puromycin Inhibition of Protein Synthesis. *Pharmacol Rev* 16:223-243
65. Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer CS, Pratt WS, Dolphin AC (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
66. De Jongh KS, Warner C, Catterall WA (1990) Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J Biol Chem* 265:14738-14741
67. De Petrocellis L, Vellani V, Schiano-Moriello A, Marini P, Magherini PC, Orlando P, Di Marzo V (2008) Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J Pharmacol Exp Ther* 325:1007-1015
68. De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allara M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, Di Marzo V (2011) Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol* 163:1479-1494
69. De Petrocellis L, Orlando P, Moriello AS, Aviello G, Stott C, Izzo AA, Di Marzo V (2012) Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol (Oxf)* 204:255-266

70. De Waard M, Campbell KP (1995) Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca<sup>2+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 485 ( Pt 3):619-634
71. De Waard M, Witcher DR, Pragnell M, Liu H, Campbell KP (1995) Properties of the alpha 1-beta anchoring site in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 270:12056-12064
72. Delpiano MA, Altura BM (1996) Modulatory effect of extracellular Mg<sup>2+</sup> ions on K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents of capillary endothelial cells from rat brain. *FEBS Lett* 394:335-339
73. Dewi BE, Takasaki T, Kurane I (2004) In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J Virol Methods* 121:171-180
74. Di Pardo A, Castaldo S, Capocci L, Amico E, Vittorio M (2017) Assessment of Blood-brain Barrier Permeability by Intravenous Infusion of FITC-labeled Albumin in a Mouse Model of Neurodegenerative Disease. *J Vis Exp*
75. Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaya G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L, Gudermann T (2007) Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflügers Arch* 455:465-477
76. Dietrich A, Fahlbusch M, Gudermann T (2014) Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator? *Cells* 3:939-962
77. Dolphin AC (2018) Voltage-gated calcium channels: their discovery, function and importance as drug targets. *Brain Neurosci Adv* 2
78. Du LL, Shen Z, Li Z, Ye X, Wu M, Hong L, Zhao Y (2018) TRPC1 Deficiency Impairs the Endothelial Progenitor Cell Function via Inhibition of Calmodulin/eNOS Pathway. *J Cardiovasc Transl Res* 11:339-345
79. Duan J, Li J, Zeng B, Chen GL, Peng X, Zhang Y, Wang J, Clapham DE, Li Z, Zhang J (2018) Structure of the mouse TRPC4 ion channel. *Nat Commun* 9:3102
80. Dung HC (1976) Relationship between the adrenal cortex and thymic involution in "lethargic" mutant mice. *Am J Anat* 147:255-264
81. Ebashi S, Ebashi F, Kodama A (1967) Troponin as the Ca<sup>++</sup>-receptive protein in the contractile system. *J Biochem* 62:137-138
82. Ehring GR, Szabo IL, Jones MK, Sarfeh IJ, Tarnawski AS (2000) ATP-induced CA<sup>2+</sup>-signaling enhances rat gastric microvascular endothelial cell migration. *J Physiol Pharmacol* 51:799-811
83. Erdogmus S, Concepcion AR, Yamashita M, Sidhu I, Tao AY, Li W, Rocha PP, Huang B, Garippa R, Lee B, Lee A, Hell JW, Lewis RS, Prakriya M, Feske S (2022) Cavbeta1 regulates T cell expansion and apoptosis independently of voltage-gated Ca(2+) channel function. *Nat Commun* 13:2033
84. Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, Chakraborty C, Mulinyawe SB, Annis DS, Huberman AD, Green EM, Lawler J, Dolmetsch R, Garcia KC, Smith SJ, Luo ZD, Rosenthal A, Mosher DF, Barres BA (2009) Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139:380-392
85. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535
86. Escayg A, De Waard M, Lee DD, Bichet D, Wolf P, Mayer T, Johnston J, Baloh R, Sander T, Meisler MH (2000) Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet* 66:1531-1539
87. Etemad S, Campiglio M, Obermair GJ, Flucher BE (2014a) The juvenile myoclonic epilepsy mutant of the calcium channel beta(4) subunit displays normal nuclear targeting in nerve and muscle cells. *Channels (Austin)* 8:334-343

88. Etemad S, Obermair GJ, Bindreither D, Benedetti A, Stanika R, Di Biase V, Burtscher V, Koschak A, Kofler R, Geley S, Wille A, Lusser A, Flockerzi V, Flucher BE (2014b) Differential neuronal targeting of a new and two known calcium channel beta4 subunit splice variants correlates with their regulation of gene expression. *J Neurosci* 34:1446-1461
89. Fecher-Trost C, Wolske K, Wesely C, Lohr H, Klawitter DS, Weissgerber P, Gradhand E, Burren CP, Mason AE, Winter M, Wissenbach U (2021) Mutations That Affect the Surface Expression of TRPV6 Are Associated with the Upregulation of Serine Proteases in the Placenta of an Infant. *Int J Mol Sci* 22
90. Fell B, Eckrich S, Blum K, Eckrich T, Hecker D, Obermair GJ, Munkner S, Flockerzi V, Schick B, Engel J (2016) alpha2delta2 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
91. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441:179-185
92. Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su TZ, Bramwell S, Corradini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D (2006) Identification of the alpha2-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
93. Flockerzi V, Oeken HJ, Hofmann F, Pelzer D, Cavalie A, Trautwein W (1986) Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* 323:66-68
94. Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, Hoffman RM, Kerbel RS (2009) Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Res* 69:7243-7251
95. Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F (1991) Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1788-1792
96. Franclin C, McLean ABH (1934) The state of calcium in the fluids of the body. *Journal of Biological Chemistry*
97. Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B (2001) Lack of an endothelial store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4<sup>-/-</sup> mice. *Nat Cell Biol* 3:121-127
98. Freise D, Held B, Wissenbach U, Pfeifer A, Trost C, Himmerkus N, Schweig U, Freichel M, Biel M, Hofmann F, Hoth M, Flockerzi V (2000) Absence of the gamma subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca<sup>2+</sup> currents and alters channel inactivation properties. *J Biol Chem* 275:14476-14481
99. Frost TS, Jiang L, Lynch RM, Zohar Y (2019) Permeability of Epithelial/Endothelial Barriers in Transwells and Microfluidic Bilayer Devices. *Micromachines* (Basel) 10
100. Funayama M, Goto K, Kondo H (1996) Cloning and expression localization of cDNA for rat homolog of TRP protein, a possible store-operated calcium (Ca<sup>2+</sup>) channel. *Brain Res Mol Brain Res* 43:259-266
101. Gao B, Sekido Y, Maximov A, Saad M, Forgacs E, Latif F, Wei MH, Lerman M, Lee JH, Perez-Reyes E, Bezprozvanny I, Minna JD (2000) Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *J Biol Chem* 275:12237-12242
102. Garcia JG, Siflinger-Birnboim A, Bizios R, Del Vecchio PJ, Fenton JW, 2nd, Malik AB (1986) Thrombin-induced increase in albumin permeability across the endothelium. *J Cell Physiol* 128:96-104

