

Philipps



Universität
Marburg

Die Rolle von TRPC1 in CA1-Neuronen des murinen Hippocampus

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie (17)

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Frauke Kepura

aus Marburg/Lahn

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 01.02.2011
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. U. Homberg

Zweitgutachter: Prof. Dr. T.D. Plant

Tag der mündlichen Prüfung am 08.02.2011

Für Dorle

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	10
Zusammenfassung	14
Summary	16
1. Einleitung	18
1.1. Die PLC-induzierte Signalkaskade	18
1.2. Die TRP-Familie	20
1.3. Die TRPC-Subfamilie	21
1.3.1. Der strukturelle Aufbau der TRP-Kanalproteine mit besonderem Fokus auf die TRPC-Subfamilie	22
1.3.2. Biophysikalische Eigenschaften von TRPC-Kanälen im Expressionssystem	23
1.4. Physiologische Funktionen und Eigenschaften von TRPC-Kanälen in nativen nicht-neuronalen Zellen	29
1.5. Neuronale nichtselektive Kationenströme und die mögliche Rolle von TRPC-Kanälen im zentralen Nervensystem	30
1.5.1. Ca^{2+} -abhängige, nichtselektive Kationenströme in Neuronen	30
1.5.2. Beschriebene physiologische Funktionen von I_{CAN} in Neuronen unter Beteiligung von TRPC-Kanälen	33
1.5.3. Mögliche physiologische Funktionen von I_{CAN} im Hippocampus	35
1.6. Zielsetzung der Arbeit	37
2. Material und Methoden	38
2.1. Lösungen, Chemikalien und Primer	38
2.2. Zellkultur von HEK293-Zellen	38
2.2.1. Transiente Transfektion von Plasmid-DNA	39
2.2.2. Vorbereitung der Zellen für Experimente	39
2.3. Versuchstiere	40
2.3.1. Präparation des Nagergehirns	40

2.3.2.	Herstellung von Gehirnschnitten	42
2.4.	Elektrophysiologie	42
2.4.1.	Die Patch-Clamp-Technik	42
2.4.1.1.	Messkonfigurationen	43
2.4.2.	Der elektrophysiologische Messplatz	44
2.4.2.1.	Mechanische Komponenten und Lösungsperfusion	44
2.4.2.2.	Das bildgebende Verfahren	44
2.4.2.3.	Pipetten und Elektroden	45
2.4.2.4.	Elektrische Komponenten	45
2.4.3.	Durchführung einer Messung	50
2.4.3.1.	Einwaschen von Pharmaka	52
2.4.3.2.	Verwendete Messprotokolle	53
2.4.3.3.	Auswertung der Daten	56
2.4.4.	Einfluss von Antagonisten schneller synaptischer Übertragung auf TRPC-vermittelte Einwärtsströme	59
2.5.	Molekularbiologie	61
2.5.1.	Isolation von Nukleinsäuren aus Gewebe	61
2.5.1.1.	RNA-Isolation aus hippocampalem Gewebe	61
2.5.1.2.	DNA-Isolation aus der Schwanzspitze bzw. einer Ohrstanze	62
2.5.2.	Polymerase-Kettenreaktion	62
2.5.2.1.	Reverse Transkription (RT-PCR)	63
2.5.2.2.	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	64
2.5.2.3.	Genotypisierung	66
2.5.3.	Agarosegelelektrophorese	66
2.6.	Histochemie	67
2.6.1.	Zellfärbung nach Golgi	67
2.6.2.	Bildanalyse	67
2.7.	Statistische Auswertung	69
3.	Ergebnisse	70
3.1.	Hippocampale TRPC-Expression	70
3.2.	Die Morphologie CA1 hippocampaler Neurone	71
3.3.	Induktion eines Einwärtsstroms durch Stimulation G _q -koppelter Rezeptoren	73
3.3.1.	Charakteristika des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms im Wildtyp	76
3.3.1.1.	Blockade von Na _v -Kanälen	76
3.3.1.2.	Extrazelluläre Kationen	77

3.3.1.3. Spannungsabhängigkeit	80
3.3.2. Zunahme des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms in der TRPC1 ^{-/-} -Maus	81
3.3.2.1. Extrazelluläre Kationen	83
3.3.2.2. Spannungsabhängigkeit	84
3.3.3. Intrazelluläre Modulationen des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms in der TRPC1 ^{-/-} -Maus	86
3.4. Physiologische Konsequenzen des gesteigerten Einwärtsstroms in der TRPC1 ^{-/-} - Maus	90
3.5. Die Rolle von TRPC1 während der postnatalen Entwicklung	96
3.5.1. Der DHPG-sensitive Einwärtsstrom während der postnatalen Entwicklung	97
3.5.2. Hippocampale TRPC-Expression während der postnatalen Entwicklung	98
4. Diskussion	101
4.1. Biophysikalischer und pharmakologischer Vergleich des DHPG-sensitiven Ein- wärtstroms in CA1-Neuronen mit überexprimierten TRPC1- und TRPC4/5- Kanälen	102
4.1.1. Die Spannungsabhängigkeit des DHPG-sensitiven Stroms	105
4.2. Mögliche physiologischen Auswirkungen des gesteigerten Einwärtsstrom in der TRPC1 ^{-/-} -Maus	108
4.3. Eine mögliche neuroprotektive Rolle von TRPC1	110
4.4. Eine mögliche Rolle von TRPC1 während der postnatalen Entwicklung	111
Literaturverzeichnis	114
Lebenslauf	133
Eidesstattliche Erklärung	135
Danksagung	136
A. Anhang	138
A.1. Ergänzungen der Ergebnisse	138
A.1.1. Tabellarische Zusammenfassung der La ³⁺ -Effekte	138
A.1.2. Tabellarische Zusammenfassung der hippocampalen TRPC-Expression	139
A.2. Lösungen	140
A.2.1. Lösungen für elektrophysiologische Experimente	140
A.2.1.1. Extrazelluläre Lösungen	140
A.2.1.2. Intrazelluläre Lösungen	141

A.2.2. Lösungen für molekularbiologische Experimente	142
A.2.3. Lösungen für die Histochemie	142
A.3. Chemikalien	143
A.4. Primer	144
A.4.1. Primerpaare für quantitative real-time PCR	144
A.4.2. Primerpaare zur Genotypisierung der Mäuse	144

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Die PLC-induzierte Signalkaskade	19
1.2.	Die Phylogenie und Struktur der TRPC-Subfamilie	23
1.3.	Tetramerbildung und biophysikalische Eigenschaften homo- und heteromultimerer TRPC-Kanäle	25
1.4.	TRPC-Expression im murinen Hippocampus	27
1.5.	Zusammenfassung der TRPC-Knockout-Phänotypen und physiologische Funktionen von TRPC1	31
1.6.	Neuronale nichtselektive Kationenströme und die Rolle der TRPC-Subfamilie	34
2.1.	Gehirnpräparation und Herstellung horizontaler Hippocampusschnitte	41
2.2.	Messkonfigurationen im Patch-Clamp und das Prinzip des Verstärkers	46
2.3.	Vom Giga-Seal zur Whole-Cell-Konfiguration	51
2.4.	Messprotokolle im Voltage- und Current-Clamp	54
2.5.	Auswertung von Voltage-Clamp-Daten	57
2.6.	Auswertung von Current-Clamp-Daten	58
2.7.	TRPC-vermittelte Einwärtsströme im heterologen System	60
2.8.	Wahl des TRPC1-Primers	65
2.9.	Aufbau hippocampaler Pyramidenzellen und Klassifizierung des Apikaldendriten	68
3.1.	Hippocampale TRPC-Expression	71
3.2.	Veränderte Morphologie von CA1-Neuronen in der TRPC1 ^{-/-} -Maus	72
3.3.	Stimulation G _q -koppelter Rezeptoren induziert einen Einwärtsstrom in CA1-Neuronen	74
3.4.	Effekt der Blockade von Na _v -Kanälen	77
3.5.	Vermittlung des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms durch extrazelluläre Kationen	79
3.6.	Spannungsabhängigkeit des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms	81
3.7.	Zunahme des DHPG-sensitiven Stroms in der TRPC1 ^{-/-} -Maus	82
3.8.	Vermittlung des DHPG-sensitiven Stroms durch extrazelluläre Kationen auch in der TRPC1 ^{-/-} -Maus	84

3.9. Spannungsabhängigkeit des DHPG-sensitiven Stroms: WT <i>versus</i> TRPC1 ^{-/-} -Maus	85
3.10. Intrazelluläre Modulation des DHPG-sensitiven Stroms in der TRPC1 ^{-/-} -Maus	88
3.11. Reduktion des DHPG-sensitiven Stroms durch La ³⁺ in der TRPC1 ^{-/-} -Maus	90
3.12. Veränderte Zellantwort bei Stimulation G _q -koppelnder Rezeptoren im CC: WT <i>versus</i> TRPC1 ^{-/-} -Maus	92
3.13. Zusätzliches kurzanhaltendes Plateaupotential in der TRPC1 ^{-/-} -Maus im CC	94
3.14. Der DHPG-sensitive Strom während der postnatalen Entwicklung	97
3.15. Hippocampale TRPC-Expression während der postnatalen Entwicklung	99
4.1. Die Eigenschaften des I _{CAN} in CA1-Neuronen	105
4.2. Die negativ-regulatorische Funktion von TRPC1 in CA1-Neuronen der Maus	112

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin	18
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor	18
sADP	slow afterdepolarization, langsame Nachdepolarisation	32
AHP	afterhyperpolarization, Nachhyperpolarisation	31
AlF _x	Aluminiumfluorid, AlF ₃ /AlF ₄ ⁻ ; Aktivierung von G-Proteinen	87
AMPA-R	ionotroper Glutamatrezeptor, spezifischer Agonist = AMPA	20
AP-5	D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid; NMDA-R-Antagonist	52
AP	Aktionspotential	35
BDNF	brain-derived neurotrophic factor; Neurotrophin	34
BIM X	Bisindolylmalimide X hydrochloride, PKC-Inhibitor	89
bp	Basenpaare	66
C	capacity, Kapazität	46
C _{fast}	schnelle Kompensation des EPC10-Verstärkers	49
C _m	Kapazität der Zellmembran	46
C _{slow}	langsame Kompensation des EPC10-Verstärkers	49
CA1	Ammonshorn, <i>Cornu ammonis</i> 1-Region des Hippocampus	30
Ca ²⁺	Calcium; Calciumionen	18
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration	20
Ca _v -Kanäle	spannungsgesteuerte (voltage-dependent) Ca ²⁺ -Kanäle	22
CA	Cell-Attached-Modus	43
CaM	Calmodulin	22
CC	Current-Clamp, Stromklemme	47
CCh	Carbachol; ACh-Struktur analogon, Agonist für AChR	53
CIRB	Calmodulin/IP ₃ -Rezeptor bindende Domäne	22
Cl ⁻	Chloridionen	18
CsCl	Cäsiumchlorid	50
CT-Wert	threshold cycle, Schwellenwert-Zyklus während der qRT-PCR	64
ΔΔCT-Wert	Expressionrate des Gens X in % der β-Aktinexpression	65
DAG	Diacylglycerol	19
Δt	Dauer des Einstroms oder der induzierten Depolarisation, z. B. des PP	56
DEPC	Diethylpyrocarbonat	62
DHPG	(RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycin; spezifischer Agonist für mGluRI	53
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure	39
cdNA	copy DNA; einzelsträngige DNA durch Umschreiben von RNA in DNA	63

pcDNA3	DNA-Vektor	39
DNQX	6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt; AMPA/Kainat-R-Blocker	53
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	39
EGTA	Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	32
EMEM	minimal essential medium (MEM) with Earl's salts	39
EPC10	Patch-Clamp-Verstärker von HEKA	45
sEPSP	slow excitatory postsynaptic potential; langsame erregende postsynaptische Potentiale	32
ER	endoplasmatisches Retikulum	19
EtOH	Ethanol	62
GABA _A -R	GABA _A -Rezeptor, spezifischer Agonist: γ -Aminobuttersäure (GABA)	52
mGluRI	metabotrope Glutamatrezeptoren vom Typ I, Subtypen: mGluR1, mGluR5	18
GPCR	G-protein coupled receptor, G-Protein (speziell G _q)-koppelnde Rezeptoren	18
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser	38
HEK293-Zellen	human embryonic kidney cells, menschliche embryonale Nierenzellen	26
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure, Puffersubstanz	50
I	Strom	53
I _{ADP}	Strom, der ADP vermittelt	31
I _{AHP}	Strom, der AHP vermittelt	31
I _{CAN}	Ca ²⁺ -abhängiger, nichtselektiver (TRP-ähnlicher) Kationenstrom	30
I _{-60mV}	induzierter Strom bei -60 mV	56
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat	19
IP ₃ -R	IP ₃ -Rezeptor	19
IV-Beziehung	Strom-Spannungsbeziehung	26
KCl	Kaliumchlorid	50
K ⁺	Kaliumionen	18
K _v -Kanäle	spannungsgesteuerte (voltage-dependent) K ⁺ -Kanäle	22
La ³⁺	Lanthan; unspezifischer Antagonist Ca ²⁺ -permeabler Kationenkanäle	26
LJP	liquid junction potential; Offset-Potential	48
LTD	long-term depression, Langzeitdepression	36
LTP	long-term potentiation, Langzeitpotenzierung	36
rM5R	muskarinischer M ₅ -Rezeptor aus der Ratte, im pcDNA3-Vektor	39
Mg ²⁺	Magnesiumionen	26
Na ⁺	Natriumionen	18
Na _v -Kanäle	spannungsgesteuerte (voltage-dependent) Na ⁺ -Kanäle	22
NMDA-R	ionotroper Glutamatrezeptor, N-Methyl-D-Aspartat = NMDA	28
NMDG ⁺	N-Methyl-D-Glucamin	77
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate, Nukleotide	63

OB	olfaktorischer Bulbus	27
OPA	operational amplifier, Operationverstärker	46
PASMC	pulmonary artery smooth muscle cells	30
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Phosphat-gepufferte Saline	39
PCR	polymerase-chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion	62
qRT-PCR	quantitative real-time PCR	64
Picrotoxin	GABA _A -Rezeptor-Antagonist	52
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat	19
PKC	Proteinkinase C	19
PLC	Phospholipase C	18
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetat; Aktivierung PKC	89
P10 - P12	10 - 12 Tage postnatal (nach der Geburt), frühe postnatale Entwicklung	40
P14 - P26	14 - 26 Tage postnatal, späte postnatale Entwicklung	40
P33 - P35	33 - 35 Tage postnatal, präpubertäre Entwicklung	40
P-Wert	Signifikanzwert, statistische Kennzahl	69
PP	Plateaupotential	35
lPP	long-duration plateau potential, langanhaltendes Plateaupotential	94
sPP	short-duration plateau potential, kurzanhaltendes Plateaupotential	96
R	resistance, Widerstand	46
R _f	Rückkopplungswiderstand	46
R _m	Membranwiderstand	45
R _s	Zugangs-/Serienwiderstand	49
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure	42
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA	63
ROCE	rezeptorinduzierter (receptor-operated) Ca ²⁺ -Einstrom	20
RTK	Rezeptortyrosinkinase	18
RT	Raumtemperatur	39
SEM	Standard Error of the Mean, Standardabweichung des Mittelwertes	69
SERCA	Sarko-/Endoplasmatische Retikulum-Pumpen	20
SMC	vascular smooth muscle cells, glatte Gefäßmuskelzellen	24
SN	<i>Substantia nigra</i>	30
SOCE	speicherinduzierter (store-operated) Ca ²⁺ -Einstrom	20
STIM 1	stromal interaction molecule 1	24
TEA-Cl	Tetraäthylammonium-Chlorid, Blocker für K ⁺ -Kanäle	79
TM	Transmembrandomäne	22
TRP	transient receptor potential; abgeleitet von <i>Drosophila</i> -Mutante	20
TRPC	Subfamilie der classical oder canonical TRP-Kanäle; 7 Mitglieder	21
TRPC1	erster in Vertebraten klonierter TRP-Kanal	24
TRPC1 ^{+/+}	Wildtyp (WT)- oder TRPC1 ^{+/+} -Maus	37
TRPC1 ^{-/-}	homozygote Knockout- oder TRPC1 ^{-/-} -Maus	29
mTRPC5-YFP	TRPC5-Wildtyp-DNA aus der Maus, YFP-gekoppelt; im pcDNA3-Vektor	39
hTRPC6	humane TRPC6-Wildtyp-DNA; im pcDNA3-Vektor	39

TTX	Tetrodotoxin, Na _v -Kanal-Antagonist	55
V	voltage, Spannung, Potential	53
V _{Depolarisation}	induzierte Depolarisation durch Strominjektion im CC	58
V _h	holding potential, Haltepotential; standardmäßig -60 mV	46
V _m	Ruhemembranpotential	56
V _{Plateau}	Membranspannung eines Plateaupotentials bei Strominjektion im CC	58
V _{rev}	reversal potential, Umkehrpotential; Potential, bei dem kein Strom fließt	26
VC	Voltage-Clamp, Spannungsklemme	46
VNO	Vomeronasalorgan	21
VOCE	spannungsinduzierter (voltage-operated) Ca ²⁺ -Einstrom	20
WC	Whole-Cell-, Ganzzellkonfiguration	43
WT	Wildtyp, unveränderte DNA	37
YFP	yellow fluorescent protein; im pcDNA3-Vektor; Marker für Transfektion	39
ZNS	zentrales Nervensystem	26

Zusammenfassung

Die klassischen (classical oder canonical) „transient receptor potential“-Kanäle (TRPC1 - TRPC7) bilden eine Familie von nichtselektiven Kationenkanälen, die Phospholipase C-abhängig aktiviert werden und in verschiedensten Geweben exprimiert werden, z. B. dem Gehirn (Cortex, Hippocampus, etc.; z. B. Chung *et al.*, 2006). Funktionelle Kanäle bestehen aus vier Untereinheiten und die Bildung von homo- bzw. heteromultimeren Kanälen führt zu unterschiedlichen Regulations- und Permeationseigenschaften. Im heterologen System, heteromultimerisiert TRPC1 mit und modifiziert dadurch die Eigenschaften von TRPC4 und TRPC5 (Strübing *et al.*, 2001). In CA1 hippocampalen Neuronen werden TRPC1, TRPC4 und TRPC5 koexprimiert und in diesen Neuronen induziert die Aktivierung von G_q -koppelnden Rezeptoren einen Ca^{2+} -abhängigen nichtselektiven Kationenstrom (I_{CAN} ; Congar *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass TRPC-Kanäle an der Vermittlung des I_{CAN} beteiligt sind, der Nachweis hierfür fehlt jedoch bis heute. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb, zum einen die Charakteristika des Stroms zu beschreiben, der durch die Stimulation von metabotropen Glutamatrezeptoren vom Typ I (mGluRI) mittels (RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycin (DHPG) in CA1-Neuronen des murinen Hippocampus aktiviert wird. Zum anderen sollte die Rolle von TRPC1 bei der Vermittlung dieses Stromes analysiert werden, indem die hervorgerufenen Antworten zwischen Wildtyp- (TRPC^{+/+}) und homozygoter TRPC1-Knockoutmaus (TRPC1^{-/-}) verglichen werden.

TRPC1^{-/-}-Mäuse weisen keinen offensichtlichen Phänotyp auf (Dietrich *et al.*, 2007) und die grobe Morphologie der hippocampalen Formation ist weitgehend unverändert. Auf mikroskopischer Ebene zeigten CA1-Neurone der TRPC1^{-/-}-Maus, die mittels Golgi-Färbung markiert wurden, eine kleine jedoch signifikante Zunahme der Anzahl an Primärdendriten. Bei der Durchführung von Whole-Cell Voltage-Clamp Experimenten führte die Stimulation von mGluRI zur Generierung eines Stromes sowohl im WT als auch in der TRPC1^{-/-}-Maus. Die Strom-Spannungsbeziehung des DHPG-sensitiven Stroms war S-förmig mit einem Minimum bei etwa -50 mV, einem Maximum bei circa +40 mV und einem Umkehrpotential um -10 mV. Der einwärtsgerichtete Strom wurde durch extrazelluläre Kationen wie Na^+ und Ca^{2+} getragen und durch die intrazelluläre Ca^{2+} - und extrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration moduliert. Eine Besonderheit des I_{CAN} war seine Spannungsabhängigkeit, da er ohne eine vorherige

Depolarisation der Membran nicht induziert werden konnte und somit als Integrator von Rezeptoraktivierung und Membrandepolarisation fungierte (Koinzidenz). Der Hauptunterschied zwischen WT- und TRPC1^{-/-}-Maus war die signifikante Zunahme des Einwärtsstroms in Neuronen der TRPC1^{-/-}-Maus. Des Weiteren ergaben die durchgeführten Versuche, dass es erst zwei Wochen postnatal zu der beobachteten Zunahme des Stroms in der Knockoutmaus kam. Der Stromzuwachs resultierte nicht aus einer kompensatorischen Veränderung der Expression anderer TRPC-Isoformen in Neuronen der TRPC1^{-/-}-Maus. Die Analyse der Expressionslevel einzelner TRPC-Isoformen mithilfe der Isolation von mRNA aus hippocampalem Gewebe und quantitativer real-time PCR zeigte, dass das Vorkommen der Isoformen - mit Ausnahme von TRPC1 - vergleichbar war zwischen WT- und TRPC1^{-/-}-Maus. Um die physiologische Konsequenz des gesteigerten DHPG-sensitiven Einwärtsstroms in der TRPC1^{-/-}-Maus zu untersuchen, wurden Whole-Cell Current-Clamp Experimente durchgeführt. CA1-Neurone im WT und in der TRPC1^{-/-}-Maus wiesen ein vergleichbares Ruhemembranpotential auf. Die Stimulation von mGluRI im WT rief hauptsächlich eine schwache Zelldepolarisation und die Ausbildung bzw. Steigerung von Spikeaktivität hervor. Im Gegensatz dazu zeigten Neurone in der TRPC1^{-/-}-Maus induziert durch die Stimulation mit DHPG eine stärker ausgeprägte Depolarisation und eine größere Anzahl der Zellen, die sogenannte epileptische Aktivität mit der Ausbildung von Plateaupotentialen aufwiesen. Eine schwache Strominjektion in der Anwesenheit des mGluRI-Agonisten erzeugte in Neuronen der TRPC1^{+/+}-Maus entweder eine langsame Nachdepolarisation oder eine starke Depolarisation, die mit der Ausbildung von Plateaupotentialen mit einer Dauer von bis zu 55 s nach Beendigung der Strominjektion einherging. Zusätzlich zu diesen Antworten zeigten Neurone in der TRPC1^{-/-}-Maus häufiger Plateaupotentiale vergleichbar zum WT, jedoch signifikant kürzer in ihrer Dauer.

Die dargestellten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass TRPC1 eine negativ-regulatorische Funktion in CA1 hippocampalen Neuronen übernimmt. Hierbei reduziert TRPC1, vermutlich durch die Bildung von heteromultimeren Kanälen mit TRPC4 und TRPC5, den nichtselektiven Kationeneinstrom, der durch die Stimulation von mGluRI aktiviert wird. Die Deletion von TRPC1 führt zu einer gesteigerten Anzahl der Neurone, die in Antwort auf eine Membrandepolarisation bei gleichzeitiger Aktivierung von mGluRI mit der Entwicklung von Plateaupotentialen reagieren. Da Plateaupotentiale in die Ausbildung epileptischer Aktivität involviert sind, scheint die physiologische Rolle von TRPC1 eine Modulation der Zellerregbarkeit in CA1 hippocampalen Neuronen zu sein.

Summary

The classical or canonical „transient receptor potential“ channels (TRPC1 - TRPC7) are a family of nonselective cation channels, that are activated in a phospholipase C-dependent manner and are expressed in many tissues, e.g. the brain (cortex, hippocampus, etc.; e.g. Chung *et al.*, 2006). TRPC channels are thought to be tetrameric, and the assembly of different TRPC subunits into homo- and heteromultimers creates channels with different regulatory and physiological properties. In heterologous expression systems, TRPC1 heteromultimerizes with and modifies the properties of TRPC4 and TRPC5 (Strübing *et al.*, 2001). In CA1 hippocampal neurons TRPC1, TRPC4 and TRPC5 are coexpressed and in these neurons, the activation of G_q-coupled receptors induces a Ca²⁺-activated nonselective cation current (I_{CAN}; Congar *et al.*, 1997). TRPC channels have been suggested to be involved in the generation of this current, but there is little hard evidence to support this. Therefore, the aim of this thesis was to characterize the properties of the cation current activated by stimulation of metabotropic glutamate receptors of type I (mGluRI) by (RS)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) in CA1 neurons of the murine hippocampus and to study the role of TRPC1 in the generation of this current by comparing the responses from wild type (TRPC1^{+/+}) and homozygous TRPC1 knockout mice (TRPC1^{-/-}).

TRPC1^{-/-} mice show no obvious phenotype (Dietrich *et al.*, 2007), and the morphology of the hippocampus is largely unchanged. At the microscopical level, Golgi-stained CA1 neurons showed a small but significant increase in the number of primary branches. In whole-cell voltage-clamp recordings, the stimulation of mGluRI led to the development of a current in WT as well as in TRPC1^{-/-} mice. The current-voltage relationship of the DHPG-sensitive current was S-shaped with a minimum at around -50 mV, a maximum at +40 mV and a reversal potential near -10 mV. The inward current was carried by extracellular cations like Na⁺ and Ca²⁺ and was modulated by the intracellular Ca²⁺ as well as the extracellular Mg²⁺ concentration. Interestingly, the I_{CAN} in CA1 neurons was voltage-dependent. Therefore, the nonselective cation channel required activation of mGluRI and membrane depolarization to be activated, acting as a coincidence detector. The major difference between TRPC1^{+/+} and TRPC1^{-/-} neurons was a significant increase of the inward current in TRPC1^{-/-} mice. Another finding was that the increase of the inward current in TRPC1^{-/-} mice was detectable two

weeks after birth. The larger current in TRPC1^{-/-} mice is unlikely to result from a change in the expression patterns of TRPC isoforms. Expression levels of TRPC mRNAs in the whole hippocampus measured using quantitative real-time PCR were, with the exception of TRPC1, similar in WT and TRPC1^{-/-} mice. To investigate the physiological consequences of the increased DHPG-sensitive inward current in TRPC1^{-/-} mice, whole-cell current-clamp recordings were performed. CA1 neurons from WT and TRPC1^{-/-} mice showed a comparable resting membrane potential. In most experiments, the stimulation of mGluRI in WT induced membrane depolarization leading to the generation of, or an increase in spike activity. In contrast, in TRPC1^{-/-} mice, stimulation by DHPG led to stronger membrane depolarizations and to an increased tendency of these neurons to show so-called epileptiform activity associated with the generation of plateau potentials. In response to small current injections in the presence of the mGluRI agonist, TRPC1^{+/+} neurons showed a weak slow afterdepolarization or a stronger depolarization to a plateau potential which persisted up to 55 s following the current injection. In addition to these patterns, neurons in TRPC1^{-/-} mice mainly showed plateau potentials similar to that in TRPC1^{+/+} mice, but with a significantly shorter duration.

In conclusion, this study showed that TRPC1 has a negative regulatory role in CA1 hippocampal neurons where it reduces the inward nonselective cation current generated in response to mGluRI stimulation. This probably occurs as an effect of the formation of heteromultimeric channels with TRPC4 and TRPC5. Deletion of TRPC1 results in an increase of the number of neurons developing a plateau potential in response to simultaneous membrane depolarization and mGluRI activation. Since plateau potentials may be involved in the generation of epileptiform activity, the physiological role of TRPC1 may be the modulation of cell excitability in CA1 hippocampal neurons.

1. Einleitung

Die Membran einer Zelle setzt sich aus Lipiden und Proteinen zusammen, wobei eine Phospholipiddoppelschicht die Grundstruktur bildet und als passive Trennschicht zwischen Extra- und Intrazellularraum dient. Für Wasser und darin gelöste Ionen, wie Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Calcium (Ca^{2+}) und Chlorid (Cl^-), die auf der extra- und intrazellulären Seite der Zelle in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen, ist die Lipiddoppelschicht nahezu undurchlässig (impermeabel). Durch die unterschiedliche Verteilung der Ionen kommt es zu einem elektrochemischen Gradienten über der Membran (Konzentrations- bzw. elektrischer Gradient). Verschiedene Arten von Membranproteinen sind in die Lipiddoppelschicht eingelagert und übernehmen diverse Funktionen.

Die Stimulation von eingelagerten Rezeptoren durch ihre spezifischen Liganden (Hormone oder Neurotransmitter) führt zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. In deren Verlauf kommt es zum einen zur Bildung sogenannter sekundärer Botenstoffe und zum anderen zur Öffnung von porenbildenden Transmembranproteinen, sogenannten Ionenkanälen. Über diese Ereignisse kann die elektrische Erregbarkeit von Neuronen moduliert werden. Die Ausstattung an Membranproteinen bedingt somit die biochemischen und -physikalischen Eigenschaften einer Zelle. Die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden nach der Übertragung von extrazellulären Signalen auf die Zelle dient der intrazellulären Verstärkung und gleichzeitigen Integration eingehender Signale.

1.1. Die PLC-induzierte Signalkaskade

Im Folgenden soll die Signalkaskade, die durch Stimulation von Phospholipase C (PLC)-koppelnden Rezeptoren aktiviert wird und in Abbildung 1.1 dargestellt ist, genauer vorgestellt werden. PLC-koppelnde Rezeptoren sind zum Beispiel Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und G_q -Protein-koppelnde Rezeptoren (G-protein coupled receptor, GPCR), wie metabotrope Glutamatrezeptoren vom Typ I mit den Subtypen mGluR1 und mGluR5 (mGluRI) oder muskarinische Acetylcholinrezeptoren vom Typ M1, M3 und M5 (mAChR).

Die Bindung von spezifischen Neurotransmittern, wie Glutamat und Acetylcholin (ACh), bzw. von Wachstumsfaktoren, Cytokinen oder Hormonen führt zu einer Aktivierung von iso-

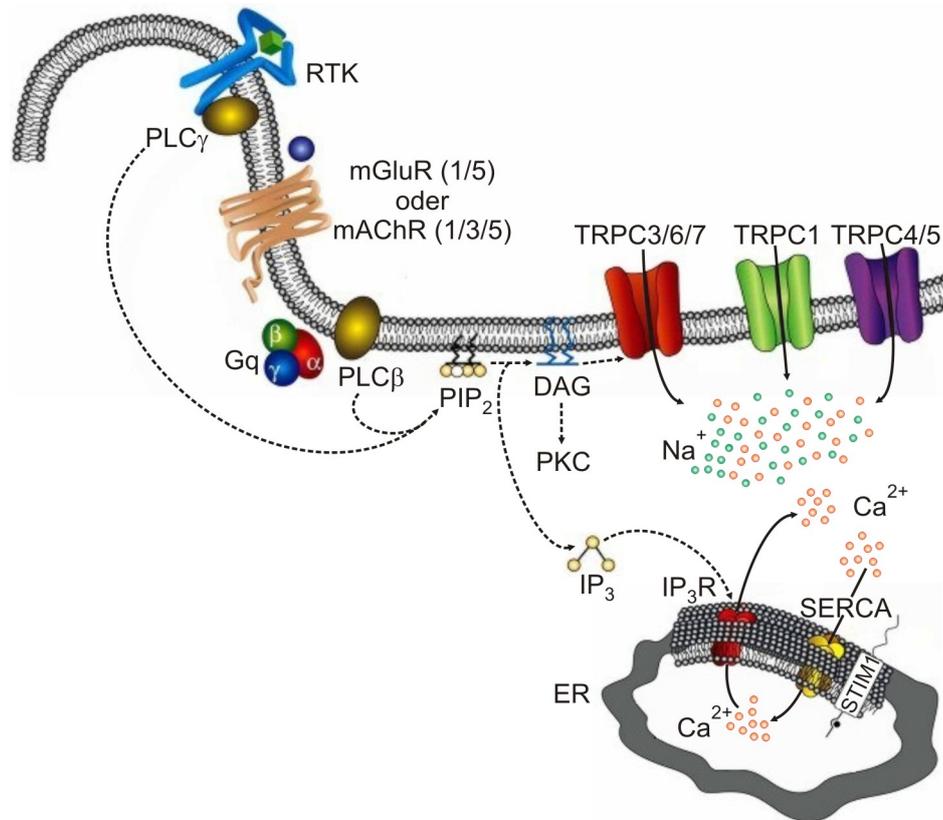


Abb. 1.1.: Die Phospholipase C (PLC)-induzierte Signalkaskade.

Die Aktivierung von GPCR (mGluRI, mAChR) und RTK führt zur Aktivierung isoformspezifischer PLCs, die eine Hydrolyse von PIP₂ zu DAG und IP₃ vermitteln. DAG führt zu einer direkten Aktivierung von Ionenkanälen (beschrieben für die Gruppe 3 der TRPC-Kanäle), zum anderen zur Aktivierung der PKC. IP₃ bindet an seinen Rezeptor (IP₃-R) im ER und induziert die Freisetzung von Ca²⁺. Die Veränderung der [Ca²⁺]_i, die durch den Transport von Ca²⁺ aus dem Cytosol in das ER u. a. über SERCA auf 100 nM reguliert wird, moduliert diverse Zellprozesse. STIM 1, lokalisiert in der Membran des ER, ist als Ca²⁺-Sensor an der Aufrechterhaltung der Ca²⁺-Homöostase und der -Signalgebung beteiligt. Die Signalkaskade nach Aktivierung der PLC, die zur Öffnung von TRPC-Kanälen führt, ist noch nicht im Detail bekannt (genauere Erläuterungen siehe Text; verändert nach Selvaraj *et al.*, 2010).

formspezifischen PLCs (PLCβ bei GPCR bzw. PLCγ bei RTK). Diese induzieren die Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) in das membranständige Diacylglycerol (DAG) und das im Cytosol lösliche Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃), die in der Zelle als sekundäre Botenstoffe fungieren. Die Bildung von DAG führt unter anderem zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die weitere Enzyme und Ionenkanäle phosphoryliert und damit deren Aktivität moduliert. IP₃ bindet hingegen an seinen spezifischen Rezeptor (IP₃-R) in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und initiiert hierdurch die Freisetzung

von Ca^{2+} aus dem intrazellulären Speicher. Calcium stellt einen bedeutenden intrazellulären Botenstoff dar, der an der Vermittlung unterschiedlichster Zellfunktionen, z. B. der Transmitterfreisetzung, der Genexpression und der Apoptose, beteiligt ist (Berridge *et al.*, 2000). Die intrazelluläre Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) von 100 nM wird durch den Transport von Ca^{2+} aus dem Cytosol über Sarko-/Endoplasmatische Retikulum-Pumpen (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA) in das ER oder in die Mitochondrien reguliert (Clapham, 1995; Berridge *et al.*, 2000) und kann transient durch zwei Mechanismen erhöht werden: zum einen durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wie es vorangehend beschrieben wurde, zum anderen durch den Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum, wo eine Ca^{2+} -Konzentration von etwa 2 mM vorliegt. Dieser Einstrom erfolgt durch Ca^{2+} -permeable Kanäle der Zellmembran in das Cytosol.

Ca^{2+} -permeable Kanäle können basierend auf ihrem Aktivierungsmechanismus in spannungsabhängige und -unabhängige Kanäle unterteilt werden. Der Öffnungsstimulus spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle stellt eine Depolarisation der Zellmembran dar und führt zu spannungsinduziertem Ca^{2+} -Einstrom (voltage-operated Ca^{2+} -entry, VOCE). Die Aktivierung eines spannungsunabhängigen Ca^{2+} -permeablen Kanals erfolgt hingegen entweder über die Bindung eines extrazellulären Liganden, wie z. B. die Bindung von Glutamat an den ionotropen AMPA-Rezeptor (AMPA-R), oder über die Vermittlung eines intrazellulären Signals. Sogenannte speicherregulierte Ca^{2+} -permeable Kanäle öffnen sich in Abhängigkeit vom Ladungszustand der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und vermitteln einen speicherinduzierten Ca^{2+} -Einstrom (store-operated Ca^{2+} -entry, SOCE). Ca^{2+} -permeable Kanäle, die nicht über eine extrazellulär lokalisierte Bindestelle für Liganden verfügen, werden als Folge der Aktivierung entsprechender metabotroper Rezeptoren geöffnet und führen zu rezeptorinduziertem Ca^{2+} -Einstrom (receptor-operated Ca^{2+} -entry, ROCE).

Es ist bereits seit einigen Jahren bekannt, dass die Stimulation von G_q -Protein- bzw. PLC-koppelnden Rezeptoren zu rezeptorinduziertem Ca^{2+} -Einstrom führt. Der Familie der „transient receptor potential“ (TRP)-Kanäle wird bei der Vermittlung von ROCE eine mögliche Beteiligung zugeschrieben (zur Übersicht siehe Minke, 2006; Villereal, 2006; Birnbaumer, 2009).

1.2. Die TRP-Familie

Die Familie der „transient receptor potential“-Kanäle ist eine Gruppe von Kationenkanälen, die für mono- und divalente Kationen wie Na^+ , Ca^{2+} und K^+ permeabel ist. Die Aktivierung von TRP-Kanälen führt zum einen zur Depolarisation der Zelle und zum anderen zur Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resultierend in der Modulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen (Wu *et al.*, 2010). In Säugetieren spielen TRP-Kanäle unter anderem eine wichtige Rolle bei

der Wahrnehmung von Geschmack (süß, bitter, umami), Pheromonen, Temperatur (warm, heiß, kalt) und Schmerz. Sie werden durch eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Stimuli aktiviert, wobei ein bestimmter TRP-Kanal meist durch verschiedene Mechanismen aktiviert werden und somit den Eingang unterschiedlicher Signale integrieren kann (Venkatachalam und Montell, 2007).

Die Bezeichnung der „transient receptor potential“-Kanäle ist zurückzuführen auf einen Phänotyp in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, in dem die Applikation eines kontinuierlichen Lichtreizes ausschließlich einen kurzanhaltenden, schnell inaktivierenden (transienten) Einwärtsstrom bzw. ein transientes Rezeptorpotential in Photorezeptoren hervorruft. Dieser Phänotyp entsteht durch eine Mutation des *trp*-Gens (Loss-of-function-Mutation) in den Photorezeptoren, die zum Funktionsverlust des Proteins führt (zur Übersicht siehe Minke und Selinger, 1996; Hardie, 2003; Raghu und Hardie, 2009).

Durch die Sequenzierung verschiedener Genome und basierend auf Sequenzhomologie konnten TRP-Kanäle in allen untersuchten Spezies ausgehend von Hefen bis hin zu Säugetieren - mit Ausnahme von Bakterien - nachgewiesen werden. In Säugetieren wird die Familie der TRP-Kanäle in vielen Geweben und Zelltypen exprimiert. Auch im Nervensystem sind alle bisher bekannten TRP-Kanäle vertreten (Venkatachalam und Montell, 2007; Clapham, 2009).

Die mittlerweile 28 bekannten Mitglieder der TRP-Familie unterscheiden sich stark im Bezug auf ihren Aktivierungsmechanismus, ihre Ionenselektivität und ihre physiologischen Funktionen, können aber aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in sieben Subfamilien eingeteilt werden: TRPC (classical oder canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPP (Polycystin), TRPML (Mucolipin), TRPA (Ankyrin) und TRPN (NOMPC, nicht in Säugetieren nachgewiesen; Pedersen *et al.*, 2005; Venkatachalam und Montell, 2007).

Im Folgenden soll die TRPC-Subfamilie mit ihren biophysikalischen Charakteristika und bereits beschriebenen physiologischen Funktionen genauer betrachtet werden, da sich diese Arbeit vornehmlich mit Mitgliedern dieser Subfamilie befasst.

1.3. Die TRPC-Subfamilie

TRPC-Kanäle sind nichtselektive Kationenkanäle und weisen im Vergleich zu den anderen TRP-Subfamilien die höchste Ähnlichkeit zu den TRP und TRPL-Kanälen von *Drosophila melanogaster* auf. Die TRPC-Subfamilie besteht aus sieben Mitgliedern (TRPC1 - TRPC7; Wu *et al.*, 2010). Basierend auf Sequenzähnlichkeit und funktionellen Übereinstimmungen werden die Mitglieder der TRPC-Subfamilie in vier Gruppen unterteilt: TRPC1 (Gruppe 1), TRPC2 (Gruppe 2), TRPC3/6/7 (Gruppe 3), TRPC4/5 (Gruppe 4; Abb. 1.2 A; Ramsey *et al.*, 2006). TRPC2 wird ausschließlich im Vomeronasalorgan (VNO) von Nagern exprimiert

und stellt im Menschen ein Pseudogen dar. Die übrigen TRPC-Isoformen werden verbreitet exprimiert und ein einzelner Zelltyp verfügt dabei über eine Vielzahl verschiedener TRPCs (Montell *et al.*, 2002).

1.3.1. Der strukturelle Aufbau der TRP-Kanalproteine mit besonderem Fokus auf die TRPC-Subfamilie

Fast allen TRP-Untereinheiten ist gemeinsam, dass sie sich aus sechs α -helikalen Transmembrandomänen (TM1 - TM6) mit einem intrazellulär gelegenen N- und C-Terminus aufbauen (Abb. 1.2 B). Zwischen TM5 und TM6 befindet sich eine extrazelluläre Schleife, die vermutlich die Porenregion der Kanäle darstellt (Minke und Cook, 2002; Clapham, 2003; Ramsey *et al.*, 2006). Aufgrund dieser Struktur werden die TRP-Kanäle den Kationen-selektiven Kanälen zugeordnet, zu denen unter anderem spannungsgesteuerte Kalium- (K_v , „Shaker“), Natrium- (Na_v) und Calciumkanäle (Ca_v), sowie CNG- (cyclic nucleotide-gated channels) und HCN-Kanäle (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels) gehören (Hartenack *et al.*, 2000; Birnbaumer, 2009). Aufgrund fehlender positiv geladener Aminosäuren in der TM4-Helix wird im Vergleich zu K_v -Kanälen vermutet, dass TRP-Kanäle nur eine schwache Spannungsabhängigkeit aufweisen (Wu *et al.*, 2010). Die Aktivierung und die Selektivität eines TRP-Kanals werden wahrscheinlich durch eine Region im Bereich der Transmembrandomänen TM5 - TM6 und der Porenschleife bestimmt. TRP-Kanäle sind nichtselektiv, leiten also sowohl mono- als auch divalente Kationen, und weisen eine relative Ca^{2+} -Permeabilität (P_{Ca}/P_{Na}) zwischen 1 und 10 auf (Owsianik *et al.*, 2006). Ausnahmen bilden monovalent-selektive Kanäle der TRPM- (TRPM4/5) und Ca^{2+} -selektive Kanäle der TRPV-Subfamilie (TRPV5/6; Clapham, 2003; Owsianik *et al.*, 2006).

Sowohl N- als auch C-terminal sind in TRPC-Untereinheiten verschiedene Struktur motive beschrieben, die für die Interaktion der Untereinheit mit anderen Proteinen verantwortlich sind (zur Übersicht siehe Vazquez *et al.*, 2004; Pedersen *et al.*, 2005; Ramsey *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010). Diese beeinflussen zum einen den Transport der Untereinheit zur Zellmembran, die dortige Lokalisation und die Zusammenlagerung mehrerer Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal: drei bis vier Ankyrin-homologe Domänen (TRPC3/6; Lussier *et al.*, 2008), eine Caveolin-bindende Region (TRPC1; Brazer *et al.*, 2003), eine N-terminal lokalisierte coiled-coil Domäne (TRPC1; Engelke *et al.*, 2002) und in TRPC4/5 eine PDZ-bindende Sequenz (Val-Thr-Thr-Arg-Leu; TRPC4; Mery *et al.*, 2002). Zum anderen erfolgt über diese Struktur motive die Interaktion mit anderen Signalmolekülen (z. B. IP_3 , Ca^{2+} / Calmodulin (CaM)), die zu einer Modulation der Kanalaktivität führt: eine CIRB-Domäne (Calmodulin/ IP_3 -Rezeptor bindende Domäne; TRPC3; Wedel *et al.*, 2003), eine C-terminal lokalisierte coiled-coil Domäne

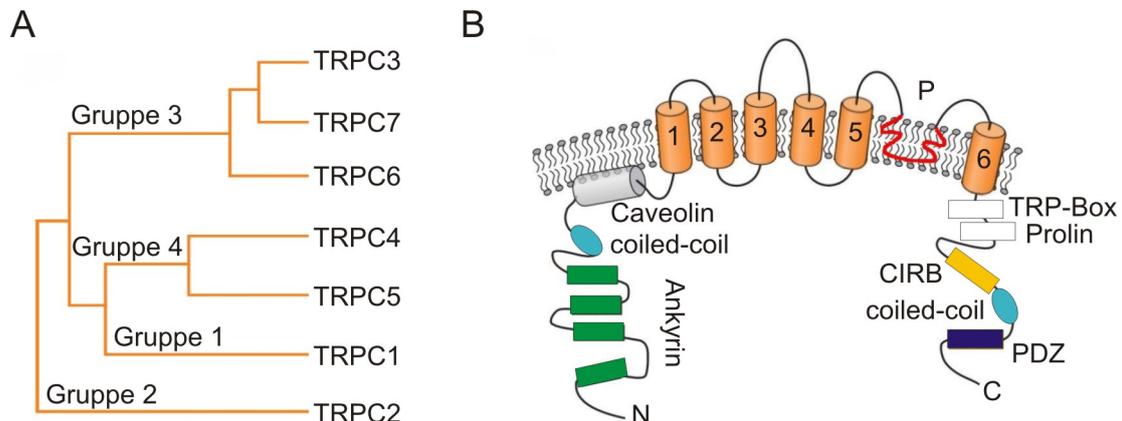


Abb. 1.2.: Die Phylogenie und Struktur der TRPC-Subfamilie.

In **A** ist die phylogenetische Beziehung innerhalb der TRPC-Subfamilie mit der Einteilung in die Gruppen 1 - 4 dargestellt. **B** zeigt die Struktur eines TRPC-Kanalproteins, die sich als Tetramer zu einem funktionellen Kanal zusammenlagern (für Erläuterungen siehe Text; N, N-Terminus; C, C-Terminus; 1 - 6, 1. - 6. Transmembrandomäne; P, Porenregion; Ankyrin, TRPC-spezifische 3 - 4 Ankyrin-homologe Domänen; coiled-coil, coiled-coil Domäne; Caveolin, Caveolin-bindende Region; TRP-Box, Glu-Trp-Lys-Phe-Ala-Arg Sequenz; Prolin, Prolin-reiche Region; CIRB, Calmodulin/IP₃-Rezeptor bindende Domäne; PDZ, PDZ-bindende Sequenz in TRPC4/5; verändert nach Putney Jr., 2004; Vazquez *et al.*, 2004).

ne (TRPC1; Singh *et al.*, 2002), die Prolin-reiche Region (TRPC1; Yuan *et al.*, 2003) und die PDZ-bindende Sequenz in TRPC4/5 (Vazquez *et al.*, 2004).

C-terminal von TM6 befindet sich in TRPC-Kanälen, aber auch in TRPV- und TRPM-Kanälen, eine hochkonservierte Aminosäuresequenz (Glu-Trp-Lys-Phe-Ala-Arg), die als TRP-Box bezeichnet wird und deren Funktion noch nicht geklärt ist (Clapham, 2002).

Funktionelle Kanäle werden durch das Zusammenlagern von vier Untereinheiten zu einem Tetramer, wie in Abbildung 1.3 A dargestellt, gebildet. Dabei kommt es sowohl zur Bildung von homomultimeren Kanälen, die aus vier gleichen Untereinheiten bestehen, als auch zur Verbindung aus zwei oder mehreren unterschiedlichen Untereinheiten, also zur Bildung von Heteromultimeren. Unterschiedlich zusammengesetzte homo- oder heteromultimere Kanäle weisen verschiedene regulatorische, physiologische und biophysikalische Eigenschaften auf (Abb. 1.3; Wu *et al.*, 2010).

1.3.2. Biophysikalische Eigenschaften von TRPC-Kanälen im Expressionssystem

Alle TRPC-Kanäle in Säugetieren werden über die PLC-induzierte Signalkaskade durch die Stimulation von GPCR oder RTK, wie sie im Abschnitt 1.1 beschrieben wurde und in Abbildung 1.1 dargestellt ist, aktiviert. Die Mechanismen und die dabei involvierten, regula-

torischen Schritte, die PLC-abhängig zu einer Kanalaktivierung führen, werden jedoch seit vielen Jahren kontrovers in der Literatur diskutiert und schließen unter anderem biophysikalische Eigenschaften wie die Strom-Spannungsbeziehung und die Ca^{2+} -Permeabilität von TRPC-Kanälen mit ein. Vor allem die Frage, ob TRPC-Kanäle speicherabhängig, also in Abhängigkeit des Füllstatus intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher, aktiviert werden, wird in diesem Bezug immer wieder aufgegriffen. Des Weiteren umfasst diese Diskussion verschiedene Protein-Protein-Interaktionen der Kanäle, z. B. mit dem IP_3 -R oder dem „stromal interaction molecule“ (STIM 1), und die direkte Regulation durch Komponenten der PLC-induzierten Signalkaskade (z. B. DAG; Plant und Schaefer, 2005). Da sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich mit TRPC-Kanälen der Gruppe 1 (TRPC1) und Gruppe 4 (TRPC4/5) befasst, werden im folgenden Abschnitt zunächst die biophysikalischen Eigenschaften dieser Gruppen behandelt.