103. Gawdi R, Emmady PD (2021). Physiology, Blood Brain Barrier. In StatPearls (Treasure Island (FL)).
104. Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN (1996) The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. *J Biol Chem* 271:5768-5776
105. Gericke B, Romermann K, Noack A, Noack S, Kronenberg J, Blasig IE, Loscher W (2020) A face-to-face comparison of claudin-5 transduced human brain endothelial (hCMEC/D3) cells with porcine brain endothelial cells as blood-brain barrier models for drug transport studies. *Fluids Barriers CNS* 17:53
106. Gilon P, Shepherd RM, Henquin JC (1993) Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> as evidences in single pancreatic islets. *J Biol Chem* 268:22265-22268
107. Gochman A, Tan X, Bae C, Chen H, Swartz KJ, Jara-Oseguera A (2023) Cannabidiol sensitizes TRPV2 channels to activation by 2-APB. *bioRxiv*
108. Gregg RG, Messing A, Strube C, Beurg M, Moss R, Behan M, Sukhareva M, Haynes S, Powell JA, Coronado R, Powers PA (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
109. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450
110. Gstraunthaler G (2003) Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX* 20:275-281
111. Guo YY, Gao Y, Hu YR, Zhao Y, Jiang D, Wang Y, Zhang Y, Gan H, Xie C, Liu Z, Zhong B, Zhang ZD, Yao J (2022) The Transient Receptor Potential Vanilloid 2 (TRPV2) Channel Facilitates Virus Infection Through the Ca(2+) -LRMDA Axis in Myeloid Cells. *Adv Sci (Weinh)* 9:e2202857
112. Hashida R, Anamizu C, Yagyu-Mizuno Y, Ohkuma S, Takano T (1986) Transcellular transport of fluorescein dextran through an arterial endothelial cell monolayer. *Cell Struct Funct* 11:343-349
113. Hegmann EJ, Bauer HC, Kerbel RS (1992) Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured cerebral capillary endothelial cells. *Cancer Res* 52:6969-6975
114. Held B, Tsvilovskyy V, Meissner M, Kaestner L, Ludwig A, Mossmang S, Lipp P, Freichel M, Flockerzi V (2007) Ca<sup>2+</sup> channel currents and contraction in CaVbeta3-deficient ileum smooth muscle from mouse. *Cell Calcium* 42:477-487
115. Hernandez Vera R, Genove E, Alvarez L, Borros S, Kamm R, Lauffenburger D, Semino CE (2009) Interstitial fluid flow intensity modulates endothelial sprouting in restricted Src-activated cell clusters during capillary morphogenesis. *Tissue Eng Part A* 15:175-185
116. Hibino H, Pironkova R, Onwumere O, Rousset M, Charnet P, Hudspeth AJ, Lesage F (2003) Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca<sup>2+</sup>-channel beta 4 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:307-312
117. Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, Wegener JW (2014) L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev* 94:303-326
118. Hofmann F, Belkacemi A, Flockerzi V (2015) Emerging Alternative Functions for the Auxiliary Subunits of the Voltage-Gated Calcium Channels. *Curr Mol Pharmacol* 8:162-168
119. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397:259-263
120. Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7461-7466

121. Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD, Zhu MX (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* 279:35741-35748
122. Huang AJ, Manning JE, Bandak TM, Rataou MC, Hanser KR, Silverstein SC (1993) Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J Cell Biol* 120:1371-1380
123. Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V (1992) Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J* 11:885-890
124. Hullin R, Khan IF, Wirtz S, Mohacsi P, Varadi G, Schwartz A, Herzig S (2003) Cardiac L-type calcium channel beta-subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics. *J Biol Chem* 278:21623-21630
125. Huynh KW, Cohen MR, Jiang J, Samanta A, Lodowski DT, Zhou ZH, Moiseenkova-Bell VY (2016) Structure of the full-length TRPV2 channel by cryo-EM. *Nat Commun* 7:11130
126. Iadarola MJ, Sapio MR, Raithel SJ, Mannes AJ, Brown DC (2018) Long-term pain relief in canine osteoarthritis by a single intra-articular injection of resiniferatoxin, a potent TRPV1 agonist. *Pain* 159:2105-2114
127. Ikeda M, Kohno M, Takeda T (1995) Inhibition by cardiac natriuretic peptides of rat vascular endothelial cell migration. *Hypertension* 26:401-405
128. Iwata Y, Ito S, Wakabayashi S, Kitakaze M (2020) TRPV2 channel as a possible drug target for the treatment of heart failure. *Lab Invest* 100:207-217
129. Jardin I, Diez-Bello R, Falcon D, Alvarado S, Regodon S, Salido GM, Smani T, Rosado JA (2021) Melatonin downregulates TRPC6, impairing store-operated calcium entry in triple-negative breast cancer cells. *J Biol Chem* 296:100254
130. Javerzat S, Franco M, Herbert J, Platonova N, Peille AL, Pantesco V, De Vos J, Assou S, Bicknell R, Bikfalvi A, Hagedorn M (2009) Correlating global gene regulation to angiogenesis in the developing chick extra-embryonic vascular system. *PLoS One* 4:e7856
131. Jay SD, Ellis SB, McCue AF, Williams ME, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP (1990) Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 248:490-492
132. Jeon D, Song I, Guido W, Kim K, Kim E, Oh U, Shin HS (2008) Ablation of Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit leads to enhanced N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long term potentiation and improved long term memory. *J Biol Chem* 283:12093-12101
133. Jha MK, Badou A, Meissner M, McRory JE, Freichel M, Flockerzi V, Flavell RA (2009) Defective survival of naive CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the absence of the beta3 regulatory subunit of voltage-gated calcium channels. *Nat Immunol* 10:1275-1282
134. Jiang H, Li H, Cao Y, Zhang R, Zhou L, Zhou Y, Zeng X, Wu J, Wu D, Wu D, Guo X, Li X, Wu H, Li P (2021) Effects of cannabinoid (CBD) on blood brain barrier permeability after brain injury in rats. *Brain Res* 1768:147586
135. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427:260-265
136. Kamp TJ, Perez-Garcia MT, Marban E (1996) Enhancement of ionic current and charge movement by coexpression of calcium channel beta 1A subunit with alpha 1C subunit in a human embryonic kidney cell line. *J Physiol* 492 ( Pt 1):89-96
137. Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H, Li L, Shibata H, Kojima I (1999) Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* 1:165-170

138. Katanosaka Y, Iwasaki K, Ujihara Y, Takatsu S, Nishitsuji K, Kanagawa M, Sudo A, Toda T, Katanosaka K, Mohri S, Naruse K (2014) TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. *Nat Commun* 5:3932
139. Katiyar R, Weissgerber P, Roth E, Dorr J, Sothilingam V, Garcia Garrido M, Beck SC, Seeliger MW, Beck A, Schmitz F, Flockerzi V (2015) Influence of the beta2-Subunit of L-Type Voltage-Gated Cav Channels on the Structural and Functional Development of Photoreceptor Ribbon Synapses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56:2312-2324
140. Kato AS, Zhou W, Milstein AD, Knierman MD, Siuda ER, Dotzlaf JE, Yu H, Hale JE, Nisenbaum ES, Nicoll RA, Brecht DS (2007) New transmembrane AMPA receptor regulatory protein isoform, gamma-7, differentially regulates AMPA receptors. *J Neurosci* 27:4969-4977
141. Katz B, Miledi R (1965) The Effect of Calcium on Acetylcholine Release from Motor Nerve Terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 161:496-503
142. Kharade SV, Sonkusare SK, Srivastava AK, Thakali KM, Fletcher TW, Rhee SW, Rusch NJ (2013) The beta3 subunit contributes to vascular calcium channel upregulation and hypertension in angiotensin II-infused C57BL/6 mice. *Hypertension* 61:137-142
143. Kim DI, Kang M, Kim S, Lee J, Park Y, Chang I, Suh BC (2015) Molecular Basis of the Membrane Interaction of the beta2e Subunit of Voltage-Gated Ca(2+) Channels. *Biophys J* 109:922-935
144. Kim YV, Di Cello F, Hillaire CS, Kim KS (2004) Differential Ca<sup>2+</sup> signaling by thrombin and protease-activated receptor-1-activating peptide in human brain microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C31-42
145. Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M, Hofmann F (1999) Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* 19:684-691
146. Kohn EC, Alessandro R, Spoonster J, Wersto RP, Liotta LA (1995) Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1307-1311
147. Koivisto AP, Belvisi MG, Gaudet R, Szallasi A (2022) Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nat Rev Drug Discov* 21:41-59
148. Kollewe A, Schwarz Y, Oleinikov K, Raza A, Haupt A, Wartenberg P, Wyatt A, Boehm U, Ectors F, Bildl W, Zolles G, Schulte U, Bruns D, Flockerzi V, Fakler B (2022) Subunit composition, molecular environment, and activation of native TRPC channels encoded by their interactomes. *Neuron* 110:4162-4175 e4167
149. Kurshan PT, Oztan A, Schwarz TL (2009) Presynaptic alpha2delta-3 is required for synaptic morphogenesis independent of its Ca<sup>2+</sup>-channel functions. *Nat Neurosci* 12:1415-1423
150. Kusudo T, Wang Z, Mizuno A, Suzuki M, Yamashita H (2012) TRPV4 deficiency increases skeletal muscle metabolic capacity and resistance against diet-induced obesity. *J Appl Physiol* (1985) 112:1223-1232
151. Lambert TL, Kent RS, Whorton AR (1986) Bradykinin stimulation of inositol polyphosphate production in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 261:15288-15293
152. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E (1992) A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 118:1511-1522
153. Lathia JD, Chigurupati S, Thundyil J, Selvaraj PK, Mughal MR, Woodruff TM, Chan SL, Karamyan VT, Mattson MP, Arumugam TV (2010) Pivotal role for beta-1 integrin in neurovascular remodelling after ischemic stroke. *Exp Neurol* 221:107-114
154. Launay P, Fleig A, Perraud AL, Scharenberg AM, Penner R, Kinet JP (2002) TRPM4 is a Ca<sup>2+</sup>-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109:397-407
155. Le Boeuf F, Houle F, Sussman M, Huot J (2006) Phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) on Ser732 is induced by rho-dependent kinase and is essential for proline-rich tyrosine kinase-2-

- mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to vascular endothelial growth factor. *Mol Biol Cell* 17:3508-3520
156. Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, Perez-Reyes E (1999) Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19:1912-1921
157. Lee KP, Yuan JP, So I, Worley PF, Muallem S (2010) STIM1-dependent and STIM1-independent function of transient receptor potential canonical (TRPC) channels tunes their store-operated mode. *J Biol Chem* 285:38666-38673
158. Lemos FO, Bultynck G, Parys JB (2021) A comprehensive overview of the complex world of the endo- and sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-leak channels. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1868:119020
159. Li M, Jiang J, Yue L (2006) Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol* 127:525-537
160. Li M, Shen X, Liu H, Yang B, Lu S, Tang M, Ling Y, Li Y, Kuang H (2020) Reduced neuropathy target esterase in pre-eclampsia suppresses tube formation of HUVECs via dysregulation of phospholipid metabolism. *J Cell Physiol*
161. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y (2013) Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504:107-112
162. Liao Y, Plummer NW, George MD, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L (2009) A role for Orai in TRPC-mediated Ca<sup>2+</sup> entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3202-3206
163. Lin BL, Matera D, Doerner JF, Zheng N, Del Camino D, Mishra S, Bian H, Zeveleva S, Zhen X, Blair NT, Chong JA, Hessler DP, Bedja D, Zhu G, Muller GK, Ranek MJ, Pantages L, McFarland M, Netherton MR, Berry A, Wong D, Rast G, Qian HS, Weldon SM, Kuo JJ, Sauer A, Sarko C, Moran MM, Kass DA, Pullen SS (2019) In vivo selective inhibition of TRPC6 by antagonist BI 749327 ameliorates fibrosis and dysfunction in cardiac and renal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:10156-10161
164. Link TM, Park U, Vonakis BM, Raben DM, Soloski MJ, Caterina MJ (2010) TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat Immunol* 11:232-239
165. Lintschinger B, Balzer-Geldsetzer M, Baskaran T, Graier WF, Romanin C, Zhu MX, Groschner K (2000) Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca<sup>2+</sup>-sensitive cation channels. *J Biol Chem* 275:27799-27805
166. Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr., Meyer T (2005) STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* 15:1235-1241
167. Liu X, Cheng KT, Bandyopadhyay BC, Pani B, Dietrich A, Paria BC, Swaim WD, Beech D, Yildirim E, Singh BB, Birnbaumer L, Ambudkar IS (2007) Attenuation of store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17542-17547
168. Lodola F, Laforenza U, Bonetti E, Lim D, Dragoni S, Bottino C, Ong HL, Guerra G, Ganini C, Massa M, Manzoni M, Ambudkar IS, Genazzani AA, Rosti V, Pedrazzoli P, Tanzi F, Moccia F, Porta C (2012) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry is remodelled and controls in vitro angiogenesis in endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients. *PLoS One* 7:e42541
169. Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40:551-561
170. Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F (1997) Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci* 17:1339-1349