TRPC1 (Gruppe 1):

TRPC1 ist der erste klonierte TRP-Kanal in Säugetieren (Zhu *et al.*, 1995; Wes *et al.*, 1995). Der Aktivierungsmechanismus von TRPC1 ist noch nicht endgültig geklärt. Diskutiert werden dabei sowohl PLC-abhängige Prozesse als auch die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher (Abb. 1.5 B; Zitt *et al.*, 1996; Montell, 2005). In *Xenopus*-Oocyten wurde TRPC1 zudem als Komponente eines mechanosensitiven Kanals beschrieben (Abb. 1.5 B; Maroto *et al.*, 2005). Überexpression im heterologen System kann keinen messbaren TRPC1-vermittelten Strom hervorrufen (Lintschinger *et al.*, 2000; Strübing *et al.*, 2001; zur Übersicht siehe Beech *et al.*, 2003; Beech, 2005). Es wird vermutet, dass TRPC1 nur im Zusammenspiel mit anderen TRPC-Isoformen in die Zellmembran eingebaut wird (Wu *et al.*, 2010).

Es wird derzeit kontrovers diskutiert, ob TRPC1 an der Vermittlung von SOCE beteiligt ist (zur Übersicht siehe Salido *et al.*, 2009; Vaca, 2010). TRPC1 tritt innerhalb der Zelle in spezialisierten Bereichen der Membran auf und die Verteilung von TRPC1 scheint in enger Verknüpfung mit dem ER zu stehen (Golovina, 2005). Es wurden verschiedene Protein-Bindungspartner beschrieben, die auf eine Lokalisation von TRPC1 in spezialisierten Membrankompartimenten hinweisen (Abb. 1.1; zur Übersicht siehe Beech, 2005): das membranständige Caveolin-1 (Brazer *et al.*, 2003), Cholesterin-reiche Mikrodomänen der Zellmembran („lipid rafts“; Lockwich *et al.*, 2000; Bergdahl *et al.*, 2003), der IP_3 -R und das Adapterprotein Homer (Yuan *et al.*, 2003), sowie dem Ca^{2+} -Sensor STIM 1 in der Membran des ER und dem Ca^{2+} -Kanal Orai.

TRPC1 wird ubiquitär exprimiert (Beech *et al.*, 2003; Montell, 2005) und in unterschiedlichen Geweben - wie Speicheldrüsen, Leber, Endothelien, Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (vascular smooth muscle cells, SMC), Herz, Gehirn - wurden diverse physiologische Funktionen von TRPC1 beschrieben, die in Abbildung 1.5 B zusammengefasst sind.

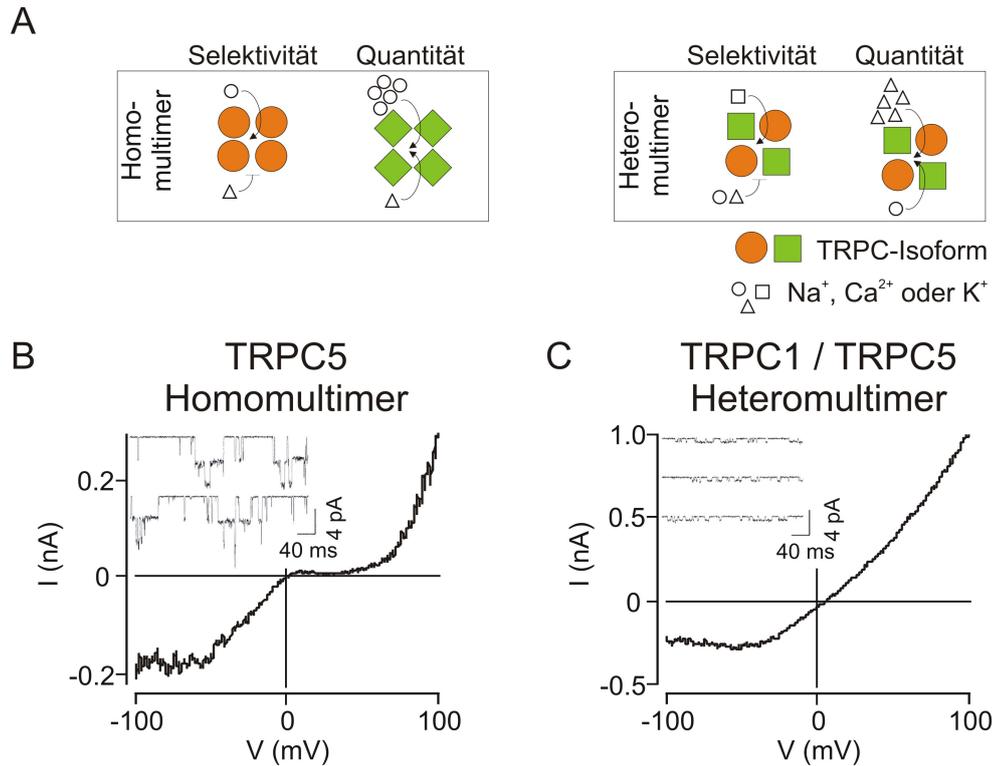


Abb. 1.3.: Tetramerbildung und biophysikalische Eigenschaften homo- und heteromultimerer TRPC-Kanäle.

A zeigt mögliche Unterschiede in den Permeationseigenschaften homo- und heteromultimerer Kanäle. Homomultimerer Kanäle (links) aus verschiedenen Untereinheiten (orangene Kreise bzw. grüne Quadrate) können sich zum einen in der Selektivität (verschiedene Ionen dargestellt durch kleine Kreise, Dreiecke oder Quadrate) und/oder der Ionenmenge pro Zeiteinheit (Quantität, dargestellt durch die Anzahl kleiner Kreise oder Dreiecke), die den Kanal passiert, unterscheiden. Die Bildung von Heteromultimeren (rechts) kann nochmals die Permeationseigenschaften (sowohl die Selektivität als auch die Quantität) eines Kanals beeinflussen (verändert nach Kiselyov *et al.*, 2005). In **B** ist die IV-Beziehung von homomultimeren TRPC5-Kanälen während einer Ableitung in der Whole-Cell-Konfiguration in HEK293-Zellen dargestellt. Das Inset zeigt eine Einzelkanalableitung in der Cell-Attached-Konfiguration bei einem Potential von +60 mV. In **C** ist dagegen die IV-Beziehung heteromultimerer Kanäle geformt aus TRPC1 und TRPC5 in HEK293-Zellen abgebildet. Das Inset zeigt wiederum eine Einzelkanalableitung in der Cell-Attached-Konfiguration bei einem Potential von +60 mV (weitere Erläuterungen siehe Text; IV-Beziehungen zur Verfügung gestellt von S. Jung (unveröffentlicht); Einzelkanalableitungen nach Strübing *et al.*, 2001).

TRPC4/5 (Gruppe 4):

TRPC4 und TRPC5 verfügen über 64 % Sequenzidentität und weisen viele funktionelle Gemeinsamkeiten auf. Beide Kanäle werden durch die Stimulation von GPCR aktiviert und der

Verlauf ihrer Strom-Spannungsbeziehungen (IV-Beziehung), die der Beschreibung von biophysikalischen Eigenschaften eines Ionenkanals dienen, sind vergleichbar (Okada *et al.*, 1998; Schaefer *et al.*, 2000). Obwohl für die Aktivierung dieser Kanäle scheinbar die enzymatische Aktivität der PLC benötigt wird, ist bis heute kein direkter Aktivator bekannt (Schaefer *et al.*, 2000).

Die IV-Beziehung homomultimerer Kanäle, gebildet aus TRPC4 oder TRPC5 in HEK293-Zellen, wie sie in Abbildung 1.3 B exemplarisch für TRPC5-Homomultimere dargestellt ist, weist einen typischen, nichtlinearen Verlauf mit einem Umkehrpotential (reversal potential, V_{rev}) nahe 0 mV auf. Ihre Form wird als doppelt-rektifizierend beschrieben. Der Einwärtsstrom nimmt bei Potentialen negativer als 0 mV zu. Potentiale größer als das Umkehrpotential induzieren einen auswärtsgerichteten Strom, gefolgt von einem charakteristischen Plateauverlauf zwischen +20 und +40 mV. Über diesem Bereich nimmt der Auswärtsstrom wiederum zu (Schaefer *et al.*, 2000; Strübing *et al.*, 2001; Schaefer *et al.*, 2002; Plant und Schaefer, 2003, 2005). Homomultimere TRPC4-Kanäle weisen eine Einzelkanalleitfähigkeit von 28 - 30 pS (Schaefer *et al.*, 2002), TRPC5-Kanäle hingegen von 38 - 63 pS auf (Abb. 1.3 B, Inset, exemplarisch für TRPC5-Homomultimer; Schaefer *et al.*, 2000; Strübing *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2003).

Heterolog exprimierte TRPC4- oder TRPC5-Kanäle werden durch eine Vielzahl an Modulatoren beeinflusst. Die Aktivität von homomultimeren TRPC5-Kanälen wird durch $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Blair *et al.*, 2009), CaM (Ordaz *et al.*, 2005), extrazelluläres Thioredoxin (Xu *et al.*, 2008) und Stickstoffmonoxid (Yoshida *et al.*, 2006) gesteigert. Durch TRPC4/5-vermittelte Ströme werden im Gegensatz zu allen anderen TRP-Kanälen durch die trivalenten Kationen Lanthan (La^{3+}) und Gadolinium (Gd^{3+}) in mikromolaren Konzentrationen potenziert (Schaefer *et al.*, 2000; Strübing *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2003). Eine Verminderung der Aktivität homomultimerer TRPC5-Kanäle erfolgt durch intrazelluläres Magnesium (Mg^{2+} ; Obukhov und Nowycky, 2005, 2008) und für TRPC4 wurde eine Inhibition durch PIP_2 nachgewiesen (Otsuguro *et al.*, 2008). Eine PKC-vermittelte Phosphorylierung führt zur Abschaltung des homomultimeren TRPC5-Kanals (Ordaz *et al.*, 2005; zur Übersicht siehe Yao *et al.*, 2005). Im heterologen System konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation von RTK (z. B. des Epidermal growth factor (EGF)-Rezeptors) zum Transport von TRPC5 zur Zellmembran führt (Bezzarides *et al.*, 2004) und TRPC4/5-Kanäle mit verschiedenen Proteinen, wie IP_3 -R, STIM 1 und Orai, interagieren (Abb. 1.1; zur Übersicht siehe Salido *et al.*, 2009).

TRPC4 wird im Gehirn, in Endothelien, der Niere, der Retina, den Testis und der Nebenniere exprimiert (Freichel *et al.*, 2004, 2005). Die Hauptexpression von TRPC5 findet sich hingegen im zentralen Nervensystem (ZNS; Freichel *et al.*, 2005; Montell, 2005).

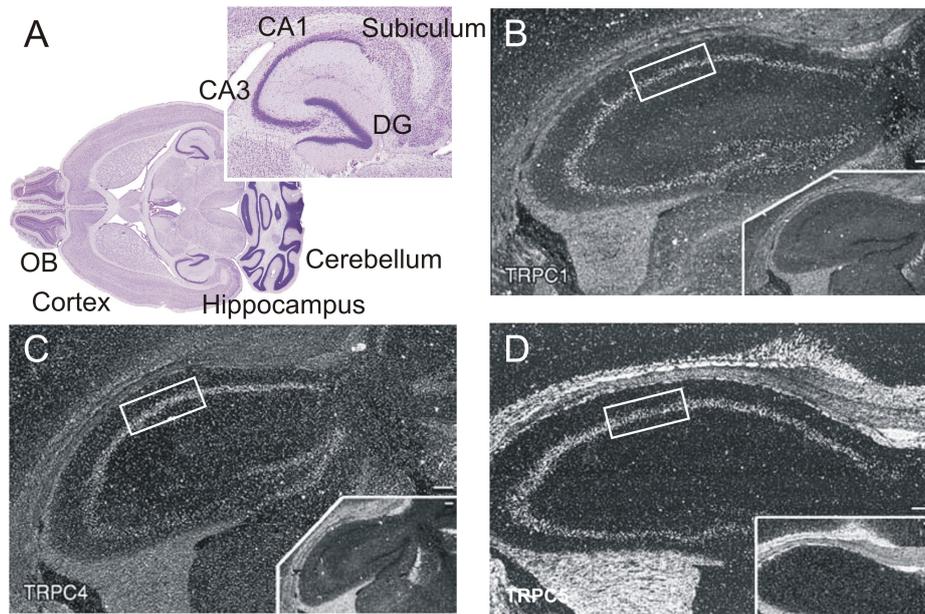


Abb. 1.4.: Die TRPC-Expression im murinen Hippocampus.

A zeigt einen mit Kresylviolett gefärbten Horizontalschnitt des murinen Gehirns. Zu erkennen sind Gehirnstrukturen wie der olfaktorische Bulbus (OB), der Cortex mit dem Hippocampus und das Cerebellum. Innerhalb des Hippocampus sieht man das *Stratum granulare* (Körnerzellschicht) des *Gyrus dentatus* (DG), das *Stratum pyramidale* (Pyramidenzellschicht) der CA3- bis CA1-Region und das Subiculum (Paxinos und Franklin, 2001). In B - D sind *in situ* Hybridisierungen gegen TRPC1 (B), TRPC4 (C) und TRPC5 (D) mit jeweiliger Negativkontrolle gezeigt. Die TRPC-Isoformen zeigen ein überlappendes Expressionsmuster im Hippocampus, u. a. im *Stratum pyramidale* der CA1-Region (siehe Kasten; Größenmaßstab 100 μm ; Freichel *et al.*, 2005).

Heteromultimerisierung von TRPC1 und TRPC4/5:

TRPC1, TRPC4 und TRPC5 werden im Gehirn vornehmlich im Hippocampus (Abb. 1.4), dem Cortex, dem olfaktorischen Bulbus (OB) und der Amygdala exprimiert (Otsuka *et al.*, 1998; Philipp *et al.*, 1998; Strübing *et al.*, 2001; Riccio *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2006; Zechel *et al.*, 2007), jedoch auch im Herz, der Lunge, der Leber, der Milz und den Testis (Venkatachalam und Montell, 2007; Riccio *et al.*, 2002). TRPC1 ist in der Lage, sich mit der Gruppe 4 (TRPC4/5) und im embryonalen Gewebe auch mit der Gruppe 3 (TRPC3/6/7) zu heteromultimeren Kanälen zusammenzulagern. Ebenso bilden sich Heteromultimere innerhalb der Gruppe 4 bzw. Gruppe 3 (Lintschinger *et al.*, 2000; Strübing *et al.*, 2001; Goel *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2002; Strübing *et al.*, 2003; Schilling und Goel, 2004). In hippocampalen Neuronen kann eine Kolokalisation von TRPC1 und TRPC5 vornehmlich im Soma und in den proximalen Anteilen der Zellausläufer nachgewiesen werden, wohingegen in den

Wachstumskegeln von Zellfortsätzen ausschließlich TRPC5 auftritt (Greka *et al.*, 2003). Die letztendliche Zusammensetzung und die daraus resultierenden physiologischen Eigenschaften nativer TRPC-Kanäle ist jedoch weitgehend unbekannt (Schilling und Goel, 2004).

Heteromultimerisation von TRPC1 mit TRPC4/5 in HEK293-Zellen führt zu einer deutlichen Veränderung der IV-Beziehung, die vergleichbar ist zu der von NMDA-Rezeptoren (NMDA-R) und als auswärts-rektifizierend beschrieben wird (Abb. 1.3 C, exemplarisch für TRPC1/TRPC5-Heteromultimer; Strübing *et al.*, 2001; Plant und Schaefer, 2005). Die IV-Beziehung heteromultimerer Kanäle zeigt ein Umkehrpotential in der Nähe von 0 mV und eine deutliche Abnahme des Einwärtsstroms bei Potentialen kleiner als -30 mV. Positive Potentiale induzieren einen prominenten Auswärtsstrom. Interessanterweise fehlt der IV-Beziehung heteromultimerer TRPC-Kanäle der für homomultimere Kanäle zuvor beschriebene Plateauverlauf zwischen +20 und +40 mV. Die Einzelkanalleitfähigkeit heteromultimerer TRPC1/TRPC5-Kanäle ist im Vergleich zu homomultimeren TRPC5-Kanälen deutlich reduziert und beträgt nur 5 pS (Abb. 1.3 C, Inset; Strübing *et al.*, 2001; Plant und Schaefer, 2003).

TRPC3/6/7 (Gruppe 3):

Die Aminosäuresequenzen der Isoformen TRPC3, TRPC6 und TRPC7 sind zu 75 % identisch. Im heterologen System exprimiert werden Kanäle dieser Gruppe durch die Stimulation von GPCR und direkt durch DAG aktiviert (Abb. 1.1; Hofmann *et al.*, 1999; Trebak *et al.*, 2003; Desai und Clapham, 2005; zur Übersicht siehe Harteneck und Gollasch, 2010). TRPC3/6/7 bilden nichtselektive Kationenkanäle mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 65 pS für TRPC3, 35 pS für TRPC6 und 25 pS für TRPC7, die eine doppelt-rektifizierende IV-Beziehung aufweisen (Wu *et al.*, 2010).

Verschiedene Signalmoleküle modulieren die Aktivität von TRPC3/6/7-Kanälen. Durch intrazelluläres Ca^{2+} wird sowohl eine positive (TRPC6) als auch eine negative Modulation (TRPC7) der Kanäle vermittelt (Shi *et al.*, 2004). Die Interaktion von TRPC3 mit PLC führt zur Bindung von PIP_2 an den Kanal (van Rossum *et al.*, 2005) und eine PKC-vermittelte Phosphorylierung zur Inhibition der Kanalaktivität (Venkatachalam *et al.*, 2003; Kwan *et al.*, 2004; Trebak *et al.*, 2005). Der Transport und der Einbau des Kanalproteins in die Zellmembran wird durch die Interaktion mit Signalmolekülen, wie z.B. Homer, beeinflusst (Singh *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006).

TRPC3 wird im Gehirn exprimiert mit dem höchsten Vorkommen im Cerebellum, dem Cortex und dem Hippocampus (Zhu *et al.*, 1996; Freichel *et al.*, 2005). TRPC6-Expression ist hauptsächlich in der Lunge, dem Gehirn und in SMC zu finden (Montell, 2005). TRPC7 wird in zahlreichen Geweben exprimiert, u. a. im Gehirn, im Herz, in der Lunge und dem Auge (Okada *et al.*, 1999).

TRPC2 (Gruppe 2):

TrpC2 ist ein Pseudogen im Menschen, kodiert jedoch in Nagern für einen funktionellen Kanal, der an der Detektion von Pheromonen beteiligt ist. Für die Überexpression im heterologen System wurden gegensätzliche Beobachtungen veröffentlicht. Die Expression von TRPC2 in COS M6-Zellen („african green monkey kidney cells“) führt zu einem Kationen-permeablen Kanal, der sowohl Agonisten- als auch speicherabhängig aktiviert werden kann (Vannier *et al.*, 1999), wohingegen in HEK293-Zellen weder ein rezeptor-, noch ein speicherinduzierter Ca^{2+} -Einstrom beobachtet wurde (Hofmann *et al.*, 2000; zur Übersicht siehe Kiselyov *et al.*, 2010).

In der Maus wird TRPC2 im VNO exprimiert (Vannier *et al.*, 1999). Außerdem wurde das TRPC2-Protein in Spermien von Nagern und Rindern gefunden (Wissenbach *et al.*, 1998; Jungnickel *et al.*, 2001).

1.4. Physiologische Funktionen und Eigenschaften von TRPC-Kanälen in nativen nicht-neuronalen Zellen

Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind vor allem in neuronale Prozesse wie der Modulation von Erregbarkeit, der Transmitterfreisetzung und dem Neuronenwachstum involviert (Berridge *et al.*, 2000, 2003), sind aber auch von immenser Bedeutung in nicht-neuronalen Zellen.

Die Sekretion von Speichel aus *Speicheldrüsen* ist Ca^{2+} -abhängig und eine Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wird begleitet durch eine gesteigerte Sekretion. Singh *et al.* konnten 2001 nachweisen, dass die Überexpression von *TRPC1* in der Submandibulardrüse sowohl zu einem gesteigerten ROCE als auch SOCE und einer vermehrten Speichelsekretion führt (Abb. 1.5 B). Diese Ergebnisse wurden durch eine reduzierte Speichelsekretion und einen verminderten Ca^{2+} -Einstrom in *TRPC1* defizienten Mäusen (*TRPC1*^{-/-}) bestätigt (Abb. 1.5 A und B; Liu *et al.*, 2007).

Chen und Barritt beschrieben 2003, parallel zu einem verringerten Ca^{2+} -Einstrom, eine veränderte Regulation des Zellvolumens in *Leberzellen* bei einer induzierten Reduktion der *TRPC1*-Expression (Abb. 1.5 B; Chen und Barritt, 2003).

Als natürliche Barriere regulieren *Endothelzellen*, die die Innenwand von Blutgefäßen auskleiden, den Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut. Für *TRPC1* wurde eine Beteiligung an einer PKC-vermittelten, Ca^{2+} -abhängigen Zunahme der Endotheldurchlässigkeit (Abb. 1.5 B; Ahmed *et al.*, 2004) und für *TRPC4* eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Ca^{2+} -Signalen in diesen Zellen beschrieben. So zeigen sich in *TRPC4* defizienten Mäusen (*TRPC4*^{-/-}) Veränderungen in der ACh-induzierten Vasoregulation und der Gefäßpermeabilität in der Lunge (Abb. 1.5 A; Freichel *et al.*, 2001; Tirupathi *et al.*, 2002).

Die Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ ist außerdem ein wichtiger Faktor für das Zellwachstum in der glatten Gefäßmuskulatur. Die Proliferation von *glatten Gefäßmuskulaturzellen* (SMC) und SMC der Lungenarterie (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMC) wird sowohl mit einer erhöhten *TRPC1*-Expression und einem gesteigerten SOCE (Abb. 1.5 B; Golovina *et al.*, 2001; Sweeney *et al.*, 2002) als auch mit der *TRPC6*-Expression und einem rezeptorinduzierten, nichtselektiven Kationenstrom, der in diesen Zellen beobachtet werden kann, verknüpft (Inoue *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2004). In SMCs von *TRPC6* defizienten Mäusen (*TRPC6*^{-/-}) zeigt sich eine gesteigerte Agonist-induzierte Kontraktilität der Gehirnarterien, die Zunahme eines Na⁺-vermittelten Einwärtsstroms und einhergehend ein Anstieg des arteriellen Blutdrucks (Abb. 1.5 A; Dietrich *et al.*, 2004; Mederos y Schnitzler *et al.*, 2004; Dietrich *et al.*, 2005).

Im Herz sind Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in verschiedenste Funktionen bzw. Krankheitsbilder involviert. Ohba *et al.* zeigten 2007, dass eine durch Stimulation von GPCR-induzierte Herzhypertrophie zum Anstieg der *TRPC1*-Expression und einer Zunahme des SOCE, der zum Teil auch durch *TRPC7* vermittelt wird, führt (Abb. 1.5 B; Satoh *et al.*, 2007).

Untersuchungen an humanen *Neuroblastomzellen* (SH-SY5Y) konnten nachweisen, dass die Behandlung der Zellen mit Neurotoxinen eine Abnahme des *TRPC1*-Proteinlevels induziert. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die Überexpression und Aktivierung von *TRPC1* neuroprotektiv wirkt (Abb. 1.5 B; Bollimuntha *et al.*, 2005, 2006).

1.5. Neuronale nichtselektive Kationenströme und die mögliche Rolle von TRPC-Kanälen im zentralen Nervensystem

1.5.1. Ca²⁺-abhängige, nichtselektive Kationenströme in Neuronen

Aufgrund ihres Aktivierungsmechanismus und ihrer Permeabilitätseigenschaften stellen TRPC-Kanäle in Neuronen eine Verknüpfung zwischen metabotropen Rezeptoren für Neurotransmitter, Neuropeptide, wie Cholecystokinin oder Vasopressin, oder Wachstumsfaktoren und einer dadurch induzierten Depolarisation der Membran und einem Ca²⁺-Einstrom dar.

In den letzten Jahren wurde die Aktivierung von *Ca²⁺-abhängigen, nichtselektiven (TRP-ähnlichen) Kationenströmen (ICAN)* durch Stimulation von mGluRI oder mAChR in verschiedenen Regionen des Nagergehirns - wie dem Cortex, dem Cerebellum, der *Substantia nigra* (SN), der Amygdala und der CA3- und CA1-Region des Hippocampus (Ammonshorn, *Cornu ammonis*) - beschrieben, wo sie an der Regulation der Erregbarkeit und/oder des Wachstums von Neuronen beteiligt sind (zur Übersicht siehe Talavera *et al.*, 2008; Tai *et al.*, 2009).

Bereits in den 80ern und 90ern beschrieben Autoren, dass die cholinerge Stimulation im präfrontalen Cortex der Ratte durch eine Depolarisation der Zelle zu einer Steigerung der Zell-

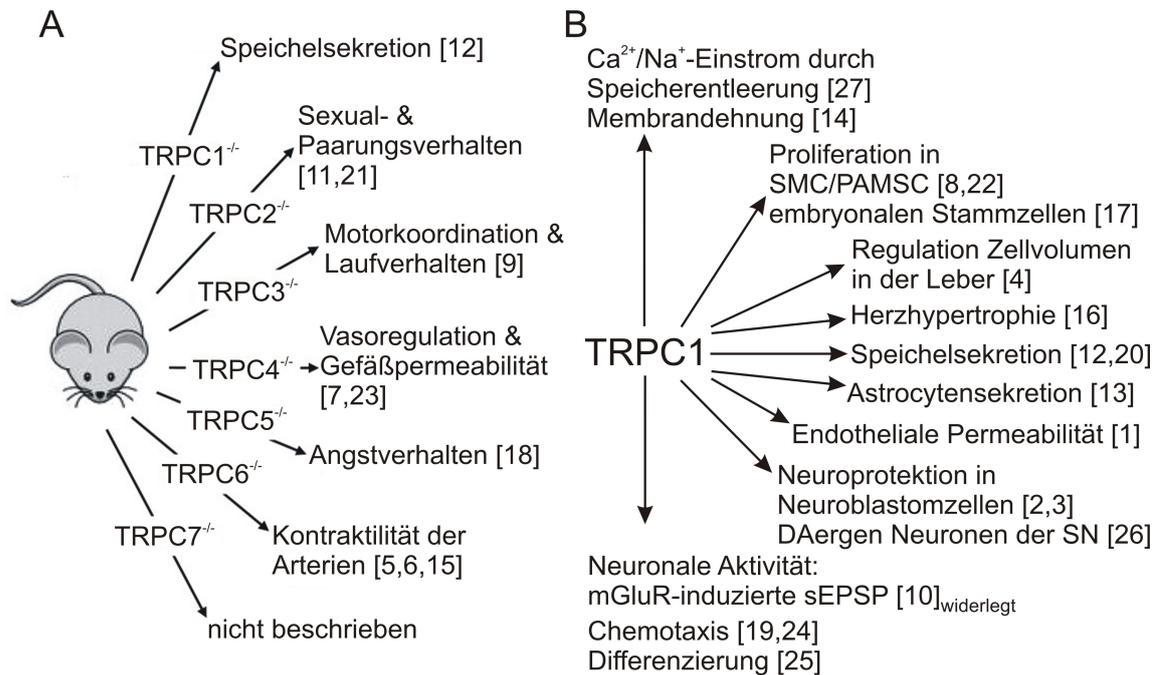


Abb. 1.5.: Zusammenfassung der in TRPC-Knockoutmäusen beschriebenen Phänotypen und die physiologischen Funktionen von TRPC1.

In **A** sind die beschriebenen Phänotypen in TRPC-Knockoutmäusen (Wu *et al.*, 2010), in **B** die beschriebenen physiologischen Funktionen von TRPC1 zusammengefasst (verändert nach Beech, 2005; Erläuterungen siehe Text; [1] Ahmed *et al.*, 2004; [2] Bollimuntha *et al.*, 2005; [3] Bollimuntha *et al.*, 2006; [4] Chen und Barritt, 2003; [5] Dietrich *et al.*, 2004; [6] Dietrich *et al.*, 2005; [7] Freichel *et al.*, 2001; [8] Golovina *et al.*, 2001; [9] Hartmann *et al.*, 2008; [10] Kim *et al.*, 2003; [11] Leypold *et al.*, 2002; [12] Liu *et al.*, 2007; [13] Malarkey *et al.*, 2008; [14] Maroto *et al.*, 2005; [15] Mederos y Schnitzler *et al.*, 2004; [16] Ohba *et al.*, 2007; [17] Pla *et al.*, 2005; [18] Riccio *et al.*, 2009; [19] Shim *et al.*, 2005; [20] Singh *et al.*, 2001; [21] Stowers *et al.*, 2002; [22] Sweeney *et al.*, 2002; [23] Tirupathi *et al.*, 2002; [24] Wang und Poo, 2005; [25] Wu *et al.*, 2004; [26] Yao *et al.*, 2009; [27] Zitt *et al.*, 1996).

erregbarkeit führt (Andrade, 1991). Über eine vergleichbare Antwort von Zellen wurde auch im cerebralen Cortex (Krnjevic *et al.*, 1971; McCormick und Prince, 1985) und im Hippocampus (Madison *et al.*, 1987) berichtet. Über viele Jahre wurde angenommen, dass ausschließlich eine Inhibition von K⁺-Strömen, z. B. eines Ca²⁺-aktivierten K⁺-Stroms (I_{AHP}), der eine Nachhyperpolarisation (afterhyperpolarization, AHP) vermittelt, für die Zunahme der Zellerregbarkeit verantwortlich ist (Krause *et al.*, 2002). In den darauffolgenden Jahren wurden sowohl in akuten Gehirnschnittpräparaten als auch in primären Zellkulturen mit molekularbiologischen und elektrophysiologischen Methoden einzelne Komponenten und Signalkaskaden, die zur Induktion eines Einwärtsstroms von Kationen (I_{ADP}) und einer verknüpften langsamen

Nachdepolarisation (slow afterdepolarization, sADP) führen, untersucht.

In der CA1- und CA3-Region des Hippocampus wurde bereits in den 90ern die Aktivierung eines I_{CAN} durch synaptische Stimulation oder pharmakologische Aktivierung von mAChR und mGluRI (Crépel *et al.*, 1994; Pozzo Miller *et al.*, 1995; Guérineau *et al.*, 1995) und die Entstehung von langsamen erregenden postsynaptischen Potentialen (slow excitatory postsynaptic potential, sEPSP) nach Stimulation von mGluR beschrieben (Breakwell *et al.*, 1996). In den folgenden Jahren veröffentlichten Congar *et al.* (1997) und Gee *et al.* (2003) ihre Beobachtungen eines nichtselektiven Kationenstroms (Abb. 1.6), der durch die Stimulation von mGluRI und hochfrequente, elektrische Stimulation induziert wird und eine IV-Beziehung aufweist, wie sie für heteromultimere Kanäle aus TRPC1 und TRPC4/5 (Strübing *et al.*, 2001) beschrieben wurde. I_{CAN} wird durch die Aktivierung von G-Proteinen (GTP γ S *versus* GDP β S) induziert und durch intrazelluläre Ca²⁺-Chelatoren (BAPTA, EGTA) vollständig unterbunden. Er wird also von der [Ca²⁺]_i moduliert, wie es für TRP-Kanäle, u. a. TRPC4 und TRPC5, nachgewiesen wurde (Okada *et al.*, 1998; Philipp *et al.*, 1998; Schaefer *et al.*, 2000; Strübing *et al.*, 2001). Des Weiteren wird I_{CAN} durch zweiwertige Kationen, wie Mg²⁺, Cadmium und Zink, moduliert (Congar *et al.*, 1997), wie es für die Inhibition des Einwärtsstroms durch eine erhöhte extrazelluläre Mg²⁺-Konzentration für heterolog exprimierte TRPC3- und TRPC6-Kanäle beschrieben wurde (Konieczny, 2010). Zusätzlich wird I_{CAN} durch La³⁺ und einen IP₃-R-Antagonisten (2-Aminoethoxydiphenylborane, 2-APB) inhibiert (Gee *et al.*, 2003). Eine Identifikation der Kanäle, die an der Vermittlung von I_{CAN} und der resultierenden Depolarisation in Pyramidenzellen des Hippocampus beteiligt sind, ist bis heute noch relativ unklar.

In Pyramidenzellen des cerebralen Cortex (TRPC5/6; Yan *et al.*, 2009), Neuronen der Amygdala (TRPC5; Riccio *et al.*, 2009), cholinergen Interneuronen des Striatums (TRPC3/7; Berg *et al.*, 2007), in Neuronen des VNO (TRPC2; Lucas *et al.*, 2003), Purkinjoneuronen des Cerebellums (TRPC3; Hartmann *et al.*, 2008) und in hippocampalen Neuronen (TRPC5; Tai *et al.*, 2010) konnte hingegen die Vermittlung von cholinerg und glutamaterg induzierten nichtselektiven Kationenströmen und langsamen Nachdepolarisationen, die vergleichbare Eigenschaften (Aktivierungsmechanismus, IV-Beziehung, Modulation) wie der von Congar *et al.* beschriebene I_{CAN} aufweisen, bereits mit definierten TRPC-Isoformen in Verbindung gebracht werden (Abb. 1.6).

1.5.2. Beschriebene physiologische Funktionen von I_{CAN} in Neuronen unter Beteiligung von TRPC-Kanälen

In einigen Gehirnregionen konnten zudem physiologische Funktionen für bestimmte TRPC-Isoformen nachgewiesen werden. Im Thalamus (TRPC4; Munsch *et al.*, 2003) und in Astrocyten des Cortex (TRPC1; Abb. 1.5 B; Malarkey *et al.*, 2008) sind TRPC-Kanäle an der Modulation der *Transmitterfreisetzung* beteiligt (Abb. 1.6).

Die exklusive Expression von TRPC2 im VNO von Nagern legt eine Rolle bei der *Detektion von Pheromonen* und dem Sexualverhalten nahe. So zeigen TRPC2 defiziente Mäuse (TRPC2^{-/-}) eine drastisch veränderte Verhaltensantwort auf die Gabe von Pheromonen und ein abnormales Paarverhalten (Abb. 1.5 A; Stowers *et al.*, 2002; Leypold *et al.*, 2002).

Riccio *et al.* wiesen 2009 eine verringerte Ausprägung von *Angstverhalten* in TRPC5 defizienten Mäusen nach (TRPC5^{-/-}; Abb. 1.5 A). Auf zellulärer Ebene spiegelt sich dies in einer verminderten Antwort auf die Stimulation von mGluRI und Cholecystokinrezeptoren in Neuronen der Amygdala, einer Gehirnregion, die an der Verarbeitung von Emotionen und dem verknüpften Verhalten beteiligt ist, wider.

Auch in Purkinjoneuronen des Cerebellums wurde die Beteiligung von TRPC-Kanälen an der Entstehung einer Nachdepolarisation bestätigt. Zunächst beschrieben Kim *et al.* (2003) die Rolle von *TRPC1* bei der Entstehung eines mGluRI-vermittelten Einwärtsstroms und der Generierung von sEPSP (Abb. 1.5 B und Abb. 1.6). Hartmann *et al.* veröffentlichten jedoch 2008 widersprüchliche Ergebnisse in der TRPC1 defizienten Maus (TRPC1^{-/-}). Die Autoren zeigten, dass sowohl in der TRPC1^{-/-}-Maus als auch in der TRPC1/TRPC4-Doppelknockout (TRPC1^{-/-}/TRPC4^{-/-}) die Stimulation von GPCR einen zum Wildtyp vergleichbaren Einwärtsstrom induzierte, der in der *TRPC3* defizienten Maus (TRPC3^{-/-}) hingegen vollständig verschwunden ist. Da TRPC3^{-/-}-Mäuse eine Veränderung im Laufverhalten aufweisen, schließen die Autoren auf eine Rolle von TRPC3 an der *Bewegungscoordination* (Abb. 1.5 A und Abb. 1.6; Hartmann *et al.*, 2008). Ergänzend konnte in sogenannten „Moonwalker“-Mäusen, die sowohl Bewegungs- und Koordinationsdefizite als auch einen charakteristischen rückwärtsgerichteten Gang aufweisen, eine Gain-of-function-Mutation (T635A) im TRPC3-Gen und ein permanenter Ca²⁺-Einstrom in die Zellen nachgewiesen werden (Abb. 1.6; Becker *et al.*, 2009).

Weitere Beobachtungen weisen auf diverse Funktionen von TRPC-Isoformen bei *Ereignissen während der neuronalen Entwicklung* hin (zur Übersicht siehe Wen und Zheng, 2006; Talavera *et al.*, 2008; Tai *et al.*, 2009). Analog zu den Funden in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, wird *TRPC1* eine Rolle bei der *Proliferation* von cortikalen Neuronen (Maric *et al.*, 2000) und embryonalen Stammzellen der Ratte (Pla *et al.*, 2005) zugeschrieben, die vom Ca²⁺-Einstrom in die Zelle abhängig ist (Abb. 1.5 B und Abb. 1.6).

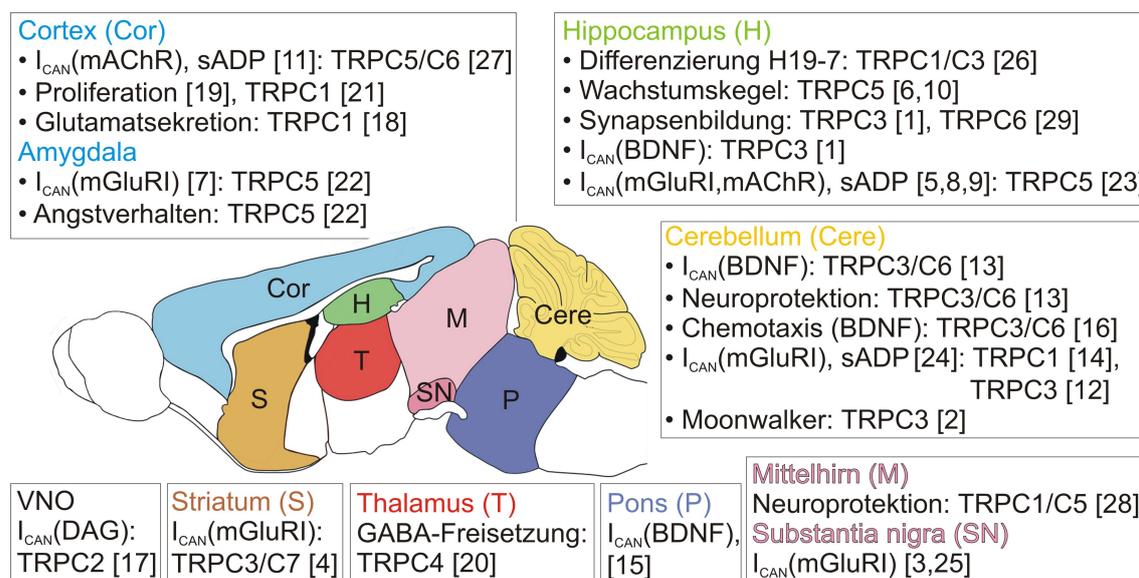


Abb. 1.6.: Neuronale nichtselektive Kationenströme und die Rolle der TRPC-Subfamilie.

Zusammenfassung neuronaler I_{CAN} und mögliche Funktionen der TRPC-Kanäle (Gehirnatlas von www.gensat.org, verändert; Erläuterungen siehe Text; [1] Amaral und Pozzo-Miller, 2007; [2] Becker *et al.*, 2009; [3] Bengtson *et al.*, 2004; [4] Berg *et al.*, 2007; [5] Congar *et al.*, 1997; [6] Davare *et al.*, 2009; [7] Faber *et al.*, 2006; [8] Fraser und MacVicar, 1996; [9] Gee *et al.*, 2003; [10] Greka *et al.*, 2003; [11] Haj-Dahmane und Andrade, 1996; [12] Hartmann *et al.*, 2008; [13] Jia *et al.*, 2007; [14] Kim *et al.*, 2003; [15] Li *et al.*, 1999; [16] Li *et al.*, 2005; [17] Lucas *et al.*, 2003; [18] Malarkey *et al.*, 2008; [19] Maric *et al.*, 2000; [20] Munsch *et al.*, 2003; [21] Pla *et al.*, 2005; [22] Riccio *et al.*, 2009; [23] Tai *et al.*, 2010; [24] Tempia *et al.*, 2001; [25] Tozzi *et al.*, 2003; [26] Wu *et al.*, 2004; [27] Yan *et al.*, 2009; [28] Yao *et al.*, 2009; [29] Zhou *et al.*, 2008).

Die *Differenzierung* von kultivierten H19-7-Zellen (Zelllinie aus hippocampalen Neuronen) kann *in vitro* induziert werden und führt zu einem Anstieg der Expressionslevel von *TRPC1* und *TRPC3* sowie einem gekoppelten SOCE (Abb. 1.5 B und Abb. 1.6; Wu *et al.*, 2004).

Neben der Fähigkeit von Neurotrophinen, z. B. BDNF (brain-derived neurotrophic factor), sowohl in Neuronen des Hippocampus als auch in pontinen Neuronen einen *TRPC3*-vermittelten I_{CAN} zu induzieren (Abb. 1.6; Li *et al.*, 1999; Amaral und Pozzo-Miller, 2007), wurde für *TRPC1*, *TRPC3* und *TRPC6* eine Funktion an Neurotrophin-induzierter *Chemotaxis* von Wachstumskegeln in Neuronen des Cerebellums (Li *et al.*, 2005) und kultivierten *Xenopus*-Neuronen (Wang und Poo, 2005; Shim *et al.*, 2005) beschrieben (Abb. 1.5 B und Abb. 1.6).

Ergänzend konnte in hippocampalen Neuronen gezeigt werden, dass die Aktivität von *TRPC5*, das über die Interaktion mit dem Protein Stathmin 2 (growth cone-enriched protein) in Wachstumskegel transportiert wird, über einen Ca²⁺/CaM-abhängigen Prozess das

Auswachsen von Neuriten inhibiert und dadurch die *Morphologie der Wachstumskegel* beeinflusst (Abb. 1.6; Greka *et al.*, 2003; Davare *et al.*, 2009).

Außerdem wurde gezeigt, dass *TRPC6* neben *TRPC3* im Hippocampus an der *Ausbildung von Synapsen* beteiligt ist und transgene Mäuse, die *TRPC6* überexprimieren, eine verbesserte Fähigkeit im Lernen und in der Ausbildung von Gedächtnis aufweisen (Abb. 1.6; Amaral und Pozzo-Miller, 2007; Zhou *et al.*, 2008). Zudem berichten Autoren in einer im vergangenen Jahr veröffentlichten Studie von einer *neuroprotektiven Rolle* von *TRPC1* in Kombination mit *TRPC5* in Mittelhirnneuronen der Ratte gegenüber HIV (Abb. 1.5 B und Abb. 1.6; Yao *et al.*, 2009; zur Übersicht siehe Selvaraj *et al.*, 2010).

1.5.3. Mögliche physiologische Funktionen von I_{CAN} im Hippocampus

In Neuronen der CA1-Region ist bereits bekannt, dass die Aktivierung von GPCR sowohl zu spannungsunabhängigen, transienten als auch zu spannungsabhängigen, langanhaltenden Anstiegen der $[Ca^{2+}]_i$ führt (Bianchi *et al.*, 1999) und gleichzeitig eine Ca^{2+} -abhängige, langsame Nachdepolarisation und langanhaltende Plateaupotentiale induziert (Abb. 1.6; Fraser und MacVicar, 1996; Kuzmiski und MacVicar, 2001). Diese Veränderung der Erregbarkeit, die u. a. durch die Stimulation von mGluR hervorgerufen wird, ist in hippocampalen Neuronen seit vielen Jahren bekannt und wird als epilepsieartige Aktivität bezeichnet, die mit der Ausbildung sogenannter Bursts (Dauer im Millisekundenbereich; Merlin und Wong, 1997; Lee *et al.*, 2002) oder Plateaupotentiale (PP; Dauer im Sekundenbereich; Bianchi *et al.*, 2009) einhergeht. Dabei kommt es aufgrund des Zusammenspiels mehrerer Komponenten - Aktivierung von mGluRI, Inhibition von K^+ -Leitfähigkeiten (I_{AHP} , I_M ; Anwyl, 1999; Krause *et al.*, 2002), Aktivierung von I_{CAN} und Ca_v -Kanälen vom L-Typ und die abschließende Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle (Rutecki *et al.*, 2002) - zur Ausbildung hochfrequenter Aktionspotentiale (AP) und dadurch zu einer stark ausgeprägten Zelldepolarisation variabler Dauer (Beck und Yaari, 2008). Die beschriebenen Ereignisse dienen als Grundlage für eine Synchronisation der Aktivität innerhalb einer Zellpopulation (Yaari und Jensen, 1989; Bianchi und Wong, 1995).

Der Botenstoff Glutamat, der im Gehirn den vorherrschenden exzitatorischen Neurotransmitter - u. a. in der trisynaptischen Schleife des Hippocampus von Moosfasern, Schaffer-Kollateralen der CA3-Region und Pyramidenzellen der CA1-Region - darstellt, aktiviert durch die Stimulation von mGluRI Ca^{2+} -abhängige, nichtselektive (TRP-ähnliche) Einwärtsströme mit vergleichbaren Charakteristika in verschiedenen Gehirnregionen (Congar *et al.*, 1997; Tempia *et al.*, 2001; Gee *et al.*, 2003; Tozzi *et al.*, 2003; Bengtson *et al.*, 2004; Faber *et al.*, 2006) und induziert über mGluRs und Kationenkanäle die Entstehung von sEPSP nach repetitiver

Stimulation (Congar *et al.*, 1997). Im Hippocampus ist die Aktivierung von mGluRs zusätzlich an der Ausprägung synaptischer Plastizität beteiligt (Bortolotto *et al.*, 1999). Die synaptische Plastizität ist definiert als die aktivitätsbedingte Veränderung der synaptischen Übertragung. Diese Veränderungen können sowohl durch Änderung der Morphologie (Ausbildung oder Abbau von Synapsen) als auch der Physiologie der Synapse (z.B. Typen und Anzahl postsynaptisch lokalisierter Rezeptoren) erzielt werden. Zur Ausprägung der synaptischen Plastizität zählt zum einen die Langzeitpotenzierung (LTP), eine lang anhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragung, zum anderen die Langzeitdepression (LTD), die eine lang anhaltende Erniedrigung der synaptischen Übertragung beschreibt und somit eine gegensätzliche Ausprägung zur LTP darstellt.

Der durch Congar *et al.* beschriebene I_{CAN} in der CA1-Region wurde aufgrund seiner Charakteristika zum einen in Verbindung gebracht mit der Ausbildung von synaptischer Plastizität, zum anderen mit der exzitatorischen Wirkung von Glutamat unter pathologischen Bedingungen wie Epilepsie und Ischämie, einer mangelhaften Versorgung einzelner Organe mit Blut (Congar *et al.*, 1997).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Der im vorherigen Abschnitt beschriebene Ca^{2+} -abhängige, nichtselektive Kationenstrom in der CA1-Region des Hippocampus (Congar *et al.*, 1997) und die überlappende Expression der TRPC-Isoformen TRPC1, TRPC4 und TRPC5 innerhalb des Hippocampus (Abb. 1.4) legen die Vermutung nahe, dass TRPC-Untereinheiten in die Generation des I_{CAN} involviert sind, wie es bereits für andere Gehirnareale beschrieben ist (Hartmann *et al.*, 2008; Riccio *et al.*, 2009).

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren deshalb

1. die Induktion eines nichtselektiven Kationenstroms in CA1-Neuronen der C57bl6/129SV Wildtyp-Maus (WT oder TRPC1^{+/+}),
2. die Analyse der Funktion eines Mitgliedes der TRPC-Subfamilie, TRPC1, bei der Vermittlung des I_{CAN} mithilfe eines TRPC1-defizienten Mausmodells (TRPC1^{-/-}, homozygote Knockoutmaus),
3. die Charakterisierung des I_{CAN} vergleichend zwischen WT und der TRPC1^{-/-}-Maus,
4. die Prüfung der physiologischen Konsequenzen der Stimulation von mGluRI im WT und in der TRPC1^{-/-}-Maus und
5. die Untersuchung der Rolle von TRPC1 während der postnatalen Entwicklung des Hippocampus.