171. Luo H, Rossi E, Saubamea B, Chasseigneaux S, Cochois V, Choublier N, Smirnova M, Glacial F, Perriere N, Bourdoulous S, Smadja DM, Menet MC, Couraud PO, Cisternino S, Declèves X (2019) Cannabidiol Increases Proliferation, Migration, Tubulogenesis, and Integrity of Human Brain Endothelial Cells through TRPV2 Activation. *Mol Pharm* 16:1312-1326
172. Luo H, Saubamea B, Chasseigneaux S, Cochois V, Smirnova M, Glacial F, Perriere N, Chaves C, Cisternino S, Declèves X (2020) Molecular and Functional Study of Transient Receptor Potential Vanilloid 1-4 at the Rat and Human Blood-Brain Barrier Reveals Interspecies Differences. *Front Cell Dev Biol* 8:578514
173. Ma X, Cheng KT, Wong CO, O'Neil RG, Birnbaumer L, Ambudkar IS, Yao X (2011) Heteromeric TRPV4-C1 channels contribute to store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in vascular endothelial cells. *Cell Calcium* 50:502-509
174. Madej MG, Ziegler CM (2018) Dawning of a new era in TRP channel structural biology by cryo-electron microscopy. *Pflugers Arch* 470:213-225
175. Malczyk M, Veith C, Fuchs B, Hofmann K, Storch U, Schermuly RT, Witzernath M, Ahlbrecht K, Fecher-Trost C, Flockerzi V, Ghofrani HA, Grimminger F, Seeger W, Gudermann T, Dietrich A, Weissmann N (2013) Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 188:1451-1459
176. Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Biochem* 122:498-505
177. Mayhan WG, Joyner WL (1984) The effect of altering the external calcium concentration and a calcium channel blocker, verapamil, on microvascular leaky sites and dextran clearance in the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 28:159-179
178. McMillin MA, Frampton GA, Seiwel AP, Patel NS, Jacobs AN, DeMorrow S (2015) TGFβ1 exacerbates blood-brain barrier permeability in a mouse model of hepatic encephalopathy via upregulation of MMP9 and downregulation of claudin-5. *Lab Invest* 95:903-913
179. Meoli DF, White RJ (2009) Thrombin induces fibronectin-specific migration of pulmonary microvascular endothelial cells: requirement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:L706-714
180. Michaelis UR (2014) Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol Life Sci* 71:4131-4148
181. Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S (1989) Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340:230-233
182. Miller M, Shi J, Zhu Y, Kustov M, Tian JB, Stevens A, Wu M, Xu J, Long S, Yang P, Zholos AV, Salovich JM, Weaver CD, Hopkins CR, Lindsley CW, McManus O, Li M, Zhu MX (2011) Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels. *J Biol Chem* 286:33436-33446
183. Miranda-Laferte E, Ewers D, Guzman RE, Jordan N, Schmidt S, Hidalgo P (2014) The N-terminal domain tethers the voltage-gated calcium channel β2e-subunit to the plasma membrane via electrostatic and hydrophobic interactions. *J Biol Chem* 289:10387-10398
184. Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine AV, Rusakov DA, Attwell D (2016) Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat Neurosci* 19:1619-1627
185. Monet M, Gkika D, Lehen'kyi V, Pournier A, Vanden Abeele F, Bidaux G, Juvin V, Rassendren F, Humez S, Prevarsakaya N (2009) Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochim Biophys Acta* 1793:528-539
186. Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313-1323

187. Mori Y, Friedrich T, Kim MS, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T, et al. (1991) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350:398-402
188. Muller CS, Haupt A, Bildl W, Schindler J, Knaus HG, Meissner M, Rammner B, Striessnig J, Flockerzi V, Fakler B, Schulte U (2010) Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14950-14957
189. Murakami M, Yamamura H, Murakami A, Okamura T, Nunoki K, Mitui-Saito M, Muraki K, Hano T, Imaizumi Y, Flockerzi T, Yanagisawa T (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. *J Cardiovasc Pharmacol* 36 Suppl 2:S69-73
190. Murakami M, Fleischmann B, De Felipe C, Freichel M, Trost C, Ludwig A, Wissenbach U, Schwegler H, Hofmann F, Hescheler J, Flockerzi V, Cavalie A (2002) Pain perception in mice lacking the beta3 subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 277:40342-40351
191. Murakami M, Yamamura H, Suzuki T, Kang MG, Ohya S, Murakami A, Miyoshi I, Sasano H, Muraki K, Hano T, Kasai N, Nakayama S, Campbell KP, Flockerzi V, Imaizumi Y, Yanagisawa T, Iijima T (2003) Modified cardiovascular L-type channels in mice lacking the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit. *J Biol Chem* 278:43261-43267
192. Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93:829-838
193. Nabissi M, Morelli MB, Amantini C, Farfariello V, Ricci-Vitiani L, Caprodossi S, Arcella A, Santoni M, Giangaspero F, De Maria R, Santoni G (2010) TRPV2 channel negatively controls glioma cell proliferation and resistance to Fas-induced apoptosis in ERK-dependent manner. *Carcinogenesis* 31:794-803
194. Nagasawa M, Nakagawa Y, Tanaka S, Kojima I (2007) Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages. *J Cell Physiol* 210:692-702
195. Naito M, Hayashi T, Kuzuya M, Funaki C, Asai K, Kuzuya F (1989) Vascular endothelial cell migration in vitro roles of cyclic nucleotides, calcium ion and cytoskeletal system. *Artery* 17:21-31
196. Namkung Y, Smith SM, Lee SB, Skrypnik NV, Kim HL, Chin H, Scheller RH, Tsien RW, Shin HS (1998) Targeted disruption of the Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit reduces N- and L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity and alters the voltage-dependent activation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12010-12015
197. Natarajan R, Northrop N, Yamamoto B (2017) Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Dextran Extravasation as a Measure of Blood-Brain Barrier Permeability. *Curr Protoc Neurosci* 79:9 58 51-59 58 15
198. Neef J, Gehrt A, Bulankina AV, Meyer AC, Riedel D, Gregg RG, Strenzke N, Moser T (2009) The Ca<sup>2+</sup> channel subunit beta2 regulates Ca<sup>2+</sup> channel abundance and function in inner hair cells and is required for hearing. *J Neurosci* 29:10730-10740
199. Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Wang Y, Flores CM, Qin N (2007) Activation properties of heterologously expressed mammalian TRPV2: evidence for species dependence. *J Biol Chem* 282:15894-15902
200. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, 2nd, Lyman S, Paddock C, Muller WA (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247:1219-1222
201. Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW (1985) A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316:443-446

202. Nishihara H, Perriot S, Gastfriend BD, Steinfurt M, Cibien C, Soldati S, Matsuo K, Guimbal S, Mathias A, Palecek SP, Shusta EV, Pasquier RD, Engelhardt B (2022) Intrinsic blood-brain barrier dysfunction contributes to multiple sclerosis pathogenesis. *Brain* 145:4334-4348
203. Ohta T, Ohba T, Suzuki T, Watanabe H, Sasano H, Murakami M (2010) Decreased calcium channel currents and facilitated epinephrine release in the Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit-null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 394:464-469
204. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:359-371
205. Omid Y, Campbell L, Barar J, Connell D, Akhtar S, Gumbleton M (2003) Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Res* 990:95-112
206. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526
207. Park U, Vastani N, Guan Y, Raja SN, Koltzenburg M, Caterina MJ (2011) TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J Neurosci* 31:11425-11436
208. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1992) Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 189:824-831
209. Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Bagstrom E, Lacerda AE, Wei XY, Birnbaumer L (1992) Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem* 267:1792-1797
210. Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391:896-900
211. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Kurzeder C, du Bois A, Sehouli J, Kimmig R, Stahle A, Collinson F, Essapen S, Gourley C, Lortholary A, Selle F, Mirza MR, Leminen A, Plante M, Stark D, Qian W, Parmar MK, Oza AM, Investigators I (2011) A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med* 365:2484-2496
212. Pickel S, Cruz-Garcia Y, Bandleon S, Barkovits K, Heindl C, Volker K, Abesser M, Pfeiffer K, Schaaf A, Marcus K, Eder-Negrin P, Kuhn M, Miranda-Laferte E (2021) The beta2-Subunit of Voltage-Gated Calcium Channels Regulates Cardiomyocyte Hypertrophy. *Front Cardiovasc Med* 8:704657
213. Pleines I, Hagedorn I, Gupta S, May F, Chakarova L, van Hengel J, Offermanns S, Krohne G, Kleinschnitz C, Brakebusch C, Nieswandt B (2012) Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Blood* 119:1054-1063
214. Powers PA, Liu S, Hogan K, Gregg RG (1992) Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J Biol Chem* 267:22967-22972
215. Pragnell M, Sakamoto J, Jay SD, Campbell KP (1991) Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel beta-subunit. *FEBS Lett* 291:253-258
216. Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP (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
217. Prawitt D, Monteilh-Zoller MK, Brixel L, Spangenberg C, Zabel B, Fleig A, Penner R (2003) TRPM5 is a transient Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15166-15171

218. Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R (2020) The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *J Exp Med* 217
219. Pumroy RA, Protopopova AD, Fricke TC, Lange IU, Haug FM, Nguyen PT, Gallo PN, Sousa BB, Bernardes GJL, Yarov-Yarovoy V, Leffler A, Moiseenkova-Bell VY (2022) Structural insights into TRPV2 activation by small molecules. *Nat Commun* 13:2334
220. Qin N, Platano D, Olcese R, Costantin JL, Stefani E, Birnbaumer L (1998) Unique regulatory properties of the type 2a Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit caused by palmitoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4690-4695
221. Qin N, Yagel S, Momplaisir ML, Codd EE, D'Andrea MR (2002) Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Mol Pharmacol* 62:485-496
222. Qu YY, Wang LM, Zhong H, Liu YM, Tang N, Zhu LP, He F, Hu QH (2017) TRPC1 stimulates calcium sensing receptor induced store operated Ca<sup>2+</sup> entry and nitric oxide production in endothelial cells. *Mol Med Rep* 16:4613-4619
223. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V, Leighl N, Mezger J, Archer V, Moore N, Manegold C (2009) Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. *J Clin Oncol* 27:1227-1234
224. Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34:207-217
225. Reichhart N, Keckeis S, Fried F, Fels G, Strauss O (2015) Regulation of surface expression of TRPV2 channels in the retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 253:865-874
226. Ruan GX, Kazlauskas A (2012) Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *EMBO J* 31:1692-1703
227. Ruck T, Bittner S, Epping L, Herrmann AM, Meuth SG (2014) Isolation of primary murine brain microvascular endothelial cells. *J Vis Exp*:e52204
228. Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F (1989) Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 245:1115-1118
229. Sahu U, Barth RF, Otani Y, McCormack R, Kaur B (2022) Rat and Mouse Brain Tumor Models for Experimental Neuro-Oncology Research. *J Neuropathol Exp Neurol* 81:312-329
230. Samanta A, Hughes TET, Moiseenkova-Bell VY (2018) Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem* 87:141-165
231. Sanchez-Diaz PC, Chang JC, Moses ES, Dao T, Chen Y, Hung JY (2017) Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL1) is associated with stem-like cancer cell functions in pediatric high-grade glioma. *PLoS One* 12:e0176879
232. Santoni G, Amantini C, Maggi F, Marinelli O, Santoni M, Nabissi M, Morelli MB (2020) The TRPV2 cation channels: from urothelial cancer invasiveness to glioblastoma multiforme interactome signature. *Lab Invest* 100:186-198
233. Sasase T, Fatchiyah F, Ohta T (2022) Transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels: Basal properties and physiological potential. *Gen Physiol Biophys* 41:165-190
234. Saternos HC, Almarghalani DA, Gibson HM, Meqdad MA, Antypas RB, Lingireddy A, AbouAlaiwi WA (2018) Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. *Physiol Genomics* 50:1-9
235. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682