2. Material und Methoden

2.1. Lösungen, Chemikalien und Primer

Lösungen für elektrophysiologische Experimente, Molekularbiologie und Histochemie:

Die eingesetzten Lösungen wurden unter der Verwendung von doppelt-destilliertem Wasser (ddH₂O) aus einer Optipure Analytical-Anlage (MembraPur GmbH, Bodenheim, D) hergestellt.

Die Einstellung des pH-Wertes und die Bestimmung der Osmolarität einer Lösung erfolgte mit dem pH-Meter InoLab[®] 720 (WTW, Weilheim, D) bzw. mithilfe des Osmometers Vapro[®] 5520 (Vapor Pressure Osmometer, Wescor, Langenfeld, D). Die Osmolarität von Lösungen für elektrophysiologische Experimente lag zwischen 290 - 310 mosm/l. Die meisten Lösungen wurden bei 4 °C im Kühlschrank bzw. Kühlraum gelagert.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden vornehmlich von BioTrend (Köln, D), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D) oder Roth (Karlsruhe, D) bezogen. Die Zusammensetzung der für elektrophysiologische Experimente (A.2.1.1 und A.2.1.2), Molekularbiologie (A.2.2) und Histochemie (A.2.3) eingesetzten Lösungen sind im Anhang aufgelistet und die Herkunft der dazu verwendeten Chemikalien in A.3 vermerkt.

Primer (Oligonukleotide):

Die zur Genotypisierung von Mäusen und zur Durchführung von quantitativen real-time PCRs eingesetzten Primer sind im Anhang zu finden (A.4) und wurden von MWG Operon (Ebersberg, D) bezogen.

2.2. Zellkultur von HEK293-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK293-Zellen - eine Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen („human embryonic kidney cells“) - als heterologes Expressionssystem verwendet.

HEK293-Zellen wurden in 250 ml Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, D) bei 37 °C unter befeuchteter Atmosphäre und 5 % Kohlendioxid (CO₂) in einem CO₂-Inkubator (HeraCell[®] 150,

Heraeus, Wehrheim, D) kultiviert. Zur Kultivierung der HEK293-Zellen wurde „minimal essential medium with Earle’s salts“ (EMEM, PAA Laboratories, Cölbe, D) verwendet. EMEM wurde ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum (Invitrogen, Karlsruhe, D), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (beide PAA Laboratories). Bei einer Konfluenz der Zellen von 80 bis 90 % wurden diese mit 10 ml Phosphat-gepufferter Saline (Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline (PBS), 1x, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , PAA Laboratories) gewaschen, um abgestorbene Zellen und zweiwertige Kationen zu entfernen, mit 2 ml einer 0,02 % EDTA / 0,05 % Trypsin-Lösung (PAA Laboratories) vom Boden der Kulturflasche abgelöst und in 10 ml EMEM aufgenommen. 10 % der Zellen wurden in eine neue Flasche eingesät. Für transiente Transfektionen wurde die Anzahl der Zellen mithilfe einer Neubauer Zählkammer (Roth) bestimmt und jeweils 300.000 HEK293-Zellen in 35 mm Kulturschalen (Nunc, Langenselbold, D) in 1,5 ml Medium vereinzelt.

2.2.1. Transiente Transfektion von Plasmid-DNA

Zum Einbringen von rekombinanter DNA, z. B. eines definierten Ionenkanals oder Rezeptors und damit verbundener Überexpression des entsprechenden Proteins in HEK293-Zellen, wurde der pcDNA3-Vektor eingesetzt. Zwei Tage nach dem Einsäen der HEK293-Zellen wurden pro 35 mm Kulturschale 2 µg Kanal-pcDNA (mTRPC5-YFP oder hTRPC6) und 0,5 µg Rezeptor-pcDNA für mAChR (rM5R) mithilfe des Lipofektionsreagenz TransIT[®] (Mirus Bio Corporation, Madison, USA) kotransfiziert. Bei Transfektionen von Kanaluntereinheiten, die kein fluoreszierendes Markerprotein (hTRPC6) enthielten, wurden zusätzlich 0,1 µg YFP beigefügt. Hierfür wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 100 µl EMEM ohne fötales Kälberserum bei Raumtemperatur (RT) vorgelegt. Nachdem das TransIT[®] vollständig aufgetaut bzw. schlierenfrei war, wurde es kurz mit dem Vortex (VortexGenie2, Scientific Industries, New York, USA) durchmischt. Pro Mikrogramm eingesetzter pcDNA wurden dem EMEM 3 µl TransIT[®] beigemischt und für fünf Minuten bei RT inkubiert. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurde die entsprechende pcDNA vorgelegt. Anschließend wurde das Lipofektionsreagenz-Medium-Gemisch auf die pcDNA getropft und für weitere 20 bis 25 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit umschloss das lipophile TransIT[®] die pcDNA und ermöglichte somit, nach Zugabe des Gemisches zu HEK293-Zellen, den Durchtritt der pcDNA über die Membran in die Zelle. Die Transfektionszeit betrug zwei Tage.

2.2.2. Vorbereitung der Zellen für Experimente

Für Patch-Clamp-Experimente wurden transfizierte HEK293-Zellen auf 10 mm Glasplättchen (Menzel Gläser, Braunschweig, D) vereinzelt. Hierzu wurden die zwei Tage zuvor transfizierten

Zellen mit 1000 μ l PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 300 μ l EDTA-Trypsin enzymatisch vom Untergrund gelöst. Durch Hinzupipettieren von 1500 μ l EMEM wurde diese Reaktion gestoppt und die Zellen weiterhin mechanisch vereinzelt. Zum Schluss wurden zwischen 250 - 300 μ l der Zellen auf den vorbereiteten Glasplättchen verteilt und die Zellen bis zum Versuch am selben Tag im Brutschrank aufbewahrt. Die Expression der transfizierten pcDNAs in HEK293-Zellen wurde mittels Fluoreszenz kontrolliert (Quecksilberdampfampe U-RFL-T; YFP-Filter U-MNIBA2 (YFP: Extinktion 470 - 490 nm/Emission 510 - 550 nm), beides Olympus, Hamburg, D).

2.3. Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden Versuche in hippocampalem Gewebe von männlichen C57bl6/129SV-Mäusen zweier Genotypen durchgeführt: Wildtyp - (WT oder TRPC1^{+/+}) und homozygoten Knockoutmäusen (TRPC1^{-/-}). Eingesetzt wurden die Tiere im Alter von 10 - 35 Tagen nach der Geburt (postnatal, P10 - P35). Die Mäuse wurden in „isolated ventilated cages“ gehalten, hatten unbegrenzten Zugang zu Futter und Wasser und unterlagen einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Die verwendeten Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Alexander Dietrich (mittlerweile: Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt. Die gendefizienten Mäuse wurden auf einem C57bl6/129SV genetischen Hintergrund gezüchtet (Dietrich *et al.*, 2007). Ab einem Alter von etwa 20 Tagen postnatal wurden die Jungtiere abgesetzt und jeweils weibliche und männliche Tiere voneinander getrennt. Die Durchführung aller Tierexperimente erfolgte entsprechend der genehmigten Anzeige V 54 - 19 c 20/15 c MR 20/29 (Regierungspräsidium Gießen).

2.3.1. Präparation des Nagergehirns

Eine 10 bis 35 Tage alte Maus wurde mit Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, D) narkotisiert und dekapitiert (Präparationsbesteck mit Dumont-Pinzetten, kleine/große Schere, Löffelspatel und Spatel von Fine Science Tools, Heidelberg, D; Storz Instrument GmbH, Heidelberg, D; Roboz, Gaithersburg, USA). Das Fell am Oberkopf wurde durch einen medianen Schnitt mit einer Rasierklinge (Campden Instruments, Loughborough, GB) durchtrennt. Mithilfe von zwei zusätzlichen Schnitten an beiden Seiten wurde die Haut im Bereich der Ohren vom Schädel getrennt. Um Reste vom Rückenmark zu entfernen, wurde mit einer feinen Schere ein transversaler Schnitt am Schädel durchgeführt. Ausgehend vom *Magnum foramen* wurden anschließend zwei kleine Schnitte zu den Ohren und ein langer, median verlaufender Dorsalschnitt bis zum olfaktorischen Bulbus ausgeführt (Hetzl, 2008). Jetzt wurden die oberen Schädelteile mit

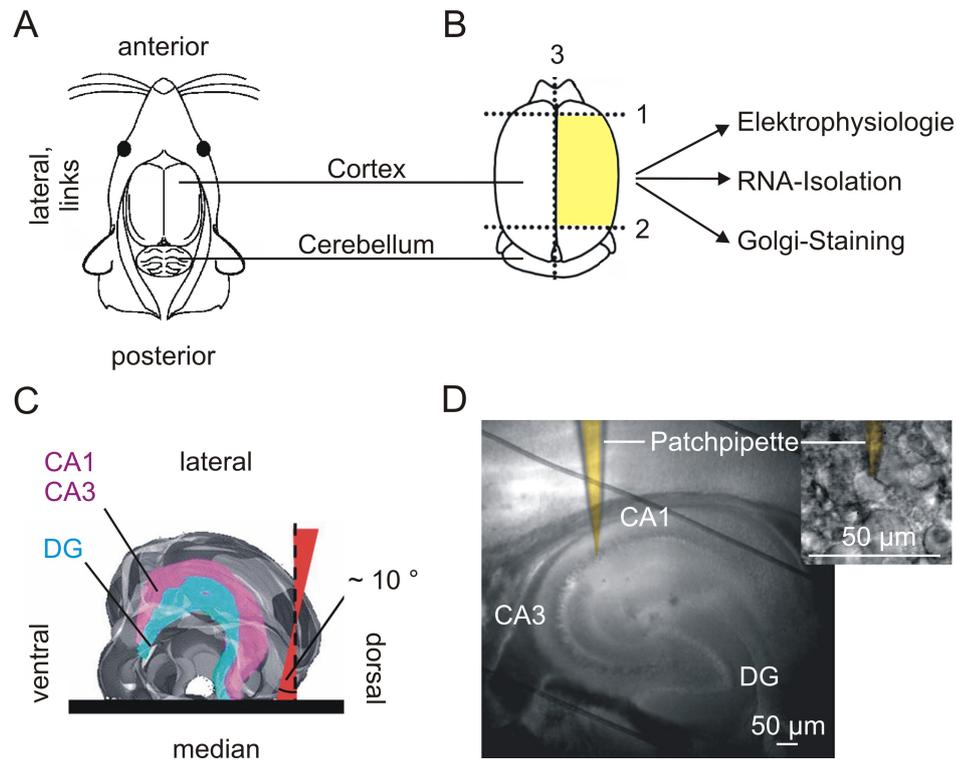


Abb. 2.1.: Gehirnpräparation und Herstellung horizontaler Hippocampusschnitte für elektrophysiologische Untersuchungen.

In **A** ist die Dorsalansicht des Nagergehirns nach Poolos und Jones (2004) dargestellt, eine Hemisphäre des Cortex und das Cerebellum sind gekennzeichnet. Nach der Entnahme des Gehirns aus dem Schädel (**B**) wurde durch zwei coronale Schnitte (1 und 2) und einem medianen Schnitt (3) ein Gewebekblock angefertigt, der den Hippocampus enthielt (Gogolla *et al.*, 2006). Die einzelne Hemisphäre (gelb hinterlegt) konnte nun für unterschiedliche Untersuchungen (Elektrophysiologie, RNA-Isolation, Golgi-Staining) herangezogen werden. Der in **C** abgebildete Präparationsschritt nach Bischofberger *et al.* (2006) wurde eingesetzt, um horizontale Schnitte des dorsalen Hippocampus anzufertigen und ermöglichte die Herstellung von Präparaten mit unverletzten und damit intakten Zellen für elektrophysiologische Untersuchungen (blau, *Gyrus dentatus* (DG); violett, CA1- und CA3-Region). In **D** sieht man die hippocampale Formation mit DG, CA1- und CA3-Region in einem 200 µm dicken Horizontalschnitt. Ergänzend ist die Lokalisation einer Patchpipette (nachträglich eingefärbt) in der CA1-Region und in der Vergrößerung an einem CA1-Neuron dargestellt.

einer Pinzette zur Seite gebogen und damit das Gehirn freigelegt. Zwischendurch wurde das Gehirn mit eisgekühlter Saccharose-basierter Präparationslösung (siehe Anhang A.2.1.1.1.) nach Bischofberger *et al.* (2006) zum Kühlen beträufelt. Anschließend wurde es mit einem feinen Spatel aus dem Schädel gelöst, die optischen Nerven mit einer feinen Schere durchtrennt und das Gehirn für eine kurze Erholungsphase in eisgekühlter Saccharose-basierter Präparationslösung aufgenommen.

Das Gehirn wurde mit seiner dorsalen Seite auf eine vorgekühlte Metallplatte gelegt. Mit einer Rasierklinge wurden der caudale Teil (etwa $\frac{1}{5}$ der Länge des Gehirns) und danach der rostrale Teil etwa gleicher Größe abgetrennt. Durch einen median verlaufenden Schnitt wurden nun die beiden Hemisphären voneinander getrennt (Abb. 2.1 A und B; Bischofberger *et al.*, 2006). Entweder wurde eine Hemisphäre für elektrophysiologische Versuche und die andere zur Isolation der RNA aus dem Gesamthippocampus genutzt, oder es wurden beide Hemisphären für die RNA-Isolation oder die Histochemie eingesetzt.

2.3.2. Herstellung von Gehirnschnitten

Um horizontale Schnitte der hippocampalen CA1-Region anzufertigen, wurde eine Hemisphäre mit der medianen Schnittfläche auf einer Rasierklinge positioniert, wie es in Abbildung 2.1 C gezeigt ist. Mit einer zweiten Rasierklinge wurde nun vom dorsalen Bereich des Gehirns in einem Winkel von circa 10 ° ein Stück Gewebe entfernt (Bischofberger *et al.*, 2006). Mit der so neu entstandenen Schnittfläche wurde der Gehirnblock, der die gesuchte Gehirnregion enthielt, auf einem gekühlten Schneideblock des Vibratoms (Slicer HR2, Sigmann-Elektronik, Hüffenhardt, D) per Zyanoacrylat (UHU, Bühl/Baden, D) fixiert. Der Block wurde in der mit eiskalter, teilweise gefrorener Saccharose-basierten Präparationslösung gefüllten Schneidekammer des Vibratoms befestigt. Es wurden 200 µm dicke Gehirnschnitte angefertigt. Das Schneiden mithilfe einer Rasierklinge erfolgte bei einer Geschwindigkeit von 0,03 - 0,04 mm/s, bei einer Vibrationsfrequenz von 80 - 85 Hz und einer Amplitude von 1,0 mm. Die Schnitte wurden mittels einer Glaspipette mit Saugaufsatz in ein Becherglas, gefüllt mit Carbogenbegaster Aufbewahrungslösung, überführt (siehe Anhang A.2.1.1.2.; verändert nach Hetzel (2008) und Abrahamsson *et al.* (2008)). Zur Erholung wurden die Schnitte für 30 Minuten bei 35 °C im Wasserbad (institutsinterne Werkstatt; Badthermostat, Haake DC 10, Thermo, Karlsruhe, D) inkubiert und anschließend bis zu den Messungen bis zu acht Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.4. Elektrophysiologie

2.4.1. Die Patch-Clamp-Technik

Durch die Entwicklung der sogenannten Patch-Clamp-Technik, die zum ersten Mal von Neher und Sakmann (1976) beschrieben und in den folgenden Jahren weiterentwickelt und verfeinert wurde (Hamill *et al.*, 1981; Sakmann und Neher, 1984), ist es möglich, Ströme von circa 1 pA durch einzelne Ionenkanäle der Zellmembran darzustellen und zu untersuchen.

2.4.1.1. Messkonfigurationen

In Patch-Clamp-Messungen wird eine mit Elektrolytlösung gefüllte Mikropipette mit einem Spitzendurchmesser von circa 1 μm an die Zellmembran gepresst und durch Anlegen eines Unterdruckes der Membranfleck oder *Patch* von der Umgebung elektrisch isoliert (Abb. 2.2 A; *Cell-Attached* (CA)-Modus). Der Widerstand zwischen Pipette und Zellmembran beträgt in diesem Modus mehr als 1 Gigaohm ($G\Omega$, *Giga-Seal*), welches auf die große Nähe von etwa 1 nm zwischen Oberfläche der Glaspipette und der Zellmembran zurückzuführen ist. Eine Eigenschaft dieses CA-Modus ist, dass das Zellinnere weitgehend unverändert bleibt, wodurch einerseits während einer Messung relativ „lebensechte“ intrazelluläre Bedingungen vorherrschen, die Zusammensetzung des Cytosols und damit das Membranpotential jedoch unbekannt sind.

Wegen der hohen mechanischen Belastbarkeit des Seals können drei weitere Patch-Clamp-Konfigurationen erzielt werden: Inside-Out, Whole-Cell und Outside-Out. Bewegt man die Pipette im CA-Modus von der Zellmembran fort, wird der Membranfleck in der Pipette von der Zelle abgezogen. Seine vormals intrazelluläre Seite ist nun zur Badlösung gerichtet (*Inside-Out*-Modus). In dieser Konfiguration können daher - im Gegensatz zum CA-Modus - Einzelkanalströme unter definierten Bedingungen auf beiden Seiten der Membran untersucht werden. Da für gewöhnlich die Badlösung leicht austauschbar ist, werden Messungen im Inside-Out-Modus oft dafür benutzt, um die Effizienz intrazellulärer Regulatoren von Ionenkanälen zu testen.

Der *Ganzzell*- oder *Whole-Cell* (WC)-Modus (Abb. 2.2 A) wird durch die Applikation eines starken Unterdrucks auf die Pipette in der CA-Konfiguration erreicht. Dadurch wird der Membranfleck unter der Pipette zerstört und man erlangt über die Elektrode in der Pipette einen direkten elektrischen Zugriff mit geringem Widerstand (idealerweise $< 10 M\Omega$) auf das Zellinnere. Das intrazelluläre Milieu wird durch die Elektrolytlösung in der Pipette per Diffusion passiv ausgetauscht. Dies führt zu definierten Bedingungen in Bezug auf die Zusammensetzung der Lösungen sowohl extra- als auch intrazellulär. Im WC-Modus können für gewöhnlich keine Einzelkanalströme aufgelöst werden, vielmehr wird die *Summenaktivität aller offenen Ionenkanäle* in der gesamten Zellmembran gemessen. Die in dieser Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Messungen wurden ausschließlich im WC-Modus durchgeführt.

Sollen Einzelkanalströme unter verschiedenen Konditionen auf der extrazellulären Seite der Membran untersucht werden, wird der *Outside-Out*-Modus verwendet. Diesen erreicht man ausgehend vom WC-Modus durch Abziehen der Pipette von der Zellmembran. Das führt zu einem Patch, dessen extrazelluläre Seite zur Badlösung gerichtet ist.

2.4.2. Der elektrophysiologische Messplatz

2.4.2.1. Mechanische Komponenten und Lösungsperfusion

In einer von der institutsinternen Werkstatt gebauten Versuchskammer wurde das Präparat, entweder ein mit transfizierten HEK293-Zellen bestücktes Glasplättchen oder ein Gehirnschnitt, platziert. Um Bewegungen des Schnittpräparates (Schwimmen im Bad) aufgrund von Strömungen durch die Lösungsperfusion zu verhindern, wurden die Schnitte mit einem U-förmigen Platindraht und darüber gespannten Nylonfäden fixiert. Die Versuchskammer wurde mithilfe eines in xy-Richtung manuell beweglichen Mikromanipulators (Luigs & Neumann, Ratingen, D) im Strahlengang des Mikroskops positioniert. Versuchskammer, Mikroskop und Mikromanipulatoren waren auf einem durch Druckluft (Aire Liquide, Düsseldorf, D) schwingungsgedämpften Tisch (Vibraplane, Kinetic Systems, Boston, USA) befestigt, um mechanische Störungen (Vibration) zu unterbinden. Zusätzlich wurden elektromagnetische Störungen abgeschirmt, indem der komplette Messplatz innerhalb eines Faraday'schen Käfigs (institutsinterne Werkstatt) positioniert wurde.

Das Präparat wurde während der gesamten Dauer eines Versuches kontinuierlich mit extrazellulärer Lösung unter Einsatz einer Perfusionspumpe (RegloAnalog, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, D) umspült. Das Einleiten von Agonisten und Antagonisten in die Versuchskammer erfolgte aus einem zweiten, separat geschalteten Spritzen-Schlauchsystem (50 ml Spritzen (Omnifix[®], Perfusor[®], luerlock), Braun, über Kobe; Silikon- und Polyethylenschläuche, verschiedene Durchmesser, über Kobe) über Gravitation und eine Absaugpumpe (Rietschle, Schopfheim, D). Alle Experimente fanden bei Raumtemperatur statt (20 - 25 °C).

2.4.2.2. Das bildgebende Verfahren

Die Visualisierung des Präparates erfolgte mittels IR-DIC Videomikroskopie (infrared differential interference contrast, Infrarot-Differential-Interferenz-Kontrast; Stuart *et al.*, 1993). Dazu dienten eine IR CCD Kamera (VX55, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D), die auf einem aufrechten Mikroskop (BX51WI, Olympus) montiert wurde, und eine Halogenlampe (TH4-200, Olympus) als Lichtquelle. Mithilfe eines Übersichtsobjektivs (UPlanFI 4x, Olympus) wurde im Gewebeschnitt die gewünschte Gehirnregion, z.B. CA1-Region des Hippocampus, identifiziert. Eine detailliertere Darstellung von Zellverbänden im Gewebeschnitt, einzelner Zellen bei Verwendung des heterologen Systems und die Identifikation transfizierter Zellen mittels Fluoreszenz erfolgte anschließend mit einem 40x Wasserimmersionsobjektiv (LUMPlanFI/IR 40x, Olympus). Bei Bedarf kam ein zusätzlicher Zoom (Fourfold-changer (1x, 2x, 4x), Luigs & Neumann) zum Einsatz. Einzelne Zellen und Übersichten wurde auf einem Videomonitor (Black and White, PVM-145E, Sony, D) dargestellt und mit einem di-

gitalen Videokonverter (Plextor ConvertX PX-AV200U, Plextor Europe, Belgien) und dem Programm „Presto! Digital Converter 1.09“ (NewSoft, USA) dokumentiert (Abb. 2.1 D).

2.4.2.3. Pipetten und Elektroden

Glaspipetten wurden aus dünnwandigem Borosilikatglas mit Filament (GB 150TF-8P 1,05 x 1,5 x 80 mm, Science Products GmbH, Hofheim, D) gezogen. Das Ziehen der Pipetten erfolgte mithilfe eines Horizontalpullers (DMZ-Universal-Puller und Heizfilamente (3 mm), Zeitz-Instrumente GmbH, Planegg, D) mit anschließendem Feuerpolieren der Pipettenspitze. Für Versuche im WC-Modus wurden Pipetten mit einem Widerstand von 2,5 - 4,5 M Ω hergestellt. Die Bestimmung des Pipettenwiderstands erfolgte jeweils nach Eintauchen der Pipette in die extrazelluläre Lösung bei angelegtem Überdruck.

Nach dem Befüllen der Pipette mit intrazellulärer Lösung (siehe Anhang A.2.1.2) wurde diese in einem Pipettenhalter (Polycarbonat; HEKA Elektronik, Lambrecht, D) befestigt. Eine Silber/Silberchlorid-Elektrode (Ag/AgCl-Draht, World Precision Instruments WPI, Berlin, D) mit einem Durchmesser von 0,25 mm diente als direkte Verbindung zwischen der intrazellulären Lösung der Pipette und dem Verstärker. Auch die verwendete Bad- oder Referenzelektrode war ein Pellet-Ag/AgCl-Draht (Pellet-Durchmesser 2 mm; Ag/AgCl-Elektrode mit Pellet, WPI), der dem Schluss des Stromkreises beim Eintauchen in die Badlösung und der Erdung diente.

Pipettenhalter und Vorverstärker waren auf einem in xyz-Richtung beweglichen, elektrisch betriebenen Mikromanipulator (Luigs & Neumann) befestigt, der über ein externes Steuerelement (SMI, Luigs & Neumann) bewegt werden konnte.

2.4.2.4. Elektrische Komponenten

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Datenaufnahme mithilfe eines EPC10 Patch-Clamp-Verstärkers (HEKA Elektronik). Die Steuerung des Verstärkers wurde über einen PC (Dell Dimension 8400) mit dem Programm „Pulse v8.74“ (HEKA Elektronik) durchgeführt. Dieses ermöglichte sowohl die Kontrolle des Verstärkers als auch die gleichzeitige Aufzeichnung der Daten.

Bis auf den Vorverstärker (headstage oder probe) waren alle weiteren elektronischen Komponenten, wie Hauptverstärker, Monitor und Rechner, außerhalb des Faraday'schen Käfigs positioniert, um Störungen während der Messungen zu minimieren.

Das Prinzip des Verstärkers:

Die Membran einer Zelle stellt einen Ohm'schen Widerstand dar (Membranwiderstand, R_m),

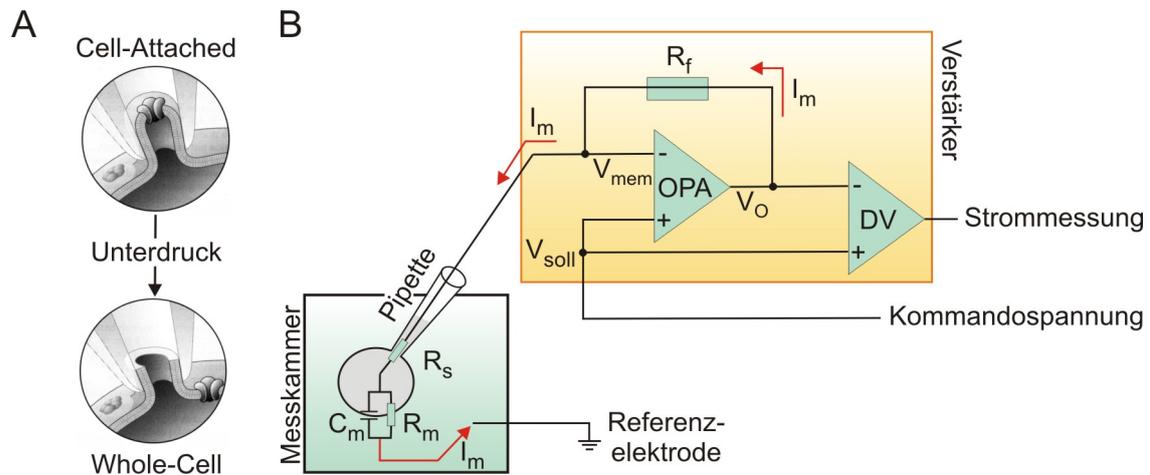


Abb. 2.2.: Messkonfigurationen im Patch-Clamp und das Prinzip des Verstärkers.

In **A** ist die Ausbildung des Giga-Seals, das Erreichen der Cell-Attached (CA)-Konfiguration und der durch applizierte Unterdruck herbeigeführte Übergang in den Whole-Cell (WC)-Modus dargestellt (weitere Erläuterungen siehe Text; verändert nach Numberger und Draguhn, 1996). In **B** ist der vereinfachte Schaltkreis des Verstärkers im Voltage-Clamp und das vereinfachte Schaltbild einer Zelle im WC-Modus abgebildet (detaillierte Erläuterungen siehe Text; Verstärker: OPA, Operationsverstärker; R_f , Rückkopplungswiderstand; DV, Differenzverstärker; V_{soll} , Kommandospannung; V_{mem} , Membranspannung; V_O , Ausgangsspannung; I_m , Kompensationsstrom; Messkammer: R_m , Membranwiderstand; C_m , Membrankapazität; R_s , Zugangs-/Serienwiderstand; verändert nach Salonikidis, 2007).

dessen Eigenschaften über die geöffneten Kanäle in der Membran definiert werden. Des Weiteren verfügt die Zellmembran über kapazitive Eigenschaften (Membrankapazität, C_m). R_m und C_m sind zueinander parallel geschaltet und bilden ein *RC-Glied* (R , Widerstand; C , Kapazität), wie es in Abbildung 2.2 B dargestellt ist. Der im WC-Modus hergestellte direkte Zugang zur Zelle ermöglicht es, der Zelle ein definiertes Potential vorzugeben. Hierdurch kommt es zu einem Stromfluss, der die Umladung von C_m bedingt und über R_m abfließt.

In der Patch-Clamp-Technik wird eine einzelne Elektrode genutzt, um sowohl das Potential der Zelle zu bestimmen als auch eine Injektion eines Kompensationsstroms durchzuführen. Der diesem Prinzip zugrunde liegende, stark vereinfachte elektrische Schaltkreis ist in Abbildung 2.2 B für Messungen im *Voltage-Clamp* (VC, Spannungsklemme) dargestellt.

Der abgebildete Schaltkreis stellt einen Strom-Spannungswandler dar. Die Hauptbestandteile des Verstärkers sind der *Operationsverstärker* (operational amplifier, OPA) und der *Rückkopplungswiderstand* (R_f). Im VC wird das Membranpotential der Zelle durch eine gewählte Kommandospannung (V_{soll}) durch den Experimentator vorgegeben (z. B. ein Haltepotential (V_h) von -60 mV oder eine Spannungsrampe von +60 bis -100 mV). Die Zelle wird auf

V_{soll} „geklemmt“. V_{soll} liegt am nicht-invertierenden (+) Eingang des OPA an. Am zweiten, invertierenden Eingang des OPA liegt die Potentialdifferenz zwischen Pipetten- und Referenzelektrode, also die Membranspannung (V_{mem}) an. Der OPA bestimmt die Abweichung von V_{mem} zu V_{soll} , wenn z. B. ein Strom durch Ionenkanäle über die Zellmembran fließt, und gibt an seinem Ausgang eine zur Differenz proportionale und in Abhängigkeit von R_f verstärkte Spannung (V_O) aus. Induziert durch V_O fließt ein entgegengesetzter Strom (= Kompensationsstrom, I_m) über den zum OPA parallel geschalteten Rückkopplungswiderstand R_f . Da der OPA unendlich hohe Eingangswiderstände besitzt, kann der Kompensationsstrom nur in die Pipette fließen. Dies führt solange zur Änderung von V_{mem} , bis sich die Differenz von V_{soll} und V_{mem} ausgleicht. Diese Rückkopplung erfolgt sehr schnell und präzise, so dass V_{mem} als V_{soll} angenommen werden kann, d. h. V_O gegen Null geht. Dies kann in der Gleichung $V_O = V_{\text{soll}} - I_m \cdot R_f$ zusammengefasst werden. I_m entspricht dabei dem Strom, der durch Ionenkanäle über die Zellmembran fließt, und benötigt wird, um $V_{\text{mem}} = V_{\text{soll}}$ aufrechtzuerhalten. Die Bestimmung von I_m erfolgt dabei mithilfe eines nachgeschalteten Differenzverstärkers (DV), der V_{soll} von V_O subtrahiert. Hieraus ergibt sich I_m in Abhängigkeit von R_f aus der oben genannten Gleichung. Die Umwandlung des Signals durch einen Analog/Digital-Wandler und die Dokumentation des Kompensationsstroms wurde mittels Pulse v8.74 vorgenommen (Numberger und Draguhn, 1996; Sigworth, 1983; HEKAManual, 2008). Dabei erfolgt während Messungen in der WC-Konfiguration die Darstellung von Einwärtsströmen, d. h. dem Einstrom von Kationen in die Zelle, als negativer, die Abbildung von Auswärtsströmen, d. h. dem Ausstrom von Kationen aus der Zelle hinaus, hingegen als positiver Strom (siehe Abb. 2.5 A).

Versuche im VC ermöglichen die Messung von Strömen über die Membran als Resultat von Ionenkanalaktivität. Zusätzlich können intrinsische Faktoren der Ionenkanäle, wie Aktivierungsmechanismus oder Spannungsabhängigkeit, charakterisiert werden. Bei dem verwendeten EPC10-Verstärker konnten in Abhängigkeit vom Verstärkungsbereich drei mögliche Rückkopplungswiderstände gewählt werden: 5 M Ω , 500 M Ω , 50 G Ω . Für Messungen im Ganzzellmodus wurde in dieser Arbeit der mittlere Rückkopplungswiderstand (500 M Ω) gewählt, mit dem Ströme von 0,5 - 20 nA aufgezeichnet werden können (HEKAManual, 2008).

Bei Experimenten in der Stromklemme (*Current-Clamp*, CC) wird die Zelle hingegen auf einen Kommandostrom I_{soll} „geklemmt“ und das Potential zwischen Pipettenelektrode und Badelektrode gemessen. Der im VC-Modus beschriebene elektrische Schaltkreis des Verstärkers wird analog eingesetzt. Der CC wird zum einen dazu verwendet, den spontanen zeitlichen Verlauf des Membranpotentials, z. B. Depolarisation der Zellmembran nach pharmakologischer Stimulation der Zelle und Bildung von Aktionspotentialen, zu registrieren. In diesem Fall wird der Zelle kein Kommandostrom vorgegeben. Der Verstärker arbeitet damit als sogenannter

Spannungsfolger. Zum anderen kann der CC genutzt werden, um eine Potentialänderung nach Strominjektion, z. B. eine depolarisierende Strominjektion, darzustellen.

Kompensationsprozeduren:

Der EPC10-Verstärker bietet die Möglichkeit, Spannungsdifferenzen, die durch Komponenten innerhalb des Messsystems auftreten, durch Erweiterungen bzw. Ergänzungen des zuvor beschriebenen elektrischen Schaltkreises zu eliminieren (HEKAManual, 2008).

1. *Ausgleich von Offset-Potentialen:*

Sogenannte „Offset“-Potentiale entstehen aufgrund unterschiedlicher Ionenzusammensetzungen beteiligter Komponenten innerhalb eines Messsystems. Sie entstehen an Grenzflächen von Flüssigkeit und Metall (z. B. zwischen Ag/AgCl-Draht im Pipettenhalter und intrazellulärer Lösung oder Badelektrode und extrazellulärer Lösung) oder von verschiedenen Flüssigkeiten (liquid junction potential, LJP; z. B. zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Lösung). Um Offset-Potentiale als Summe der auftretenden Grenzflächenpotentiale zu verringern, wurde am Anfang eines jeden Versuches beim Eintauchen der Pipette in die extrazelluläre Lösung der Nullpunkt des Potentials definiert, bei dem zwischen Pipette und Bad kein Strom fließt. Das auftretende LJP zwischen intra- und extrazellulärer Lösung wurde nicht gesondert korrigiert.

2. *Korrektur von Kapazitäten:*

Die elektrische Kapazität eines Gegenstandes ist definiert als die Ladungsmenge, die benötigt wird, um den Gegenstand mit einem elektrischen Potential zu versehen. Während elektrophysiologischer Messungen spielen sowohl die Kapazität des Rückkopplungswiderstands R_f , der keinen idealen Ohm'schen Widerstand ohne kapazitive Komponente darstellt, als auch die kapazitiven Eigenschaften von Pipette und Zellmembran (C_m) eine wichtige Rolle. Eine Veränderung von V_{soll} führt nicht zu einer sofortigen, instantanen Veränderung der Membranspannung, da zunächst die Kapazitäten von Pipette und Zellmembran umgeladen werden müssen. Als Antwort auf einen applizierten Testpuls von -5 mV für 5 ms (Abb. 2.3 A) zeigen sich schnell ansteigende und exponentiell abfallende, sogenannte transiente (kapazitive) Ströme. Da diese transienten Ströme sehr hohe Werte annehmen können, die das eigentliche Messsignal stören und überlagern bzw. zu einer Sättigung des Verstärkers führen könnten, wurden sie in jeder Messung korrigiert. Indem der zur Umladung der Kapazitäten benötigte Strom nicht über den Regelkreis des Verstärker, sondern über einen parallel geschalteten Stromkreis injiziert wird, wird der transiente Strom nicht mehr als Signal angezeigt.

Dabei verfügte der verwendete EPC10-Verstärker über zwei automatische Korrekturme-

chanismen: Die schnelle Kompensation (C_{fast}) wird zur Korrektur kapazitiver Ströme der Pipette und des Pipettenhalters genutzt. Sie wurde in der CA-Konfiguration durchgeführt und im weiteren Verlauf des Versuches nicht mehr verändert.

Die langsame Kompensation (C_{slow}) dient der Korrektur von Umladeströmen der Zellmembran. Sie wurde deshalb nach dem Übergang von der CA- in die WC-Konfiguration ausgeführt. Die Amplitude und Kinetik der kapazitiven Ströme sind dabei ein direktes Maß für Membrankapazität (C_m) und Serienwiderstand (R_s , siehe kommender Abschnitt). Dabei ist die Zeitkonstante (τ) direkt abhängig von C_m und R_s (für $R_s \gg R_m$ gilt: $\tau = R_s \cdot C_m$) und gibt die Zeit an, in der der Stromtransient auf circa $\frac{1}{3}$ der Anfangsamplitude absinkt. Dies ermöglicht die direkte Bestimmung von C_m über C_{slow} und damit die Abschätzung der Zellgröße, da die Zelloberfläche die Membrankapazität bestimmt.

3. Kompensation des Zugangs- oder Serienwiderstands R_s :

Beim Übergang von der CA- zur WC-Konfiguration wird der Membranfleck unter der Pipette durch Unterdruck zerstört. Man erlangt einen direkten, elektrischen Zugang von der Pipette zum Zellinneren. Der Zugangs- oder Serienwiderstand R_s , der mit dem Membranwiderstand (R_m) in Reihe geschaltet ist (Abb. 2.2 B), entsteht zum einen durch den Pipettenwiderstand, zum anderen durch Membranfragmente im Bereich der Pipettenöffnung, die den Zugang von der Pipette zur Zelle erschweren. Er verlangsamt die Umladung der Zellmembran bei Veränderung der Kommandospannung V_{soll} , indem er den Fluss des Kompensationsstroms I_m in die Zelle behindert (zeitliche Verzögerung = kinetischer Fehler). Ein Teil von V_{soll} fällt über R_s ab, sodass V_{soll} und V_{mem} nicht identisch sein können. Dieser Spannungsfehler, der sich durch den Spannungsabfall über R_s ergibt und die Messung erheblich beeinträchtigen kann, je größere Werte R_s und I_m annimmt, kann mithilfe des Ohm'schen Gesetzes beschrieben werden: $V = R_s \cdot I_m$. Zur Verbesserung der WC-Messungen wird der Spannungsverlust über R_s kompensiert, indem der vorgegebenen Kommandospannung ein zusätzlicher Anteil hinzugefügt wird. Der Spannungsabfall über R_s kann jedoch nicht vollständig ausgeglichen werden, da der positive Rückkopplungsmechanismus dieser Kompensation zu Schwingungen und damit zur Oszillation führen würde. Als Faustregel gilt: Je kleiner R_s , desto größer der Strom, der R_s passieren kann, desto schneller erfolgt die Umladung der Membrankapazität C_m . Daraus folgt: je kleiner R_s , desto schneller wird die gewünschte (vorgegebene) Spannung in der Zelle erreicht (Numberger und Draguhn, 1996).

2.4.3. Durchführung einer Messung

Nachdem das Präparat, entweder ein Glasplättchen mit transfizierten HEK293-Zellen oder ein Gewebeschnitt, in der Versuchskammer platziert und befestigt worden war, wurde dieses im Strahlengang des Mikroskops positioniert. Zu Beginn eines jeden Versuches wurde das jeweilige Präparat mit extrazellulärer Lösung umspült. Im Allgemeinen kamen dabei für HEK293-Zellen HEPES-gepufferte (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure), für Gewebeschnitte hingegen Carbogen-gepufferte Lösungen, also Bicarbonatpuffer, zum Einsatz, da diese zur Zellumgebung *in vivo* vergleichbar sind und eine Versorgung der Zellen im Gewebeschnitt mit Sauerstoff ermöglichen. Für Voltage-Clamp-Versuche wurden Cäsiumchlorid (CsCl)-basierte Lösungen eingesetzt, um K⁺-vermittelte Ströme zu unterbinden. Für Current-Clamp-Experimente wurden hingegen Kaliumchlorid (KCl)-basierte Lösungen verwendet (siehe Anhang A.2.1.1). Die Auswahl einer Zelle erfolgte bei HEK293-Zellen durch die Kontrolle der Fluoreszenz. Es wurden ausschließlich Zellen gemessen, die eine deutliche YFP-Fluoreszenz und keinen Kontakt zu benachbarten Zellen aufwiesen. Neurone im Gewebeschnitt wurden anhand ihrer Lage in der Pyramidenzellschicht der CA1-Region und ihrem Erscheinungsbild ausgewählt.

Im Anschluss wurde eine zuvor hergestellte Pipette mit etwa 5 µl der intrazellulären Lösung befüllt. Für VC-Experimente wurden verschiedene Cäsium-Methansulfonat-basierte Lösungen, für CC-Versuche hingegen eine Kalium-Gluconat-basierte Lösung verwendet (siehe Anhang A.2.1.2). Die Pipette wurde im Pipettenhalter befestigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Ag/AgCl-Draht in die intrazelluläre Lösung eintauchte. Schließlich wurde ein Überdruck an der Pipette angelegt. Dies diente zum einen dazu, mögliche Verunreinigungen der Pipettenspitze (z. B. beim Eintauchen und beim Fahren in der extrazellulären Lösung) zu verhindern, zum anderen dazu, in Schnittpräparaten die zu untersuchende Zelle von umgebendem Gewebe zu säubern, da nur mit einer sauberen Pipette und Zelloberfläche ein stabiler Giga-Seal erreicht werden konnte.

Mithilfe des elektrisch, in xyz-Richtung zu bewegenden Mikromanipulators wurde die Patchpipette in die Versuchskammer abgesenkt und der Zelle genähert. Dies erfolgte unter optischer Kontrolle per Videomikroskopie. Der Pipettenwiderstand wurde protokolliert. Während der Bewegung der Pipette in der extrazellulären Lösung wurde über das Pulse-Programm ein Testpuls von 5 ms Dauer und -5 mV Amplitude auf die Pipette appliziert (Abb. 2.3 A). In Abbildung 2.3 B ist die Stromantwort auf den applizierten Testpuls zu sehen (durchgezogene Linie). Auftretende Offset-Potentiale wurden an dieser Stelle wiederholt korrigiert (siehe vorangegangener Abschnitt).

Bei Annäherung bzw. erstem Kontakt mit der Zellmembran kam es durch Zunahme des

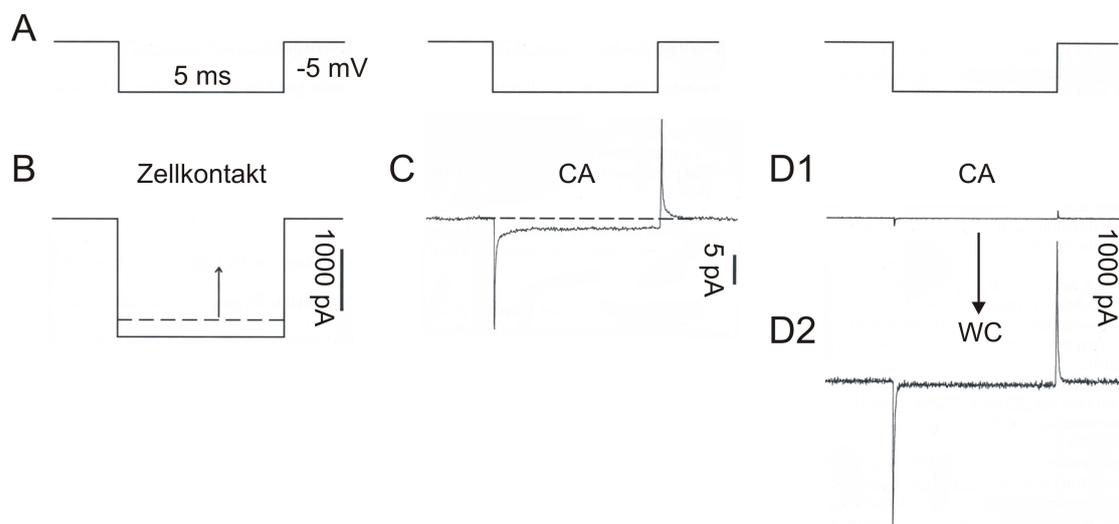


Abb. 2.3.: Vom Giga-Seal zur WC-Konfiguration während einer Patch-Clamp-Messung.

Die Applikation eines Testpulses von -5 mV für 5 ms (A) diente der Beurteilung der Übergänge zwischen verschiedenen Messkonfigurationen während Patch-Clamp-Versuchen. In B (durchgezogene Linie) sieht man die Stromantwort auf den applizierten Testpuls nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung. An dieser Stelle wurden Offset-Potentiale (z. B. liquid junction potential) korrigiert. Bei Annäherung der Pipette an die Zelle kam es bei gleichbleibender Spannungsapplikation und Zunahme des Widerstandes zwischen Pipette und Membran zu einer Abnahme der Stromantwort auf den Testpuls (B, gestrichelte Linie). Das Anlegen von Unterdruck und einem negativen Potential induzierte die Ausbildung des Giga-Seals. Die Stromantwort auf den Testpuls zeigte einen minimalen Strom während und transiente, sogenannte kapazitive Ströme, zum Beginn und zum Ende des Testpulses (C und D1), die mittels der C_{fast} -Kompensation korrigiert wurden. Durch Anlegen eines Unterdrucks erreichte man ausgehend von der CA-Konfiguration den WC-Modus (D2), gekennzeichnet durch die erneute, abrupte Zunahme der kapazitiven Ströme (verändert nach Numberger und Draguhn, 1996).

Widerstands zwischen Pipette und Membran bei gleichbleibender Spannungsapplikation zu einer Abnahme der Stromantwort (Abb. 2.3 B, gestrichelte Linie). In diesem Moment wurde der Überdruck an der Pipette entfernt und durch leichtes Saugen ein Unterdruck auf die Zelle appliziert. Parallel wurde eine negative Spannung an die Membran angelegt. Dies führte dazu, dass der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Membran weiter anstieg bis der bereits beschriebene Giga-Seal erreicht war. Durch die weitere Zunahme des Widerstands zeigte die Stromantwort auf den applizierten Testpuls eine annähernd gerade Linie mit transienten, kapazitiven Strömen zum Beginn und zum Ende des Spannungspulses (Abb. 2.3 C). Diese kapazitiven Ströme wurden mithilfe der schnellen Kompensation (C_{fast}) des EPC10-Verstärkers korrigiert. In der nun erreichten CA-Konfiguration wurde die zu untersuchende Zelle standardmäßig auf ein Haltepotential (V_h) von -60 mV geklemmt. Zur Dokumentation

der Morphologie und der Lage der Neurone im Gewebeschnitt wurde die zu untersuchende Zelle in ihrem Gewebeverband an dieser Stelle mittels Videoaufzeichnung dokumentiert.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Messungen wurden in der WC-Konfiguration aufgezeichnet. Hierfür wurde der Membranfleck unter der Pipette durch leichtes Saugen, also durch Unterdruck, zerstört. Als Merkmal für den Durchbruch der Zellmembran diente erneut der applizierte Testpuls: Die Amplitude der kapazitiven Ströme, die in der CA-Konfiguration durch die schnelle Kompensation minimiert worden waren (Abb. 2.3 D1), nahm abrupt zu (Abb. 2.3 D2). Dies erfolgte, da bei Durchbrechen des Membranflecks plötzlich die gesamte Restmembran der Zelle umgeladen werden musste. An dieser Stelle erfolgte erstmalig die langsame Kompensation (C_{slow}) der Umladeprozesse der Zellmembran. Die langsame Kompensation wurde im Verlauf der einzelnen Messung alle zwei bis vier Minuten aktualisiert.

Der Zugangswiderstand R_s wurde standardmäßig um 70 % bei Messungen im heterologen System und um 20 % bzw. 40 % in Gewebeschnitten kompensiert. Die Werte für die Membrankapazität C_m und den Zugangswiderstand R_s wurden über den gesamten Verlauf des Experimentes dokumentiert. Nur Messungen, die einen maximalen Zugangswiderstand von 30 M Ω aufwiesen, wurden in der Auswertung berücksichtigt. Die Membrankapazität C_m diente bei der Auswertung der Versuche der Normierung der gemessenen Ströme auf die Zellgröße (Stromdichte in pA/pF).

Am Ende eines jeden Experiments an Gehirnschnitten wurde nochmals die Lage des untersuchten Neurons mithilfe des 4x Übersichtsobjektivs dokumentiert. Dies sollte gewährleisten, dass ausschließlich Neurone, deren Soma im *Stratum pyramidale* der CA1-Region lokalisiert waren, in die Auswertung aufgenommen wurden (siehe Abb. 2.1 D).

2.4.3.1. Einwaschen von Pharmaka

Alle eingesetzten Pharmaka wurden ausschließlich über Einwaschen in die Versuchskammer, also über den vollständigen Austausch der extrazellulären Lösung, appliziert. Zellen wurden zu Beginn eines jeden Versuchs mit einfacher extrazellulärer Lösung (CsCl- oder KCl-basiert; HEPES- oder Carbogen-gepuffert) umspült. Nach Erreichen der WC-Konfiguration wurde die zu untersuchende Zelle solange in dieser Lösung belassen, bis sich ein stabiler steady-state Zustand etabliert hatte (normalerweise ein bis zwei Minuten). Erst dann wurde mit dem Wechsel von extrazellulären Lösungen und damit mit dem eigentlichen Versuch begonnen.

In Experimenten an Gewebeschnitten wurden standardmäßig schnelle, synaptische Eingänge unterbunden, indem der extrazellulären Lösung Antagonisten für ionotrope Rezeptoren beigefügt wurden: 200 μM Picrotoxin (GABA_A-Rezeptoren; BioTrend); 25 μM D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5; NMDA-R; BioTrend) und 10 μM 6,7-Dinitroquinoxaline-

2,3-dione disodium salt (DNQX; AMPA/Kainat-R; BioTrend). Die Antagonisten wurden mindestens zwei Minuten lang in das Bad eingewaschen, bevor der Versuch weitergeführt wurde.

Um mögliche Auswirkungen der in dieser Arbeit verwendeten Antagonisten schneller, synaptischer Übertragung auf TRPC-vermittelte Ströme zu untersuchen, wurden Kontrollversuche im heterologen System durchgeführt. Die hieraus entstandenen Resultate sind im Abschnitt 2.4.4 dargestellt.

Die Applikation von Agonisten für muskarinische Acetylcholinrezeptoren (100 μ M Carbachol, CCh, Sigma-Aldrich) und metabotrope Glutamatrezeptoren vom Typ I (100 μ M (RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycin, DHPG, BioTrend) erfolgte ebenfalls über Badapplikation für 60 s.

2.4.3.2. Verwendete Messprotokolle

Während Versuchen im VC-Modus wurde der Strom standardmäßig bei einem Haltepotential (V_h) von -60 mV diskontinuierlich, d. h. im Wechsel mit den eingesetzten Spannungsrampen (siehe folgender Abschnitt), in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet (Strom-Zeitverlauf, X-Chart). Diese Aufzeichnung wurde mit dem Erreichen der CA-Konfiguration begonnen und ihr Beginn als Nullpunkt definiert. Weitere Manipulationen im Verlaufe des Experiments, wie Einwaschen von Antagonisten und Agonisten, richteten sich nach dieser Zeitskala.

Messungen im Voltage-Clamp:

Zur Charakterisierung der gemessenen Ströme dienten sogenannte Strom-Spannungsbeziehungen (IV-Beziehung) vor und während der Applikation von Agonisten. Um die IV-Beziehung zu ermitteln, wurden alternierend zum Strom-Zeitverlauf sogenannte Spannungsrampen ausgehend vom Haltepotential im Bereich zwischen +60 mV und -100 mV über einen Zeitraum von 400 ms aufgezeichnet. Die Applikation von Spannungsrampen im Versuchsverlauf ermöglichte es, einer definierten Spannung (V ; zwischen +60 und -100 mV) einen induzierten Strom (I) zuzuordnen. Der Strom konnte somit in Abhängigkeit von der Spannung dargestellt werden (Abb. 2.5). Alle Signale wurden mithilfe eines 10 kHz Besselfilters, der hochfrequentes Hintergrundrauschen reduziert, gefiltert (HEKAManual, 2008). Abhängig von der Fragestellung kamen verschiedene Spannungsrampen zum Einsatz:

Die *basale Spannungsrampe* (Abb. 2.4 A) wurde sowohl im heterologen System als auch in Gewebeschnitten verwendet. Hierbei wurde die Zelle ausgehend von V_h sprunghaft auf +60 mV depolarisiert. Dies induzierte einen auswärtsgerichteten Strom. Der Depolarisationsprung diente in Neuronen der Inaktivierung von Na_v -Kanälen zu Beginn der Rampe. Nach 50 ms schloss sich eine Spannungsrampe von +60 nach -100 mV innerhalb von 400 ms an. Dabei kam es zur Abnahme des Auswärtsstroms bis das Umkehrpotential V_{rev} erreicht wurde

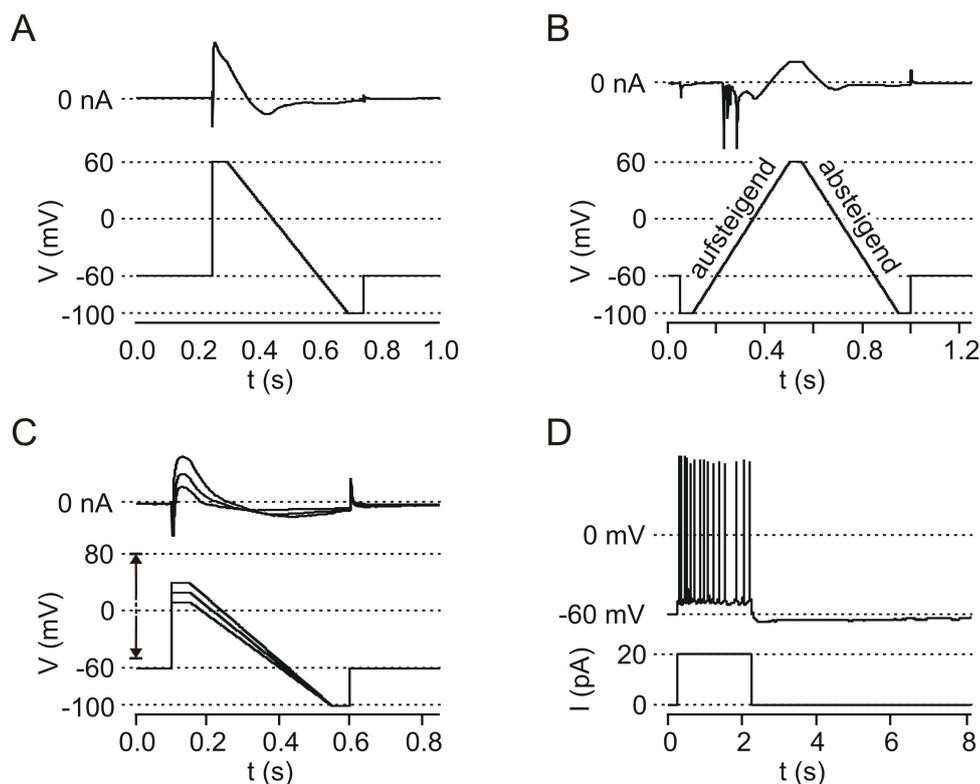


Abb. 2.4.: Messprotokolle im Voltage- und Current-Clamp.

Dargestellt sind die verwendeten Spannungsprotokolle im VC (**A** - **C**) und das Stromprotokoll im CC (**D**) jeweils ergänzt durch eine typische Strom- bzw. Spannungsantwort eines CA1-Neurons. In **A** ist die basale Spannungsrampe von +60 nach -100 mV abgebildet. Um die Spannungsabhängigkeit eines Stroms zu untersuchen, wurde zum einen die trianguläre Rampe (**B**), zum anderen eine Kombination von depolarisierenden Spannungssprüngen mit anschließender, absteigender Rampe (**C**) verwendet. In **D** ist die depolarisierende Strominjektion (+20 pA) für 2 s im CC dargestellt (weitere Erläuterungen siehe Text).

und sich ein charakteristischer Einwärtsstrom anschloss. Nach weiteren 50 ms sprang das Potential zurück auf -60 mV. Die Applikation dieser Rampe erfolgte während des gesamten Versuchszeitraums alle 5 bis 10 s. Nach einer Filterung von 0,4 kHz wurden die Rampen mit einer Frequenz von 2 kHz (Sampling 500 μ s) digitalisiert.

Um die Spannungsabhängigkeit des zu untersuchenden Stroms zu charakterisieren, wurden zwei unterschiedliche Rampenprotokolle verwendet: Die *trianguläre Rampe* (Abb. 2.4 B) und eine *Kombination von depolarisierenden Spannungssprüngen und der absteigenden Rampe* (Abb. 2.4 C).

Im Verlauf der *triangulären Rampe* wurde die Zelle von V_h auf -100 mV hyperpolarisiert. Die Hemmung von Na_v -Kanälen erfolgte in diesem Fall durch die Anwesenheit von 500 nM

Tetrodotoxin (TTX, Sigma-Aldrich oder BioTrend) in der extrazellulären Lösung. Nach 50 ms schloss sich eine *aufsteigende* Spannungsrampe von -100 nach +60 mV innerhalb von 400 ms an, die - wie Abbildung 2.4 B zeigt - ohne die Blockade von Na_v -Kanälen (ohne TTX) einen deutlichen Einwärtsstrom mit zusätzlichen schnellen Stromtransienten induzierte. Nach 50 ms folgte die zuvor beschriebene *absteigende* Spannungsrampe von +60 nach -100 mV und nach weiteren 50 ms der Sprung zurück zum Haltepotential. Die dadurch induzierte Stromantwort entsprach in ihrem Verlauf der vorangegangenen beschriebenen basalen Rampe. Die Applikation der triangulären Rampe erfolgte während des gesamten Versuchszeitraums alle 10 s mit einer Digitalisierungsrate von 2 kHz und einem Filter von 0,4 kHz.

Die *Kombination von depolarisierenden Spannungssprüngen und absteigender Rampe* wurde eingesetzt, um die Depolarisationsstärke zu charakterisieren, die zur Induktion des zu untersuchenden Stroms notwendig war. Ausgehend von V_h wurde die Zelle sprunghaft auf verschiedene Potentiale in einem Bereich von -50 bis +80 mV depolarisiert. Dies erfolgte in +10 mV-Schritten. In Abbildung 2.4 C ist beispielhaft die Depolarisation auf +10, +20 und +30 mV in einem Neuron dargestellt, was bei steigender Depolarisation zu einer Zunahme des Auswärtsstroms führte. Nach 50 ms schloss sich ausgehend von dem jeweiligen Potential die absteigende Spannungsrampe nach -100 mV innerhalb von 400 ms an und nach weiteren 50 ms erfolgte der Sprung zurück zu V_h . Die Rampe rief jeweils eine Abnahme des Auswärtsstroms, das Erreichen von V_{rev} und die Induktion eines Einwärtsstroms hervor. Die Applikation dieser Rampe erfolgte nur zu bestimmten Zeitpunkten während des Experimentes (z. B. vor und während der Applikation des Agonisten). Da der Agonisten-sensitive Strom schnell inaktivierte, betrug das Intervall der einzelnen Spannungsrampen (maximal fünf Spannungsrampen pro Stimulation) 2,5 s mit einer Filterung von 0,4 kHz und einer Digitalisierungsrate von 2 kHz.

Messungen im Current-Clamp:

Im Current-Clamp wurde zum einen die Spontanaktivität der Zellen und die Veränderung des Membranpotentials bei Applikation von Antagonisten und Agonisten in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Hierfür wurde kein Strom appliziert. Der Patch-Clamp-Verstärker diente als Spannungsfolger. Die Digitalisierung der Daten erfolgte alle 200 μs (5 kHz) mit einer Filterung von 1,7 kHz.

Zum anderen erfolgte die Injektion von depolarisierenden Strömen in +20 pA-Schritten vor und während der Applikation von Agonisten (Abb. 2.4 D). Hierfür wurde teilweise ein Strom injiziert, um die zu untersuchende Zelle auf ein Membranpotential nahe -60 mV einzustellen. Von hier ausgehend wurden schließlich die depolarisierenden Strominjektionen für 2 s durchgeführt. Dies induzierte eine Depolarisation der Zelle und die Ausbildung von Aktionspotentialen. Mit der Beendigung der Strominjektion nach 2 s kam es zur Nachhyperpolarisation

und anschließender Rückkehr der Zelle zum Ruhepotential. Die Digitalisierung der Daten fand ebenfalls alle 200 μs (5 kHz) mit einer Filterung von 1,7 kHz statt.

2.4.3.3. Auswertung der Daten

Die Auswertung der mit Pulse aufgezeichneten Daten erfolgte mit dem Programm „Igor 6.02A“ (WaveMetrics, Oregon, USA), zum Teil mithilfe des Patcher’s Power Tools von F. Würriehausen (Göttingen, D).

Zu Beginn wurden die im VC aufgezeichneten IV-Beziehungen aus den eingesetzten Spannungsrampen (siehe Abschnitt 2.4.3.2) ermittelt, indem der Strom (I) abhängig von der applizierten Spannung (V) abgebildet wurde (Abb. 2.5 A). Um die zu untersuchenden Ströme (z. B. Strom-Zeitverläufe und IV-Beziehungen) zwischen verschiedenen Zellen vergleichen zu können, wurden diese zunächst auf die Zellkapazität C_m normiert, die durch die langsame Kompensationsprozedur (C_{slow}) während eines gesamten Experimentes aktualisiert wurde. Alle in dieser Arbeit abgebildeten Ströme sind deshalb als Stromdichte in pA/pF in Abhängigkeit von der Spannung oder der Zeit dargestellt (Abb. 2.5 A).

Des Weiteren wurde der durch die Applikation des Agonisten induzierte Strom ermittelt, indem die IV-Beziehung vor der Applikation des Agonisten von der IV-Beziehung während der Stimulation subtrahiert wurde (Abb. 2.5 B). Die Darstellung des *Agonisten-sensitiven Stroms* (z. B. DHPG-sensitiver Strom) ermöglichte den Vergleich zwischen verschiedenen Genotypen und unterschiedlichen Versuchsanordnungen. Als charakteristische Punkte der IV-Beziehungen wurden der *Strom bei -60 mV* ($I_{-60\text{mV}}$) und das Umkehrpotential (V_{rev}) definiert und somit als Kriterien für statistische Vergleiche herangezogen.

Um die basale, synaptische Aktivität in CA1-Neuronen zwischen WT und der TRPC1^{-/-}-Maus zu beurteilen, wurden nach dem Übergang von der CA- in die WC-Konfiguration im Strom-Zeitverlauf (X-Chart) die Anzahl und die Amplituden einzelner synaptischer Ereignisse vor dem Einwaschen ionotroper Rezeptor-Antagonisten analysiert. Ergänzend hierzu wurde bei jeder aufgezeichneten IV-Beziehung während eines Experiments der Strom bei -100 mV bestimmt und in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt (Abb. 2.5 B, Inset). An diesem Strom-Zeitverlauf wurde die Dauer (Δt) des einwärtsgerichteten Stroms, der durch die Applikation eines Agonisten induziert wurde, bestimmt und in den beiden Genotypen gegenübergestellt.

Bei Daten, die im kontinuierlichen Modus (Spannungsfolger) des CC aufgezeichnet wurden (Abb. 2.6 A), erfolgte nach mindestens zweiminütigem Einwaschen der verwendeten Antagonisten ionotroper Rezeptoren die Ermittlung des Ruhemembranpotentials (V_m). Anschließend wurden die durch Applikation von 100 μM DHPG beobachteten Zellantworten quantifiziert.

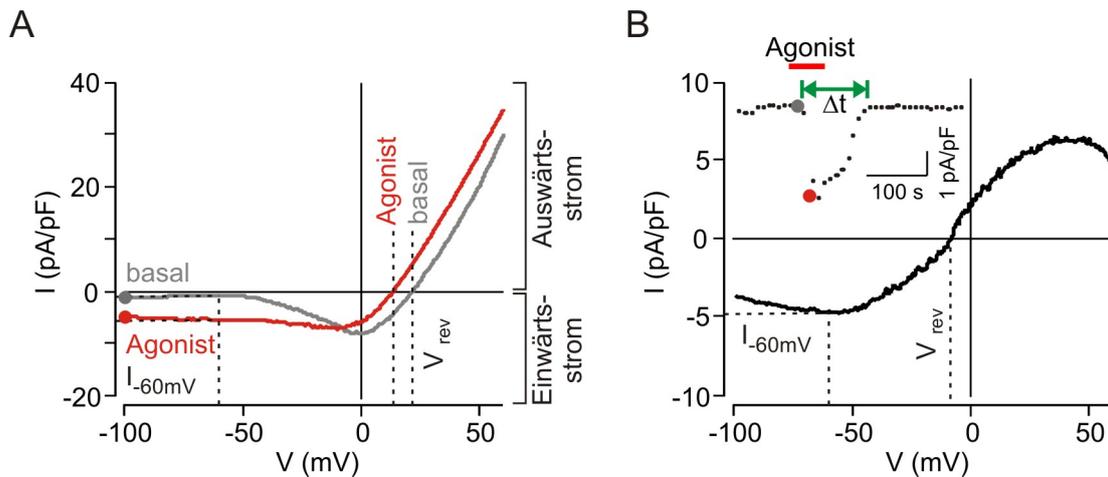


Abb. 2.5.: Auswertung von Voltage-Clamp-Daten: IV-Beziehungen, der Strom-Zeitverlauf, die Ermittlung des Agonisten-sensitiven Stroms, $I_{-60\text{mV}}$ und V_{rev} .

In **A** sind die typischen IV-Beziehungen eines CA1-Neurons vor (basal, grau) und während der Applikation von $100 \mu\text{M}$ DHPG (Agonist, rot) als Antwort auf die basale Spannungsrampe dargestellt. Dabei sind Einwärtsströme negativ, Auswärtsströme hingegen positiv aufgetragen. Im Folgenden wurde an jeder IV-Beziehung der Strom bei -100 mV bestimmt (siehe gefüllte Kreise) und in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen (Inset in **B**). Im so ermittelten Strom-Zeitverlauf wurde die Dauer der Agonistenapplikation und die Zeitpunkte der in **A** abgebildeten IV-Beziehungen markiert. Hier erfolgte zusätzlich die Ermittlung der Dauer des Einwärtsstroms (Δt). Die Bestimmung des Agonisten-sensitiven Stroms (**B**) erfolgte durch Subtraktion der basalen IV-Beziehung vor der Stimulation (**A**, grau) von der IV-Beziehung während der Stimulation (**A**, rot). An den originalen IV-Beziehungen (in **A**) und dem abgeleiteten Agonisten-sensitiven Strom (in **B**) wurde jeweils der Strom bei -60 mV ($I_{-60\text{mV}}$) und das Umkehrpotential (V_{rev}) ermittelt.

Dabei wurde zwischen drei hervorgerufenen Membranspannungen unterschieden: eine Depolarisation (Abb. 2.6 A, links), eine Hyperpolarisation (Abb. 2.6 A, rechts) und - im Falle eines Plateaupotentials - das Spannungsplateau (Abb. 2.6 A, rechts). Alle Potentiale wurden, bei der Ausbildung von Aktionspotentialen, an der Basis dieser APs bestimmt (Abb. 2.6 A, links und rechts), die Amplitude von APs wurde somit nicht berücksichtigt.

Bei der depolarisierenden Strominjektion von $+20 \text{ pA}$ (Abb. 2.6 B) wurde die Zelle zunächst durch eine Strominjektion auf eine Membranspannung nahe -60 mV gebracht, um eine einheitliche Ausgangsspannung für die Strominjektion und somit eine Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Zellen zu gewährleisten. Die tatsächliche Membranspannung (V) vor der Strominjektion wurde zur Kontrolle bestimmt. Versuche, in denen V um mehr als $\pm 5 \text{ mV}$ von -60 mV abwich, wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Des Weiteren erfolgte die Ermittlung der durch die Strominjektion von $+20 \text{ pA}$ induzierten Membranspannung jeweils unter Kontrollbedingungen, d.h. in Anwesenheit ionotroper Rezeptor-Antagonisten (als Bei-

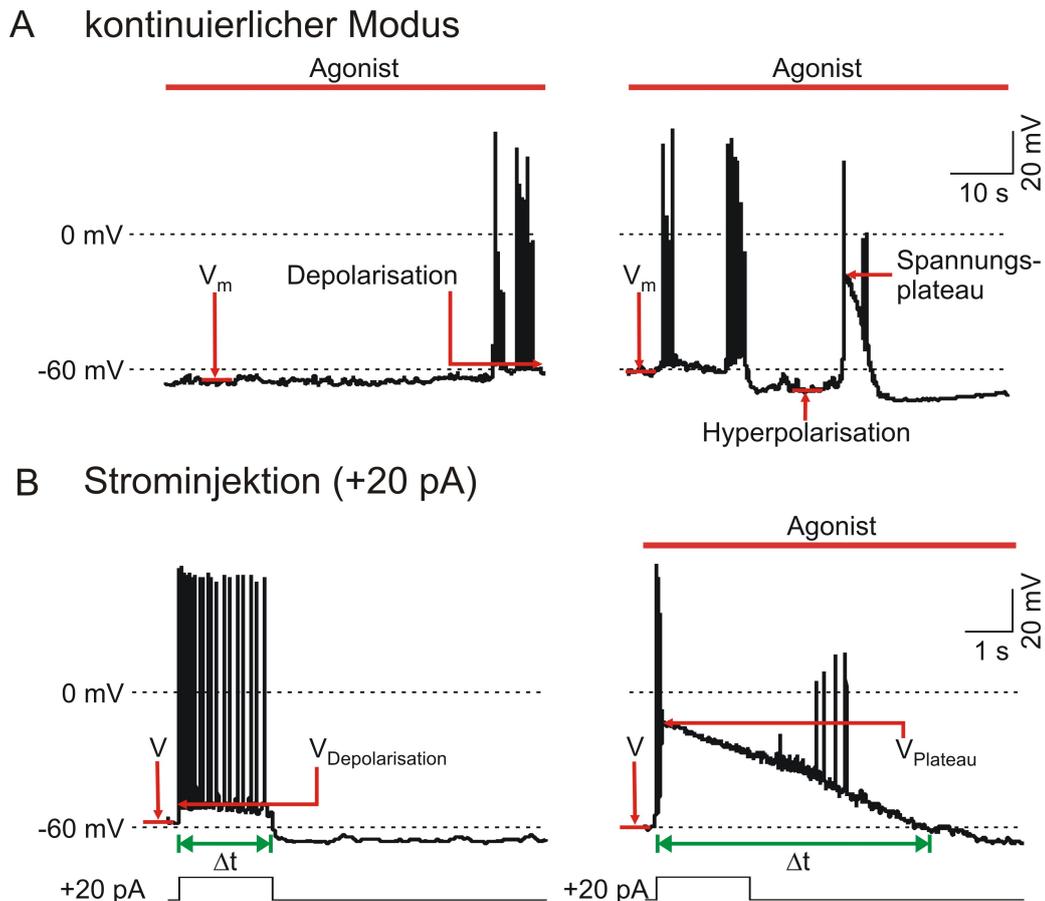


Abb. 2.6.: Auswertung von Current-Clamp-Daten: V_m , $V_{\text{Depolarisation}}$, V_{Plateau} und Δt .

Bei Versuchen, die im kontinuierlichen Modus des CC aufgezeichnet wurden (**A**), erfolgte die Bestimmung des Ruhemembranpotentials (V_m) in Anwesenheit ionotroper Rezeptor-Antagonisten und die durch Applikation eines Agonisten hervorgerufene Membranspannung der Zelle. Dabei wurde zwischen Depolarisation (links), Hyperpolarisation und Spannungsplateau (rechts) unterschieden. In Experimenten, in denen eine depolarisierende Strominjektion appliziert wurde (**B**), wurde zwischen einer durch die Strominjektion induzierten Depolarisation ($V_{\text{Depolarisation}}$, links) und einer Spannung bei Generierung eines Plateaupotentials (V_{Plateau} , rechts) differenziert. Zusätzlich wurde die Dauer der induzierten Depolarisation (Δt) bestimmt.

spiel siehe Abb. 2.6 B, links), und während der Stimulation von mGluRI mittels DHPG (als Beispiel siehe Abb. 2.6 B, rechts). Dabei wurde unterschieden zwischen einer durch +20 pA induzierten Depolarisation ($V_{\text{Depolarisation}}$; Abb. 2.6 B, links) und der Membranspannung, die bei der Ausbildung eines Plateaupotentials erreicht wurde (V_{Plateau} ; Abb. 2.6 B, rechts). Wiederum wurde die Spannung an der Basis der APs ermittelt, die Amplitude von APs also nicht berücksichtigt. Ergänzend wurde die Dauer der durch die Strominjektion induzierten Depolarisation (Δt), d. h. vom Beginn der Depolarisation bis zum Erreichen der Ausgangsmembran-

spannung um -60 mV, sowohl unter Kontrollbedingungen als auch während der Stimulation mit einem Agonisten bestimmt (Abb. 2.6 B, links und rechts).

2.4.4. Einfluss von Antagonisten schneller synaptischer Übertragung auf TRPC-vermittelte Einwärtsströme

Der Hauptteil der in dieser Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen wurde an hippocampalen Gehirnschnitten durchgeführt. Der Einsatz von verschiedenen Antagonisten wird im Gewebeschnitt standardmäßig eingesetzt, um ionotrope Rezeptoren und damit schnelle synaptische Übertragung innerhalb eines Zellverbandes zu unterbinden (Crépel *et al.*, 1994; Congar *et al.*, 1997; Gee *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurden ionotrope Eingänge von benachbarten Zellen im Gewebeverband stets durch die Applikation von Antagonisten für GABA_A-, NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptoren (siehe Abschnitt 2.4.3.1) unterdrückt.

Im folgenden Abschnitt sollte eine mögliche Wirkung der hier verwendeten Antagonisten auf den durch Stimulation G_q-koppelnder Rezeptoren und TRPC-Untereinheiten-vermittelten Einwärtsstrom untersucht werden. Hierfür wurden HEK293-Zellen transient mit pcDNA für mTRPC5 (aus der TRPC-Gruppe 4) oder hTRPC6 (aus der TRPC-Gruppe 3; siehe Abb. 1.2 A) mit dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor (rM5R) kotransfiziert. Die Stimulation des mAChR erfolgte mit 100 µM CCh per Badapplikation.

Die IV-Beziehungen - sowohl TRPC5- als auch TRPC6-exprimierender Zellen - zeigten bei Stimulation von mAChR einen typischen Verlauf (Abb. 2.7): Die Zellen wiesen bei negativen Potentialen einen einwärtsgerichteten Strom auf. Dieser Einwärtsstrom zeigte in TRPC5-exprimierenden Zellen ein Maximum bei ungefähr -60 mV und wurde geringer bei negativeren Potentialen (Abb. 2.7 A, blau, n = 14). In TRPC6-exprimierenden Zellen hingegen kam es zu einer Stromzunahme je negativer das Potential wurde (Abb. 2.7 B, blau, n = 22). Sowohl die IV-Beziehungen bei maximaler Stimulation mit CCh von TRPC5 als auch die von TRPC6 wiesen ein Umkehrpotential nahe 0 mV und einen auswärtsgerichteten Strom bei positiven Potentialen auf. Der charakteristische Plateauverlauf der IV-Beziehungen zwischen +20 und +40 mV, wie er in Abbildung 1.3 B exemplarisch für TRPC5-Homomultimere dargestellt ist, konnte sowohl in TRPC5- als auch in TRPC6-exprimierenden Zellen beobachtet werden.

In einigen Zellen wurden nach Aktivierung von mAChR und Induktion der TRPC5- bzw. TRPC6-typischen IV-Beziehung die in dieser Arbeit verwendeten Antagonisten in die Versuchskammer eingewaschen. Die Applikation von 200 µM Picrotoxin, 25 µM AP-5 und 10 µM DNQX wurde für mindestens zwei Minuten durchgeführt. Aufgrund der Deaktivierung von mAChR und/oder Inaktivierung der überexprimierten Kanäle kam es innerhalb dieser Zeit zur Abnahme der Amplitude sowohl der Einwärts- als auch der Auswärtsströme. Aus diesem

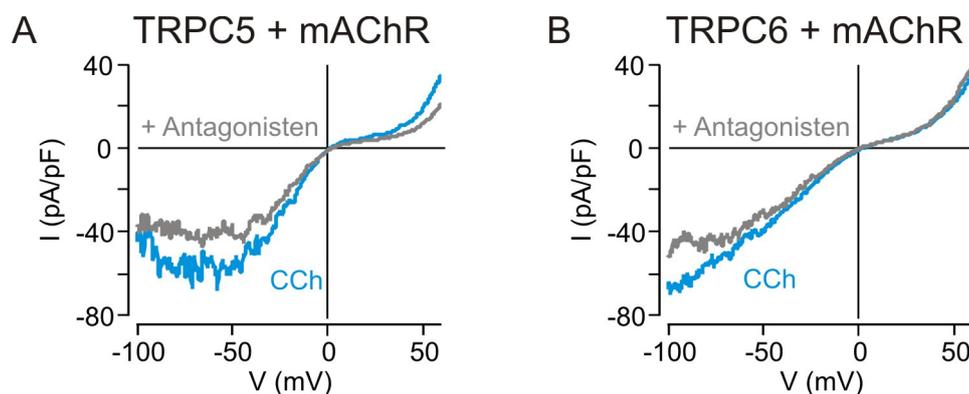


Abb. 2.7.: TRPC-vermittelte Einwärtsströme im heterologen System.

Abgebildet sind die IV-Beziehungen von TRPC5- (A) und TRPC6-exprimierenden (B) HEK293-Zellen bei maximaler mAChR-Aktivierung durch CCh (blau) und in Anwesenheit von GABA_A-, NMDA- und AMPA/Kainat-Antagonisten (grau) jeweils in der gleichen Zelle. Das Einwaschen von Antagonisten ionotroper Rezeptoren hatte weder in TRPC5- noch in TRPC6-exprimierenden Zellen eine Auswirkung auf den prinzipiellen Verlauf der IV-Beziehung.

Grund wurden der Verlauf der IV-Beziehung, der Strom bei -60 mV ($I_{60\text{mV}}$) und das Umkehrpotential (V_{rev}) circa eine Minute nach Einwaschen der Antagonisten zur weiteren Untersuchung herangezogen. Weder in TRPC5- noch in TRPC6-exprimierenden Zellen konnte ein auffälliger Unterschied im Verlauf der IV-Beziehungen in Anwesenheit der Antagonisten beobachtet werden (Abb. 2.7 A und B, grau).

TRPC5-exprimierende Zellen wiesen in CCh einen Strom bei -60 mV von $-28,41 \pm 11,41$ pA/pF und ein Umkehrpotential von $4,5 \pm 1,57$ mV ($n = 4$) auf. Eine Minute nach Einwaschen der Antagonisten betrug $I_{60\text{mV}}$ durchschnittlich $-17,98 \pm 4,13$ pA/pF ($P = 0,2943$) und V_{rev} $4,26 \pm 0,55$ mV ($n = 10$; $P = 0,8547$). Auch der TRPC6-vermittelte Strom bei -60 mV (CCh: $-15,72 \pm 5,17$ pA/pF, $n = 7$; +Antagonisten: $-13,63 \pm 3,39$ pA/pF, $n = 15$; $P = 0,7355$) und V_{rev} (CCh: $-1,56 \pm 1,39$ mV, $n = 7$; +Antagonisten: $1,84 \pm 0,74$ mV, $n = 15$; $P = 0,0276$ *) waren vergleichbar zwischen der maximalen CCh-Aktivierung und nach dem Einwaschen der Antagonisten.

An dieser Stelle kann zusammenfassend gesagt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Antagonisten für ionotrope Rezeptoren keinen wesentlichen Einfluss auf die Amplitude und auf die Kinetik TRPC5- und TRPC6-vermittelter Ionenströme zeigten, die als Vertreter der zwei großen TRPC-Subfamilien (TRPC4/5 und TRPC3/6/7) ausgewählt wurden, und darin begründet in Versuchen an Gehirnschnitten angewendet werden konnten.

2.5. Molekularbiologie

2.5.1. Isolation von Nukleinsäuren aus Gewebe

2.5.1.1. RNA-Isolation aus hippocampalem Gewebe

Zur Isolation von RNA und anschließender quantitativer real-time Polymerase-Kettenreaktion wurden Gesamthippocampi aus Mäusen der verschiedenen Genotypen in verschiedenen postnatalen Stadien (P10 - P12, P14 - P26 und P33 - P35) präpariert.

Nach der Entnahme des Gehirns aus der Schädelkapsel und der Trennung der beiden Hemisphären (siehe Abschnitt 2.3.1 und Abb. 2.1 B) wurde die zur Isolation des Gesamthippocampus bestimmte Hemisphäre mit der Medianfläche nach oben orientiert. Die weitere Präparation erfolgte unter einem Binokular (SZ61, Okulare: WHSZ 10x-H/22, Olympus). Die Hemisphäre wurde mithilfe einer Pinzette am rostralen Ende (Richtung Schnauze, olfaktorischer Bulbus) fixiert. Mit einem Skalpell konnte nun das verbliebene Rückenmark und Cerebellum entfernt werden. Als nächstes wurde vorsichtig das Mittelhirn herausgelöst, um den darunter liegenden Hippocampus nicht zu verletzen. Der Hippocampus war durch eine aufgelagerte Vene gut zu erkennen. Jeweils ein Schnitt ober- bzw. unterhalb des Hippocampus ermöglichte das Herausklappen des Gewebes. Im Anschluss konnte der Hippocampus vom restlichen Cortex freigeschnitten werden (Fuller und Dailey, 2007).

Der isolierte Hippocampus wurde sofort in 1 ml eisgekühltes TriReagent™ (Sigma-Aldrich) überführt, welches aus Phenol und Guanidinisothiocyanat besteht. Im Anschluss wurde der Hippocampus entweder sofort mithilfe einer Pistille (Homogenisator für 2 ml Reaktionsgefäß, autoklavierbar) homogenisiert oder direkt bei -80 °C eingefroren und aufbewahrt. Bei der Isolierung von RNA musste verhindert werden, dass diese von RNAsen zerstört wird. Da diese fast überall anzutreffen sind, wurde hierbei ausschließlich mit Handschuhen, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäßen aus neu geöffneten Beuteln gearbeitet.

Die RNA-Isolation aus hippocampalem Gewebe erfolgte durch Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Mittels TriReagent™, in das das isolierte Gewebe überführt wurde, konnten Zellen sowohl lysiert, als auch RNAsen und andere Enzyme inaktiviert werden. Nach fünf Minuten bei RT wurden 200 µl Chloroform (RNase frei, Roth) zugefügt, gut geschüttelt und für 10 Minuten bei 13.000 Umdrehungen/Minute und 4 °C in einer Tischzentrifuge (5417 R, temperierbar, Eppendorf, Hamburg, D) zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen aus: eine wässrige, in welcher die RNA enthalten war, eine Interphase mit der DNA und eine organische Phase mit den Proteinen. Die wässrige Phase mit der RNA wurde in ein frisches Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol (RNase frei, Acros organics, Fisher Scientific, Schwerte, D) überführt und für weitere 10 Minuten bei RT inkubiert. Durch er-

neute Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 Umdrehungen/Minute und 4 °C wurde die RNA pelletiert. Der Überstand konnte verworfen werden. Die RNA wurde mit 70 % Ethanol (EtOH, Roptipuran[®], 100 %, Roth) gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde schließlich in 50 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser (siehe Anhang A.2.2; Sigma-Aldrich) aufgenommen, welches der Inaktivierung von RNAsen diente, und für 15 Minuten auf 65 °C auf dem Rüttler erhitzt und somit gelöst. Die Proben wurden schließlich bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.5.1.2. DNA-Isolation aus der Schwanzspitze bzw. einer Ohrstanze

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mit DNA, welche aus einem Stück Gewebe der Schwanzspitze bzw. einer Ohrstanze gewonnen wurde. Bei etwa drei Wochen alten Mäusen bzw. Mäusen, deren Gehirne für elektrophysiologische, molekularbiologische oder histochemische Untersuchungen verwendet wurden, wurden die letzten 3 mm der Schwanzspitze abgetrennt bzw. ein Gewebestück aus dem Ohr entnommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Zur Isolation der DNA aus der Gewebeprobe wurde die Schwanzspitze/Ohrstanze in 300 µl Puffer B (siehe Anhang A.2.2) mit 30 µl 10 % Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS, Roth; siehe Anhang A.2.2) und 0,3 mg Proteinkinase K (PCR Grade, Roche Diagnostics, Mannheim, D) über Nacht bei 55 °C auf einem Rüttler (HT MR 131, temperierbar, Haep Labor Consult HLC, Bovenden, D) verdaut. Am nächsten Tag wurde 1,5 µl RNase A (10 mg/ml, Sigma-Aldrich) zugegeben, um RNA zu entfernen, und für mindestens 30 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Es wurde 100 µl gesättigte NaCl-Lösung (siehe Anhang A.2.2) zugegeben, geschüttelt und 30 Minuten bei 13.000 Umdrehungen/Minute die nun gefällten Proteine abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die DNA wurde durch Zugabe von 860 µl 100 % EtOH für fünf Minuten auf dem Schüttler gefällt und anschließend 15 Minuten bei 13.000 Umdrehungen/Minute abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, abzentrifugiert, für zwei bis drei Stunden an der Luft getrocknet (nicht über Nacht) und in 100 µl autoklaviertem ddH₂O bei RT resuspendiert. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert.

2.5.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain reaction, PCR) dient der Vervielfältigung (Amplifikation) sehr geringer Nukleinsäuremengen aus den unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien. Das grundlegende Prinzip der PCR lässt sich wie folgt beschreiben:

1. Bei 94 °C wird die als Doppelstrang vorliegende DNA *denaturiert* und liegt danach

einzelsträngig vor.

2. Bei 55 °C kommt es zur Hybridisierung (Anlagerung) der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotide (*Primer*) an komplementäre Sequenzen des einzelsträngigen Vorlagestrangs (*Annealing*).
3. Bei einer Temperatur von 72 °C kommt es bei Anwesenheit freier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, Nukleotide) zur Verlängerung (*Elongation*) der Oligonukleotide durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase (Taq-Polymerase). Am Ende der Elongation liegt somit wieder doppelsträngige DNA vor, die der ursprünglichen Vorlagen-DNA exakt gleicht.

Da die Komplementierung an beiden Strängen der Vorlagen-DNA erfolgt, kommt es im Verlaufe des eben beschriebenen Zyklus zur Verdopplung der Vorlagen-DNA und somit zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA bei weiteren Zyklen (Müller, 2001; Mülhardt, 2006). Das grundlegende Prinzip der PCR wurde in dieser Arbeit für verschiedene Zwecke verwendet: reverse Transkription, quantitative real-time PCR und Genotypisierung.

2.5.2.1. Reverse Transkription (RT-PCR)

Um die Expression von mRNA in Zellen festzustellen, musste die zuvor isolierte RNA (siehe Abschnitt 2.5.1.1) in einzelsträngige „copy DNA“ (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgte in der sogenannten *Erststrangsynthese* mittels PCR mit dem Enzym „Reverse Transkriptase“ (RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase, Fermentas, St. Leon-Rot, D) und einem Oligonukleotidgemisch (Random Hexamer Primer, 0,2 µg/µl, Fermentas) mit sechs zufällig angeordneten Basen, mit denen fast überall eine Bindung an die RNA möglich ist. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die bei einem Temperaturoptimum von 42 °C ausgehend vom gebundenen Oligonukleotid die RNA durch Anfügen von Nukleotiden in cDNA kopiert (Mülhardt, 2006).

Es wurden 10 µl Proben-RNA und 1 µl der Random Hexamer Primer in der PCR-Maschine für fünf Minuten auf 70 °C erhitzt. Die Proben wurden anschließend sofort auf Eis überführt. Dort wurden dann 8 µl 5fach Reaktionspuffer (Reaktionspuffer für M-MuLV Reverse Transkriptase, Fermentas), 4 µl 10 mM Nukleotide (dNTP Mix) und 16 µl DEPC-Wasser hinzugegeben und der Ansatz für fünf Minuten auf 25 °C erhitzt. Vor Ort wurde 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben und die reverse Transkription mit folgendem Programm gestartet: 10 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 42 °C und 10 Minuten bei 70 °C. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

2.5.2.2. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (Saiki *et al.*, 1985) und bietet zusätzlich die Möglichkeit einer indirekten DNA-Quantifizierung (Higuchi *et al.*, 1992). Sie ermöglicht eine Aussage über die relative Expressionsstärke eines beliebigen Gens in Bezug auf ein stabil exprimiertes Gen, dem sogenannten „house-keeping gene“. Dabei besteht ein Zyklus einer PCR-Reaktion aus den zuvor beschriebenen drei Phasen: Denaturierung, Annealing und Elongation.

Die Menge der vorhandenen DNA kann nach jedem Zyklus ermittelt werden, indem am Ende der Elongation die Emissionsfluoreszenz bei 530 nm eines DNA-interkalierenden Farbstoffes, der mit Licht einer Wellenlänge von 494 nm angeregt wird, ermittelt wird. In diesem Fall wurde SYBR[®]-Green I als interkalierender Farbstoff verwendet, welches sich sowohl in die doppelsträngigen DNA einlagert als auch an diese bindet und nur in dieser Konformation fluoreszieren kann (Zipper *et al.*, 2004). Wenn die Menge des Produkts einen gewissen, zuvor definierten Schwellenwert überschritten hat, wird dieser Zyklus als CT-Wert (threshold cycle) bezeichnet. Hier ist so viel PCR-Produkt vorhanden, dass die Fluoreszenz deutlich die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Idealerweise wird die Menge an DNA bei jedem Zyklus verdoppelt. So ist es möglich, die DNA-Menge eines zu untersuchenden Gens im Bezug auf das stabil exprimierte „house-keeping gene“ zu berechnen (Gleichung 2.1 und 2.3).

Nach der reversen Transkription wurden spezifische Fragmente der erhaltenen cDNA für TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6, TRPC7 und β -Aktin, das als „house-keeping gene“ diente, mithilfe der qRT-PCR amplifiziert. Die zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente der verschiedenen TRPC-Isoformen und β -Aktin verwendeten Primerpaare (Forward- und Reverseprimer) nach Dietrich *et al.* (2007) und Hartmann *et al.* (2008) sind im Anhang A.4.1 aufgelistet.

Zur Amplifikation spezifischer Fragmente des TRPC1-Gens kam ein Forwardprimer zum Einsatz (Abb. 2.8), der über eine bewusst gewählte Bindesequenz verfügte: Seine Zielsequenz lag in der Region des Exons 8, die in der TRPC1-defizienten Maus deletiert worden war (Dietrich *et al.*, 2007). Aufgrund der fehlenden Bindungsmöglichkeit des Forwardprimers konnte im Verlauf der qRT-PCR bei Vorliegen von DNA einer TRPC1^{-/-}-Maus kein spezifisches Produkt gebildet werden. Die Verwendung dieses Forwardprimers ermöglichte somit die direkte Unterscheidung von WT- und TRPC1^{-/-}-Probe (Abb. 2.8; Dietrich *et al.*, 2007; Fahlbusch, 2008).

Die qRT-PCR wurde mit dem Absolute[™] QPCR Syber[®]-Green Capillary Mix (ABgene, Hamburg, D) durchgeführt, der eine Thermo-Start[™] DNA-Polymerase, Puffer, Nukleotide (dNTPs) und SYBR[®]-Green I beinhaltet. 2 μ l von jedem Primerpaar (Forward- und Rever-

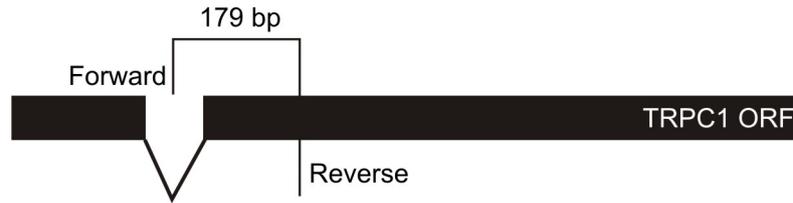


Abb. 2.8.: Wahl des TRPC1-Primers während der qRT-PCR.

Für die qRT-PCR wurde zur Amplifikation der spezifischen DNA-Sequenz des TRPC1-Gens ein Forwardprimer verwendet, der eine Besonderheit aufwies: Seine Bindung erfolgte in der in der TRPC1^{-/-}-Maus deletierten Region des Exons 8, was in der Abbildung durch die Bruchstelle im ORF (open reading frame) des TRPC1-Gens gekennzeichnet ist (Erläuterungen siehe Text).

seprimer, je 1:10 verdünnt) und 2 µl der jeweiligen Erststrangsynthese (1:10 verdünnt) wurden 5 µl SYBR-Green qPCR Master Mix (2x) und 1 µl RNA- und DNA-freies Wasser beigelegt. Das Gemisch wurde in eine Light Cycler Kapillare (Roche Diagnostics) gegeben und für eine Minute bei maximal 2.000 Umdrehungen/Minute abzentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich die Flüssigkeit auf dem Boden der Kapillare befand. Die Kapillaren wurden schließlich in den Probenbehälter des Light Cyclers gestellt (Roche Diagnostics). An jedem Versuchstag wurde die cDNA von β -Aktin zur Quantifizierung der Expressionsmenge der untersuchten Gene (TRPC1 - TRPC7) amplifiziert. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle bei jeder Messung jedes Oligonukleotid einmal mit Wasser anstelle der cDNA gemessen (Wasserprobe).

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 15 Minuten initiale Aktivierung und anschließend 45 Zyklen von 12 s bei 95 °C, 30 s bei 55 °C, 30 s bei 72 °C und 10 s bei 81 °C.

Die Fluoreszenzintensität wurde jeweils am Ende eines jeden Zyklus nach Erwärmung auf 81 °C bestimmt, um Fluoreszenz von Primerdimeren auszuschließen, die bei einer geringeren Temperatur (< 80 °C) schmelzen. Proben, die Primerdimere enthielten, wurden aus der weiteren Betrachtung durch Schmelzkurvenanalyse ausgeschlossen. Die so erhaltenen CT-Werte wurden mithilfe von Microsoft Excel und des Programms „GraphPad 4.00“ (für Windows, GraphPad Software, www.graphpad.com) nach der CT-Methode ausgewertet (Dietrich *et al.*, 2007). Dazu wurde die folgende Rechenoperation durchgeführt:

$$\Delta CT = CT_{\beta\text{-Aktin}} - CT_{\text{Oligo X}} \quad (2.1)$$

$$\Delta\Delta CT = 2e^{\Delta CT} \cdot 100 \quad (2.2)$$

$$= 2e^{(CT_{\beta\text{-Aktin}} - CT_{\text{Oligo X}})} \cdot 100 \quad (2.3)$$

Der $\Delta\Delta CT$ -Wert gibt schließlich die Expressionsrate des zu untersuchenden Gens in Prozent der β -Aktinexpression wieder (Dietrich *et al.*, 2007).

2.5.2.3. Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mäuse, deren Gehirne für elektrophysiologische, molekularbiologische oder histochemische Untersuchungen verwendet wurden, erfolgte mittels PCR aus Proben-DNA der Schwanzspitze bzw. einer Ohrstanze.

Die PCR wurde vollständig in einem Thermocycler (GeneAmp 2400, Perkin Elmer, Rodgau, D; TGradient, Biometra, Göttingen, D) durchgeführt. Die folgenden Reagentien wurden auf Eis in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß gegeben und gemischt: 36,1 µl ddH₂O, 5,0 µl PCR-Puffer (PE-Puffer, 10 mM, + KCl, Fermentas), 3,6 µl 25 mM MgCl₂, 1,0 µl dNTPs; je 1,0 µl Forward- und Reverseprimer (je 1 : 10 verdünnt), 0,3 µl Taq-Polymerase (Fermentas), 2,0 µl Proben-DNA (1 : 10 verdünnt). Das Temperaturprogramm der PCR wurde wie folgt gewählt: die Proben wurden für fünf Minuten bei 94 °C denaturiert, anschließend folgten 45 Zyklen: eine Minute bei 94 °C, eine Minute bei 55 °C, gefolgt von einer Minute bei 72 °C. Am Ende wurden die Proben für sieben Minuten bei 72 °C gehalten und abschließend auf 4 °C abgekühlt und aufbewahrt.

Für jede Gewebeprobe wurden parallel zwei PCR-Reaktionen durchgeführt - sowohl mit Primern für WT-spezifische Fragmente der DNA als auch mit Primern für TRPC1^{-/-}-spezifische Fragmente der DNA. Lieferten beide Oligonukleotidpaare ein Produkt, lag eine heterozygote Maus vor. Die verwendeten Primer nach Dietrich *et al.* (2007) sind im Anhang A.4.2 aufgelistet.

2.5.3. Agarosegelelektrophorese

Um die Anwesenheit und die Größe der mittels PCR amplifizierten Fragmente zu überprüfen, wurden die Produkte sowohl aus der qRT-PCR als auch aus der Genotypisierung in ein mit Ethidiumbromid (1 %, Roth)-gefärbtes 2 % Agarosegel (siehe Anhang A.2.2) aufgetragen. Dazu wurden die Proben mit Ladepuffer (Loading Dye, 6x, Fermentas) vermischt, um die DNA zu beschweren und somit in den Taschen des Geles einbringen zu können. Die Auftrennung und Dokumentation der Produkte erfolgte mithilfe einer Spannungsquelle (PowerPac 1000, BioRad, München, D) und eines Geldokumentationssystems (Quantum, PeqLab, Erlangen, D).