236. Schindl R, Fritsch R, Jardin I, Frischauf I, Kahr H, Muik M, Riedl MC, Groschner K, Romanin C (2012) Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca<sup>2+</sup> influx. *J Biol Chem* 287:35612-35620
237. Schopf CL, Ablinger C, Geisler SM, Stanika RI, Campiglio M, Kaufmann WA, Nimmervoll B, Schlick B, Brockhaus J, Missler M, Shigemoto R, Obermair GJ (2021) Presynaptic alpha(2)delta subunits are key organizers of glutamatergic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118
238. Schredelseker J, Di Biase V, Obermair GJ, Felder ET, Flucher BE, Franzini-Armstrong C, Grabner M (2005) The beta 1a subunit is essential for the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17219-17224
239. Schwenk J, Harmel N, Brechet A, Zolles G, Berkefeld H, Muller CS, Bildl W, Baehrens D, Huber B, Kulik A, Klocker N, Schulte U, Fakler B (2012) High-resolution proteomics unravel architecture and molecular diversity of native AMPA receptor complexes. *Neuron* 74:621-633
240. Sehnal D, Bittrich S, Deshpande M, Svobodova R, Berka K, Bazgier V, Velankar S, Burley SK, Koca J, Rose AS (2021) Mol\* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Res* 49:W431-W437
241. Sel S, Rost BR, Yildirim AO, Sel B, Kalwa H, Fehrenbach H, Renz H, Gudermann T, Dietrich A (2008) Loss of classical transient receptor potential 6 channel reduces allergic airway response. *Clin Exp Allergy* 38:1548-1558
242. Selli C, Erac Y, Kosova B, Tosun M (2009) Post-transcriptional silencing of TRPC1 ion channel gene by RNA interference upregulates TRPC6 expression and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol* 51:96-100
243. Shastry S, Tyagi SC (2004) Homocysteine induces metalloproteinase and shedding of beta-1 integrin in microvessel endothelial cells. *J Cell Biochem* 93:207-213
244. Shen Y, Thillaiappan NB, Taylor CW (2021) The store-operated Ca(2+) entry complex comprises a small cluster of STIM1 associated with one Orai1 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118
245. Shistik E, Ivanina T, Puri T, Hosey M, Dascal N (1995) Ca<sup>2+</sup> current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J Physiol* 489 ( Pt 1):55-62
246. Snutch TP, Leonard JP, Gilbert MM, Lester HA, Davidson N (1990) Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3391-3395
247. Song IK, Kim HJ, Magesh V, Lee KJ (2018) Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 plays a key role in angiogenesis by regulating hydrogen peroxide generated by NADPH oxidase 4. *Biochem Biophys Res Commun* 495:1567-1572
248. Soong TW, Stea A, Hodson CD, Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP (1993) Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260:1133-1136
249. Soto D, Coombs ID, Renzi M, Zonouzi M, Farrant M, Cull-Candy SG (2009) Selective regulation of long-form calcium-permeable AMPA receptors by an atypical TARP, gamma-5. *Nat Neurosci* 12:277-285
250. Stanley CP, Hind WH, Tufarelli C, O'Sullivan SE (2015) Cannabidiol causes endothelium-dependent vasorelaxation of human mesenteric arteries via CB1 activation. *Cardiovasc Res* 107:568-578
251. Stanness KA, Guatteo E, Janigro D (1996) A dynamic model of the blood-brain barrier "in vitro". *Neurotoxicology* 17:481-496
252. Starr TV, Prystay W, Snutch TP (1991) Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5621-5625

253. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103:755-766
254. Storch U, Forst AL, Philipp M, Gudermann T, Mederos y Schnitzler M (2012) Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *J Biol Chem* 287:3530-3540
255. Storch U, Forst AL, Pardatscher F, Erdogmus S, Philipp M, Gregoritzka M, Mederos YSM, Gudermann T (2017) Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E37-E46
256. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I (1983) Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306:67-69
257. Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BH, Wutz K, Gutwillinger N, Ruther K, Drescher B, Sauer C, Zrenner E, Meitinger T, Rosenthal A, Meindl A (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 19:260-263
258. Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29:645-655
259. Sun W, Uchida K, Suzuki Y, Zhou Y, Kim M, Takayama Y, Takahashi N, Goto T, Wakabayashi S, Kawada T, Iwata Y, Tominaga M (2016) Lack of TRPV2 impairs thermogenesis in mouse brown adipose tissue. *EMBO Rep* 17:383-399
260. Tadmouri A, Kiyonaka S, Barbado M, Rousset M, Fablet K, Sawamura S, Bahembera E, Pernet-Gallay K, Arnoult C, Miki T, Sadoul K, Gory-Faure S, Lambrecht C, Lesage F, Akiyama S, Khochbin S, Baulande S, Janssens V, Andrieux A, Dolmetsch R, Ronjat M, Mori Y, De Waard M (2012) Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *EMBO J* 31:3730-3744
261. Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5478-5482
262. Takeda K, Schini V, Stoeckel H (1987) Voltage-activated potassium, but not calcium currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Arch* 410:385-393
263. Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-318
264. Taylor J, Pereyra A, Zhang T, Messi ML, Wang ZM, Herenu C, Kuan PF, Delbono O (2014) The Cavbeta1a subunit regulates gene expression and suppresses myogenin in muscle progenitor cells. *J Cell Biol* 205:829-846
265. Tedeschi V, Sisalli MJ, Pannaccione A, Piccialli I, Molinaro P, Annunziato L, Secondo A (2022) Na(+)/Ca(2+) exchanger isoform 1 (NCX1) and canonical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) are recruited by STIM1 to mediate Store-Operated Calcium Entry in primary cortical neurons. *Cell Calcium* 101:102525
266. Tervo T, Joo F, Palkama A, Salminen L (1979) Penetration barrier to sodium fluorescein and fluorescein-labelled dextrans of various molecular sizes in brain capillaries. *Experientia* 35:252-254
267. Thastrup O, Cullen PJ, Drøbak BK, Hanley MR, Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2466-2470
268. Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG (2007) Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* 150:613-623