Die erwarteten Größen der durch die qRT-PCR amplifizierten DNA-Fragmente, die mithilfe eines 100 Basenpaar (bp)-DNA Markers überprüft wurden (100 bp DNA ladder, Fermentas), betragen (in bp): TRPC1: 179 (Abb. 2.8); TRPC3: 207; TRPC4: 216; TRPC5: 210; TRPC6: 209; TRPC7: 205; β -Aktin: 106 (Dietrich *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2008).

Die bei der Genotypisierung vervielfältigten DNA-Fragmente einer WT-Probe hatten eine Größe von 150 bp, die einer gendefizienten Probe hingegen 180 bp. Konnten Banden beider

Größen in einer Probe detektiert werden, lag eine TRPC1-heterozygote (TRPC1^{+/-}) Maus vor (Dietrich *et al.*, 2007).

2.6. Histochemie

2.6.1. Zellfärbung nach Golgi

Bei der von Camillo Golgi entwickelten Methode handelt es sich um eine histologische Färbung mittels Silbernitrat. Durch die Imprägnation werden einzelne Neurone, wobei aus unbekannter Ursache lediglich 1 - 2 % der Neurone vollständig gefärbt werden, und Zellstrukturen (z. B. der Golgi-Apparat) sichtbar gemacht. Die Golgi-Färbung ermöglicht die Charakterisierung verschiedener Zelltypen - wie Pyramidenzellen und Interneurone - in einem Gewebeschnitt.

Für Zellfärbungen nach der „*Rapid Golgi Staining*“ - Methode wurden Gehirne von Mäusen im Alter von 20 - 25 Tagen postnatal wie zuvor beschrieben präpariert (siehe Abschnitt 2.3.1.) und die Hemisphären geteilt. Diese wurden in frisch hergestelltem Fixativ, dessen Zusammensetzung im Anhang A.2.3 festgehalten ist, in 6-Well-Platten (Sarstedt) aufgenommen und verblieben dort für sechs Tage bei RT im Dunkeln auf einem Wipptisch (WT17, Biometra). Jeden zweiten Tag wurde das Fixativ erneuert. Sieben Tage nach der Präparation wurden die Gewebeblöcke mit 0,75 % Silbernitratlösung (siehe Anhang A.2.3) mehrmals gewaschen und schließlich für vier Tage bei RT im Dunkeln in 0,75 % Silbernitratlösung imprägniert (Shankaranarayana Rao und Raju, 2004). Nach der Inkubation wurden die Gewebeblöcke für drei Tage in 30 % Saccharoselösung (siehe Anhang A.2.3) überführt und anschließend mithilfe eines Vibratoms (Slicer HR2) 120 µm Horizontalschnitte des Gehirns angefertigt. Die Schnitte wurden in 6 % Saccharose aufgenommen (siehe Anhang A.2.3; Gibb und Kolb, 1998).

Danach wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden EtOH-Reihe - 50 %, 70 %, 90 % für je zwei Minuten und zweimal 100 % für je fünf Minuten - entwässert und für 15 Minuten in Xylol (Roth) geklärt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel Gläser) aufgezogen und mit Kanadabalsam (Roth) und 24 x 60 mm Deckgläsern (Menzel Gläser) eingedeckelt. Schließlich wurden die Präparate abgedunkelt an der Luft getrocknet.

2.6.2. Bildanalyse

Es wurden imprägnierte Gewebeschnitte von fünf unabhängigen Mäusegehirnen jedes Genotyps (TRPC1^{+/+} und TRPC1^{-/-}) mithilfe eines 40x Wasserimmersionsobjektivs untersucht.

Als erstes wurde die Anzahl der Primärdendriten, die direkt dem Soma eines Neurons entspringen und somit Basal- und Apikaldendriten umfassen (Abb. 2.9 A), von 59 - 134 Neuronen

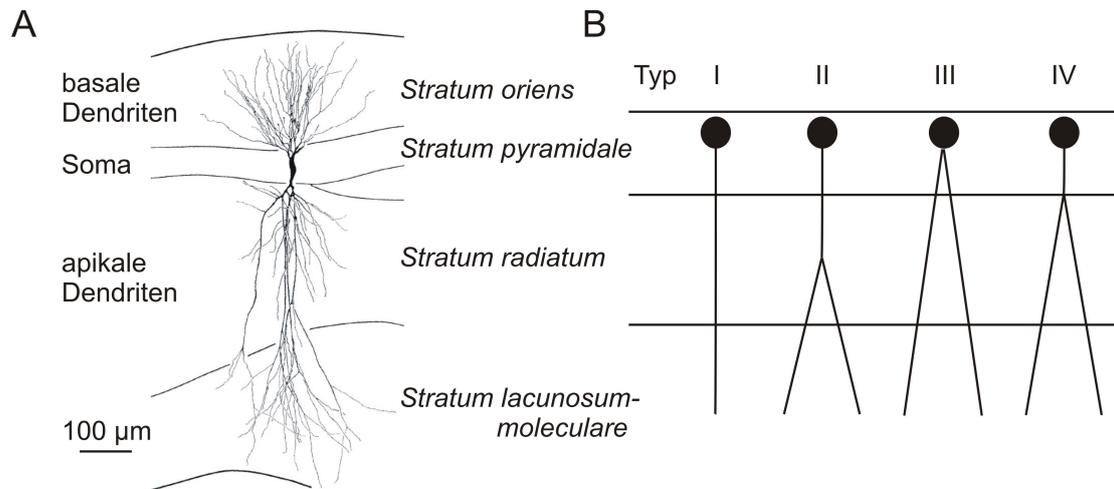


Abb. 2.9.: Aufbau hippocampaler Pyramidenzellen und Klassifizierung des Apikaldendriten.

In **A** ist die Lokalisation des Somas einer CA1 hippocampalen Pyramidenzelle im *Stratum pyramidale* dargestellt. Der deutlich ausgeprägte Apikaldendrit zieht vom Soma ausgehend in das *Stratum radiatum* bzw. das *Stratum lacunosum-moleculare*, wo das Neuron über die Schaffer-Kollaterale aus der hippocampalen CA3-Region synaptische Eingänge erhält. Basale Dendriten erstrecken sich hingegen ausgehend vom Soma in das *Stratum oriens* (Ishizuka *et al.*, 1995). In **B** ist die Klassifizierung der Verzweigungstypen des Apikaldendriten nach Nakamura *et al.* (2009) dargestellt (genauere Erläuterungen siehe Text).

pro Gehirn ausgezählt und innerhalb der Genotypen gemittelt. Des Weiteren wurde der Verzweigungstyp des deutlich ausgeprägten Apikaldendriten der CA1 hippocampalen Neurone - in Anlehnung an Nakamura *et al.* (2009) - in vier Gruppen klassifiziert (Abb. 2.9 B):

- I. Neurone, die einen durchgehenden Apikaldendriten aufweisen;
- II. Neurone, deren Apikaldendrit im *Stratum radiatum* aufzweigt;
- III. Neurone, die zwei oder mehr Apikaldendriten vom Soma ausgehend aufweisen und
- IV. Neurone, deren Apikaldendrit an der Grenze *Stratum pyramidale* zum *Stratum radiatum* aufzweigt.

In jedem Gehirn wurden 112 - 248 individuelle Neurone, deren Apikaldendrit in seiner gesamten Länge mit Silbernitrat gefärbt war, analysiert. Der Anteil jeder Neuronengruppe wurde bestimmt und in den Genotypen gemittelt.

2.7. Statistische Auswertung

Alle Daten aus der Elektrophysiologie, qRT-PCR und Histochemie wurden mithilfe von Microsoft Excel und GraphPad 4.00 statistisch ausgewertet.

Alle Werte sind jeweils angegeben als Mittelwert \pm SEM (Standard Error of the Mean). Statistische Signifikanz wurde mittels des Student's t-Test in GraphPad 4.00 ermittelt, wobei die dortigen Schwellenwerte für eine Verwerfung der Nullhypothese übernommen wurden (* für $P < 0,05$, ** für $P < 0,01$ und *** für $P < 0,001$). Normalerweise wurde der ungepaarte t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. In einigen Fällen kam jedoch auch der gepaarte t-Test für abhängige Stichproben zum Einsatz. Dies ist an den entsprechenden Experimenten vermerkt.

3. Ergebnisse

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass TRPC1 und andere TRPC-Isoformen rezeptorinduzierte, nichtselektive Kationenkanäle bilden, die durch Stimulation von G_q-Protein- bzw. PLC-gekoppelten Rezeptoren aktiviert werden können. Des Weiteren werden die verschiedenen TRPC-Isoformen stark in der CA1-Region des Hippocampus exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Rolle der TRPC1-Untereinheit bei der Vermittlung von nichtselektiven Strömen in der CA1-Region des Hippocampus von Mäusen, die durch Stimulation G_q-koppelnder Rezeptoren induziert wurden, untersucht. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die durch Stimulation metabotroper Glutamaterezeptoren vom Typ I (mGluRI) mittels (RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycin (DHPG) induzierten Ströme in hippocampalen Neuronen von Wildtyp- und TRPC1^{-/-}-Mäusen gelegt.

3.1. Hippocampale TRPC-Expression

In den folgenden Versuchen sollte zunächst die Expression der einzelnen TRPC-Isoformen TRPC1, TRPC3/6/7 und TRPC4/5 im Hippocampus des hier eingesetzten Mausstamms C57bl6/129SV überprüft und damit sichergestellt werden. Des Weiteren könnte die genetische Deletion von TRPC-Untereinheiten - im Falle dieser Arbeit von TRPC1 - zu kompensatorischen Veränderungen im Expressionslevel anderer TRPC-Isoformen führen (Dietrich *et al.*, 2007). Die eventuell veränderte Kombination zu funktionellen heteromultimeren Kanälen könnte veränderte biophysikalische Eigenschaften der Zelle, wie z. B. die Aktivierung und Modulation oder die Amplitude von Ionenströmen, hervorrufen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die mRNA-Level der unterschiedlichen TRPC-Isoformen im Hippocampus von WT- und TRPC1^{-/-}-Mäusen im Alter von 14 bis 26 Tagen postnatal bestimmt. Hierzu wurde die gesamte RNA aus dem Hippocampusgewebe (Präparation nach Fuller und Dailey, 2007; siehe Abschnitt 2.5.1.1) isoliert, mithilfe von quantitativer real-time PCR (siehe Abschnitt 2.5.2.2) spezifische Fragmente der einzelnen TRPC-Isoformen amplifiziert und schließlich auf die Expressionsstärke des "house-keeping genes" β -Aktin bezogen. Die Sequenz des Forwardprimers für TRPC1 wurde so gewählt, dass er in der Region des Exons 8 bindet, die in der TRPC1^{-/-}-Maus deletiert war (siehe Abb. 2.8; Dietrich *et al.*, 2007). Dies ermöglichte

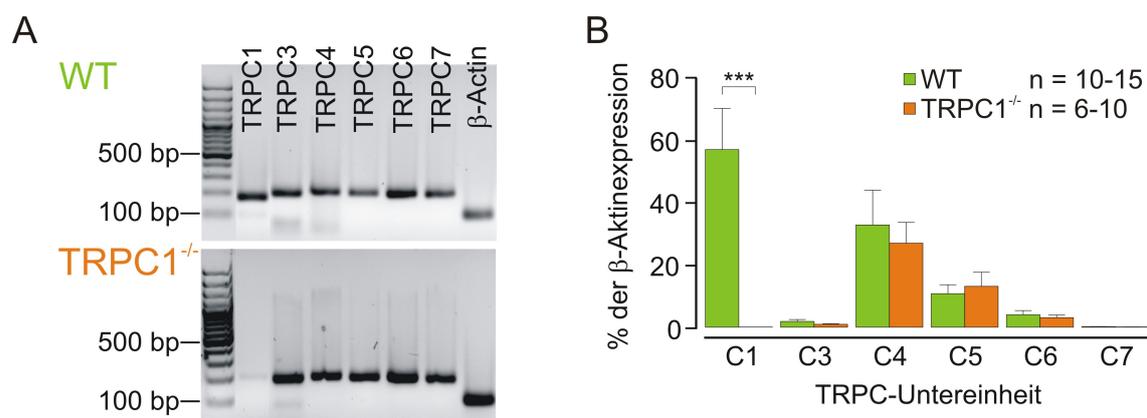


Abb. 3.1.: Hippocampale TRPC-Expression im WT und in der TRPC1^{-/-}-Maus.

A zeigt zwei typische Agarosegele zur Auftrennung der während der qRT-PCR amplifizierten Produkte im WT und in der TRPC1^{-/-}-Maus. Sowohl im WT als auch in der TRPC1^{-/-}-Maus konnten Produkte der TRPC-Isoformen 3 - 7 und β -Aktin nachgewiesen werden. Durch die Wahl des Forwardprimers für TRPC1 (Abb. 2.8) konnte direkt zwischen WT- und TRPC1^{-/-}-Probe unterschieden werden, da in der TRPC1^{-/-}-Maus kein PCR-Produkt amplifiziert wurde. In **B** ist die gemittelte Expressionsstärke der unterschiedlichen TRPC-Isoformen in % der β -Aktinexpression im WT (grün) und in der TRPC1^{-/-}-Maus (orange) im Alter von P14 - P26 aufgetragen. Im WT konnten alle untersuchten TRPC-Isoformen nachgewiesen werden. In der TRPC1^{-/-}-Maus wurden die TRPC-Isoformen, mit Ausnahme von TRPC1, in vergleichbarer Stärke exprimiert.

die direkte Unterscheidung von WT- und Knockout-DNA.

Im hippocampalen Gewebe der TRPC1^{+/+}-Maus konnten alle zu untersuchenden TRPC-Isoformen nachgewiesen werden (Abb. 3.1 B, grün). Mit Ausnahme von TRPC1, für das kein PCR-Produkt amplifiziert werden konnte, wurden in der TRPC1^{-/-}-Maus ebenfalls alle TRPC-Isoformen in vergleichbarer Expressionsstärke zum WT detektiert (Abb. 3.1 B, orange). Ein Vergleich der Expressionsstärke von TRPC1 zwischen den beiden Genotypen zeigte eine fehlende Expression in der TRPC1^{-/-}-Maus (***, $P = 0,0008$). Die Zusammenfassung der hippocampalen TRPC-Expression im Alter von 14 bis 26 Tagen nach der Geburt ist in Tabelle A.1.2 im Anhang zu finden.

An dieser Stelle kann zusammenfassend gesagt werden, dass in der TRPC1^{-/-}-Maus im Alter P14 bis P26 keine kompensatorischen Veränderungen in der Expression verschiedener TRPC-Isoformen im Vergleich zum WT auftreten.

3.2. Die Morphologie CA1 hippocampaler Neurone

Die durch Dietrich *et al.* (2007) vorgestellte TRPC1^{-/-}-Maus zeigt keine Defizite im Verhalten und in der Entwicklung und weist - abgesehen von einer Zunahme von Körpergröße und

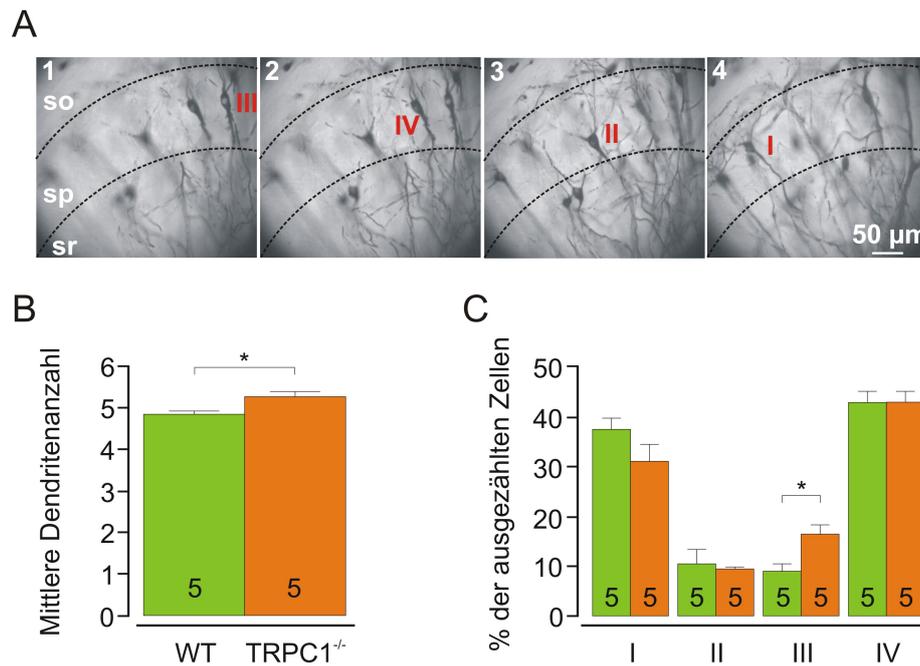


Abb. 3.2.: Veränderte Morphologie von CA1-Neuronen in der TRPC1^{-/-}-Maus.

A (1 - 4) zeigt mittels der „Rapid Golgi Staining“-Methode (siehe Abschnitt 2.6.1) gefärbte Neurone in der CA1-Region innerhalb eines 100 μ m Gewebeschnittes im WT, die die vier unterschiedlichen Verzweigungstypen des Apikaldendriten aufweisen (siehe Abb. 2.9 B; I - IV, rot; so, *Stratum oriens*; sp, *Stratum pyramidale*; sr, *Stratum radiatum*). In **B** ist der signifikante Anstieg der Primärdendritenzahl (Basal- und Apikaldendriten) in der TRPC1^{-/-}-Maus (orange) gegenüber dem WT (grün) dargestellt. In **C** ist die Klassifizierung des Apikaldendriten zusammengefasst, bei der in der TRPC1^{-/-}-Maus eine signifikante Zunahme der Zellen auffiel, die mehr als einen Apikaldendriten aufwiesen (Typ III; genauere Erläuterungen siehe Text).

-gewicht - keinen offensichtlichen Phänotyp auf. Auch die Struktur des Gehirns - mit besonderem Augenmerk auf den Hippocampus - zeigte keine auffälligen Veränderungen. In Abbildung 2.1 D ist beispielhaft die grobe Morphologie der hippocampalen Formation einer 21 Tage alten WT-Maus dargestellt, die vergleichbar auch in der TRPC1^{-/-}-Maus zu finden war. Um die Morphologie individueller hippocampaler CA1-Neurone zu quantifizieren, wurden in dieser Arbeit histochemische Zellfärbungen nach der „Rapid Golgi Staining“-Methode an Gehirnen von WT- und TRPC1^{-/-}-Mäusen durchgeführt.

Färbungen in fünf unabhängigen Gehirnen jedes Genotyps zeigten grundlegend die charakteristische Zellstruktur eines Pyramidenneurons (Abb. 2.9 A) mit einem pyramidal-geformten Soma, das im *Stratum pyramidale* lokalisiert war. Die Zellen wiesen eine variable Anzahl an Basaldendriten auf, die in das *Stratum oriens* zogen, und einen deutlich ausgeprägten Apikaldendrit, der das *Stratum radiatum* durchzog.

Zunächst wurde die Anzahl an *Primärdendriten*, d. h., Fortsätze, die direkt dem Soma entsprangen und somit Basal- und Apikaldendriten darstellten, von 59 - 134 individuellen Zellen pro Gehirn bestimmt. Im WT wies ein pyramidales Neuron der CA1-Region im Durchschnitt $4,86 \pm 0,07$ Primärdendriten ($n = 5$) auf. In der TRPC1^{-/-}-Maus kam es hingegen zu einer geringen, jedoch signifikanten Zunahme der Dendritenanzahl pro Zelle: $5,28 \pm 0,12$ ($n = 5$; *, $P = 0,0174$; Abb. 3.2 B).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Folgenden der Verzweigungstyp des deutlich ausgeprägten *Apikaldendriten* in Anlehnung an Nakamura *et al.* (2009) klassifiziert, wie es in Abbildung 2.9 B dargestellt ist. Bei der Bestimmung des Verzweigungstyps von 112 bis 248 Neuronen pro Gehirn in beiden Genotypen wurde darauf geachtet, dass der Apikaldendrit in seiner gesamten Länge mit Silbernitrat gefärbt worden war. Sowohl im WT als auch in der TRPC1^{-/-}-Maus traten Neurone, deren Apikaldendrit an der Grenze von *Stratum pyramidale* und *Stratum radiatum* aufzweigte (Typ IV), am häufigsten auf (WT: $42,91 \pm 2,26$ %, $n = 5$; TRPC1^{-/-}: $42,98 \pm 2,17$ %, $n = 5$; $P = 0,9832$), gefolgt von Neuronen mit einem durchgehenden Apikaldendriten vom Typ I (WT: $37,54 \pm 2,24$ %, $n = 5$; TRPC1^{-/-}: $31,11 \pm 3,39$ %, $n = 5$; $P = 0,1525$). Beide Verzweigungstypen kamen in vergleichbarer Häufigkeit im WT und der TRPC1^{-/-}-Maus vor. In einem geringeren Maße zeigten Neurone in beiden Genotypen einen Apikaldendriten, der sich im *Stratum radiatum* verzweigte (Typ II; WT: $10,51 \pm 2,87$ %, $n = 5$; TRPC1^{-/-}: $9,45 \pm 0,4$ %, $n = 5$; $P = 0,7234$). Interessanterweise, traten in der TRPC1^{-/-}-Maus mit $16,46 \pm 1,84$ % ($n = 5$) signifikant häufiger Pyramidenzellen auf, die zwei oder mehr Apikaldendriten aufwiesen, also der Klassifizierung vom Typ III entsprachen (WT: $9,04 \pm 1,48$ %, $n = 5$; *, $P = 0,0138$; Abb. 3.2 C).

Die Färbung von Gehirnschnitten mithilfe von Silbernitrat in dieser Arbeit bewiesen, dass es bei CA1 hippocampalen Neuronen der TRPC1^{-/-}-Maus zu einer geringen Veränderung der Zellmorphologie kommt. Diese Veränderung zeigte sich in einer Zunahme der Primärdendritenanzahl pro Soma in der TRPC1^{-/-}-Maus.

3.3. Induktion eines Einwärtstroms durch Stimulation G_q-koppelter Rezeptoren in CA1-Neuronen des murinen Hippocampus

In den nun folgenden Versuchen sollte zunächst herausgefunden werden, ob in CA1 hippocampalen Neuronen von 14 bis 26 Tage alten WT-Mäusen des hier eingesetzten Stammes C57bl6/129SV ein Kationenstrom mit reproduzierbaren Eigenschaften durch die Stimulation verschiedener G_q-koppelter Rezeptoren (mGluRI und mAChR) aktiviert werden konnte. Hierfür wurden WC-Messungen im VC-Modus an Neuronen der CA1-Region durchgeführt,

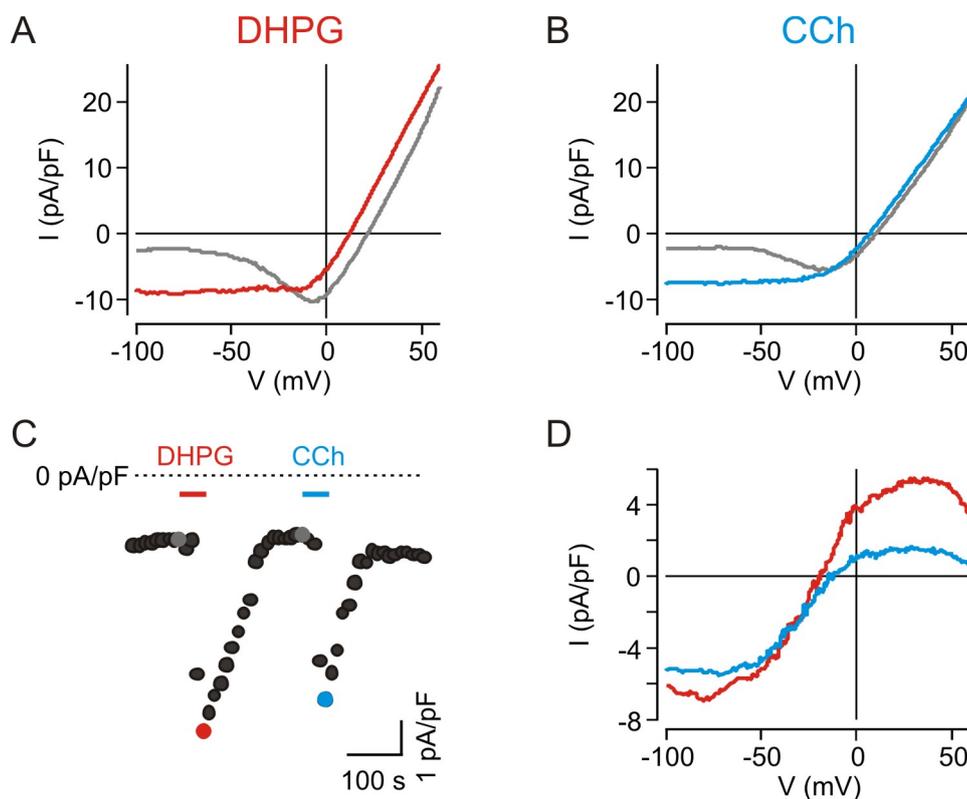


Abb. 3.3.: Stimulation G_q -koppelter Rezeptoren induziert einen Einwärtsstrom in CA1-Neuronen der WT-Maus.

Dasselbe CA1-Neuron wurde in diesem Versuch zunächst 60 s mit 100 μM DHPG und anschließend mit CCh stimuliert. **A** und **B** zeigen die dazugehörigen IV-Beziehungen unter Kontrollbedingungen (grau) und während der Stimulation G_q -koppelter Rezeptoren mit DHPG (**A**, rot) und CCh (**B**, blau). In **C** ist der Strom-Zeitverlauf dieses Versuches bei -100 mV dargestellt. Vermerkt wurde die Applikationsdauer der Agonisten und die Zeitpunkte (basal, grau; Agonisten, rot bzw. blau) der in **A** und **B** abgebildeten IV-Beziehungen. **D** zeigt den aus **A** und **B** jeweils ermittelten Agonisten-sensitiven Strom (DHPG, rot; CCh, blau; detaillierte Erläuterungen siehe Text).

bei denen die Stromantworten auf die basale Spannungsrampe vor und während der Badapplikation verschiedener Agonisten G_q -koppelter Rezeptoren (100 μM DHPG und CCh) aufgezeichnet wurden. In allen elektrophysiologischen Untersuchungen im VC-Modus wurde K^+ sowohl in den extrazellulären Lösungen als auch in der Pipettenlösung durch Cäsium (Cs^+) ersetzt, um K^+ -Ströme zu minimieren (siehe Anhang A.2.1.1.3. und A.2.1.2.1.). Des Weiteren erfolgten alle Versuche in Anwesenheit von Antagonisten ionotroper GABA_A - und Glutamatrezeptoren (siehe Abschnitt 2.4.3.1).

Die IV-Beziehung in Anwesenheit ionotroper Rezeptor-Antagonisten und vor der Applikation eines Agonisten von G_q -koppelter Rezeptoren (*basale IV-Beziehung*; Abb. 3.3 **A** und

B, grau) wies einen geringen Einwärtsstrom zwischen -100 und -60 mV auf. Bei Potentialen größer -60 mV, nahm die Amplitude des Einwärtsstrom zu, bis sie zwischen -15 und 0 mV ihr Maximum erreichte. Schließlich verringerte sich der Einwärtsstrom und kehrte bei einem Potential zwischen +10 und +20 mV um. Potentiale größer +20 mV führten zu einem Auswärtsstrom. Der hier beschriebene Verlauf der einwärtsgerichteten Stromkomponente ähnelt dem spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (z. B. Viard *et al.*, 2004; Talavera und Nilius, 2006).

Induziert durch die Stimulation G_q -koppelnder Rezeptoren (mGluRI oder mAChR) kam es zu einer Zunahme von Einwärtsströmen bei Potentialen unterhalb von -20 mV und bei positiven Potentialen von Auswärtsströmen. Durch DHPG wurde dabei ein durchschnittlicher Anstieg des $I_{60\text{mV}}$ von $-4,69 \pm 0,58$ auf $-14,54 \pm 2,07$ pA/pF vermittelt ($n = 13$; ***, $P < 0,0001$, gepaarter t-Test; Abb. 3.3 A, rot), durch CCh hingegen von $-6,72 \pm 4,25$ auf $-17,85 \pm 11,33$ pA/pF ($n = 3$; Abb. 3.3 B, blau). Gleichzeitig führte die Stimulation G_q -koppelnder Rezeptoren zu einer Linksverschiebung von V_{rev} zu negativeren Potentialen: in DHPG von $18,55 \pm 1,24$ mV auf $11,15 \pm 1,53$ mV ($n = 13$; ***, $P < 0,0001$, gepaarter t-Test; Abb. 3.3 A, rot) und in CCh von $11,27 \pm 3,23$ mV auf $7,93 \pm 2,21$ mV ($n = 3$; Abb. 3.3 B, blau).

Die Stimulation G_q -koppelnder Rezeptoren induzierte eine transiente Stromzunahme, d. h., dass es zum Teil noch in Anwesenheit des Agonisten bereits wieder zu einer Abnahme des Stroms kam. Des Weiteren war die Stromzunahme vollständig reversibel, womit gemeint ist, dass es nach vollständigem Auswaschen des Agonisten zu einer Abnahme des Ein- bzw. Auswärtsstroms kam und nach einer gewissen Zeit zum Wiedererreichen seines Ausgangsniveaus führte (Abb. 3.3 C). Bei wiederholter Stimulation G_q -koppelnder Rezeptoren konnte beobachtet werden, dass eine zweite Stimulation einen in seiner Kinetik vergleichbaren Einwärtsstrom induzierte, die maximale Amplitude jedoch reduziert war. Abbildung 3.3 C zeigt hierfür ein Beispiel für die Applikation von DHPG und CCh. Ein vergleichbarer, reduzierender Effekt konnte jedoch auch bei zweimaliger Gabe von DHPG beobachtet werden. Darin begründet wurde in den folgenden Experimenten jeweils nur die erste Zellantwort für die Auswertung und folgende statistische Vergleiche berücksichtigt.

Der *Agonisten-sensitive Strom*, der wie in Abschnitt 2.4.3.3 beschrieben ermittelt wurde, wies ein Umkehrpotential in der Nähe von -10 mV auf (Abb. 3.3 D): in DHPG $-11,08 \pm 1,66$ mV ($n = 13$; rot) und in CCh $-7,33 \pm 3,15$ mV ($n = 3$; blau). Die gemittelte IV-Beziehung des Agonisten-sensitiven Stroms sowohl für DHPG als auch für CCh war S-förmig mit einem einwärtsgerichteten Strom bei negativen Potentialen, einem Maximum bei ungefähr -50 mV und einem durchschnittlichen $I_{60\text{mV}}$ in DHPG von $-9,85 \pm 1,64$ pA/pF ($n = 13$) und in CCh von $-11,13 \pm 7,08$ pA/pF ($n = 3$). Bei positiven Potentialen zeigte sich ein Auswärtsstrom mit einem Maximum um +40 mV. Der Strom nahm bei Potentialen negativer als -50 mV bzw.

positiver als +40 mV ab.

Unter physiologischen Bedingungen spielt der negative Spannungsbereich in der Nähe des Ruhemembranpotentials um -60 mV eine wichtige Rolle. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen der durch Stimulation von metabotropen Glutamatrezeptoren induzierte einwärtsgerichtete Strom, der DHPG-sensitive Einwärtsstrom, weiter untersucht.

3.3.1. Charakteristika des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms im Wildtyp

Im Folgenden sollten im Wildtyp Charakteristika des DHPG-sensitiven Stroms, wie vermittelnde Ionen und Voraussetzungen für dessen Aktivierung, untersucht werden.

3.3.1.1. Blockade von Na_v -Kanälen mittels Tetrodotoxin

In den zuvor beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von mGluRI bei negativen Membranpotentialen zwischen -100 und -10 mV zu einem Einwärtsstrom führte. Unterschiedlichste Kationen-permeable Kanäle könnten einen solchen Einstrom vermitteln. Na_v -Kanäle, die durch das Erreichen einer definierten Spannungsschwelle aktiviert werden und an der Entstehung von Aktionspotentialen und damit an der Fortleitung von Signalen innerhalb eines neuronalen Netzwerks maßgeblich beteiligt sind, induzieren einen starken, jedoch zeitlich begrenzten Na^+ -Einstrom. Die starke Depolarisation zu Beginn der in dieser Arbeit eingesetzten basalen Spannungsrampen vom Haltepotential (-60 mV) auf +60 mV diente der Inaktivierung von Na_v -Kanälen (siehe Abschnitt 2.4.3.2). Um jedoch zu überprüfen, ob diese Kanäle möglicherweise an der Vermittlung des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms beteiligt sind, wurden Experimente durchgeführt, in denen Na_v -Kanäle mittels 500 nM Tetrodotoxin (TTX) in der extrazellulären Lösung zusätzlich blockiert wurden.

In Zellen, die für mindestens eine Minute mit 500 nM TTX umspült wurden, konnte eine geringfügige Abnahme des Stroms bei -60 mV in der *basalen IV-Beziehung* von $-4,69 \pm 0,58$ pA/pF ($n = 13$) auf $-2,16 \pm 0,96$ pA/pF ($n = 6$; *, $P = 0,0307$) in TTX beobachtet werden. Das Umkehrpotential veränderte sich in Anwesenheit von TTX hingegen nicht (Kontrolle: $18,55 \pm 1,24$ mV, $n = 13$; +500 nM TTX: $16,43 \pm 1,15$ mV, $n = 6$; $P = 0,306$). Die Applikation von DHPG - sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in Anwesenheit von 500 nM TTX - führte zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Potentialen und zur Zunahme des Einwärtsstroms, wie es im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurde.

Der Einwärtsstrom bei -60 mV des *DHPG-sensitiven Stroms* (Kontrolle: $-9,85 \pm 1,64$ pA/pF, $n = 13$; +500 nM TTX: $-9,41 \pm 2,72$ pA/pF, $n = 6$; $P = 0,8861$) und das Umkehrpotential (Kontrolle: $-11,08 \pm 1,66$ mV, $n = 13$; +500 nM TTX: $-7,13 \pm 0,99$ mV, $n = 6$; $P = 0,143$) zeigten keine Unterschiede zwischen Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von TTX (Abb.

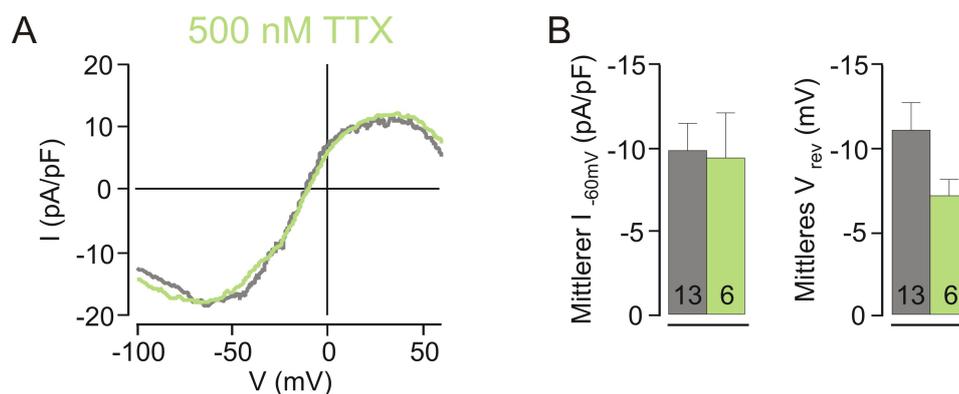


Abb. 3.4.: Effekt der Blockade von Na_v -Kanälen auf den DHPG-sensitiven Strom.

In **A** ist der typische DHPG-sensitive Strom unter Kontrollbedingungen (grau) und in Anwesenheit von 500 nM TTX (grün) in zwei unterschiedlichen Zellen abgebildet. Durch die Blockade von Na_v -Kanälen kam es weder zu einer Veränderung des $I_{-60\text{mV}}$ noch von V_{rev} (**B**).

3.4 B).

Diese Versuche konnten zeigen, dass die zusätzliche Blockade von Na_v -Kanälen durch TTX bei gleichzeitiger Depolarisation der Zelle durch Applikation der basalen Spannungsrampe keinen Einfluss auf den DHPG-sensitiven Strom hat. Damit kann ausgeschlossen werden, dass alleinig Na_v -Kanälen für die Vermittlung des DHPG-sensitiven Stroms verantwortlich sind.

3.3.1.2. Extrazelluläre Kationen

Es ist bekannt, dass TRPC-Untereinheiten nichtselektive Kationenkanäle bilden. Dies bedeutet, dass sie bei Potentialen in der Nähe des Ruhemembranpotentials Kationen entlang ihres Konzentrationsgradienten von außen in die Zelle leiten. Es sollte deshalb im nächsten Schritt geklärt werden, welche Ionen den DHPG-sensitiven Einwärtsstrom vermitteln.

In den folgenden Versuchen sollten Kationen vor der Applikation von DHPG aus der extrazellulären Lösung entfernt werden, um den Anteil des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms zu ermitteln, der durch den Einstrom von extrazellulären Kationen getragen wird. Um Na^+ in der Badlösung vollständig ersetzen zu können, wurde die Carbogen-gepufferte Lösung (NaHCO_3 ; siehe Anhang A.2.1.1.3.) speziell in diesen Versuchen durch eine HEPES-gepufferte Lösung (siehe Anhang A.2.1.1.5.) ausgetauscht. Auch in HEPES-gepuffertter extrazellulärer Kontrolllösung induzierte DHPG einen Strom (Abb. 3.5 A, grau), der zum bereits beschriebenen Agonisten-sensitiven Strom in Carbogen-gepuffertter Lösung vergleichbar war (3.3 D). In Experimenten, in denen der Gehirnschnitt mit HEPES-gepuffertter Lösung umspült wurde, in der Na^+ , Cs^+ und Ca^{2+} durch equimolares *N-Methyl-D-Glucamin* (NMDG^+ , Sigma-Aldrich) ersetzt wurden (siehe Anhang A.2.1.1.6.), welches aufgrund seiner Größe Ionenkanäle nicht oder

nur schlecht passieren und somit in die Zelle einströmen kann, konnte der DHPG-sensitive Einwärtsstrom vollständig unterdrückt werden (Abb. 3.5 A, blau). Der Strom bei -60 mV wurde von $-14,77 \pm 1,68$ pA/pF ($n = 5$) in der Kontrolllösung auf $-0,25 \pm 0,11$ pA/pF ($n = 6$; ***, $P < 0,0001$) in der NMDG⁺-haltigen Lösung reduziert (Abb. 3.5 C, blau) und es kam zu einer Zunahme des Auswärtsstroms (Abb. 3.5 A, blau). Zusätzlich zeigte sich in NMDG⁺-haltiger Lösung ein signifikant negativeres Umkehrpotential von $-49,92 \pm 3,17$ mV ($n = 6$) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ($-6,0 \pm 1,17$ mV, $n = 5$; ***, $P < 0,0001$; Abb. 3.5 D, blau).

Auch in einer extrazellulären Lösung, in der NaCl durch *Cholin-Cl* substituiert und somit die extrazelluläre Na⁺-Konzentration von 152,4 mM auf 26,4 mM reduziert wurde (siehe Anhang A.2.1.1.3c), konnte der Einwärtsstrom bei -60 mV im Vergleich zum Strom unter Kontrollbedingungen von $-7,5 \pm 2,71$ pA/pF ($n = 5$) auf $-4,59 \pm 2,26$ pA/pF ($n = 5$; **, $P = 0,0048$, gepaarter t-Test) minimiert werden. Es wurde ein negativeres Umkehrpotential in reduzierter extrazellulärer Na⁺-Konzentration beobachtet (152,4 mM Na⁺: $-6,16 \pm 1,43$ mV, $n = 5$; 26,4 mM Na⁺: $-16,36 \pm 2,49$ mV, $n = 5$; *, $P = 0,0498$, gepaarter t-Test; Abb. 3.5 C und D, grün).

Weitere Versuche erfolgten in *nominell Ca²⁺-freier Lösung* (0 mM Ca²⁺; siehe Anhang A.2.1.1.3a), der kein CaCl₂ jedoch auch kein zusätzlicher Ca²⁺-Chelator zugefügt wurde. DHPG-sensitive Einwärtsströme in 0 mM Ca²⁺ wurden ebenfalls im Vergleich zu Strömen unter Kontrollbedingungen in 2 mM Ca²⁺ stark vermindert (Abb. 3.5 B, gelb). Bei einem Potential von -60 mV konnte eine Reduktion des Einwärtsstroms von $-11,93 \pm 2,53$ pA/pF ($n = 6$) in 2 mM Ca²⁺ auf $-4,76 \pm 1,59$ pA/pF ($n = 7$; *, $P = 0,0307$) in 0 mM extrazellulärem Ca²⁺ beobachtet werden (Abb. 3.5 C, gelb). Das geringfügig negativere Umkehrpotential in 0 mM extrazellulärem Ca²⁺ ($-15,69 \pm 2,87$ mV, $n = 7$) war nicht signifikant unterschiedlich zu V_{rev} unter Kontrollbedingungen ($-14,47 \pm 3,77$ mV, $n = 6$; $P = 0,7985$; Abb. 3.5 D, gelb). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der DHPG-sensitive Einwärtsstrom in CA1 hippocampalen Neuronen hauptsächlich durch extrazelluläre Kationen getragen wird.

K⁺-Ionen liegen im Gegensatz zu Na⁺ und Ca²⁺ unter physiologischen Bedingungen intrazellulär in einer höheren Konzentration vor. Bei Öffnung entsprechender Ionenkanäle strömen sie deshalb bei physiologischen Potentialen entlang ihres Konzentrationsgradienten aus der Zelle hinaus. Wie bereits vorangehend erwähnt, wurden in VC-Experimenten K⁺-Kanäle standardmäßig durch den Ersatz von K⁺ durch Cs⁺ sowohl in der extra- als auch in der intrazellulären Lösung gehemmt. Um eine Beteiligung von K⁺-Strömen, die möglicherweise nicht vollständig blockiert wurden, an der Vermittlung des DHPG-sensitiven Stroms zu überprüfen, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt, in denen der extrazellulären Lösung 10 mM

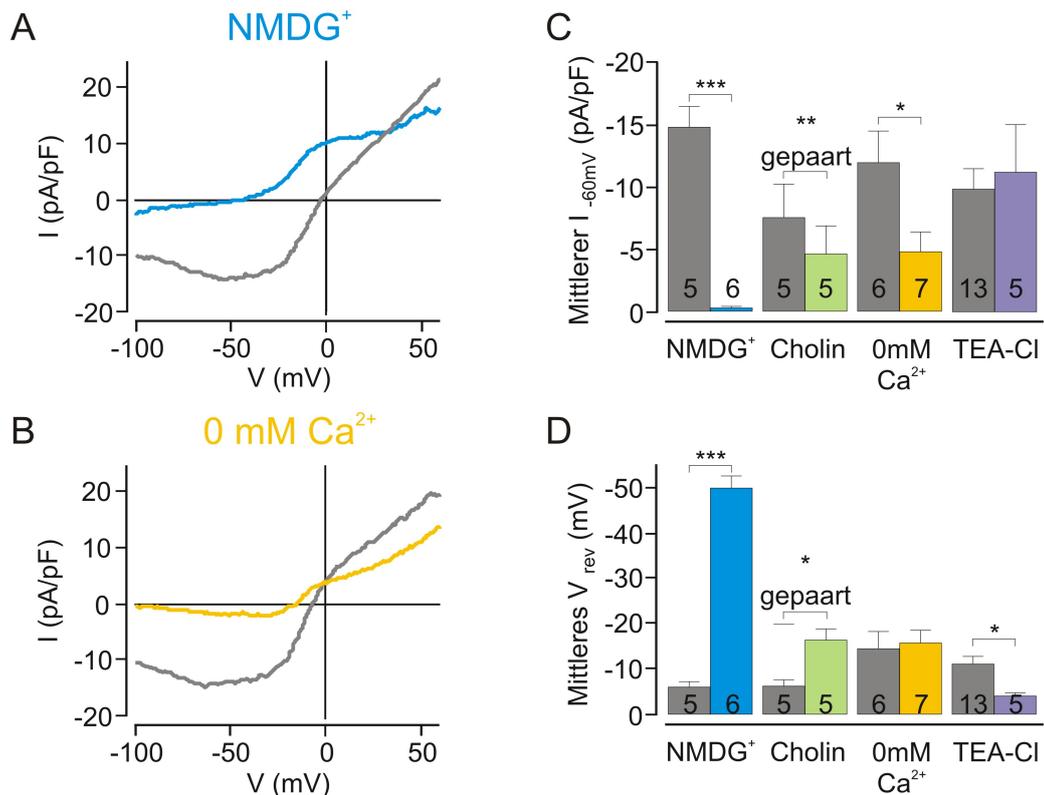


Abb. 3.5.: Vermittlung des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms durch extrazelluläre Kationen.

In Versuchen, in denen extrazelluläre Kationen entfernt bzw. ersetzt wurden, sollte untersucht werden, welche Ionen an der Vermittlung des DHPG-sensitiven Stroms in CA1-Neuronen beteiligt waren. **A** zeigt den DHPG-sensitiven Strom unter Kontrollbedingungen (grau) und den Effekt der Substitution von extrazellulärem Na^+ , Cs^+ und Ca^{2+} durch equimolares NMDG^+ (blau) in zwei Zellen. In **B** ist hingegen der DHPG-sensitive Strom unter Kontrollbedingungen (2 mM Ca^{2+} , grau) und bei Entfernen von extrazellulärem Ca^{2+} (nominell 0 mM Ca^{2+} , gelb) in unterschiedlichen Zellen dargestellt. In **C** und **D** sind die Auswirkungen von extrazellulärem NMDG^+ (siehe auch A, blau), Cholin-Cl (siehe Text, grün), nominell 0 mM Ca^{2+} (siehe auch B, gelb) und der Blockade von K^+ -Kanälen mittels TEA-Cl (siehe Text, violett) auf den $I_{-60\text{mV}}$ (**C**) und V_{rev} (**D**) des DHPG-sensitiven Stroms zusammengefasst (Erläuterungen siehe Text).

Tetraäthylammonium-Chlorid (TEA-Cl, Sigma-Aldrich) beigelegt wurde.

Die Applikation von TEA-Cl induzierte in der *basalen IV-Beziehung* ein positiveres Umkehrpotential von $25,64 \pm 0,57$ mV ($n = 5$) im Vergleich zum V_{rev} unter Kontrollbedingungen ($18,55 \pm 1,24$ mV, $n = 13$; **, $P = 0,0034$). Es kam jedoch nicht zu einer Veränderung des einwärtsgerichteten Stroms bei -60 mV (Kontrolle: $-4,69 \pm 0,58$ pA/pF, $n = 13$; +10 mM TEA-Cl: $-3,61 \pm 1,03$ pA/pF, $n = 5$; $P = 0,356$). Durch die Applikation von DHPG sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in Anwesenheit von 10 mM TEA-Cl kam es zur Verschiebung

des Umkehrpotentials zu negativeren Potentialen und zur Zunahme des Einwärtsstroms, wie es bereits vorausgehend mehrfach beschrieben wurde.

Der *DHPG-sensitive Strom* zeigte unter Kontrollbedingungen ein Umkehrpotential von $-11,08 \pm 1,66$ mV und einen Strom bei -60 mV von $-9,85 \pm 1,64$ pA/pF ($n = 13$). Durch die Blockade von K^+ -Kanälen mittels TEA-Cl konnte beim mittleren DHPG-sensitiven Strom ein positiveres Umkehrpotential von $-3,96 \pm 0,72$ mV ($n = 5$; *, $P = 0,0203$; Abb. 3.5 D) und eine Abnahme des auswärtsgerichteten Stroms nachgewiesen werden. Der Einwärtsstrom bei -60 mV veränderte sich hingegen nicht ($-11,2 \pm 3,83$ pA/pF, $n = 5$; $P = 0,7116$; Abb. 3.5 C).

Diese Ergebnisse zeigten, dass der DHPG-sensitive Einwärtsstrom unter physiologischen Bedingungen durch einen Kationeneinstrom (Na^+ und Ca^{2+}) vermittelt wird, und dass trotz Cs^+ -haltigen Lösungen diese nichtselektiven Kationenströme durch TEA-sensitive K^+ -Ströme kontaminiert sind.

3.3.1.3. Spannungsabhängigkeit

Die Wahl einer absteigenden Spannungsrampe von +60 bis -100 mV, zunächst um spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle zu inaktivieren, stellte sich in unseren Versuchen als glücklicher Zufall heraus, da in aufsteigenden Rampen von -100 bis +60 mV kein oder nur ein geringer Einwärtsstrom mittels DHPG aktiviert werden konnte. Dies ist in Abbildung 3.6 dargestellt: In diesen Versuchen setzten wir die *trianguläre Spannungsrampe* ein (siehe Abschnitt 2.4.3.2). Spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle wurden in diesen Versuchen über die Gabe von 500 nM Tetrodotoxin in der Badlösung blockiert.

Die IV-Beziehung des DHPG-sensitiven Stroms während des *aufsteigenden Teiles der Spannungsrampe* (Abb. 3.6 A) zeigte einen deutlich auswärtsgerichteten Strom, der bei Potentialen positiver als -30 mV stark zunahm. Diesem Anteil des DHPG-sensitiven Stroms fehlte jedoch gänzlich eine einwärtsgerichtete Komponente und zeigte lediglich einen I_{-60mV} von $-0,15 \pm 0,18$ pA/pF ($n = 6$). Das Umkehrpotential des Stroms betrug durchschnittlich $-25,5 \pm 9,12$ mV ($n = 6$). Im Gegensatz dazu wies der DHPG-sensitive Strom während des *absteigenden Teils der gleichen Spannungsrampe* im gleichen Neuron (Abb. 3.6 B) zusätzlich zum Auswärtsstrom eine deutlich ausgeprägte, einwärtsgerichtete Stromkomponente mit einem durchschnittlichen, signifikant größeren I_{-60mV} von $-11,8 \pm 2,61$ pA/pF ($n = 6$; **, $P = 0,0067$, gepaarter t-Test) auf. Das Umkehrpotential des Stromes unterschied sich hingegen nicht im Vergleich zwischen aufsteigender und absteigender Rampe ($-14,53 \pm 3,55$ mV, $n = 6$; $P = 0,1615$, gepaarter t-Test).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivierung des Einwärtsstroms in CA1 hippocampalen Neuronen sowohl von einer Stimulation von mGluRI mittels DHPG abhängig ist,

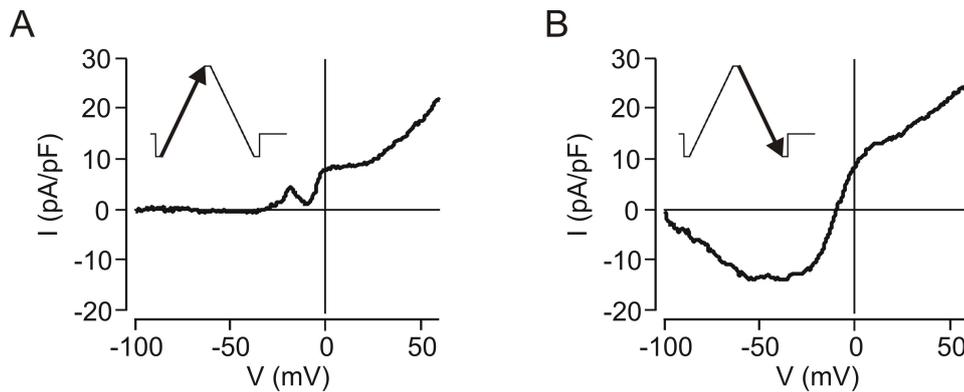


Abb. 3.6.: Spannungsabhängigkeit des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms.

In **A** ist der DHPG-sensitive Strom während des *aufsteigenden* Anteils der triangulären Rampe von -100 nach +60 mV dargestellt (siehe Inset). Ab einem Potential größer -30 mV wurde ein Auswärtsstrom induziert. Eine einwärtsgerichtete Komponente bei negativen Potentialen fehlte vollständig. In **B** ist der DHPG-sensitive Strom während des *absteigenden* Anteils der gleichen Rampe im gleichen Neuron abgebildet. Im Unterschied zum DHPG-sensitiven Strom in **A** zeigte sich hier ein ausgeprägter Einwärtsstrom mit einem Maximum nahe -50 mV.

jedoch auch eine Depolarisation der Zellmembran benötigt.

3.3.2. Zunahme des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms in der TRPC1^{-/-}-Maus

Um die Rolle von TRPC1 an der Vermittlung des rezeptorinduzierten Einwärtsstroms in CA1-Neuronen zu untersuchen, wurde in den nun folgenden Versuchen der zuvor beschriebene Effekt im WT mit dem in der TRPC1^{-/-}-Maus verglichen. Wie vorangehend bereits beschrieben, weisen TRPC1^{-/-}-Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp auf (Dietrich *et al.*, 2007). Es konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zu geringen Veränderungen der Morphologie pyramidalen Neurone in der CA1-Region des Hippocampus in der Knockoutmaus kommt (siehe Abschnitt 3.1).

Die *basale IV-Beziehung* in Anwesenheit von ionotropen Rezeptor-Antagonisten wies in CA1-Neuronen der TRPC1^{-/-}-Maus einen zum WT vergleichbaren Verlauf auf, wie es für die Stimulation G_q-koppelnder Rezeptoren im WT vorangehend beschrieben wurde und in Abbildung 3.3 gezeigt ist. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Genotypen konnte beobachtet werden, wenn mittels DHPG mGluRI aktiviert wurde: In der TRPC1^{-/-}-Maus kam es zu einem größeren Einwärtsstrom bei -60 mV von $-42,6 \pm 10,3$ pA/pF ($n = 25$), der sich jedoch nicht signifikant vom WT unterschied ($I_{60\text{mV}}$: WT $-14,54 \pm 2,07$ pA/pF, $n = 13$; $P = 0,0597$). Das Umkehrpotential war hingegen vergleichbar zwischen der TRPC1^{-/-}-Maus ($14,95 \pm 1,36$ mV, $n = 25$) und dem WT ($11,15 \pm 1,53$ mV, $n = 13$; $P = 0,0903$).

Auch der Verlauf des *DHPG-sensitiven Stroms* unterschied sich zwischen WT- und Knock-

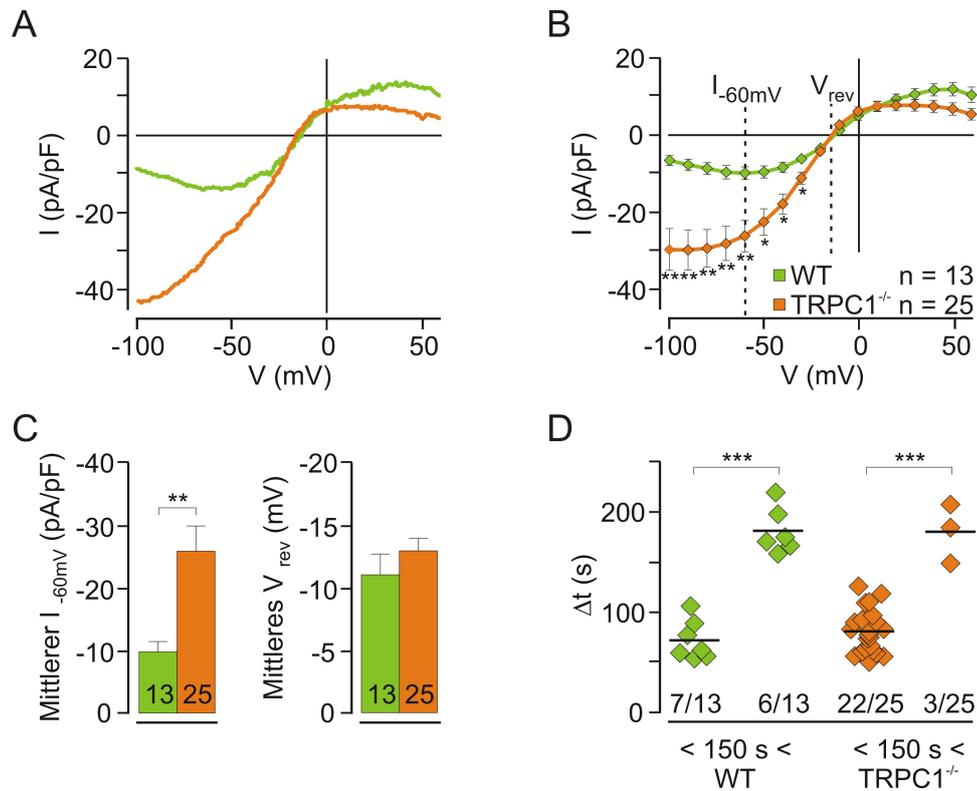


Abb. 3.7.: Zunahme des DHPG-sensitiven Stroms in der TRPC1^{-/-}-Maus.

A zeigt einen typischen DHPG-sensitiven Strom in der WT- (grün) und der TRPC1^{-/-}-Maus (orange) und **B** die gemittelten DHPG-sensitiven Ströme für alle WT- und TRPC1^{-/-}-Messungen im Alter von 14 bis 26 Tagen. In **C** sind $I_{-60\text{mV}}$ und V_{rev} im WT und der TRPC1^{-/-}-Maus gegenübergestellt. In **D** ist die Dauer des Einwärtsstroms (Δt), ermittelt aus dem Strom-Zeitverlauf bei -100 mV, im WT und in der TRPC1^{-/-}-Maus dargestellt (genauere Erläuterungen siehe Text).

outmaus (Abb. 3.7 A und B). Im Verlauf der IV-Beziehung in der Knockoutmaus fehlte eine Region mit Stromabnahme bei Potentialen negativer als -50 mV und der Auswärtsstrom war geringer. Diese Unterschiede fanden sich auch, wenn die jeweils gemittelten DHPG-sensitiven Ströme für WT und TRPC1^{-/-}-Mäuse im Alter von 14 bis 26 Tage postnatal miteinander verglichen wurden (Abb. 3.7 B): In Neuronen von Knockoutmäusen waren Einwärtsströme bei Potentialen negativer als -30 mV signifikant größer, was sich bei dem Vergleich des $I_{-60\text{mV}}$ in der TRPC1^{-/-}-Maus von $-26,0 \pm 4,05$ pA/pF ($n = 25$) und im WT von $-9,85 \pm 1,64$ pA/pF ($n = 13$; **, $P = 0,0081$) bestätigte. Das durchschnittliche Umkehrpotential des DHPG-sensitiven Stroms in der Knockoutmaus mit $-13,01 \pm 0,99$ mV ($n = 25$) unterschied sich hingegen nicht gegenüber dem Umkehrpotential im WT ($-11,08 \pm 1,66$ mV, $n = 13$; $P = 0,2951$; Abb. 3.7 C). Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Amplitude des Auswärtsstroms.

Parallel zu der Zunahme des Einwärtsstroms in der TRPC1^{-/-}-Maus konnte bei gleicher

Applikationsdauer des Agonisten von 60 s eine Veränderung der Dauer des Einwärtsstroms im Strom-Zeitverlauf bei -100 mV beobachtet werden. Hierzu wurde die Dauer des Einwärtsstroms (Δt ; Abb. 3.7 D) von seinem Beginn bis zum Wiedererreichen der Ausgangsstromamplitude, wie es in Abb. 2.5 B (Inset) dargestellt ist, bestimmt. Im WT kam es in 54 % der gemessenen Zellen (7/13) durchschnittlich innerhalb von $71,61 \pm 7,47$ s zum Rückgang des einwärtsgerichteten Stroms, bis das Ausgangsniveau wieder erreicht wurde. In 6 von 13 Zellen dauerte der Einstrom hingegen länger als 150 s an. Der Vergleich zu der Einstromdauer in der TRPC1^{-/-}-Maus zeigte einen deutlich größeren Anteil von rund 88 % (22/25) der Zellen, in denen der Einstrom durchschnittlich innerhalb von $80,62 \pm 4,62$ s beendet war. Nur in 3 aus 25 Zellen dauerte der Einstrom länger als 150 s. In der TRPC1^{-/-}-Maus kam es im Vergleich zum WT somit häufiger zu einem kürzer andauernden Einwärtsstrom (< 150 s).

Da TRPC1 ebenso auf der präsynaptischen Seite einen Einfluss auf die Freisetzung von Transmittern haben könnte, sollte im folgenden Schritt die basale, synaptische Aktivität der Neurone in der CA1-Region im WT und der TRPC1^{-/-}-Maus überprüft werden. Hierzu wurden sowohl die Anzahl als auch die Amplituden einzelner synaptischer Ereignisse vor Einwaschen von ionotropen Rezeptor-Antagonisten analysiert. Wir fanden keinen Anhalt dafür, dass in der TRPC1^{-/-}-Maus möglicherweise eine veränderte basale, synaptische Aktivität auftritt. Im WT traten synaptische Ereignisse mit einer mittleren Frequenz von $0,19 \pm 0,02$ Hz und einer durchschnittlichen Amplitude von $-4,0 \pm 0,61$ pA/pF ($n = 13$) auf. In der TRPC1^{-/-}-Maus zeigten sich sowohl für die Häufigkeit ($0,16 \pm 0,02$ Hz, $n = 25$; $P = 0,3254$) als auch für die Amplitude ($-3,29 \pm 0,42$ pA/pF, $n = 25$; $P = 0,3343$) vergleichbare Werte.

3.3.2.1. Extrazelluläre Kationen

Wie in der TRPC1^{+/+}-Maus (siehe Abschnitt 3.3.1.2) wurde auch in der Knockoutmaus der Einwärtsstrom bei -60 mV durch den Austausch von extrazellulären Kationen durch NMDG⁺ von $-27,4 \pm 7,27$ pA/pF ($n = 7$) unter Kontrollbedingungen auf $-2,32 \pm 0,51$ pA/pF ($n = 5$) in NMDG⁺-haltiger Lösung stark reduziert (*, $P = 0,0167$; Abb. 3.8 B, blau). Das Umkehrpotential war in NMDG⁺-haltiger Lösung wie bereits im WT beschrieben signifikant negativer ($-37,78 \pm 1,48$ mV, $n = 5$) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ($-12,16 \pm 1,38$ mV, $n = 7$; ***, $P < 0,0001$; Abb. 3.8 C, blau).

Der Entzug von extrazellulärem Ca²⁺ (*nominell 0 mM Ca²⁺*) hatte im Vergleich zur WT-Maus hingegen einen geringeren Effekt auf den DHPG-sensitiven Strom (Abb. 3.8 B und C, gelb). Die Stromdichte bei -60 mV betrug $-15,63 \pm 3,04$ pA/pF ($n = 12$) in 2 mM Ca²⁺ und wurde in 0 mM Ca²⁺ auf $-14,36 \pm 3,31$ pA/pF ($n = 4$; $P = 0,8257$) reduziert. Auch das Umkehrpotential unterschied sich nicht signifikant zwischen Kontrollbedingungen

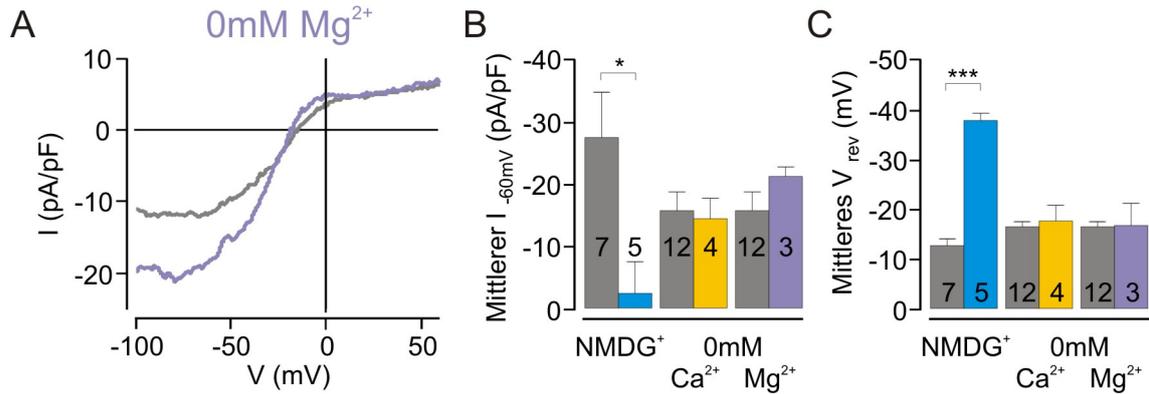


Abb. 3.8.: Vermittlung des DHPG-sensitiven Stroms durch extrazelluläre Kationen auch in der TRPC1^{-/-}-Maus.

In **A** sieht man den DHPG-sensitiven Strom in 1 mM Mg²⁺ (grau) und bei Entzug von extrazellulärem Mg²⁺ (0 mM Mg²⁺, violett). In **B** ist der mittlere I_{-60mV} und in **C** das mittlere V_{rev} für Versuche in NMDG⁺ (blau), nominell 0 mM Ca²⁺ (gelb) und Mg²⁺ (siehe auch A, violett) in der TRPC1^{-/-}-Maus zusammengefasst (weitere Erläuterungen siehe Text).

(-16,42 ± 1,0 mV, n = 12) und nominell Ca²⁺-freier Lösung (-17,53 ± 3,14 mV, n = 4; P = 0,6561).

Die Entfernung von extrazellulärem Mg²⁺ (0 mM Mg²⁺; siehe Anhang A.2.1.1.3b) führte in der TRPC1^{-/-}-Maus tendenziell zu einer Zunahme des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms von -15,63 ± 3,04 pA/pF (n = 12) unter Kontrollbedingungen (1 mM Mg²⁺) auf -21,12 ± 1,54 pA/pF (n = 3; P = 0,3988) in 0 mM Mg²⁺. Das Umkehrpotential war jedoch vergleichbar zwischen 1 mM und 0 mM extrazellulärem Mg²⁺ (1 mM Mg²⁺: -16,42 ± 1,0 mV, n = 12; 0 mM Mg²⁺: -16,67 ± 4,44 mV, n = 3; P = 0,9308; Abb. 3.8, violett).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann festgehalten werden, dass der DHPG-sensitive Einwärtsstrom auch in der TRPC1^{-/-}-Maus durch extrazelluläre Kationen, wie Na⁺ und Ca²⁺, vermittelt wird. Zusätzlich zeigten diese Resultate, dass die Amplitude des Einwärtsstroms durch die Anwesenheit von extrazellulärem Mg²⁺ moduliert wird.

3.3.2.2. Spannungsabhängigkeit

Um die Spannungsabhängigkeit des DHPG-sensitiven Stroms in der TRPC1^{-/-}-Maus zu untersuchen, wurden zunächst ebenfalls die *triangulären Spannungsrampen* - wie zuvor im WT beschrieben (siehe Abschnitt 3.3.1.3) - eingesetzt. CA1-Neurone in der Knockoutmaus wiesen bei Verwendung dieser Rampen eine zum WT vergleichbare Spannungsabhängigkeit auf: Die IV-Beziehung des DHPG-sensitiven Stroms zeigte bei Blockade von Na_v-Kanälen mittels 500 nM TTX während des aufsteigenden Teils der Rampe einen Strom bei -60 mV von

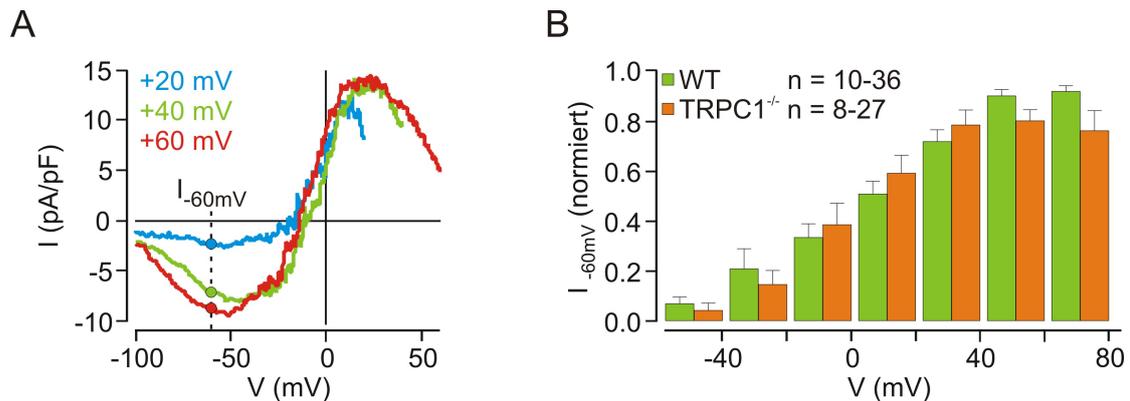


Abb. 3.9.: Spannungsabhängigkeit des DHPG-sensitiven Stroms: WT *versus* TRPC1^{-/-}-Maus.

Dargestellt ist die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit des DHPG-sensitiven Stroms mithilfe der in Abschnitt 2.4.3.2 beschriebenen Kombination von depolarisierenden Spannungssprüngen und absteigender Rampe. **A** zeigt typische DHPG-sensitive Ströme nach Depolarisation von -60 mV auf +20 (blau), +40 (grün) und +60 mV (rot) in einem CA1-Neuron im WT. In **B** ist der normierte I_{-60mV} in Abhängigkeit von der induzierten Membranspannung aufgetragen. Der DHPG-sensitive Einwärtsstrom zeigte in beiden Genotypen (WT, grün; TRPC1^{-/-}, orange) eine vergleichbare schwache Spannungsabhängigkeit (Erläuterungen siehe Text).

$-0,20 \pm 0,13$ pA/pF und ein Umkehrpotential von $-18,28 \pm 4,51$ pA/pF ($n = 12$). Zusätzlich konnte während dieses Rampenteils ein deutlicher Auswärtsstrom beobachtet werden. Der absteigende Anteil der Spannungsrampe induzierte einen DHPG-sensitiven Strom in Knock-outmäusen mit einem signifikant größeren I_{-60mV} von $-13,80 \pm 2,99$ pA/pF ($n = 12$; ***, $P = 0,0008$, gepaarter t-Test). Die Umkehrpotentiale induziert durch den aufsteigenden und absteigenden Teil der Rampe ($-18,73 \pm 1,27$ pA/pF, $n = 12$; $P = 0,9038$, gepaarter t-Test) waren miteinander vergleichbar, wie es vorangehend für den WT beschrieben wurde.

Eine mögliche Erklärung für die Zunahme des DHPG-sensitiven einwärtsgerichteten Stroms in der TRPC1^{-/-}-Maus könnte eine veränderte Spannungsabhängigkeit des induzierten Einwärtsstroms sein. Um diese Möglichkeit zu quantifizieren, sollten im Folgenden der durch Depolarisationssprünge induzierte Strom vor und während der Applikation von DHPG untersucht werden. Die Amplitude und die Kinetik sogenannter Tail-Ströme, die durch die Applikation von Depolarisations- bzw. Hyperpolarisationspulsen induziert werden, werden häufig genutzt, um die Spannungsabhängigkeit von definierten Strömen zu charakterisieren. Aufgrund der komplexen Membrankapazitäten von nativen Zellen, z. B. der hier untersuchten, stark verzweigten Pyramidenzellen, waren durch Depolarisationssprünge induzierte Tail-Ströme in den untersuchten CA1-Neuronen sehr variabel und schlecht reproduzierbar. Aus diesem Grund kamen ausgehend vom Haltepotential (-60 mV) *Spannungssprünge* zu verschiedenen depola-

risierenden Potentialen von -50 bis +80 mV mit anschließender absteigender Rampe (nach -100 mV) zum Einsatz, um die Spannungsabhängigkeit des DHPG-sensitiven Stroms in den Genotypen genauer zu beschreiben (siehe Abschnitt 2.4.3.2 und Abb. 2.4 C). Hierzu wurde bei einer Reihe von maximal fünf Depolarisationssprüngen pro DHPG-Stimulation jeweils der $I_{60\text{mV}}$ bestimmt und auf den maximal induzierten Strom bei -60 mV in der Zelle normiert. Abbildung 3.9 A zeigt beispielhaft den jeweiligen DHPG-sensitiven Strom mit hervorgehobenen $I_{60\text{mV}}$ als Antwort auf drei Depolarisationssprünge auf +20, +40 und +60 mV in einem Neuron. In diesem Fall wurden die ermittelten $I_{60\text{mV}}$ bei +20, +40 und +60 mV auf den $I_{60\text{mV}}$ bei +60 mV, als maximal induzierten Strom, normiert. Um eine übersichtliche Darstellung zu ermöglichen, wurde der so normalisierte $I_{60\text{mV}}$ schließlich in 20 mV Schritten gemittelt und in Abhängigkeit von der induzierten Depolarisation in der Abbildung 3.9 B dargestellt.

Depolarisationssprünge vom Haltepotential -60 mV führten sowohl im WT als auch in der Knockoutmaus zu einer Zunahme des $I_{60\text{mV}}$, also dem induzierten Einwärtsstrom, wobei stärkere Depolarisationen eine größere Amplitude des Stroms hervorriefen (Abb. 3.9 B). Der halbmaximale Strom wurde in beiden Genotypen bei einer Depolarisation auf 0 bis +20 mV erzielt (Boltzmann Fit: im WT: V_{50} : $15,61 \pm 0,75$ mV, Steigung: $23,64 \pm 0,94$, R^2 : 0,994, $n = 10 - 36$; in der TRPC1^{-/-}-Maus: V_{50} : $-2,6 \pm 0,61$ mV, Steigung: $15,45 \pm 0,45$; R^2 : 0,993, $n = 8 - 27$). Ab einem Depolarisationssprung auf +50 mV konnte im Schnitt keine weitere Zunahme des $I_{60\text{mV}}$ mehr beobachtet werden. Es wurde sowohl im WT als auch in der TRPC1^{-/-}-Maus ein Maximum erreicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der DHPG-sensitive Strom in beiden Genotypen nur schwach spannungsabhängig ist. Das heißt, die ansteigende Phase der Stromzunahme im getesteten Spannungsbereich zwischen -50 bis +50 mV verlief flach, was sich in einer langsamen Steigung des Boltzmann Fits widerspiegelte. Es zeigen sich aber keine signifikanten Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit zwischen WT- und TRPC1^{-/-}-Maus.

3.3.3. Intrazelluläre Modulationen des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms in der TRPC1^{-/-}-Maus

Wie zuvor beschrieben bilden TRPC-Kanäle rezeptorinduzierte, nichtselektive Kationenkanäle. Sowohl in CA1 hippocampalen Neuronen in der WT- als auch in der TRPC1^{-/-}-Maus konnte in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden, dass die Stimulation von G_q-Proteinkoppelnden Rezeptoren wie mAChR oder mGluRI zur Aktivierung eines durch extrazelluläre Kationen vermittelten Einwärtsstromes führte. Die durch die Stimulation von G_q-Proteinkoppelnden Rezeptoren aktivierte Signaltransduktionskaskade in CA1-Neuronen ist dabei jedoch noch nicht geklärt. Deshalb sollten in den nun folgenden Experimenten einzelne Kom-

ponenten dieser Signalkaskade pharmakologisch manipuliert werden. Diese Versuche wurden aufgrund des deutlicher ausgeprägten Einwärtsstroms in der TRPC1^{-/-}-Maus durchgeführt.

Zunächst wurde *Aluminiumfluorid* (AlF_x), wobei der intrazellulären Lösung Konzentrationen von 30 µM Aluminiumchlorid (AlCl₃) und 10 mM Natriumfluorid (NaF) beigelegt wurden (1 µl 0,5 M NaF und 0,5 µl 3 mM AlCl₃ (beides Roth) in 50 µl Pipettenlösung), genutzt, um eine Aktivierung von G-Proteinen zu induzieren. Durch eine zu einem Phosphat vergleichbare chemische Struktur inhibiert AlF_x die Aktivität von hydrolytischen Enzymen (z. B. GTPasen) und führt hierdurch zur dauerhaften Aktivierung heterotrimerer GTP-bindender Proteine (Strunecká *et al.*, 2002; Li, 2003).

Durch die Infusion von AlF_x (Abb. 3.10 A) nach dem Übergang in die WC-Konfiguration in das Cytosol, kam es in allen untersuchten Zellen (n = 5) zu einer Zunahme des einwärtsgerichteten Stroms im Strom-Zeitverlauf bis eine Plateauphase erreicht wurde. Dieser induzierte Strom inaktivierte nicht. Der Verlauf der IV-Beziehung des AlF_x-sensitiven Stroms, wie er in Abbildung 3.10 A dargestellt ist, zeigte eine charakteristische, einwärtsgerichtete Komponente mit einem Maximum zwischen -50 und -40 mV. Der Strom bei -60 mV von $-12,05 \pm 2,45$ pA/pF (n = 5) war nicht signifikant unterschiedlich von dem I_{60mV} induziert durch die Applikation von 100 µM DHPG ($-26,04 \pm 4,05$ pA/pF, n = 25; P = 0,1412; Abb. 3.10 C, blau). Bei einem negativeren Potential kam es zur Abnahme des AlF_x-induzierten Einwärtsstroms. Bis zum Erreichen des Umkehrpotentials bei $-15,7 \pm 1,92$ mV (AlF_x, n = 5) und $-13,01 \pm 0,99$ mV (DHPG, n = 25; P = 0,2674; Abb. 3.10 D, blau) verliefen die IV-Beziehungen des AlF_x- und DHPG-sensitiven Stroms nahezu parallel. Der Auswärtsstrom des AlF_x-sensitiven Stroms zeigte ein Maximum bei etwa 0 mV.

Des Weiteren wurde der Effekt einer veränderten intrazellulären *Pufferung von Ca²⁺* auf den DHPG-sensitiven Strom untersucht. Hierfür kam eine intrazelluläre Lösung zum Einsatz, die im Vergleich zur Standardpipettenlösung (1 mM EGTA; siehe Anhang A.2.1.2. 1.) eine reduzierte Konzentration von EGTA (0,1 mM; siehe Anhang A.2.1.2. 2.), eines Ca²⁺-spezifischen Chelators, aufwies (Abb. 3.10 B). Beide Lösungen enthielten - ermittelt mit dem Programm „CaBuF“ (Guy.Droogmans@med.KULeuven.ac.be) - eine Konzentration von 100 nM freiem Ca²⁺.

Eine schlechtere Pufferung von intrazellulärem Ca²⁺ führte bei der Stimulation von CA1-Neuronen in der TRPC1^{-/-}-Maus tendenziell zu einer Zunahme der einwärtsgerichteten Komponente des DHPG-sensitiven Stroms von $-15,63 \pm 3,04$ pA/pF (n = 12) unter Kontrollbedingungen (1 mM EGTA) auf $-22,07 \pm 4,13$ pA/pF (n = 4; P = 0,2877) mit 0,1 mM intrazellulärem EGTA (Abb. 3.10 C, gelb). Gleichzeitig führte die Reduktion von intrazellulärem EGTA zu einem signifikant positiveren Umkehrpotential von $-10,4 \pm 1,2$ mV (n = 4) im Vergleich zur Kontrolle ($-16,42 \pm 1,0$ mV, n = 12; **, P = 0,0064), wie es in Abbildung

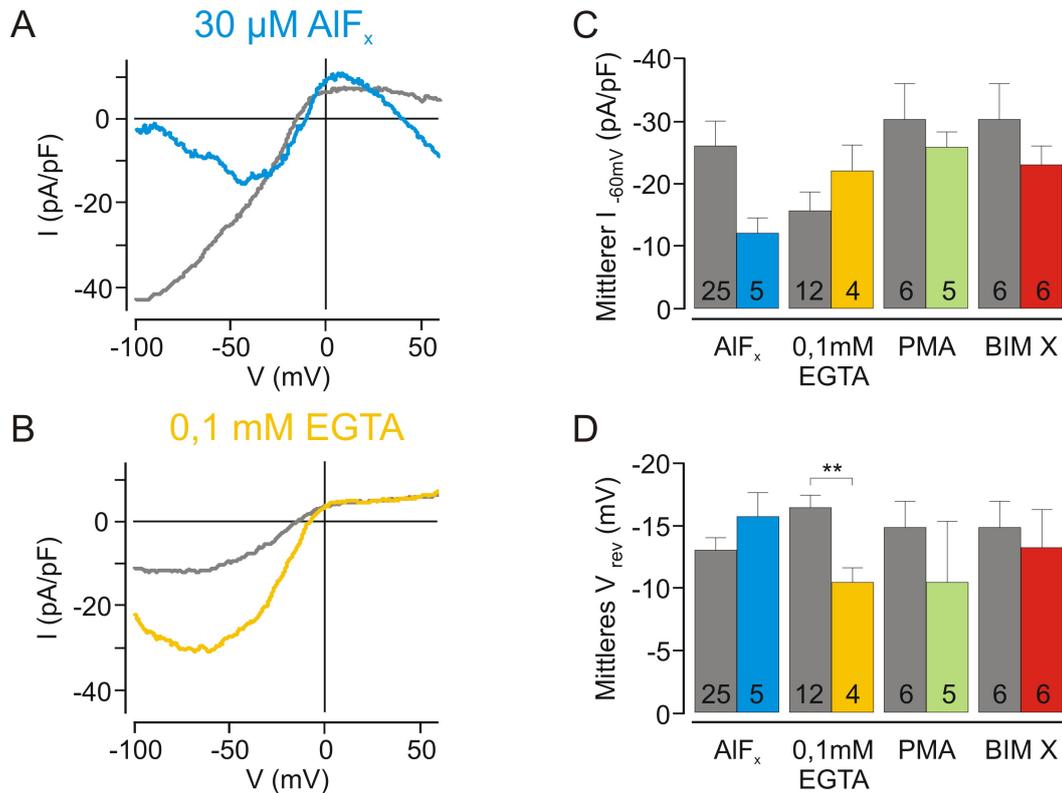


Abb. 3.10.: Intrazelluläre Modulation des DHPG-sensitiven Stroms in der TRPC1^{-/-}-Maus.

In **A** ist die Induktion eines Einwärtsstroms durch DHPG (grau), wie sie vorangehend beschrieben wurde, und durch die Infusion von 30 μM AIF_x (blau) in das Cytosol, welches direkt zur Aktivierung heterotrimerer G-Proteine führt, abgebildet. **B** zeigt die Zunahme des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms bei reduzierter intrazellulärer EGTA-Konzentration (0,1 mM, gelb) im Vergleich zur Kontrolle (1 mM EGTA, grau). **C** ($I_{-60\text{mV}}$) und **D** (V_{rev}) geben den statistischen Vergleich des DHPG-sensitiven Stroms mit dem AIF_x-sensitiven Strom (siehe auch A, blau) und den Effekt einer verminderten Ca^{2+} -Pufferung (0,1 mM EGTA, siehe auch B, gelb) und die pharmakologische Manipulation der PKC (PMA, grün; BIM X, rot) auf den DHPG-sensitiven Strom wieder.

3.10 D (gelb) dargestellt ist.

Die Signaltransduktionskaskade, die durch die Stimulation von G_q -Proteinen - unabhängig ob durch DHPG oder AIF_x - ausgelöst wird, führt neben der Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} zur Aktivierung der PKC (siehe Abb. 1.1). Über Phosphorylierung hat die PKC regulatorischen Einfluss auf die Aktivität verschiedenster Zellproteine wie Enzyme oder Ionenkanäle. Für Kanäle aus der TRP-Familie wurden in der Vergangenheit sowohl potenzierende (TRPV1; z. B. Premkumar und Ahern, 2000) als auch negativ-regulatorische Effekte (TRPC3/6; Soboloff *et al.*, 2007; Min *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010) der PKC beschrieben. Im Folgenden soll-

te deshalb die Auswirkung einer PKC-Aktivierung mittels Phorbol 12-Myristate 13-Acetat (PMA, 5 μM) und die Inhibition der PKC durch Bisindolylmalimide X hydrochloride (BIM X (Ro 31-8425), 5 μM , beides Sigma-Aldrich) auf den DHPG-sensitiven Einwärtsstrom analysiert werden.

Eine Voraktivierung der PKC durch Inkubation der gepatchten Zelle für fünf Minuten in PMA vor der Applikation von 100 μM DHPG hatte keine Auswirkung auf die Amplitude des Einwärtsstroms. Der $I_{60\text{mV}}$ unter Kontrollbedingungen betrug durchschnittlich $-30,34 \pm 5,73$ pA/pF ($n = 6$) und veränderte sich in Anwesenheit von 5 μM PMA nicht ($-25,85 \pm 2,49$ pA/pF, $n = 5$; $P = 0,5212$). Auch das Umkehrpotential des DHPG-sensitiven Stroms war vergleichbar zwischen der Kontrolle ($-14,82 \pm 2,11$ mV, $n = 6$) und bei der Applikation von PMA ($-10,4 \pm 4,91$ mV, $n = 5$; $P = 0,4008$; Abb. 3.10 C und D, grün). Auch die Inhibition der PKC mithilfe von BIM X in der extrazellulären Lösung führte zu keiner signifikanten Veränderung des DHPG-sensitiven Stroms. Die Amplitude des $I_{60\text{mV}}$, die unter Kontrollbedingungen $-30,34 \pm 5,73$ pA/pF ($n = 6$) betrug, blieb auch in 5 μM BIM X mit $-23,03 \pm 3,03$ pA/pF ($n = 6$; $P = 0,5212$) vergleichbar. Ebenso wies die Gegenüberstellung des Umkehrpotentials von $-14,82 \pm 2,11$ mV ($n = 6$) unter Kontrollbedingungen und von $-13,2 \pm 3,08$ mV ($n = 6$; $P = 0,6581$) in BIM X keinen Unterschied auf (Abb. 3.10 C und D, rot).

Lanthan (La^{3+}), ein Lanthanoid, ist ein unspezifischer Blocker Ca^{2+} -permeabler Kationenkanäle. Vorangegangene Studien hatten gezeigt, dass Lanthanoide, wie Lanthan oder Gadolinium, in mikromolaren Konzentrationen verwendet werden können, um zwischen verschiedenen, im heterologen System exprimierten TRPC-Isoformen zu unterscheiden. So werden durch TRPC6-vermittelte Ströme inhibiert, Ströme durch TRPC5-Kanäle hingegen potenziert (Jung *et al.*, 2003; Semtner *et al.*, 2007). Diese gegenläufigen Eigenschaften sollten im nächsten Schritt genutzt werden, um zum einen eine mögliche Beteiligung von TRPC-Kanälen an der Vermittlung des DHPG-sensitiven Stroms in CA1-Neuronen der TRPC1^{-/-}-Maus nachzuweisen. Zum anderen sollte mithilfe von La^{3+} eine Unterscheidung zwischen den TRPC-Gruppen 3 und 4 erfolgen. Deshalb wurde in Anlehnung an Jung *et al.* (2003) der Effekt von 10, 100 und 1000 μM La^{3+} (Lanthanum Chlorid Heptahydrat, Sigma-Aldrich) auf den DHPG-sensitiven Einwärtsstrom analysiert.

Unabhängig von der eingesetzten La^{3+} -Konzentration kam es vornehmlich zu einer Abnahme der einwärtsgerichteten Komponente des DHPG-sensitiven Stroms (Abb. 3.11 A). Es konnte keine konzentrationsabhängige Inhibition oder Potenzierung des Stromes bei -60 mV festgestellt werden (Abb. 3.11 B). Das Umkehrpotential des DHPG-sensitiven Stroms blieb im Vergleich zur Kontrolle jedoch konstant (Abb. 3.11 C). Die Zusammenfassung der Mittelwerte und die dazugehörige Statistik findet sich im Anhang A.1.1.

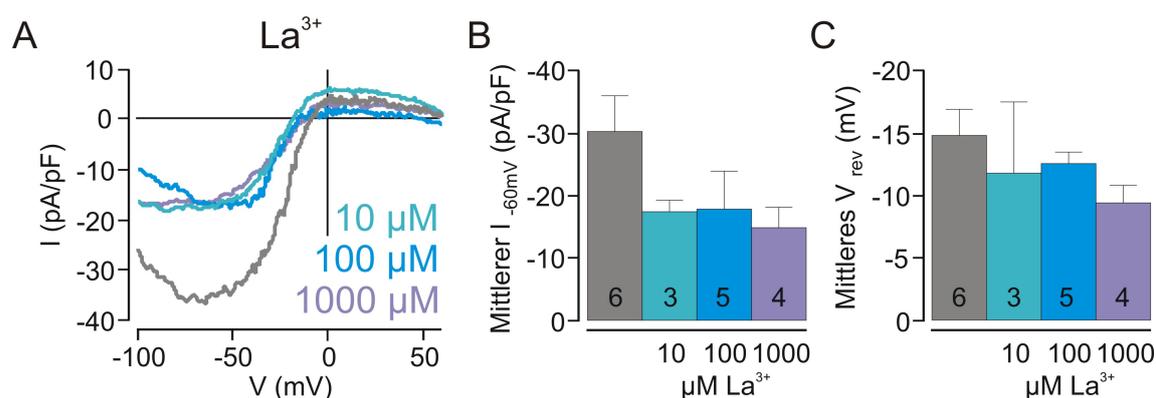


Abb. 3.11.: Reduktion des DHPG-sensitiven Stroms durch La^{3+} in der $\text{TRPC1}^{-/-}$ -Maus.

A zeigt die konzentrationsunabhängige Verringerung der einwärtsgerichteten Stromamplitude des DHPG-sensitiven Stroms nach Inkubation in 10, 100 oder 1000 μM La^{3+} . In B ist der Effekt der untersuchten La^{3+} -Konzentrationen auf den $I_{-60\text{mV}}$ und in C auf V_{rev} dargestellt.

Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse kann geschlossen werden, dass der DHPG-sensitive Strom in CA1 hippocampalen Neuronen der $\text{TRPC1}^{-/-}$ -Maus durch die Aktivierung von G-Proteinen induziert und durch die Konzentration bzw. Verfügbarkeit von freiem intrazellulären Ca^{2+} moduliert wird. Eine Beteiligung der PKC an der Vermittlung des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Die Verminderung der einwärtsgerichteten Stromamplitude in Anwesenheit verschiedener La^{3+} -Konzentrationen deutet auf die Beteiligung Ca^{2+} -permeabler Kanäle an der Vermittlung des DHPG-sensitiven Stroms hin. Die Identität dieser Kanäle kann hier nicht eindeutig festgelegt werden.

3.4. Physiologische Konsequenzen des gesteigerten Einwärtsstroms in der $\text{TRPC1}^{-/-}$ -Maus

Um den physiologischen Effekt des gesteigerten DHPG-sensitiven Einwärtsstroms in $\text{TRPC1}^{-/-}$ -Mäusen zu untersuchen, wurden CC-Messungen in der WC-Konfiguration an CA1-Neuronen vor und während der Applikation von 100 μM DHPG im WT und in der Knockoutmaus durchgeführt. In den nun folgenden Untersuchungen im CC-Modus kamen ausschließlich K^{+} -haltige Lösungen zum Einsatz (siehe Anhang A.2.1.1.4. und A.2.1.2.3.) und in der intrazellulären Lösung wurde in Anlehnung an die vorangegangenen beschriebenen Versuche eine geringe Ca^{2+} -Pufferung (0,1 mM EGTA; siehe Anhang A.2.1.2.3.) verwendet. Des Weiteren erfolgten auch die Aufzeichnung dieser Experimente in Anwesenheit von ionotropen Glutamat- und GABA_A -Rezeptor-Antagonisten.

Die Versuche im CC wurden zunächst im *kontinuierlichen Modus* durchgeführt und die Ver-

änderung der Membranspannung ohne Strominjektion analysiert. Dabei wurde, wie in Abbildung 2.6 A dargestellt ist, das Ruhemembranpotential (V_m) nach Einwaschen der Rezeptor-Antagonisten bestimmt.

In WT-Mäusen im Alter von 14 bis 26 Tagen postnatal wiesen CA1 hippocampale Neurone ein durchschnittliches V_m von $-62,62 \pm 1,29$ mV ($n = 20$) auf. Unter basalen Bedingungen, d. h. in Anwesenheit der ionotropen Rezeptor-Antagonisten, waren Neurone entweder stumm, zeigten also keine Spontanaktivität, oder bildeten einzelne Aktionspotentiale (APs, Spikeaktivität), wie es in Abbildung 3.12 A und B dargestellt ist. Die Applikation des mGluRI-Agonisten DHPG für eine Minute führte zu sehr heterogenen Zellantworten in CA1-Neuronen des WT: 7 von 20 Zellen zeigten zunächst eine Hyperpolarisation, wiederum 7 von 20 Zellen eine direkte schwache Depolarisation und 6 von 20 Zellen eine starke Depolarisation, die sich zu einem Plateaupotential entwickelte. Diese Zellantwort, die in unterschiedlichen Ausprägungen in Abbildung 3.12 B und C dargestellt ist, war gekennzeichnet durch einen schnellen Anstieg des Membranpotentials (starke Depolarisation), die Ausbildung von hochfrequenten APs und das Erreichen eines Spannungsplateaus (Plateaupotential, PP). Die meisten Zellen zeigten eine Blockade der APs (Depolarisationsblock), wie es auch in Abbildung 3.12 B und C zu sehen ist. Beendet wurde diese Zellantwort durch eine Abnahme des Membranpotentials gefolgt von einer deutlich ausgeprägten Nachhyperpolarisation. Die durch DHPG induzierte Depolarisation der Zelle war nach dem Auswaschen des Agonisten vollständig reversibel, d. h., dass nach dem Entfernen des Agonisten die Membranspannung auf ein Ruhemembranpotential um -60 mV zurückkehrte.

Um die durch DHPG-induzierten Zellantworten zu quantifizieren, wurden die Membranspannungen von schwachen Depolarisationen, Hyperpolarisationen und/oder - bei Ausbildung eines Plateaupotentials - das erreichte Spannungsplateau bestimmt (siehe Abb. 2.6 A). In den meisten Neuronen in der WT-Maus (13/20, 65 %) war die Stimulation per DHPG letztlich mit einer schwachen Depolarisation der Membran auf durchschnittlich $-57,88 \pm 1,85$ mV verknüpft und wurde teilweise mit der Ausbildung bzw. der Steigerung von Spikeaktivität (6/13), wie es in Abbildung 3.12 A zu sehen ist, begleitet. In 7 von 20 Zellen konnte die Induktion von sogenannter epilepsieartiger Aktivität, die mit der Ausbildung von Plateaupotentialen verknüpft war, beobachtet werden. Dabei erfolgte eine Depolarisation durchschnittlich auf ein Spannungsplateau von $-29,33 \pm 4,28$ mV. Vornehmlich zeigten Zellen im WT (4/7) kurze PP, wie sie in Abbildung 3.12 C als Beispiel in der TRPC1^{-/-}-Maus dargestellt sind. In Abbildung 3.12 B ist exemplarisch ein langanhaltendes PP im WT (3/7 Zellen) abgebildet, welche nur in diesem Genotyp beobachtet wurden.

Im Vergleich zum WT zeigte sich kein Unterschied im durchschnittlichen Ruhemembranpotential in CA1-Neuronen der TRPC1^{-/-}-Maus in Anwesenheit von ionotropen Rezeptor-

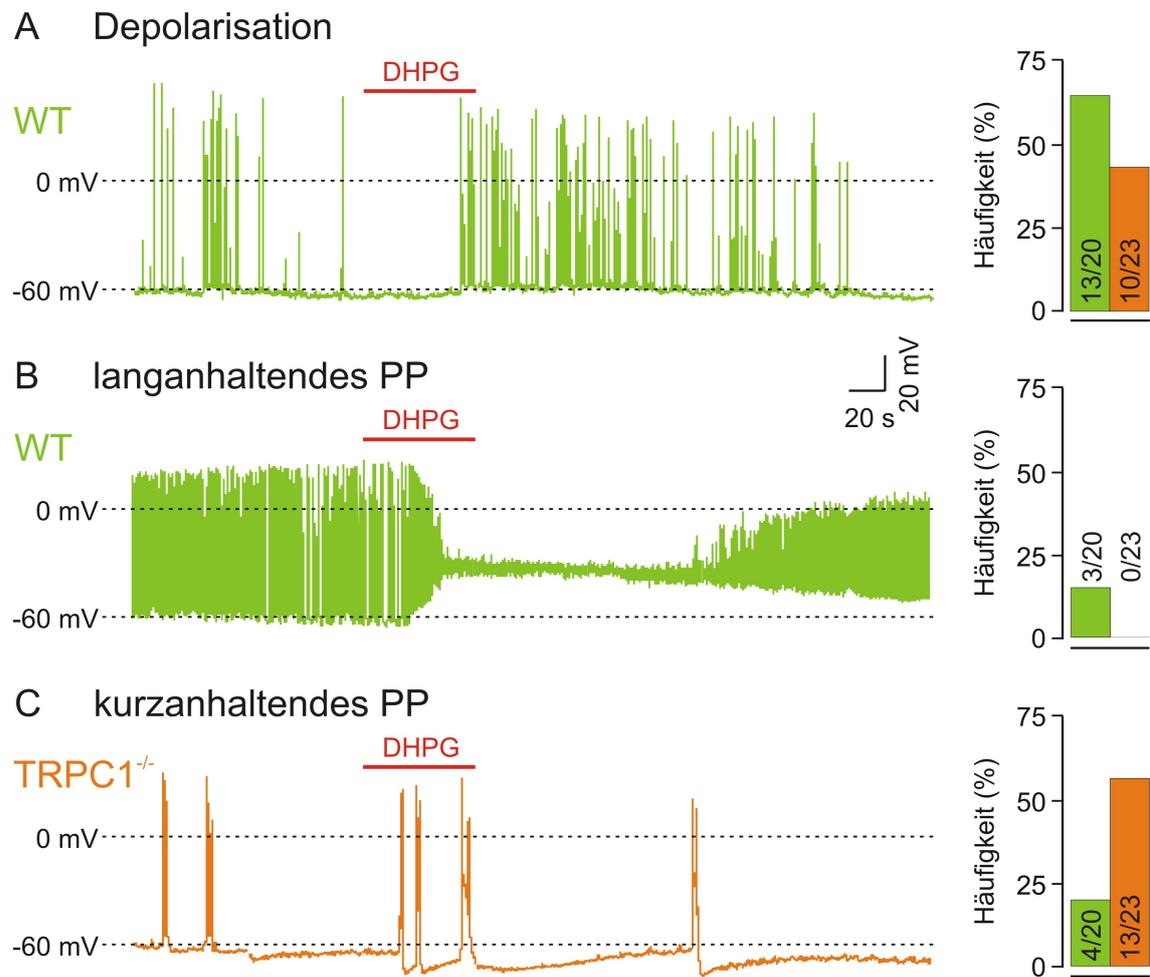


Abb. 3.12.: Veränderte Zellantwort bei Stimulation G_q-koppelter Rezeptoren im CC: WT versus TRPC1^{-/-}-Maus.