269. Thomas G, Chung M, Cohen CJ (1985) A dihydropyridine (Bay k 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. A new type of positive inotropic agent. *Circ Res* 56:87-96
270. Tiruppathi C, Freichel M, Vogel SM, Paria BC, Mehta D, Flockerzi V, Malik AB (2002) Impairment of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ Res* 91:70-76
271. Tiruppathi C, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB (2006) Ca<sup>2+</sup> signaling, TRP channels, and endothelial permeability. *Microcirculation* 13:693-708
272. Tomita S, Chen L, Kawasaki Y, Petralia RS, Wenthold RJ, Nicoll RA, Brecht DS (2003) Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J Cell Biol* 161:805-816
273. Traore M, Gentil C, Benedetto C, Hogrel JY, De la Grange P, Cadot B, Benkhelifa-Ziyyat S, Julien L, Lemaitre M, Ferry A, Pietri-Rouxel F, Falcone S (2019) An embryonic CaVbeta1 isoform promotes muscle mass maintenance via GDF5 signaling in adult mouse. *Sci Transl Med* 11
274. Tse A, Tse FW, Almers W, Hille B (1993) Rhythmic exocytosis stimulated by GnRH-induced calcium oscillations in rat gonadotropes. *Science* 260:82-84
275. Tsien RY (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290:527-528
276. Tsien RY, Rink TJ, Poenie M (1985) Measurement of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* 6:145-157
277. Tsiokas L, Arnould T, Zhu C, Kim E, Walz G, Sukhatme VP (1999) Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3934-3939
278. Turker E, Garreis F, Khajavi N, Reinach PS, Joshi P, Brockmann T, Lucius A, Ljubojevic N, Turan E, Cooper D, Schick F, Reinholz R, Pleyer U, Kohrle J, Mergler S (2018) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Induced Downstream Responses to Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) and 3-Iodothyronamine (3-T(1)AM) in Human Corneal Keratocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:670
279. Vaca L, Sinkins WG, Hu Y, Kunze DL, Schilling WP (1994) Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am J Physiol* 267:C1501-1505
280. Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC, Minor DL, Jr. (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 429:671-675
281. Vangeel L, Voets T (2019) Transient Receptor Potential Channels and Calcium Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11
282. Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L (1999) Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2060-2064
283. Varadi G, Lory P, Schultz D, Varadi M, Schwartz A (1991) Acceleration of activation and inactivation by the beta subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature* 352:159-162
284. Vargas FF, Caviedes PF, Grant DS (1994) Electrophysiological characteristics of cultured human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 47:153-165
285. Vennekens R, Hoenderop JG, Prenen J, Stuijver M, Willems PH, Droogmans G, Nilius B, Bindels RJ (2000) Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel. *J Biol Chem* 275:3963-3969
286. Veszelka S, Toth A, Walter FR, Toth AE, Grof I, Meszaros M, Bocsik A, Hellinger E, Vastag M, Rakhely G, Deli MA (2018) Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model With Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. *Front Mol Neurosci* 11:166

287. Vinet R, Vargas FF (1999) L- and T-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> currents in adrenal medulla endothelial cells. *Am J Physiol* 276:H1313-1322
288. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-5248
289. Vogel SM, Gao X, Mehta D, Ye RD, John TA, Andrade-Gordon P, Tiruppathi C, Malik AB (2000) Abrogation of thrombin-induced increase in pulmonary microvascular permeability in PAR-1 knockout mice. *Physiol Genomics* 4:137-145
290. Waithe D, Ferron L, Page KM, Chaggar K, Dolphin AC (2011) Beta-subunits promote the expression of Ca(V)<sub>2.2</sub> channels by reducing their proteasomal degradation. *J Biol Chem* 286:9598-9611
291. Wakai T, Fissore RA (2019) Constitutive IP(3)R1-mediated Ca(2+) release reduces Ca(2+) store content and stimulates mitochondrial metabolism in mouse GV oocytes. *J Cell Sci* 132
292. Wakamori M, Mikala G, Mori Y (1999) Auxiliary subunits operate as a molecular switch in determining gating behaviour of the unitary N-type Ca<sup>2+</sup> channel current in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 517 ( Pt 3):659-672
293. Walsh KB, Wolf MB, Fan J (1998) Voltage-gated sodium channels in cardiac microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 274:H506-512
294. Wang R, Sauve R, de Champlain J (1995a) Altered calcium homeostasis in tail artery endothelial cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 8:1023-1030
295. Wang R, Sauve R, de Champlain J (1995b) Abnormal regulation of cytosolic free calcium in vascular endothelial cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 13:993-1001
296. Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B (2003) Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424:434-438
297. Watanabe T, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y (2013) Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biol Pharm Bull* 36:492-495
298. Wedel BJ, Vazquez G, McKay RR, St JBG, Putney JW, Jr. (2003) A calmodulin/inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/IP<sub>3</sub> receptor-independent process. *J Biol Chem* 278:25758-25765
299. Wei SK, Colecraft HM, DeMaria CD, Peterson BZ, Zhang R, Kohout TA, Rogers TB, Yue DT (2000) Ca(2+) channel modulation by recombinant auxiliary beta subunits expressed in young adult heart cells. *Circ Res* 86:175-184
300. Weissgerber P, Held B, Bloch W, Kaestner L, Chien KR, Fleischmann BK, Lipp P, Flockerzi V, Freichel M (2006) Reduced cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> current in Ca(V)<sub>β2</sub><sup>-/-</sup> embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circ Res* 99:749-757
301. Wen X, Peng Y, Gao M, Zhu Y, Zhu Y, Yu F, Zhou T, Shao J, Feng L, Ma X (2022) Endothelial Transient Receptor Potential Canonical Channel Regulates Angiogenesis and Promotes Recovery After Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc* 11:e023678
302. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9652-9656
303. Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM (1992) Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8:71-84

304. Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V (2001) Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem* 276:19461-19468
305. Woo MS, Ufer F, Sonner JK, Belkacemi A, Tintelnot J, Saez PJ, Krieg PF, Mayer C, Binkle-Ladisch L, Engler JB, Bauer S, Kursawe N, Vieira V, Mannebach S, Freichel M, Flockerzi V, Vargas P, Friese MA (2023) Calcium channel beta3 subunit regulates ATP-dependent migration of dendritic cells. *Sci Adv* 9:eadh1653
306. Wood PG, Gillespie JI (1998) Evidence for mitochondrial Ca(2+)-induced Ca2+ release in permeabilised endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246:543-548
307. Wu J, Yan Z, Li Z, Yan C, Lu S, Dong M, Yan N (2015) Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science* 350:aad2395
308. Wu J, Yan Z, Li Z, Qian X, Lu S, Dong M, Zhou Q, Yan N (2016) Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature* 537:191-196
309. Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* 62:381-404
310. Wulf E, Deboen A, Bautz FA, Faulstich H, Wieland T (1979) Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4498-4502
311. Xu N, Meng H, Liu T, Feng Y, Qi Y, Wang H (2018) TRPC1 Deficiency Exacerbates Cerebral Ischemia/Reperfusion-Induced Neurological Injury by Potentiating Nox4-Derived Reactive Oxygen Species Generation. *Cell Physiol Biochem* 51:1723-1738
312. Yasuda T, Chen L, Barr W, McRory JE, Lewis RJ, Adams DJ, Zamponi GW (2004) Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells. *Eur J Neurosci* 20:1-13
313. Yu PC, Gu SY, Bu JW, Du JL (2010) TRPC1 is essential for in vivo angiogenesis in zebrafish. *Circ Res* 106:1221-1232
314. Zeng W, Yuan JP, Kim MS, Choi YJ, Huang GN, Worley PF, Muallem S (2008) STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol Cell* 32:439-448
315. Zernov N, Veselovsky AV, Poroikov VV, Melentjeva D, Bolshakova A, Popugaeva E (2022) New Positive TRPC6 Modulator Penetrates Blood-Brain Barrier, Eliminates Synaptic Deficiency and Restores Memory Deficit in 5xFAD Mice. *Int J Mol Sci* 23
316. Zhang L, Tang S, Ma Y, Liu J, Monnier P, Li H, Zhang R, Yu G, Zhang M, Li Y, Feng J, Qin X (2022) RGMA Participates in the Blood-Brain Barrier Dysfunction Through BMP/BMPRII/YAP Signaling in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 13:861486
317. Zhang X, Hu M, Yang Y, Xu H (2018) Organellar TRP channels. *Nat Struct Mol Biol* 25:1009-1018
318. Zhang Y, Yamada Y, Fan M, Bangaru SD, Lin B, Yang J (2010) The beta subunit of voltage-gated Ca2+ channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *J Biol Chem* 285:2527-2536
319. Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, Vogel H, Steinberg GK, Edwards MS, Li G, Duncan JA, 3rd, Cheshier SH, Shuer LM, Chang EF, Grant GA, Gephart MG, Barres BA (2016) Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron* 89:37-53
320. Zhou JJ, Shao JY, Chen SR, Pan HL (2023) Brain alpha2delta-1-Bound NMDA Receptors Drive Calcineurin Inhibitor-Induced Hypertension. *Circ Res* 133:611-627
321. Zhu X, Chu PB, Peyton M, Birnbaumer L (1995) Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila trp* gene. *FEBS Lett* 373:193-198

322. Zimmermann J, Latta L, Beck A, Leidinger P, Fecher-Trost C, Schlenstedt G, Meese E, Wissenbach U, Flockerzi V (2014) Trans-activation response (TAR) RNA-binding protein 2 is a novel modulator of transient receptor potential canonical 4 (TRPC4) protein. *J Biol Chem* 289:9766-9780
323. Zubcevic L, Le S, Yang H, Lee SY (2018) Conformational plasticity in the selectivity filter of the TRPV2 ion channel. *Nat Struct Mol Biol* 25:405-415

## 7 Publikationen

### 7.1 Publizierte Abstracts

Kaiser N., Wardas B., Flockerzi V., Belkacemi A.: “*Role of Calcium channel subunits in endothelial cell function*”. Posterpräsentation am 5. German Pharm-Tox Summit 2020 in Leipzig (D).

Martus D., Kaiser N., Fecher-Trost C., Beck A., Flockerzi V., Belkacemi A.: “*Activation of TRPV2 by  $\Delta^9$ -THC increases the permeability of the blood-brain barrier*”. Posterpräsentation an der 4. European Calcium Channel Conference in Alpbach (AT).

Martus D, Kaiser N., Wardas B., Flockerzi V., Belkacemi A.: “*Endothelial Cav $\beta$ 3 modulates Ca<sup>2+</sup> signaling and controls blood brain barrier integrity*”. Posterpräsentation am SFB Symposium 2022 in Homburg/Saar (D).

### 7.2 Veröffentlichungen

Martus D., Williams S.K., Pichi K., Mannebach-Götz S., Kaiser N., Wardas B., Fecher-Trost C., Meyer M.R., Schmitz F., Beck A., Fairless R., Diem R., Flockerzi V., Belkacemi A.: „*Cav $\beta$ 3 Contributes to the Maintenance of the Blood-Brain Barrier and Alleviates Symptoms of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*”. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2024.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
AID	$\alpha_1$ -Interaktions-Domäne
AMPA-Rezeptor	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-Rezeptor
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Bidest. Wasser	Doppelt destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
$\text{CaCl}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	Calciumchlorid-Dihydrat
CaMK4	$\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase 4
$\text{Ca}_v$	Spannungsabhängige Calciumkanäle
$\text{Ca}_v\beta_3$	Beta-3-Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO-Zellen	Chinesischer Hamster Ovarialzellen
CNG-Ionenkanal	Zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
Fura-2AM	Fura-2-Acetoxymethyl-Ester
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GK	Guanylatkinase
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethansulfonsäure
HEK-Zellen	Menschliche Embryonale Nierenzellen
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HUVEC	Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen
HSV-1	Herpes simplex Virus 1
$\text{IP}_3$	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilodalton
KO	Gendefizient
MBMECs	Mikrovaskuläre Endothelzellen des Mausgehirns
MIDAS	Metallionenabhängige Adhäsionsstelle

min	Minuten
MgCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
Orai	Calciumfreisetzung-aktivierter Calcium-Modulator
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1
PET	Polyethylenterephthalat
p-FAK	Phosphorylierte Fokale Adhäsionskinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
RyR1	Ryanodin-Rezeptor 1
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SH3	Src Homologie 3
SOCE	Speicherabhängiger Calciumeinstrom
STIM	Stromales Interaktionsmolekül
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TG	Thapsigargin
THC	Tetrahydrocannabinol
TRITC-Dextran	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat-Dextran
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPML	Transient Receptor Potential Mucolipin
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
UHPLC	Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vWA	von-Willebrand-Faktor Typ A
WT	Wildtyp
ZO-1	Zonula-Occludens-1

## **9 Lebenslauf**

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