Die Applikation von 100 μ M DHPG führte zu unterschiedlichen Aktivitätsmustern im WT (A und B) und in der TRPC1^{-/-}-Maus (C). In 65 % der untersuchten WT-Zellen induzierte DHPG eine schwache Depolarisation, die, wie in A zu sehen ist, zum Teil zu einer Steigerung der Spikeaktivität führte. B zeigt ein Beispiel für ein durch DHPG-induziertes langanhaltendes Plateaupotential (PP), dass in 3 von 7 Zellen im WT, die epileptische Aktivität zeigten, beobachtet werden konnte. In der TRPC1^{-/-}-Maus (C) kam es hingegen durch die gleiche Stimulation in den meisten Zellen (57 %) zur Ausbildung von kürzeren PP. Auf der rechten Seite ist die Häufigkeit des Auftretens (in %) von Depolarisationen, langanhaltenden und kurzanhaltenden PP im WT und in der TRPC1^{-/-}-Maus, die während Aufzeichnungen im kontinuierlichen CC-Modus beobachtet wurden, gegenübergestellt. In beiden Genotypen war die durch DHPG induzierte Depolarisation reversibel.

Antagonisten ($-64,25 \pm 1,01$ mV, $n = 23$; $P = 0,3179$). Einige Neurone waren stumm, andere zeigten unter diesen Bedingungen Spike- oder Burstaktivität. Die Applikation von 100 μ M DHPG für eine Minute führte in der TRPC1^{-/-}-Maus deutlich häufiger (17/23 Zellen) zunächst

zu einer leichten Hyperpolarisation der Zellmembran auf durchschnittlich $-67,73 \pm 0,85$ mV. In 10 von 23 Zellen folgte anschließend eine schwach ausgeprägte Depolarisation der Zelle auf im Schnitt $-65,57 \pm 1,52$ mV. Diese Membranspannung war im Vergleich zum WT signifikant geringer (**, $P = 0,0058$). Deutlich häufiger als im WT, in 57 % der untersuchten Neurone in der TRPC1^{-/-}-Maus (13/23), kam es jedoch zur Induktion von epilepsieartiger Aktivität verknüpft mit der Ausbildung von PP, wie sie in Abbildung 3.12 C dargestellt sind. Die Charakteristika dieser Zellantwort in der TRPC1^{-/-}-Maus waren vergleichbar zum WT: schneller Anstieg des Membranpotentials, AP-Bildung, Erreichen eines Spannungsplateaus und Depolarisationsblock der APs. Dabei erfolgte eine durchschnittliche Depolarisation in der TRPC1^{-/-}-Maus auf ein Spannungsplateau von $-24,98 \pm 2,62$ mV, das mit dem Spannungsplateau im WT vergleichbar war ($P = 0,3702$). Auffallend war dabei, dass in der TRPC1^{-/-}-Maus ausschließlich Plateaupotentiale mit einer kurzen Dauer zwischen 5 bis 10 s auftraten (Abb. 3.12 C), wohingegen im WT auch langanhaltende PP beobachtet wurden (Abb. 3.12 B). Auch die PP in der TRPC1^{-/-}-Maus wurden von einer deutlich ausgeprägten Nachhyperpolarisation gefolgt.

Da die Zellantworten auf die Stimulation von mGluRI im kontinuierlichen CC-Modus sehr variabel waren (siehe Abb. 3.12), sollte durch eine *Strominjektion von +20 pA* von einem festgelegten Membranpotential nahe -60 mV, auf das die Zellen eingestellt wurden, standardisierte Bedingungen zur Untersuchungen des DHPG-induzierten Effekts im WT und der TRPC1^{-/-}-Maus erzeugt werden. Um die Vergleichbarkeit dieser Experimente zu gewährleisten, wurde zunächst bei jedem Versuch die tatsächliche Membranspannung (V), von der aus die Strominjektion erfolgte, bestimmt. Messungen, bei denen V mehr als ± 5 mV von -60 mV abwich, wurden in der Auswertung verworfen. Die durchschnittliche Membranspannung V betrug im WT $-60,82 \pm 1,71$ mV ($n = 10$) und in der TRPC1^{-/-}-Maus $-59,31 \pm 0,69$ mV ($n = 15$) und war somit vergleichbar zwischen den Genotypen ($P = 0,3630$). Ausgehend von V erfolgte die depolarisierende Strominjektion von +20 pA sowohl unter Kontrollbedingungen, also in Anwesenheit ionotroper Rezeptor-Antagonisten, als auch bei Stimulation von mGluRI mittels 100 μ M DHPG. Bei den dadurch hervorgerufenen Zellantworten wurde, wie in Abbildung 2.6 B gezeigt ist, zum einen zwischen einer induzierten Depolarisation ($V_{\text{Depolarisation}}$) und einer bei der Ausbildung von Plateaupotentialen erreichten Membranspannung (V_{Plateau}) differenziert, zum anderen wurde die Dauer der Depolarisation (Δt) vom Beginn des Effekts bis zum Wiedererreichen der Ausgangsmembranspannung ermittelt.

Unter basalen Bedingungen führte die Strominjektion im WT, wie es exemplarisch in Abbildung 3.13 A gezeigt ist, ausgehend von einer durchschnittlichen Membranspannung um -60 mV zu einer Depolarisation ($V_{\text{Depolarisation}}$) auf $-51,52 \pm 2,07$ mV und zur Ausbildung von regelmäßiger Spikeaktivität in allen getesteten CA1-Neuronen ($n = 10$). Die Depolarisation

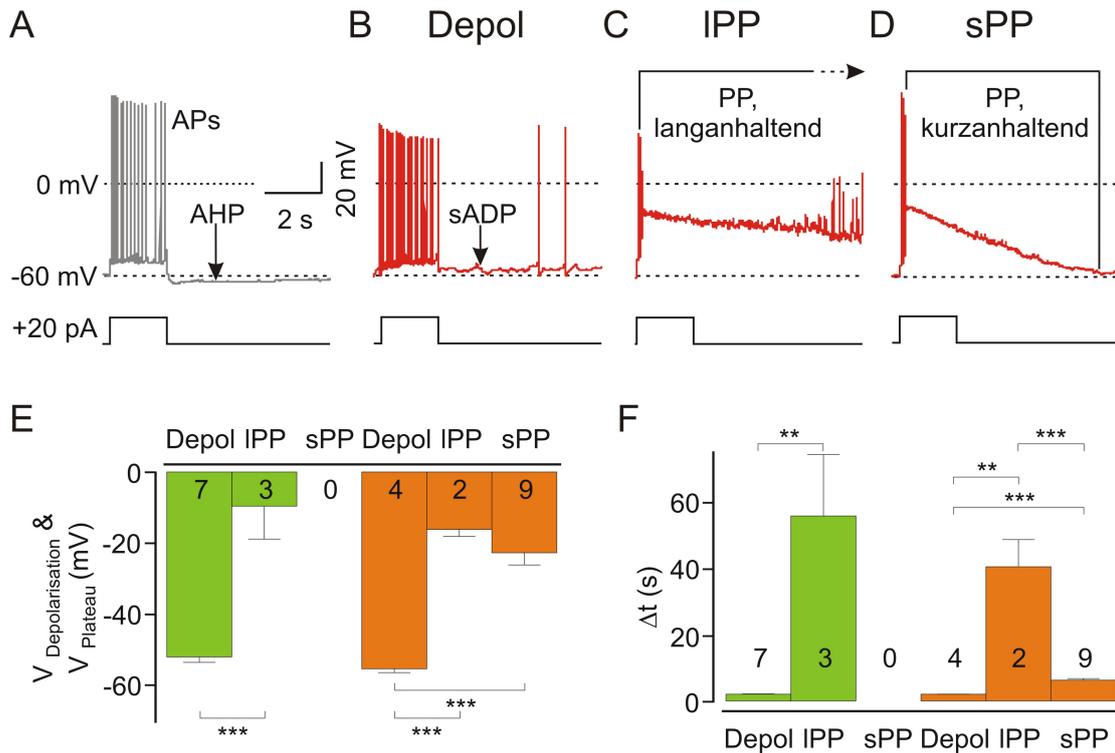


Abb. 3.13.: Zusätzliches kurzanhaltendes Plateaupotential in der TRPC1^{-/-}-Maus im CC.

Die Strominjektion von +20 pA unter basalen Bedingungen (A) führte sowohl im WT als auch in der TRPC1^{-/-}-Maus zur Zelldepolarisation und Bildung von Aktionspotentialen (APs) und nach Beendigung der Strominjektion zu einer ausgeprägten Nachhyperpolarisation (AHP). In Anwesenheit von DHPG induzierte die gleiche Strominjektion im WT zwei Antwortmuster: eine Depolarisation (Depol; B) ohne Nachhyperpolarisation, sondern mit Ausbildung einer langsamen Nachdepolarisation (sADP) nach Beendigung der Strominjektion, oder ein langanhaltendes Plateaupotential (IPP; C). In 60% der TRPC1^{-/-}-Zellen konnte ein zusätzliches kurzanhaltendes PP (sPP; D) beobachtet werden, welches im WT nicht auftrat. Die Rückkehr zum Ausgangsmembranpotential erfolgte hierbei bereits nach durchschnittlich 6 s. E fasst die ermittelten Membranspannungen $V_{\text{Depolarisation}}$ und V_{Plateau} und F die mittlere Dauer der Depolarisation (Δt) im WT (grün) und in der TRPC1^{-/-}-Maus (orange) zusammen (weitere Erläuterungen siehe Text).

dauerte an, solange die Strominjektion von 2 s erfolgte ($2,01 \pm 0,02$ s). Nach Beendigung der Strominjektion zeigten die meisten Neurone eine ausgeprägte Nachhyperpolarisation (AHP), bevor das Ausgangsmembranpotential wieder erreicht wurde.

Im Gegensatz dazu induzierte die Applikation von 100 μM DHPG bei gleicher Strominjektion zwei unterschiedliche Antwortmuster im WT: eine Depolarisation der Zellmembran oder ein langanhaltendes Plateaupotential (long-duration PP, IPP). In den meisten Zellen (70 %) führte die Injektion von +20 pA und gleichzeitiger DHPG-Stimulation zu einer Depolarisation der Membran und zur Ausbildung von regelmäßiger Spikeaktivität, dargestellt in Abbildung

Aktivitätsmuster	WT	TRPC1 ^{-/-}	P
V_{Depolarisation} und V_{Plateau}			
Depolarisation	-51,95 ± 1,54 mV, n = 7	-55,29 ± 1,08 mV, n = 4	0,1678
IPP	-9,60 ± 9,21 mV, n = 3	-16,09 ± 2,05 mV, n = 2	0,626
sPP	—	-22,68 ± 3,46 mV, n = 9	
Δt			
Depolarisation	2,07 ± 0,13 s, n = 7	2,03 ± 0,02 s, n = 4	0,8166
IPP	55,79 ± 18,52 s, n = 3	40,49 ± 8,15 s, n = 2	0,5791
sPP	—	6,30 ± 0,51 s, n = 9	

Tab. 3.1.: Zusammenfassung der V_{Depolarisation}- bzw. V_{Plateau}- und Δt-Daten im WT und in der TRPC1^{-/-}-Maus bei einer Strominjektion von +20 pA und gleichzeitiger Stimulation von mGluRI durch 100 μM DHPG.

3.13 B, vergleichbar zum Effekt unter basalen Bedingungen (V_{Depolarisation} und Δt siehe Tab. 3.1). Nach der Beendigung der Strominjektion zeigten diese Zellen keine Nachhyperpolarisation, sondern eine langsame Nachdepolarisation (sADP; Abb. 3.13 B), wie sie bereits durch Fraser und MacVicar (1996) beschrieben wurde. In 3 von 10 Zellen induzierte die Strominjektion bei gleichzeitiger Aktivierung von mGluRI hochfrequente Spikeaktivität, die in einer starken Depolarisation der Zelle und der Entwicklung eines langanhaltenden, regenerativen PP resultierte (Abb. 3.13 C). Die durchschnittlich hervorgerufene Depolarisation (V_{Plateau}) erfolgte beim IPP auf -9,6 ± 9,21 mV. Die Rückkehr der Zelle auf die Ausgangsspannung erfolgte durchschnittlich innerhalb von 55,79 ± 18,52 s (V_{Plateau} und Δt siehe Tab. 3.1; Abb. 3.13 E und F).

Wie bereits beschrieben, befand sich auch in der TRPC1^{-/-}-Maus die durchschnittliche Membranspannung V, von der aus die Injektion von +20 pA erfolgte, in der Nähe von -60 mV und unterschied sich somit nicht von den Ausgangsbedingungen im WT. Auch in der TRPC1^{-/-}-Maus führte die Strominjektion von +20 pA unter basalen Bedingungen, d. h. vor der Applikation von DHPG, zu einer Depolarisation (V_{Depolarisation}) auf durchschnittlich -50,35 ± 0,87 mV und zur Ausbildung von APs. Die Depolarisation dauerte solange an, wie die Strominjektion erfolgte (2,02 ± 0,01 s). Dies ist exemplarisch in Abbildung 3.13 A für den WT dargestellt. Es zeigte sich weder in der Depolarisation V_{Depolarisation} (P = 0,5632) noch in der Depolarisationsdauer Δt (P = 0,661) unter basalen Bedingungen ein Unterschied zwischen WT- und TRPC1^{-/-}-Maus.

Auch in der TRPC1^{-/-}-Maus induzierte die Stimulation per 100 μM DHPG die bereits im WT beschriebenen Antwortmuster: In 4 von 15 Zellen konnte eine Depolarisation mit an-

schließender Nachdepolarisation beobachtet werden, wie es in Abbildung 3.13 B exemplarisch für den WT dargestellt ist. Zu einem geringeren Anteil (2 von 15 Zellen) zeigten Neurone in der Knockoutmaus ein IPP mit einer durchschnittlichen Dauer der Depolarisation von $40,49 \pm 8,15$ s. Die Werte für $V_{\text{Depolarisation}}$ bzw. V_{Plateau} und Δt sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in $V_{\text{Depolarisation}}$ bzw. V_{Plateau} und Δt sowohl bei der Depolarisation als auch beim IPP zwischen WT- und TRPC1^{-/-}-Mäusen gefunden. In 60 % der untersuchten Zellen in der TRPC1^{-/-}-Maus wurde jedoch ein zusätzliches, kurzanhaltendes Plateaupotential (short-duration PP, sPP) induziert, wie es in Abbildung 3.13 D dargestellt ist und im WT nicht beobachtet werden konnte. Dabei erfolgte eine durchschnittliche Depolarisation (V_{Plateau}) auf $-22,68 \pm 3,46$ mV, welche sich somit nicht zum V_{Plateau} des IPP unterschied ($P = 0,414$; Abb. 3.13 E). Auch das sPP ging mit einem Depolarisationsblock der APs einher. Die Rückkehr der Membranspannung auf die Ausgangsmembranspannung erfolgte beim sPP im Gegensatz zum IPP bereits nach durchschnittlich $6,3 \pm 0,51$ s (***, $P < 0,0001$), wie es in Abbildung 3.13 F gezeigt ist, und wurde gefolgt durch eine ausgeprägte Nachhyperpolarisation.

Die hier dargestellten Ergebnisse im CC dokumentierten, dass es bei Stimulation von mGluRI in der TRPC1^{-/-}-Maus im Vergleich zum WT häufiger zur Ausbildung von epilepsieartiger Aktivität und der Ausbildung von Plateaupotentialen kommt. Des Weiteren zeigten diese Resultate, dass in der TRPC1^{-/-}-Maus bei kontrollierter Strominjektion von +20 pA ein zusätzliches, kurzanhaltendes Plateaupotential auftritt, das im WT nicht beobachtet werden konnte. Zusammenfassend kann man an dieser Stelle sagen, dass es scheinbar in der TRPC1^{-/-}-Maus zu einer Modulation der Zellerregbarkeit kommt, die mit einer Veränderung des Aktivitätsmusters in CA1 hippocampalen Neuronen einhergeht und mit der Zunahme des einwärtsgerichteten Stroms in der TRPC1^{-/-}-Maus, der durch eine Depolarisation aktiviert wird, verknüpft werden kann.

3.5. Die Rolle von TRPC1 während der postnatalen Entwicklung

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die elektrophysiologischen, molekularbiologischen und histochemischen Experimente an Tieren im Verlaufe der späten postnatalen Entwicklung (P14 - P26) durchgeführt. Ergänzend sollte die Rolle von TRPC1 während der postnatalen Entwicklung charakterisiert werden. Hierzu wurden im Folgenden vergleichbare Untersuchungen auch in Tieren während der frühen postnatalen Entwicklung (P10 - P12) und in der vorpubertären Phase (P33 - P35) durchgeführt.

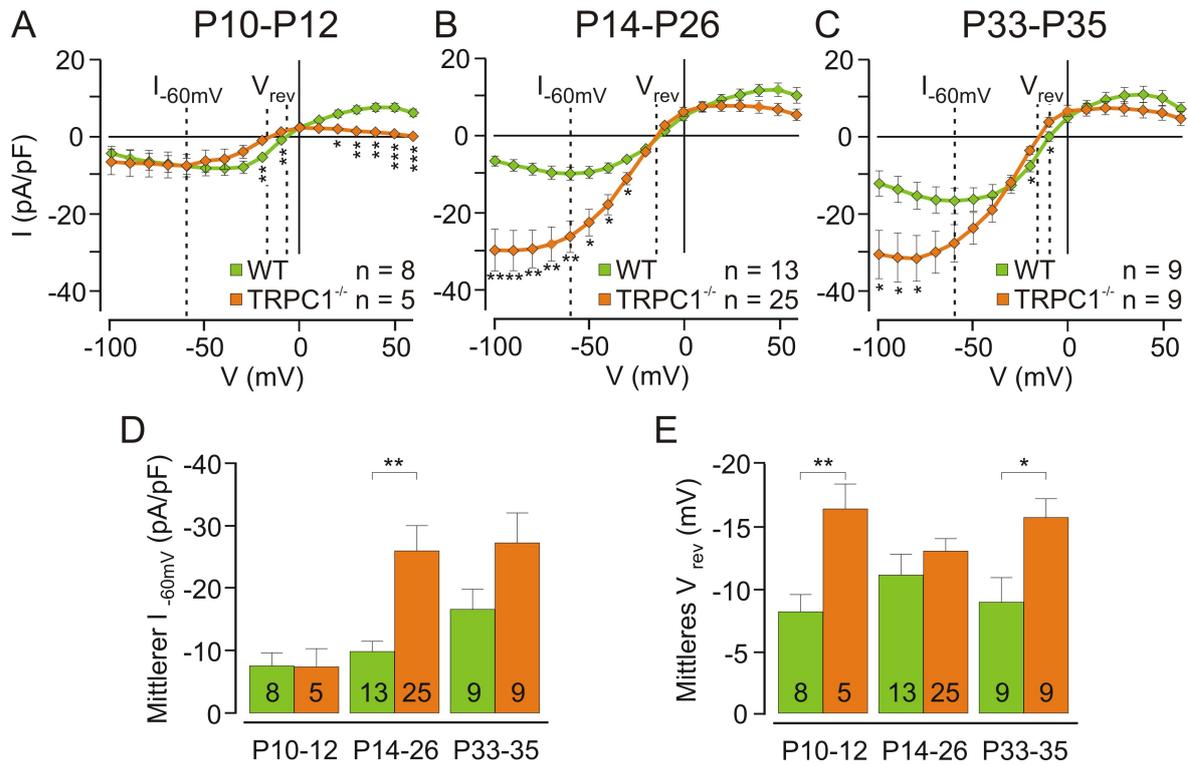


Abb. 3.14.: Der DHPG-sensitive Strom während der postnatalen Entwicklung.

A zeigt den DHPG-sensitive Strom während der frühen postnatalen Entwicklung (P10 - P12), **B** während der späten postnatalen Entwicklung (P14 - P26; siehe auch Abb. 3.7 B) und **C** in der präpubertären Phase (P33 - P35) im WT (grün) und in der TRPC1^{-/-}-Maus (orange). In **D** ist der mittlere $I_{-60\text{mV}}$, in **E** das mittlere V_{rev} im Alter von P10 - P12, P14 - P26 und P33 - P35 im WT (grün) und der TRPC1^{-/-}-Maus (orange) dargestellt (weitere Erläuterungen siehe Text).

3.5.1. Der DHPG-sensitive Einwärtsstrom während der postnatalen Entwicklung

Der Vergleich der IV-Beziehungen des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms zwischen WT und TRPC1^{-/-}-Mäusen während der *frühen postnatalen Entwicklung* (P10 - P12), wie sie in Abbildung 3.14 A dargestellt sind, zeigte keine grundlegenden Unterschiede in der Amplitude und im Verlauf des Stroms. Die Amplitude bei -60 mV von $-7,34 \pm 2,91$ pA/pF ($n = 5$) in der TRPC1^{-/-}-Maus war vergleichbar zum induzierten Strom im WT mit $-7,54 \pm 2,07$ pA/pF ($n = 8$; $P = 0,9662$; Abb. 3.14 D). In der TRPC1^{-/-}-Maus zeigte sich hingegen ein signifikant negatives Umkehrpotential (WT: $-8,11 \pm 1,4$ mV, $n = 8$; TRPC1^{-/-}: $-16,38 \pm 2,02$ mV, $n = 5$; **, $P = 0,0051$; Abb. 3.14 E).

Zwei Wochen nach der Geburt in der *späten postnatalen Entwicklung* (P14 - P26) - im Alter, in dem die Tiere ihre Augen öffnen - kam es sowohl im WT als auch in der TRPC1^{-/-}-Maus zu einer Stromzunahme (Abb. 3.14 B): Im WT stieg der $I_{-60\text{mV}}$ von $-7,54 \pm 2,07$ pA/pF

(n = 8) auf $-9,85 \pm 1,64$ pA/pF (n = 13; P = 0,3926), in der TRPC1^{-/-}-Maus dagegen von $-7,34 \pm 2,91$ pA/pF (n = 5) auf $-26,0 \pm 4,05$ pA/pF (n = 25; P = 0,0537; Abb. 3.14 D). Der Vergleich zwischen WT und Knockoutmaus zeigte den, im Abschnitt 3.3.2 beschriebenen und in Abbildung 3.7 dargestellten, signifikant gesteigerten Einwärtsstrom in der TRPC1^{-/-}-Maus (**, P = 0,0081; Abb. 3.14 D) bei vergleichbarem Umkehrpotential (Abb. 3.14 E).

Dieses Verhältnis blieb auch einen Monat nach der Geburt während der *präpubertären Phase* (P33 - P35) erhalten (Abb. 3.14 C). Die Amplitude des DHPG-sensitiven Stroms in Zellen der TRPC1^{-/-}-Maus war mit $-27,29 \pm 4,83$ pA/pF (n = 9) vergleichbar zur späten postnatalen Entwicklung (P = 0,8663; Abb. 3.14 D). Im WT nahm der Einwärtsstrom nochmals vom Stadium P14 - P26 auf $-16,61 \pm 3,23$ pA/pF (n = 9) im Stadium P33 - P35 zu (P = 0,055). Er blieb im Vergleich zur Knockoutmaus geringer, jedoch nicht signifikant unterschiedlich (P = 0,0847; Abb. 3.14 D). In der präpubertären Entwicklung zeigte sich wiederum ein negativeres Umkehrpotential von $-15,69 \pm 1,51$ mV (n = 9) in der TRPC1^{-/-}-Maus im Vergleich zum WT ($-8,89 \pm 1,99$ mV, n = 9; *, P = 0,0152; Abb. 3.14 E).

Diese Ergebnisse zeigten, dass es erst zwei Wochen nach der Geburt ab P14 zu einer Zunahme des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms in der TRPC1^{-/-}-Maus kommt. Eine mögliche Ursache könnten unterschiedliche Expressionslevel der einzelnen TRPC-Isoformen im Verlaufe der Entwicklung sein.

3.5.2. Hippocampale TRPC-Expression während der postnatalen Entwicklung

Um eine mögliche Kompensation der mRNA-Expression in der TRPC1^{-/-}-Maus zu untersuchen, wurden zusätzlich zu der elektrophysiologischen Charakterisierung des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms die Expressionslevel der verschiedenen TRPC-Isoformen in den untersuchten Stadien der postnatalen Entwicklung analysiert. Die einzelnen Werte der Expressionsstärke für WT- und TRPC1^{-/-}-Maus und das jeweilige Ergebnis der statistischen Auswertung sind für alle drei Entwicklungsstadien (P10 - P12, P14 - P26 und P33 - P35) in Tabelle A.1.2 im Anhang zusammengefasst.

Ergänzend zu den Ergebnissen während der späten postnatalen Entwicklung (P14 - P26), wie sie bereits im Abschnitt 3.1 dargestellt und nochmals in Abbildung 3.15 B aufgegriffen wurden, konnte auch in der *frühen postnatalen Entwicklung* (P10 - P12; Abb. 3.15 A, grün) und in der *präpubertären Phase* (P33 - P35; Abb. 3.15 C, grün) die Expression der Gruppe 1, Gruppe 4 und Gruppe 3 der TRPC-Subfamilie in WT-Mäusen nachgewiesen werden. Im WT kam es im Verlaufe der frühen zur späten postnatalen Entwicklung zu einer signifikanten Zunahme der TRPC1-Expression (*, P = 0,0128), die auch im präpubertären Stadium der Entwicklung bestehen blieb (P = 0,7532). Während der präpubertären Phase der Entwicklung

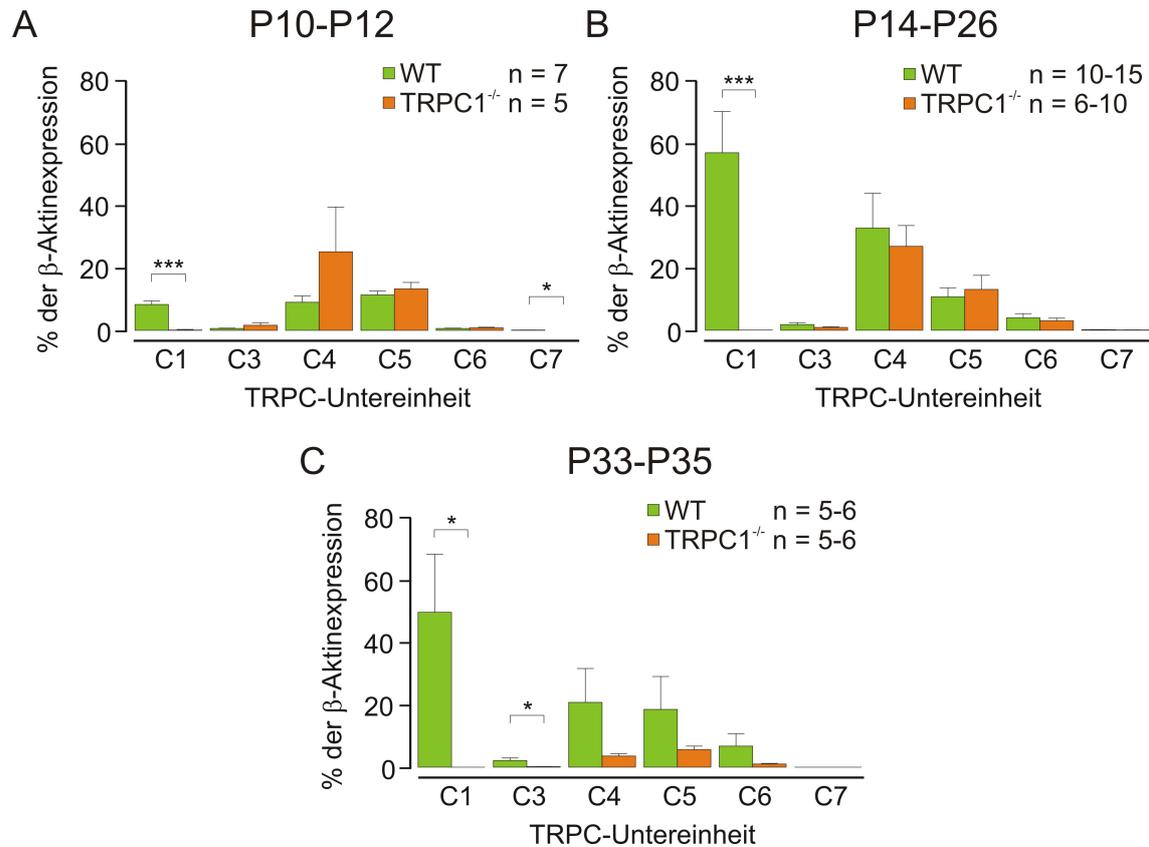


Abb. 3.15.: Hippocampale TRPC-Expression während der postnatalen Entwicklung.

In **A** ist die hippocampale TRPC-Expression während der frühen postnatalen Entwicklung (P10 - P12), in **B** während der späten postnatalen Entwicklung (P14 - P26; siehe Abschnitt 3.1) und in **C** während der präpubertären Phase (P33 - P35) im WT (grün) und der TRPC1^{-/-}-Maus (orange) zusammengefasst (weitere Erläuterungen siehe Text).

zeigte sich im WT eine vergleichbare Expression der TRPC-Isoformen wie zum Zeitpunkt P14 - P26.

Auch in der TRPC1^{-/-}-Maus konnten, wie in den Untersuchungen während der späten postnatalen Entwicklung (siehe Abschnitt 3.1 und Abb. 3.15 B), alle untersuchten TRPC-Isoformen - mit Ausnahme von TRPC1 - sowohl in der frühen postnatalen Entwicklung (Abb. 3.15 A, orange) als auch während der präpubertären Phase (Abb. 3.15 C, orange) im hippocampalen Gewebe detektiert werden. Im Verlaufe der postnatalen Entwicklung von P10 - P12 bis P14 - P26 kam es zu einer Zunahme der Expression aller TRPC-Isoformen - mit Ausnahme von TRPC1 - in der TRPC1^{-/-}-Maus (siehe Abschnitt 3.1). Von der späten postnatalen Entwicklung (P14 - P26) zur präpubertären Phase (P33 - P35) kam es in der TRPC1^{-/-}-Maus zu einer signifikanten Abnahme der Expressionsstärke von TRPC3 (**, P = 0,0017) und TRPC4 (*, P = 0,01349). Alle übrigen Isoformen konnten innerhalb des Genotyps in vergleichbarer

Menge nachgewiesen werden.

Der Vergleich der TRPC-Expression zwischen WT und TRPC1^{-/-}-Maus während der frühen postnatalen Entwicklung (P10 - P12) zeigte eine vergleichbare Expressionsstärke der TRPC-Isoformen TRPC3, TRPC4, TRPC5 und TRPC6. Die Untereinheiten TRPC1 und TRPC7 wurden in der TRPC1^{-/-}-Maus in signifikant geringerem Maße exprimiert (Abb. 3.15 A). Eine Gegenüberstellung der TRPC-Expression von WT und TRPC1^{-/-}-Maus während der präpubertären Phase (P33 - P35) zeigte ein vergleichbares Vorkommen von TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC7. Es trat jedoch eine signifikant reduzierte Expression von TRPC3 in der TRPC1^{-/-}-Maus auf. Wie erwartet konnte keine Expression von TRPC1 in der TRPC1^{-/-}-Maus nachgewiesen werden (Abb. 3.15 C).

Zusammenfassend kann man sagen, dass es im Verlaufe der postnatalen Entwicklung zu einer Zunahme der hippocampalen TRPC-Expression sowohl im WT als auch in der TRPC1^{-/-}-Maus kommt. In der TRPC1^{-/-}-Maus sieht man - abgesehen von TRPC1 - vergleichbare Expressionslevel für TRPC4 und TRPC5. Unterschiede treten ausschließlich in der Gruppe TRPC3/6/7 auf. Da die Expressionslevel von TRPC4 und TRPC5 vergleichbar zum WT sind, kann die reine Expressionsstärke nicht die Erklärung für die Zunahme des DHPG-sensitiven Stroms in der TRPC1^{-/-}-Maus darstellen.

4. Diskussion

Diese Arbeit beschäftigte sich mit Ca^{2+} -abhängigen, nichtselektiven Kationenströmen (I_{CAN}) in Neuronen der CA1-Region des murinen Hippocampus, die durch die Stimulation von G_q -koppelnden Rezeptoren aktiviert wurden. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf eine mögliche Funktion von TRPC1, einem Familienmitglied der Kationen-permeablen „transient receptor potential“-Kanäle, bei der Vermittlung von I_{CAN} gelegt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass

1. die Stimulation mit einem mGluRI-spezifischen Agonisten (DHPG) sowohl im WT als auch in der TRPC1^{-/-}-Maus einen Einwärtsstrom hervorruft, der durch extrazelluläre Kationen (z. B. Na^+ , Ca^{2+}) getragen, von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reguliert wird und der spannungsabhängig ist (Abb. 4.1);
2. die Deletion von TRPC1 im TRPC1-defizienten Mausmodell zu einer Zunahme des Ca^{2+} -abhängigen, nichtselektiven Kationenstroms in CA1 hippocampalen Neuronen führt (Abb. 4.2);
3. dieser gesteigerte Einwärtsstrom in der TRPC1^{-/-}-Maus im Vergleich zum WT die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Neurone auf die Stimulation mit DHPG mit der Induktion von epilepsieartiger Aktivität verknüpft mit der Ausbildung von kurzen Plateaupotentialen (PP) reagieren (Abb. 4.2) und damit eine veränderte/erhöhte Zellerregbarkeit aufweisen;
4. sich der Anstieg des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms erst zwei Wochen postnatal (P14 - P26) ausbildet und in der weiteren Entwicklung bestehen bleibt.

Die vorgestellten Ergebnisse weisen auf eine negativ-regulatorische Rolle von TRPC1 hin (Abb. 4.2), da eine Abnahme dieser Inhibition durch die Deletion der Isoform mit einer Zunahme des einwärtsgerichteten Stroms in der TRPC1^{-/-}-Maus einhergeht. Da TRPC1 alleine vermutlich keinen funktionellen Kanal bilden kann (zur Übersicht siehe Beech *et al.*, 2003; Beech, 2005), könnte die Isoform ihre Rolle entweder durch die Bildung von heteromultimeren Kanälen mit anderen TRPC-Isoformen, die ebenfalls in diesen Neuronen exprimiert

werden (Mori *et al.*, 1998; Otsuka *et al.*, 1998; Philipp *et al.*, 1998; Strübing *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2006), oder durch die Modulation der Aktivität unbekannter beteiligter Kanäle ausüben.

4.1. Biophysikalischer und pharmakologischer Vergleich des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms in CA1-Neuronen mit überexprimierten TRPC1- und TRPC4/5-Kanälen

In Neuronen der WT-Maus wies die IV-Beziehung des DHPG-sensitiven Stroms eine Zunahme der einwärtsgerichteten Komponente bei Potentialen negativer als V_{rev} auf und eine Abnahme, wenn das Potential negativer als -50 mV wurde. Bei positiven Potentialen sah man hingegen einen deutlich ausgeprägten Auswärtsstrom. Der DHPG-sensitive Strom im WT kann deshalb als doppelt-rektifizierend beschrieben werden (Abb. 3.3 D und Abb. 3.7 B). In der TRPC1^{-/-}-Maus kam es hingegen zu einer Veränderung der IV-Beziehung des DHPG-sensitiven Stroms (Abb. 3.7 B), da der einwärtsgerichtete Strom signifikant zunahm. Des Weiteren konnte keine Abnahme des Einwärtsstroms bei negativen Potentialen zwischen -50 und -100 mV verzeichnet werden. Die nächstliegende Erklärung für die Modifikation des Einwärtsstroms deckt sich mit den von Strübing *et al.* (2001) beschriebenen Beobachtungen in HEK293-Zellen, in denen die Koexpression von TRPC1 mit TRPC4 oder TRPC5, mit denen TRPC1 heteromultimere Kanäle bilden kann, zu einer Veränderung des Stromes führt. Dies zieht eine Veränderung der IV-Beziehung und eine Abnahme des Einwärtsstroms nach sich, zwei Beobachtungen, die ebenso in CA1-Neuronen zu finden sind. Die IV-Beziehung in hippocampalen Neuronen ist nicht identisch mit der in HEK293-Zellen, wie sie in Abbildung 1.3 B und C dargestellt sind. Dies kann zurückgeführt werden auf diverse zusätzliche Leitfähigkeiten (z. B. für K^+ oder Cl^-) in den Neuronen, die zu einer Kontamination des Stromes führen können. Eine mögliche Bestätigung hierfür liefern die Befunde in 10 mM TEA-Cl, einem Antagonisten von K^+ -Kanälen, die in Abschnitt 3.3.1.2 beschrieben sind. Diese Versuche zeigten, dass trotz der Verwendung von Cs^+ -haltigen Lösungen im VC-Modus, die K^+ -Ströme minimieren sollten, der DHPG-sensitive Strom in Anwesenheit von TEA-Cl, also bei zusätzlicher Blockade von K^+ -Kanälen, im Vergleich zur Kontrolle ein positiveres Umkehrpotential aufwies. Das Umkehrpotential in TEA-Cl nahe 0 mV ist vergleichbar mit dem V_{rev} von heterolog exprimierten TRPC4/5-Homomultimeren und TRPC1/TRPC5-Heteromultimeren (Abb. 1.3 B und C) und deutet darauf hin, dass es sich beim DHPG-sensitiven Strom in CA1-Neuronen um einen nichtselektiven Kationenstrom handelt.

Eine weitere Tatsache verknüpft den Einwärtsstrom der CA1-Neurone mit TRPC-vermittel-

ten Strömen im heterologen System: Die Vermittlung des Stroms erfolgte sowohl im WT als auch in der TRPC1^{-/-}-Maus durch extrazelluläre Kationen (Abb. 3.5 und Abb. 3.8). Der Einwärtsstrom, der durch die Aktivierung von G_q-Protein-, PLC-koppelnden Rezeptoren induziert wurde, wurde durch den Entzug von extrazellulärem Na⁺ und/oder Ca²⁺ vollständig unterbunden bzw. reduziert. Diese Eigenschaft des I_{CAN} in CA1-Neuronen ist nochmals in Abbildung 4.1 zusammengefasst.

Mithilfe der quantitativen real-time PCR konnte die Anwesenheit der verschiedenen TRPC-Isoformen in Gesamthippocampi von Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Diese Ergebnisse bestätigen bereits veröffentlichte Daten ermittelt durch *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie (siehe z.B. Mori *et al.*, 1998; Otsuka *et al.*, 1998; Philipp *et al.*, 1998; Strübing *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2006). Eine mögliche kompensatorische Hochregulation der Expression anderer TRPC-Isoformen, die durch die Deletion von TRPC1 induziert werden könnte, einhergehend mit einer Veränderung der Heteromultimerisierung von TRPC-Isoformen und damit einer Modifikation biophysikalischer Eigenschaften der Zelle (Strübing *et al.*, 2001), wurde in dieser Arbeit nicht gefunden, sofern dies mit der eingesetzten Methode detektierbar ist. Die mRNA-Level der TRPC-Isoformen TRPC3 - TRPC7 wurden zwischen WT und TRPC1^{-/-}-Mäusen während der gesamten postnatalen Entwicklung vergleichbar exprimiert (Abb. 3.1 und Abb. 3.15).

Die Charakterisierung der Signalkaskade, die in Abbildung 4.1 dargestellt ist, durch die der DHPG-sensitive Einwärtsstrom in der TRPC1^{-/-}-Maus induziert wurde, weist Übereinstimmungen mit den bereits beschriebenen I_{CAN} im nativen Gewebe auf (Congar *et al.*, 1997; Gee *et al.*, 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben einen nichtselektiven Kationenstrom, der vermutlich durch die Aktivierung von G-Proteinen hervorgerufen wurde. So führte die Infusion von 30 µM AlF_x in das Cytosol zur Induktion eines zum DHPG-induzierten Strom vergleichbaren Einwärtsstrom (Abb. 3.10 A).

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der DHPG-sensitive Strom durch die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration bzw. durch die Reduktion der intrazellulären Ca²⁺-Pufferung (Abb. 3.10 B) moduliert werden konnte, wie es bereits für TRP-Kanäle nachgewiesen wurde. So können durch TRPC5-vermittelte Ströme im heterologen System durch [Ca²⁺]_i potenziert (Blair *et al.*, 2009) und durch Stimulation von CaM die Aktivität von TRPC5-Kanälen im heterologen System (Ordaz *et al.*, 2005) sowie in hippocampalen Neuronen (Tai *et al.*, 2010) gesteigert werden.

Der Einsatz verschiedener La³⁺-Konzentrationen sollte eine Beteiligung von TRPC-Kanälen an der Vermittlung des DHPG-sensitiven Stroms und eine Unterscheidung von TRPC4/5-

und TRPC3/6/7-Kanälen in Anlehnung an die Beobachtungen von Jung *et al.* (2003) im heterologen System verdeutlichen. Jung *et al.* (2003) beschreiben potenzierende Effekte von La^{3+} eingesetzt in mikromolaren Konzentrationen auf TRPC5-vermittelte Ströme, wohingegen TRPC6-vermittelte Ströme inhibiert werden. Unabhängig von der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentration (10, 100, 1000 μM) kam es jedoch zur Inhibition des DHPG-sensitiven Stroms in der TRPC1^{-/-}-Maus (Abb. 3.11). Dies wurde analog bereits für Neuronen in der CA3-Region durch Gee *et al.* (2003) beschrieben. Lanthanoide (La^{3+} und Gd^{3+}) werden verbreitet als Inhibitoren für nichtselektive Kationen- und andere Ca^{2+} -permeable Kanäle genutzt (zur Übersicht siehe Phillis, 1974). Die Inhibition des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms in dieser Arbeit könnte somit zum einen auf die Blockade eines Ca^{2+} -Einstroms, der nicht durch TRP-Kanäle vermittelt wird, zurückzuführen sein. Da der DHPG-sensitive Einwärtsstrom Ca^{2+} -abhängig moduliert wird (siehe Abb. 3.5 B, Abb. 3.8 B und Abb. 3.10 B), würde ein fehlender Ca^{2+} -Einstrom zu einer Reduktion des Kationeneinstroms und nachgeschaltet zu einer Inhibition z. B. spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle führen. Diese Ereignisse könnten einer möglichen Potenzierung des Stromes entgegenwirken. Zum anderen kann aber eine Beteiligung von TRPC-Kanälen an der Vermittlung des Einwärtsstroms an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Da in der TRPC1^{-/-}-Maus alle untersuchten TRPC-Isoformen mit Ausnahme von TRPC1 exprimiert werden (Abb. 3.1), was zum Beispiel auch per Immunhistochemie nachgewiesen wurde (Chung *et al.*, 2006), ist es wahrscheinlich, dass in CA1 hippocampalen Neuronen eine Mischpopulation aus TRPC4/5- und TRPC3/6/7-Kanälen vorliegt. Eine klare Unterscheidung zwischen TRPC4/5- und TRPC6-vermittelten Strömen wäre durch den gegenläufigen Effekt von La^{3+} in den hier durchgeführten WC-Messungen, in denen die Summenaktivität aller offenen Kanäle einer Zelle gemessen wird, nahezu unmöglich.

Ergänzend konnte in der vorliegenden Arbeit eine modulatorische Wirkung von extrazellulärem Mg^{2+} auf den DHPG-sensitiven Einwärtsstrom nachgewiesen werden (Abb. 3.8 A), vergleichbar zu den modulatorischen Effekten zweiwertiger Kationen in der Studie von Congar *et al.* (1997). Für heterolog exprimierte TRPC5-Kanäle wurde eine spannungsabhängige, inhibitorische Regulation durch intrazelluläres Mg^{2+} beschrieben, durch die der zuvor erläuterte charakteristische Verlauf der IV-Beziehung mit dem Plateauverlauf zwischen +20 und +40 mV von homomultimeren TRPC4/5-Kanälen entsteht (Abb. 1.3 B; Obukhov und Nowycky, 2005, 2008). Des Weiteren wurde für heterolog exprimierte TRPC3- und TRPC6-Kanäle eine inhibitorische Wirkung einer erhöhten extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration auf den einwärtsgerichteten Strom nachgewiesen (Konieczny, 2010). Eine mögliche Interaktion von Mg^{2+} mit dem Kanal, z. B. über eine extrazellulär lokalisierte Bindestelle im Bereich der Pore, stellt eine Erklärung dar, die bei einer Erhöhung der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration durch Bindung von Mg^{2+} bzw. eine mögliche sterische Hinderung zu einer Reduktion des Einwärts-

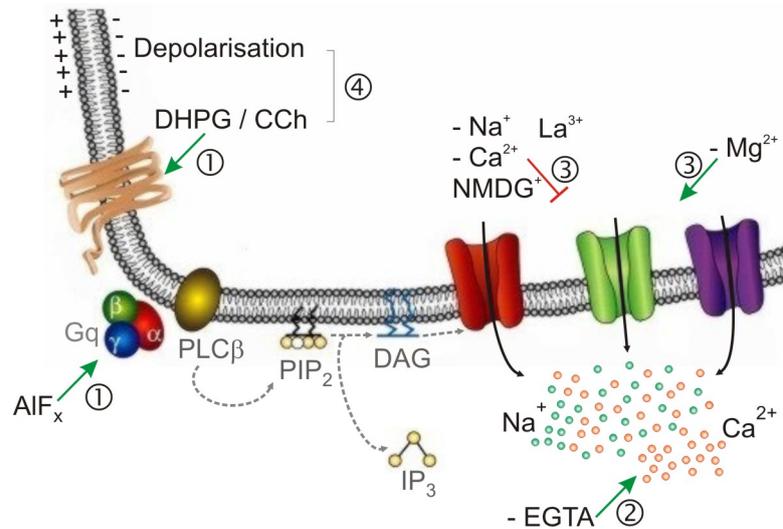


Abb. 4.1.: Die Eigenschaften des I_{CAN} in CA1-Neuronen.

Die Abbildung fasst die Eigenschaften des in dieser Arbeit beschriebenen I_{CAN} in CA1-Neuronen, die im WT und/oder in der $TRPC1^{-/-}$ -Maus beobachtet wurden, zusammen. Der I_{CAN} wird durch die Aktivierung von GPCR induziert (1), ist abhängig von der $[Ca^{2+}]_i$ (2) und wird durch extrazelluläre Kationen vermittelt und moduliert (3). Zusätzlich ist für die Aktivierung des I_{CAN} die Depolarisation der Zellmembran notwendig. Die beteiligten Kanäle fungieren somit als Koinkidenzdetektor (4).

stromes führen könnte.

4.1.1. Die Spannungsabhängigkeit des DHPG-sensitiven Stroms

Eine weitere Eigenschaft des DHPG-sensitiven Stroms in den CA1-Neuronen war seine beobachtete Spannungsabhängigkeit, da der Einwärtsstrom ohne vorangehende Depolarisation der Zelle nicht induziert wurde (Abb. 3.6 und Abb. 3.9).

Eine solche Spannungsabhängigkeit könnte möglicherweise durch eine Kopplung der Aktivierung des DHPG-sensitiven Stroms an spannungsabhängige Kanäle erklärt werden. Da der DHPG-sensitive Strom Ca^{2+} -abhängig aktiviert wird, kommen dafür z. B. spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (Ca_v) in Frage, die induziert durch eine Zelldepolarisation zu einem Ca^{2+} -Einstrom führen und damit eine Aktivierung des I_{CAN} in den CA1-Neuronen bewirken könnten. Ca_v -Kanäle werden abhängig vom Subtyp ab einem Membranpotential zwischen -60 bis -10 mV (low-voltage-activated, LVA; high-voltage-activated, HVA) aktiviert (Lacinová, 2005). In diesem Spannungsbereich kann also die Aktivierung von Ca_v -Kanälen und ein dadurch vermittelter Ca^{2+} -Einstrom die Aktivierung des DHPG-sensitiven Stroms begünstigen. Aufgrund des abnehmenden elektrochemischen Gradienten für Ca^{2+} bei positiven

Potentialen ($V_{\text{rev}}(\text{Ca}^{2+}) + 100 \text{ mV}$), kommt es bei Potentialen positiver als 0 mV zu einer zunehmenden Reduktion des Ca^{2+} -Einstroms. Der Verlauf der Strom-Spannungsbeziehung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, wie er z. B. durch Viard *et al.* (2004) oder Talavera und Nilius (2006) beschrieben wurde, kann somit als glockenförmig beschrieben werden. Auffallend war jedoch, dass der DHPG-sensitive Strom in CA1-Neuronen bis zu einer Depolarisation von +50 mV stetig zunahm und dann in eine Plateauphase überging, also sigmoidal verlief (Abb. 3.9). Die in CA1-Neuronen beobachtete Spannungsabhängigkeit des DHPG-sensitiven Stroms kann somit nicht ausschließlich mit der Kopplung an Ca_v -Kanäle und den damit vermittelten Einstrom von Ca^{2+} erklärt werden. Ergänzend konnten die Versuche in nominell 0 mM Ca^{2+} insbesondere in der TRPC1^{-/-}-Maus (Abb. 3.8 B) zeigen, dass auch in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} ein zur Kontrolle unveränderter Einwärtsstrom durch DHPG aktiviert werden konnte, der DHPG-sensitive Strom somit nicht ausschließlich vom Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle abhängig war.

Die nur durch eine starke Depolarisation der Zellmembran induzierte, also spannungsabhängige, Aktivierung von Ionenkanälen ist für einige Mitglieder der TRPV- und TRPM-Subfamilie beschrieben (Nilius *et al.*, 2003; Voets *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte für diese TRP-Kanäle nachgewiesen werden, dass es durch eine Kanalaktivierung zu einer Linksverschiebung der Spannungsabhängigkeit von stark positiven Potentialen in den negativeren Potentialbereich kommt und somit die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle im physiologischen Spannungsbereich erhöht wird (zur Übersicht siehe Nilius *et al.*, 2005). Ergänzend hierzu wurde erst vor kurzem auch für heterolog exprimierte TRPC-Kanäle (TRPC4/5 und TRPC3/6) eine vergleichbare, schwache Spannungsabhängigkeit bei G-Protein-vermittelter Aktivierung beschrieben (Otsuguro *et al.*, 2008; Semtner, 2010).

Die hier vorgestellte Spannungsabhängigkeit des DHPG-sensitiven Stroms kann möglicherweise durch das Modell für die spannungsabhängige Aktivierung von TRPV- und TRPM-Kanälen erklärt werden. Dabei kommt es bei geringer Kanalaktivierung nur zu einer Öffnung des Kanals bzw. zur Induktion eines Stroms, wenn zuvor eine Depolarisation der Membran erfolgt (Nilius *et al.*, 2005). An dieser Stelle ist festzuhalten, dass der nichtselektive Kationenkanal, der den I_{CAN} in Neuronen der CA1-Region vermittelt, sowohl die Stimulation von mGluRI als auch eine Depolarisation der Zellmembran benötigt, um aktiviert zu werden (Abb. 4.1). Er fungiert somit, vergleichbar zu NMDA-Rezeptoren, als Koinzidenzdetektor, der das gleichzeitige Auftreten von elektrischer Aktivität und der Aktivierung von metabotropen Rezeptoren integriert.

Dies benennt einen Hauptunterschied des DHPG-sensitiven Stroms zu denen, die durch homo- oder heteromultimere TRPC-Kanäle in HEK293-Zellen vermittelt werden. Im heterologen System ist bereits eine Stimulation von G-Protein- bzw. PLC-koppelnden Rezeptoren

ausreichend, um TRPC-vermittelte Einwärtsströme zu aktivieren (z. B. Semtner, 2010). Eine Depolarisation der Membran ist somit keine Voraussetzung für die Aktivierung heterolog exprimierter TRPC-Kanäle. Dies könnte unter anderem an einer höheren Kanaldichte, einem dadurch vermittelten Ca^{2+} -Einstrom und daraus resultierend einer stärkeren Aktivierung der Kanäle im heterologen System liegen. Eine weitere mögliche Erklärung für die veränderte Spannungsabhängigkeit des nativen Stroms könnte eine Modifikation der Kanaleigenschaften durch Interaktionspartner sein, die in Zellen des heterologen Systems nicht vorhanden sind.

Eine deutliche Veränderung der Spannungsabhängigkeit in der $\text{TRPC1}^{-/-}$ -Maus im Vergleich zum WT, die die Veränderung der IV-Beziehung und die Zunahme des Einwärtsstroms erklären könnte, wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet (Abb. 3.9). Hierfür wäre eine Verschiebung der Aktivierungsschwelle des Einwärtsstroms zu negativeren Potentialen am wahrscheinlichsten gewesen, da sich hierdurch bei gleicher Depolarisation ein größerer Einstrom ergeben würde. Abhängig davon, wie deutlich solche Veränderungen ausgeprägt sind, führen Streuungen in den aufgezeichneten Zellantworten von nativen Zellen im Gewebeschnitt möglicherweise dazu, dass geringfügige Veränderungen nur schwerlich erfasst werden können.

Eine Verringerung der Einzelkanalleitfähigkeit, wie sie für heteromultimere Kanäle exprimiert in HEK293-Zellen durch Strübing *et al.* (2001) beschrieben wurde und in Abbildung 1.3 C (Inset) abgebildet ist, könnte eine weitere Erklärungsmöglichkeit darstellen, die in einer Abnahme des Ganzzellstromes resultieren würde. Im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführte Einzelkanalableitungen in der Cell-Attached-Konfiguration an Neuronen der $\text{TRPC1}^{-/-}$ -Maus lieferten noch keine eindeutigen Ergebnisse, da keine Einzelkanalöffnungen identifiziert werden konnten, die eindeutig durch die Stimulation mit DHPG hervorgerufen wurden.

An dieser Stelle bleibt offen, ob die durch die Stimulation von mGluRI vermittelte Antwort in CA1-Neuronen durch einen bestimmten Kanaltyp (z. B. TRPC-Kanäle) vermittelt wird, oder ob andere Ca^{2+} -abhängige Ca^{2+} -impermeable Kanäle wie z. B. Mitglieder der TRPM-Subfamilie (TRPM4 und TRPM5; Owsianik *et al.*, 2006), die ebenfalls in CA1-Neuronen exprimiert werden (Wu *et al.*, 2010), an der Vermittlung des Stroms beteiligt sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der in dieser Arbeit beschriebene DHPG-sensitive Einwärtsstrom in seinen Charakteristika zu bereits beschriebenen Ca^{2+} -abhängigen, nichtselektiven, TRP-ähnlichen Strömen im nativen Gewebe vergleichbar ist. Ergänzend zeigen die Ergebnisse in der $\text{TRPC1}^{-/-}$ -Maus eine Beteiligung dieser Isoform an der Vermittlung des DHPG-sensitiven Stroms. Zusätzlich weist die Veränderung der IV-Beziehung zwischen WT- und $\text{TRPC1}^{-/-}$ -Maus ähnliche Eigenschaften auf, wie sie im heterologen System beobachtet wurden. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass TRPC-Kanäle an der Vermittlung von PLC-induzierten Einwärtsströmen in CA1 hippocampalen Neuronen der Maus

direkt beteiligt sind. Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, können analog zu den Befunden von Hartmann *et al.* (2008) in Purkinjoneuronen des Cerebellums gesehen werden, in denen TRPC3, nicht aber TRPC1 und TRPC4, an der Vermittlung der mGluRI-vermittelten Zellantwort beteiligt ist; in Neuronen der Amygdala, in denen TRPC5 für die Vermittlung eines G-Protein-vermittelten Kationenstroms verantwortlich ist (Riccio *et al.*, 2009) und in cortikalen und hippocampalen Neuronen, in denen die Expression und Translokation von TRPC5 in die Plasmamembran an der Vermittlung eines mAChR-induzierten I_{ADP} beteiligt ist, der für die Induktion einer langsamen Nachdepolarisation verantwortlich ist (sADP; Yan *et al.*, 2009; Tai *et al.*, 2010).

4.2. Welche physiologischen Auswirkungen könnte die Zunahme eines einwärtsgerichteten Kationenstroms in der TRPC1^{-/-}-Maus haben?

Die Eigenschaften des TRPC1-regulierten Stroms lassen sich mit einer gestiegenen Anzahl der Zellen in der TRPC1^{-/-}-Maus verknüpfen, in denen die Stimulation von GPCR zur Bildung von Plateaupotentialen führt (Abb. 3.13). Die durchgeführten Experimente im CC-Modus zeigten, dass die Applikation von DHPG im WT vornehmlich eine reversible, schwache Depolarisation der Zelle hervorrief, die zur Bildung bzw. Zunahme von Spikeaktivität führte (Abb. 3.12 A). Plateaupotentiale traten im WT nur selten auf, konnten jedoch auch beobachtet werden (Abb. 3.12 B). Auch in CA1 hippocampalen Neuronen der TRPC1^{-/-}-Maus induzierte die Stimulation von mGluRI eine Zelldepolarisation, die jedoch im Gegensatz zum WT in über 50 % der Zellen zur Ausbildung von epilepsieartiger Aktivität führte: Diese ging mit kurzen PP, welche mit einer ausgeprägten Nachhyperpolarisation verknüpft waren und in ihren Charakteristika durch Bianchi *et al.* (2009) beschrieben wurden, einher (Abb. 3.12 C).

Versuche von Hoehn *et al.* (1993) sowie von Fraser und MacVicar (1996) konnten zeigen, dass cholinerg induzierte sADP und PP in der CA1-Region durch Ca^{2+} vermittelt werden. Eine durch Stimulation von GPCR induzierte Depolarisation der Zelle induziert die nachgeschaltete Aktivierung von Ionenkanälen, die zu einem weiteren, spannungsabhängigen oder Ca^{2+} -abhängigen Kationeneinstrom beitragen (Rutecki *et al.*, 2002). Dies kann zu einer weiteren Depolarisation der Zelle bis nahe 0 mV führen. Durch diesen verstärkenden Mechanismus treten eine Depolarisation der Zelle und die Stimulation von GPCR zur gleichen Zeit auf, zwei Voraussetzungen, die für die Aktivierung des in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen DHPG-sensitiven Einwärtsstroms unerlässlich sind (Koinzidenz). Durch die Kanalöffnung und des daraus resultierenden, weiteren Kationeneinstroms wird die Ausbildung der vorangehend beschriebenen Plateaupotentiale begünstigt. Die Wahrscheinlichkeit der stärkeren De-

polarisation und der Generation von PP ist in der TRPC1^{-/-}-Maus durch den gesteigerten Einwärtsstroms im Vergleich zum WT deutlich erhöht.

Die kürzere Dauer der Plateaupotentiale und das Auftreten ausgeprägter Nachhyperpolarisationen, wie sie in Abbildung 3.12 C dargestellt sind, bzw. das Auftreten von zusätzlichen kurzanhaltenden Plateaupotentiale (sPP) in der TRPC1^{-/-}-Maus (Abb. 3.13 D) könnte sich entweder durch ein schnelleres Abschalten des Einwärtsstroms in diesem Genotyp ergeben oder durch die stärkere/schnellere Aktivierung von repolarisierenden Leitfähigkeiten, z. B. spannungsabhängigen und/oder Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanälen (Rutecki *et al.*, 2002) oder spannungsabhängige Cl⁻-Kanälen (Rinke *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen werden durch die verkürzte Dauer des Einwärtsstroms, der in der TRPC1^{-/-}-Maus auftrat und in Abbildung 3.7 D zu sehen ist, gestützt.

Die hier dargestellten Ergebnisse, die eine regulatorische Funktion von TRPC1 nahelegen, werden durch erst kürzlich veröffentlichte Beobachtungen, die eine Rolle von TRPC5 bei der Ausbildung von cholinerg induzierten Plateaupotentiale in CA1-Neuronen der Ratte beschreiben, unterstrichen. Dabei kommt es durch die Stimulation von mAChR zum Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI₃K)-abhängigen Einbau von TRPC5 in die Zellmembran und einer CaM-abhängigen Aktivierung des Kanals (Tai *et al.*, 2010). Eine vergleichbare Rolle für TRPC5 an der Vermittlung einer mAChR-induzierten sADP in cortikalen Neuronen wurde bereits 2009 durch Yan *et al.* beschrieben.

Aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse, kann geschlossen werden, dass heteromultimere Kationenkanäle, die u. a. aus der Isoform TRPC1 aufgebaut sind, im WT einen moderaten Kationeneinstrom und damit verbunden eine moderate Zelldepolarisation vermitteln. TRPC1 agiert dabei als regulatorische Komponente im funktionellen Kanal gebildet aus TRPC1 und TRPC4/5 *in vivo*. Gleichzeitig stellt der Kanal eine Form eines Koinzidenzdetektors dar, der sowohl die Stimulation einer intrazellulären PLC-induzierten Signalkaskade als auch die Depolarisation der Zelle zur Aktivierung benötigt.

Wie in dieser Arbeit beschrieben, führt die Deletion von TRPC1 in der TRPC1^{-/-}-Maus zu einem erhöhten Kationeneinstrom im Voltage-Clamp (Abb. 3.7) und dadurch häufiger zur Bildung von kurzen Plateaupotentiale, anstatt einer moderaten Depolarisation oder der Ausbildung von länger andauernden Plateaupotentiale, und ruft möglicherweise eine Veränderung der Zellerregbarkeit im Current-Clamp hervor (Abb. 3.12). Diese Befunde legen nahe, dass es in CA1-Neuronen der TRPC1^{-/-}-Maus zu einer gesteigerten mGluR-vermittelten, postsynaptischen Antwort aufgrund präsynaptischer Glutamatfreisetzung kommt, die z. B. durch repetitive oder hochfrequente präsynaptische Stimulation hervorgerufen werden kann (Congar *et al.*, 1997). Eine gesteigerte Depolarisation der Zelle resultiert voraussichtlich in einer stärkeren Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, was sich im Hinblick auf die Kommunikation von

Zellen innerhalb eines Gewebeverbandes in Form einer modifizierten synaptischen Plastizität, z. B. dem Auf- oder Abbau bzw. der Stärkung von Synapsen (LTP und LTD), bemerkbar machen könnte (Abb. 4.2).

4.3. Eine mögliche neuroprotektive Rolle von TRPC1?

In den vergangenen Jahren wurde mehrfach über hyperexzitatorische Effekte vermittelt durch die Stimulation von mGluRI per DHPG und damit verbundene Beschädigung von CA1 hippocampalen Neuronen, in geringerem Ausmass auch in der CA3-Region, berichtet (Sacaan und Schoepp, 1992; Camón *et al.*, 1998; Meli *et al.*, 2002; Scartabelli *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte in der CA1-Region der Ratte eine Beteiligung von Kanälen der TRPM- und TRPV-Subfamilie an der Zelldepolarisation, Akkumulation von intrazellulärem Ca^{2+} und einer Schwellung der Zellen induziert durch eine akute Ischämie nachgewiesen werden (Lipski *et al.*, 2006). In 2007 beschrieben Jia *et al.* die neuroprotektive Rolle von TRPC3 und TRPC6 gegenüber dem induzierten Zelltod von Körnerzellen des Cerebellums in Kultur. Ergänzend hierzu vermittelt TRPC1 einen neuroprotektiven Effekt in menschlichen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y; Bollimuntha *et al.*, 2005, 2006). So kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Rolle von mGluR-induzierter Übererregbarkeit ebenso wie die Beteiligung von Mitgliedern der TRP-Familie, insbesondere der TRPM- und TRPC-Subfamilie, an der Vermittlung von neuroprotektiven Effekten gegenüber oxidativem Stress und Neurotoxinen in verschiedenen Systemen beschrieben wurde (Pellegrini-Giampietro, 2003; Miller, 2006).

Die in dieser Arbeit beschriebene gesteigerte Tendenz zur Ausbildung von epileptischer Aktivität verknüpft mit der Bildung von Plateaupotentialen in der TRPC1^{-/-}-Maus weist nochmals auf die regulatorische Funktion von TRPC1 in den CA1-Neuronen hin und unterstreicht eine mögliche neuroprotektive Funktion des Proteins (Abb. 4.2). So kann ein weniger stark ausgeprägter Kationeneinstrom und eine damit verbundene moderate Zelldepolarisation bzw. ein moderater Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verhindern, dass verschiedene Zellprozesse (u. a. Apoptose) initiiert werden. Ein offensichtliches, morphologisches Korrelat, das diese Vermutung bestätigt, konnte in dieser Arbeit jedoch nicht gefunden werden. So zeigte sowohl die grobe Morphologie der hippocampalen Formation (Abb. 2.1) als auch die histochemischen Untersuchungen pyramidalen Neurone der CA1-Region (Abb. 3.2) keine grundlegenden Unterschiede zwischen WT- und TRPC1^{-/-}-Mäusen.

4.4. Eine mögliche Rolle von TRPC1 während der postnatalen Entwicklung?

Zusätzlich zu der Rolle bei der langsamen, über metabotrope Rezeptoren vermittelte Neurotransmission, sind TRPC-Kanäle in die Ausbildung von Neuriten, der chemotaktischen Bewegung und der Morphologie von Wachstumskegeln involviert (zur Übersicht siehe Tai *et al.*, 2009). Während der Entwicklung durchlaufen Zellen des Hippocampus Stadien der pränatalen Proliferation, der postnatalen Differenzierung, Synapsenbildung und -reifung. Diese Entwicklungsstadien sind gekennzeichnet durch die Veränderung der Expressionslevel verschiedenster Gene, abhängig von deren Funktion (Mody *et al.*, 2001). Das späte postnatale Stadium um P16 ist charakterisiert durch die Hochregulation von Genen, die für Proteine, wie Synaptotagmin und Synaptophysin, Chemokine und BDNF, und für Rezeptoren, wie mGluRI, AChR und NMDA-Rezeptoren, kodieren (Mody *et al.*, 2001).

Studien in kultivierten Körnerzellen des Cerebellums und Pyramidenneuronen des Hippocampus zeigten, dass TRPC5 an der Ausprägung der Morphologie von Wachstumskegeln und des Neuritenwachstums beteiligt ist. *Via* einer Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskade und unterschiedlicher Protein-Protein-Interaktionen, u. a. mit NCS-1 (neuronal calcium sensor-1), Stathmin 2, Ca^{2+} /CaM-Kinase-Kinase und Ca^{2+} /CaM-Kinase I, vermittelt TRPC5 einen Ca^{2+} -Einstrom in die Wachstumskegel und reguliert hierdurch das Auswachsen von Neuriten und somit die Morphologie der Wachstumskegel (Greka *et al.*, 2003; Hui *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007; Davare *et al.*, 2009; zur Übersicht siehe Gomez, 2005; Gomez und Zheng, 2006). Ergänzend hierzu wurde in hippocampalen Neuronen nachgewiesen, dass TRPC1- und TRPC5-Proteine im Soma, in den Dendriten und Axonen zu finden sind. Dabei ist festzuhalten, dass TRPC1 nicht in synaptischen Strukturen auftritt, wohingegen TRPC5 in sich bildenden Synapsen und Wachstumskegeln lokalisiert ist (Strübing *et al.*, 2001; Greka *et al.*, 2003). In Spinalneuronen von *Xenopus* wurde berichtet, dass TRPC1 notwendig ist für die gerichtete Bewegung von Wachstumskegeln als Antwort auf einen Gradienten an Netrin-1, BDNF und MAG (Myelin-associated glycoprotein) und als Mediator für den Ca^{2+} -Einstrom, der das gerichtete Wachstum von Axonen während der Entwicklung vermittelt (Shim *et al.*, 2005; Wang und Poo, 2005). Im Gegensatz dazu werden in kultivierten Körnerzellen des Cerebellums TRPC3 und TRPC6, jedoch nicht TRPC1, für BDNF-induzierte Chemotaxis benötigt (Li *et al.*, 2005).

Interessanterweise zeigten die hier vorgestellten Untersuchungen, dass DHPG während der frühen postnatalen Entwicklung (P10 - P12) einen vergleichbaren Einwärtsstrom im WT und in der TRPC1^{-/-}-Maus mit einer insgesamt geringen Amplitude induzierte (Abb. 3.14 A). Dies könnte sich möglicherweise darin begründen, dass die Expression insbesondere an TRPC1 und TRPC4/5 in diesem Entwicklungszeitraum deutlich geringer ist als in der folgenden Ent-

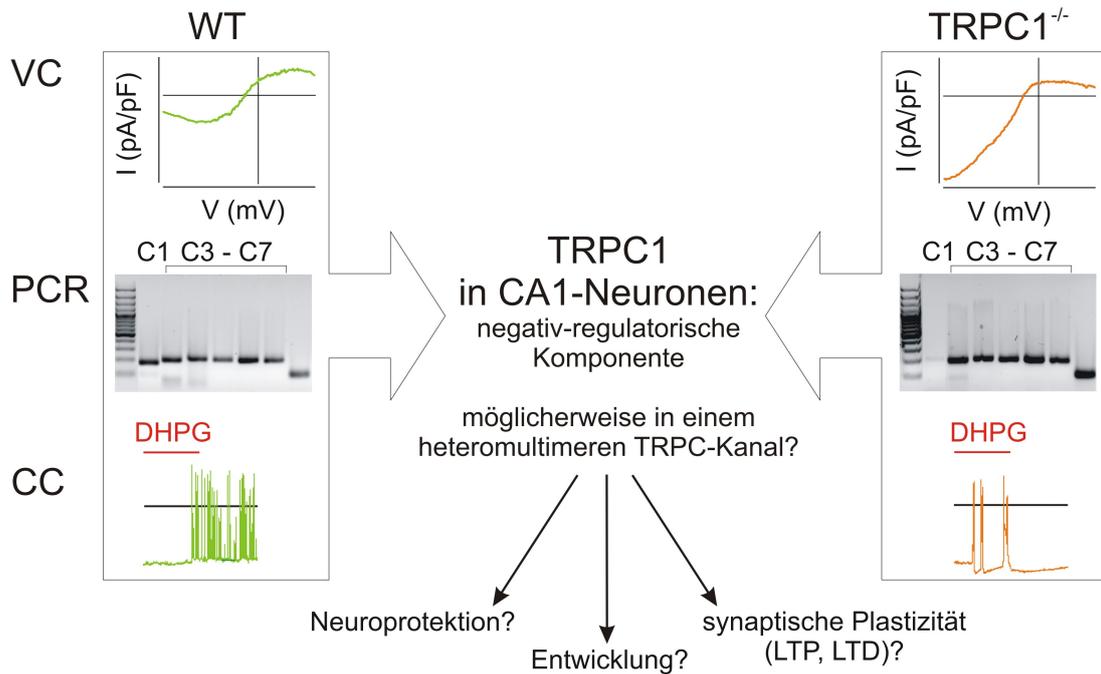


Abb. 4.2.: Die negativ-regulatorische Funktion von TRPC1 in CA1-Neuronen der Maus.

Die Abbildung gibt die gewonnenen Ergebnisse im Voltage-Clamp (VC), in der qRT-PCR (PCR) und im Current-Clamp (CC) vergleichend zwischen WT- und TRPC1^{-/-}-Maus wieder und fasst mögliche physiologische Funktionen von TRPC1 in CA1 hippocampalen Neuronen zusammen.

wicklung (Abb. 3.15). So zeigten Versuche im heterologen System, in denen Untersuchungen an heteromultimeren Kanälen gebildet aus TRPC1 und TRPC4 oder TRPC5 durchgeführt werden sollten, dass die charakteristische IV-Beziehung heteromultimerer TRPC1-TRPC4/5-Kanäle (Abb. 1.3 C) nur auftrat, wenn ein Transfektionsverhältnis für TRPC1 : TRPC4/5 von 4 : 1 eingehalten wurde (Prof. Dr. T.D. Plant, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass eine ausreichende TRPC1-Expression benötigt wird, um zum einen über eine Protein-Protein-Interaktion (z. B. mit TRPC4; Hofmann *et al.*, 2002) die Translokation der Kanaluntereinheiten vom Syntheseort zur Plasmamembran zu bewerkstelligen (Ambudkar, 2007). Zum anderen könnte aufgrund einer mangelnden TRPC1-Expression die Heteromultimerisierung mit TRPC4/5 unterbleiben bzw. erschwert sein. Dies könnte, neben der geringen Expression benötigter Proteine (u. a. mGluRI; Mody *et al.*, 2001), ein Faktor sein, warum der DHPG-sensitive Einwärtsstrom erst im Verlaufe der späten postnatalen Entwicklung (P14 - P26), wenn sich Synapsen ausbilden und reifen, in beiden Genotypen zunimmt. Diese Zunahme ist in CA1-Neuronen der TRPC1^{-/-}-Maus deutlicher ausgeprägt als im WT (Abb. 3.7) und kann möglicherweise durch die von Bezzerides *et al.* (2004) beschriebene „rapid vesicular insertion of TRP“ erklärt werden. Hierbei kommt es durch Epidermal growth factor

(EGF)-vermittelte Stimulation zu einer Zunahme des TRPC5-Einbaus in die Plasmamembran und zur Aktivierung TRPC5-vermittelter Ströme. Ein analoger Effekt wurde von Tai *et al.* (2010) auch in hippocampalen Neuronen beschrieben. Des Weiteren postuliert dieses Modell, dass die Interaktion von TRPC1 und TRPC5 diesen Einbau unterbindet. Das Fehlen des funktionellen TRPC1-Proteins in der TRPC1^{-/-}-Maus könnte somit eine Zunahme des DHPG-sensitiven Einwärtsstrom basierend auf dem Modell der „rapid vesicular insertion of TRP“ erklären.

Ergänzend konnte in den histochemischen Untersuchungen demonstriert werden, dass Pyramidenzellen der TRPC1^{-/-}-Maus im Vergleich zum WT signifikant mehr Primärdendriten bzw. prozentual mehr Neurone aufwiesen, die mehr als einen Apikaldendriten entwickelten (Abb. 3.2). Es ist möglich, dass diese Veränderung durch den gesteigerten Einfluss von TRPC4/5 in Abwesenheit von TRPC1 induziert wird. Die negative Regulation der Neuritenlänge *via* eines receptorinduzierten Ca²⁺-Einstroms in die Wachstumskegel vermittelt durch TRPC5 (Greka *et al.*, 2003) unterstreicht diese Ergebnisse. Eine mögliche Erklärung für diese Funde ist wiederum der gesteigerte Kationeneinstrom in der TRPC1^{-/-}-Maus, der Ca²⁺-abhängig das Auswachsen eines Neuriten unterdrücken und die Ausbildung neuer Neuriten fördern könnte.

Fügt man alle hier dargestellten Ergebnisse zusammen, scheint TRPC1 eine regulatorische Funktion im funktionellen, heteromultimeren Kanal, der aus TRPC1 und TRPC4/5 gebildet wird, in CA1-Neuronen der WT-Maus zu übernehmen (Abb. 4.2). Die reduzierende Modulation des Kationeneinwärtsstroms im Vergleich zur TRPC1^{-/-}-Maus bedingt eine moderate Depolarisation der Zelle. Insbesondere die zeitliche Korrelation der Hochregulation von Komponenten, die in die Chemotaxis, die Synapsenbildung und deren Stabilisation involviert sind (z. B. BDNF, mGluRI, NMDA-Rezeptoren; Mody *et al.*, 2001), und die gleichzeitige Zunahme des DHPG-sensitiven Einwärtsstroms von P10 - P12 nach P14 - P26 legt die Vermutung nahe, dass TRPC1, neben einer möglichen neuroprotektiven Rolle, durch die Modulation der Zellerregbarkeit an der Ausbildung von Synapsen und deren Reifung in der CA1-Region des murinen Hippocampus im Verlaufe der späten postnatalen Entwicklung beteiligt ist. Weitere Untersuchungen im TRPC1-defizienten Mausmodell, z. B. im Hinblick auf die Ausprägung synaptischer Plastizität, werden notwendig sein, um die Funktion von TRPC1 in CA1 hippocampalen Neuronen genauer zu charakterisieren.

Literaturverzeichnis

- Abrahamsson T, Gustafsson B, Hanse E, 2008. AMPA silencing is a prerequisite for developmental long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurophysiol* 100 (5), 2605–2614.
- Ahmed GU, Mehta D, Vogel S, Holinstat M, Paria BC, Tirupathi C, Malik AB, 2004. Protein kinase C α phosphorylates the TRPC1 channel and regulates store-operated Ca²⁺ entry in endothelial cells. *J Biol Chem* 279 (20), 20941–20949.
- Amaral MD, Pozzo-Miller L, 2007. TRPC3 channels are necessary for brain-derived neurotrophic factor to activate a nonselective cationic current and to induce dendritic spine formation. *J Neurosci* 27 (19), 5179–5189.
- Ambudkar IS, 2007. In: Handbook of Experimental Pharmacology: Transient Receptor Potential (TRP) Channels. Vol. 179. Springer Verlag, Berlin, Kapitel: Trafficking of TRP channels: determinants of channel function, S. 541–557.
- Andrade R, 1991. Cell excitation enhances muscarinic cholinergic responses in rat association cortex. *Brain Res* 548 (1-2), 81–93.
- Anwyl R, 1999. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Rev* 29 (1), 83–120.
- Beck H, Yaari Y, 2008. Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nat Rev Neurosci* 9, 357–369.
- Becker EB, Oliver PL, Glitsch MD, Banks GT, Achilli F, Hardy A, Nolan PM, Fisher EM, Davies KE, 2009. A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (16), 6706–6711.
- Beech DJ, 2005. TRPC1: store-operated channel and more. *Pflügers Arch: Eur J Physiol* 451 (1), 53–60.
- Beech DJ, Xu SZ, McHugh D, Flemming R, 2003. TRPC1 store-operated cationic channel subunit. *Cell Calcium* 33 (5-6), 433–440.

- Bengtson CP, Tozzi A, Bernardi G, Mercuri NB, 2004. Transient receptor potential-like channels mediate metabotropic glutamate receptor EPSCs in rat dopamine neurones. *J Physiol* 555 (Pt 2), 323–330.
- Berg AP, Sen N, Bayliss DA, 2007. TrpC3/C7 and Slo2.1 are molecular targets for metabotropic glutamate receptor signaling in rat striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 27 (33), 8845–8856.
- Bergdahl A, Gomez MF, Dreja K, Xu SZ, Adner M, Beech DJ, Broman J, Hellstrand P, Sward K, 2003. Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca^{2+} entry dependent on TRPC1. *Circ Res* 93 (9), 839–847.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL, 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (7), 517–529.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD, 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 (1), 11–21.
- Bezzerides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE, 2004. Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* 6 (8), 709–720.
- Bianchi R, Chuang S-C, Zhao W, Young SR, Wong RKS, 2009. Cellular plasticity for group I mGluR-mediated epileptogenesis. *J Neurosci* 29 (11), 3497–3507.
- Bianchi R, Wong RKS, 1995. Excitatory synaptic potentials dependent on metabotropic glutamate receptor activation in guinea-pig hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 487 (Pt 3), 663–676.
- Bianchi R, Young SR, Wong RKS, 1999. Group I mGluR activation causes voltage-dependent and -independent Ca^{2+} rises in hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol* 81 (6), 2903–2913.
- Birnbaumer L, 2009. The TRPC class of ion channels: A critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca^{2+} concentrations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 395–426.
- Bischofberger J, Engel D, Li L, Geiger J, Jonas P, 2006. Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nat Protoc* 1 (4), 2075–2081.
- Blair NT, Kaczmarek JS, Clapham DE, 2009. Intracellular calcium strongly potentiates agonist-activated TRPC5 channels. *J Gen Physiol* 133 (5), 525–546.

- Bollimuntha S, Ebadi M, Singh BB, 2006. TRPC1 protects human SH-SY5Y cells against salsolinol-induced cytotoxicity by inhibiting apoptosis. *Brain Res* 1099 (1), 141–149.
- Bollimuntha S, Singh BB, Shavali S, Sharma SK, Ebadi M, 2005. TRPC1-mediated inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion neurotoxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 280 (3), 2132–2140.
- Bortolotto ZA, Fitzjohn SM, Collingridge GL, 1999. Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus. *Curr Opin Neurobiol* 9 (3), 299–304.
- Brazer SC, Singh BB, Liu X, Swaim W, Ambudkar IS, 2003. Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated Ca^{2+} influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *J Biol Chem* 278 (29), 27208–27215.
- Breakwell NA, Rowan MJ, Anwyl R, 1996. Metabotropic glutamate receptor dependent EPSP and EPSP-spike potentiation in area CA1 of the submerged rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* 76 (5), 3126–3135.
- Camón L, Vives P, de Vera N, Martínez E, 1998. Seizures and neuronal damage induced in the rat by activation of group I metabotropic glutamate receptors with their selective agonist 3,5-dihydroxyphenylglycine. *J Neurosci Res* 51 (3), 339–348.
- Chen J, Barritt GJ, 2003. Evidence that TRPC1 (transient receptor potential canonical 1) forms a Ca^{2+} -permeable channel linked to the regulation of cell volume in liver cells obtained using small interfering RNA targeted against TRPC1. *Biochem J* 373 (Pt 3), 327–336.
- Chung YH, Sun Ahn H, Kim D, Hoon Shin D, Su Kim S, Yong Kim K, Bok Lee W, Ik Cha C, 2006. Immunohistochemical study on the distribution of TRPC channels in the rat hippocampus. *Brain Res* 1085 (1), 132–137.
- Clapham DE, 1995. Calcium signaling. *Cell* 80 (2), 259–268.
- Clapham DE, 2002. Hot and cold TRP ion channels. *Science* 295 (5563), 2228–2229.
- Clapham DE, 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426 (6966), 517–524.
- Clapham DE, 2009. In: Encyclopedia of Neuroscience. Vol. 9. Oxford: Academic Press, Kapitel: Transient Receptor Potential (TRP) Channels, S. 1109–1133.
- Congar P, Leinekugel X, Ben-Ari Y, Crépel V, 1997. A long-lasting calcium-activated non-selective cationic current is generated by synaptic stimulation or exogenous activation of group I metabotropic glutamate receptors in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 17 (14), 5366–5379.

- Crépel V, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Hammond C, 1994. Glutamate metabotropic receptors increase a Ca^{2+} -activated nonspecific cationic current in CA1 hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 72 (4), 1561–1569.
- Davare MA, Fortin DA, Saneyoshi T, Nygaard S, Kaech S, Banker G, Soderling TR, Wayman GA, 2009. Transient receptor potential canonical 5 channels activate Ca^{2+} /calmodulin kinase I γ to promote axon formation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 29 (31), 9794–9808.
- Desai BN, Clapham DE, 2005. TRP channels and mice deficient in TRP channels. *Pflugers Arch: Eur J Physiol* 451 (1), 11–18.
- Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaja G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L, Gudermann T, 2007. Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch: Eur J Physiol* 455 (3), 467–477.
- Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L, 2005. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 25 (16), 6980–6989.
- Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Storch U, Lauterbach B, Essin K, Obst M, Gross V, Gollasch M, Birnbaumer L, Gudermann T, 2004. TRPC6 deficient mice develop an elevated blood pressure and an early onset of the myogenic tone in cerebral arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369 (Suppl 1), R61.
- Engelke M, Friedrich O, Budde P, Schäfer C, Niemann U, Zitt C, Jüngling E, Rocks O, Lückhoff A, Frey J, 2002. Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1 β . *FEBS Lett* 523 (1-3), 193–199.
- Faber ES, Sedlak P, Vidovic M, Sah P, 2006. Synaptic activation of transient receptor potential channels by metabotropic glutamate receptors in the lateral amygdala. *Neuroscience* 137 (3), 781–794.
- Fahlbusch M, 2008. Analyse der Funktion des TRPC1-Proteins durch Charakterisierung eines TRPC1-defizienten Mausmodells. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Fraser DD, MacVicar BA, 1996. Cholinergic-dependent plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 16 (13), 4113–4128.

- Freichel M, Philipp S, Cavalie A, Flockerzi V, 2004. TRPC4 and TRPC4-deficient mice. *Novartis Found Symp* 258, 189–199.
- 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^{2+} current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* 3 (2), 121–127.
- Freichel M, Vennekens R, Olausson J, Stolz S, Philipp SE, Weissgerber P, Flockerzi V, 2005. Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *J Physiol* 567 (Pt 1), 59–66.
- Fuller L, Dailey ME, 2007. Preparation of rodent hippocampal slice cultures. *Cold Spring Harb Protoc*, <http://cshprotocols.cshlp.org>.
- Gee CE, Benquet P, Gerber U, 2003. Group I metabotropic glutamate receptors activate a calcium-sensitive transient receptor potential-like conductance in rat hippocampus. *J Physiol* 546 (Pt 3), 655–664.
- Gibb R, Kolb B, 1998. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods* 79 (1), 1–4.
- Goel M, Sinkins WG, Schilling WP, 2002. Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 277 (50), 48303–48310.
- Gogolla N, Galimberti I, DePaola V, Caroni P, 2006. Preparation of organotypic hippocampal slice cultures for long-term live imaging. *Nat Protoc* 1 (3), 1165–1171.
- Golovina VA, 2005. Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes. Close proximity to the endoplasmic reticulum. *J Physiol* 564 (Pt 3), 737–749.
- Golovina VA, Platoshyn O, Bailey CL, Wang J, Limsuwan A, Sweeney M, Rubin LJ, Yuan JX, 2001. Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca^{2+} entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (2), H746–H755.
- Gomez TM, 2005. Channels for pathfinding. *Nature* 434 (7035), 835–838.
- Gomez TM, Zheng JQ, 2006. The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nat Rev Neurosci* 7 (2), 115–125.
- Greka A, Navarro B, Oancea E, Duggan A, Clapham DE, 2003. TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat Neurosci* 6 (8), 837–845.

- Guérineau NC, Bossu J-L, Gähwiler BH, Gerber U, 1995. Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *J Neurosci* 15 (6), 4395–4407.
- Haj-Dahmane S, Andrade R, 1996. Muscarinic activation of a voltage-dependent cation non-selective current in rat association cortex. *J Neurosci* 16 (12), 3848–3861.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ, 1981. Improved patch-clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch: Eur J Physiol* 391 (2), 85–100.
- Hardie RC, 2003. Regulation of TRP channels *via* lipid second messengers. *Annu Rev Physiol* 65, 735–759.
- Harteneck C, Gollasch M, 2010. Pharmacological modulation of diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 channels. *Curr Pharm Biotechnol*, in press.
- Harteneck C, Plant TD, Schultz G, 2000. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci* 23 (4), 159–166.
- Hartmann J, Dragicevic E, Adelsberger H, Henning HA, Sumser M, Abramowitz J, Blum R, Dietrich A, Freichel M, Flockerzi V, Birnbaumer L, Konnerth A, 2008. TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron* 59 (3), 392–398.
- HEKAManual, 2008. EPC10 Patch Clamp Amplifier. Manual 2.3, <http://www.heka.com>.
- Hetzl A, 2008. Elektrophysiologische und molekularbiologische Charakterisierung der Dopamin-Autorezeptorantwort individueller dopaminerger Mittelhirnneurone der Maus (*Mus musculus L.*) unter Kontrollbedingungen und nach einmaliger *in vivo* Injektion von Kokain. Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R, 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10 (4), 413–417.
- Hoehn K, Watson TWJ, MacVicar BA, 1993. A novel tetrodotoxin-insensitive, slow sodium current in striatal and hippocampal neurons. *Neuron* 10 (3), 543–552.
- 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 (6716), 259–263.

- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T, 2000. Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2. *Biochem J* 351 (Pt 1), 115–122.
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T, 2002. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (11), 7461–7466.
- Hui H, McHugh D, Hannan M, Zeng F, Xu S-Z, Khan S-ul-H, Levenson R, Beech DJ, Weiss JL, 2006. Calcium-sensing mechanism in TRPC5 channels contributing to retardation of neurite outgrowth. *J Physiol* 572 (Pt 1), 165–172.
- Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y, 2001. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular α 1-adrenoceptor-activated Ca^{2+} -permeable cation channel. *Circ Res* 88 (3), 325–332.
- Ishizuka N, Cowan WM, Amakal DG, 1995. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 362 (1), 17–45.
- Jia Y, Zhou J, Tai Y, Wang Y, 2007. TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat Neurosci* 10 (5), 559–567.
- Jung S, Mühle A, Schaefer M, Strotmann R, Schultz G, Plant TD, 2003. Lanthanides potentiate TRPC5 currents by action at extracellular sites close to the pore mouth. *J Biol Chem* 278 (6), 3562–3571.
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM, 2001. Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by eggZP3. *Nat Cell Biol* 3 (5), 499–502.
- Kim JY, Zeng W, Kiselyov K, Yuan JP, Dehoff MH, Mikoshiba K, Worley PF, Muallem S, 2006. Homer 1 mediates store- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent translocation and retrieval of TRPC3 to the plasma membrane. *J Biol Chem* 281 (43), 32540–32549.
- Kim SJ, Kim YS, Yuan JP, Petrali RS, Worley PF, Linden DJ, 2003. Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* 426 (6964), 285–291.
- Kiselyov K, Kim JY, Zeng W, Muallem S, 2005. Protein-protein interaction and function-TRPC channels. *Pflugers Arch: Eur J Physiol* 451 (1), 116–124.
- Kiselyov K, van Rossum DB, Patterson RL, 2010. TRPC channels in pheromone sensing. *Vitam Horm* 83, 197–213.

- Konieczny V, 2010. Die Bedeutung einer negativen Ladung in der Porenregion von TRPC3 für die Permeationseigenschaften dieses Ionenkanals. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Krause M, Offermanns S, Stocker M, Pedarzani P, 2002. Functional specificity of $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ in the cholinergic and glutamatergic modulation of potassium currents and excitability in hippocampal neurons. *J Neurosci* 22 (3), 666–673.
- Krnjevic K., Pumain R, Renaud L, 1971. The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex. *J Physiol* 215 (1), 247–268.
- Kuzmiski JB, MacVicar BA, 2001. Cyclic nucleotide-gated channels contribute to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 21 (22), 8707–8714.
- Kwan HY, Huang Y, Yao X, 2004. Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (8), 2625–2630.
- Lacinová L, 2005. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 (Suppl 1), 1–78.
- Lee AC, Wong RK, Chuang SC, Shin HS, Bianchi R, 2002. Role of synaptic metabotropic glutamate receptors in epileptiform discharges in hippocampal slices. *J Neurophysiol* 88 (4), 1625–1633.
- Leypold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R, 2002. Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (9), 6376–6381.
- Li HS, Xu XZ, Montell C, 1999. Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* 24 (1), 261–273.
- Li L, 2003. The biochemistry and physiology of metallic fluoride. Action, mechanism, and implications. *Crit Rev Oral Biol Med* 14 (2), 100–114.
- Li Y, Jia YC, Cui K, Li N, Zheng ZY, Wang YZ, Yuan XB, 2005. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 434 (7035), 894–898.
- Lintschinger B, Balzer-Geldsetzer M, Baskaran T, Graier WF, Romanin C, Zhui MX, Groschner K, 2000. Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca^{2+} -sensitive cation channels. *J Biol Chem* 275 (36), 27799–27805.

- Lipski J, Park TIH, Li D, Lee SCW, Trevarton AJ, Chung KKH, Freestone PS, Bai J-Z, 2006. Involvement of TRP-like channels in the acute ischemic response of hippocampal CA1 neurons in brain slices. *Brain Res* 1077 (1), 187–199.
- Liu X, Cheng KT, Bandyopadhyay BC, Pani B, Dietrich A, Paria BC, Swaim WD, Beech DJ, Yildirim E, Singh BB, Birnbaumer L, Ambudkar IS, 2007. Attenuation of store-operated Ca^{2+} current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (44), 17542–17547.
- Lockwich TP, Liu X, Singh BB, Jadowiec J, Weiland S, Ambudkar IS, 2000. Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J Biol Chem* 275 (16), 11934–11942.
- 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 (3), 551–561.
- Lussier MP, Lepage PK, Bousquet SM, Boulay G, 2008. RNF24, a new TRPC interacting protein, causes the intracellular retention of TRPC. *Cell Calcium* 43 (5), 432–443.
- Madison DV, Lancaster B, Nicoll RA, 1987. Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. *J Neurosci* 7 (3), 733–741.
- Malarkey EB, Ni Y, Parpura V, 2008. Ca^{2+} entry through TRPC1 channels contributes to intracellular Ca^{2+} dynamics and consequent glutamate release from rat astrocytes. *Glia* 56 (8), 821–835.
- Maric D, Maric I, Barker JL, 2000. Developmental changes in cell calcium homeostasis during neurogenesis of the embryonic rat cerebral cortex. *Cereb Cortex* 10 (6), 561–573.
- Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP, 2005. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 7 (2), 179–185.
- McCormick DA, Prince DA, 1985. Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 (18), 6344–6348.
- Mederos y Schnitzler M, Storch U, Dietrich A, Gudermann T, 2004. Increased currents in isolated smooth muscle cells of TRPC6-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369 (Suppl 1), R62.
- Meli E, Picca R, Attucci S, Cozzi A, Peruginelli F, Moroni F, Pellegrini-Giampietro DE, 2002. Activation of mGlu1 but not mGlu5 metabotropic glutamate receptors contributes

- to postischemic neuronal injury *in vitro* and *in vivo*. *Pharmacol Biochem Behav* 73 (2), 439–446.
- Merlin LR, Wong RKS, 1997. Role of group I metabotropic glutamate receptors in the patterning of epileptiform activities *in vitro*. *J Neurophysiol* 78, 539–544.
- Mery L, Strauss B, Dufour JF, Krause KH, Hoth M, 2002. The PDZ-interacting domain of TRPC4 controls its localization and surface expression in HEK293 cells. *J Cell Sci* 115 (Pt 17), 3497–3508.
- Miller BA, 2006. The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J Membr Biol* 209 (1), 31–41.
- Min M-Y, Shih P-Y, Wu Y-W, Lu H-W, Lee M-L, Yang H-W, 2009. Neurokinin 1 receptor activates transient receptor potential-like currents in noradrenergic A7 neurons in rats. *Mol Cell Neurosci* 42 (1), 56–65.
- Minke B, 2006. TRP channels and Ca²⁺ signaling. *Cell Calcium* 40 (3), 261–275.
- Minke B, Cook B, 2002. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 82 (2), 429–472.
- Minke B, Selinger Z, 1996. The roles of trp and calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* 6 (4), 459–466.
- Mülhardt C, 2006. Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Müller H-J, 2001. PCR - Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Mody M, Cao Y, Cui Z, Tay K-Y, Shyong A, Shimizu E, Pham K, Schultz P, Welsh D, Tsien JZ, 2001. Genome-wide gene expression profiles of the developing mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (15), 8862–8867.
- Montell C, 2005. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005 (272), re3.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108 (5), 595–598.
- Mori Y, Takada N, Okada T, Wakamori M, Imoto K, Wanifuchi H, Oka H, Oba A, Ikenaka K, Kurosaki T, 1998. Differential distribution of TRP Ca²⁺ channel isoforms in mouse brain. *Neuroreport* 9 (3), 507–515.

- Munsch T, Freichel M, Flockerzi V, Pape HC, 2003. Contribution of transient receptor potential channels to the control of GABA release from dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (26), 16065–16070.
- Nakamura F, Ugajin K, Yamashita N, Okada T, Uchida Y, Tangiguchi M, Ohshima T, Goshima Y, 2009. Increased proximal bifurcation of CA1 pyramidal apical dendrites in Sema3A mutant mice. *J Comp Neurol* 516 (5), 360–375.
- Neher E, Sakmann B, 1976. Single-channel current recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260 (5554), 799–802.
- Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V, 2003. Voltage dependence of the Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 278 (33), 30813–30820.
- Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T, 2005. Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* 567 (Pt 1), 35–44.
- Numberger M, Draguhn A, 1996. Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Obukhov AG, Nowycky MC, 2005. A cytosolic residue mediates Mg^{2+} block and regulates inward current amplitude of a transient receptor potential channel. *J Neurosci* 25 (5), 1234–1239.
- Obukhov AG, Nowycky MC, 2008. TRPC5 channels undergo changes in gating properties during the activation-deactivation cycle. *J Cell Physiol* 216 (1), 162–171.
- Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Takahashi Y, Iino K, Kuromitsu S, Mori Y, Ono K, Iijima T, Ito H, 2007. Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 42 (3), 498–507.
- Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka, Imoto K, Mori Y, 1999. Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca^{2+} -permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 274 (39), 27359–27370.
- Okada T, Shimizu S, Wakamori M, Maeda A, Kurosaki T, Takada N, Imoto K, Mori Y, 1998. Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca^{2+} channel from mouse brain. *J Biol Chem* 273 (17), 10279–10287.

- Ordaz B, Tang J, Xiao R, Salgado A, Sampieri A, Zhu MX, Vaca L, 2005. Calmodulin and calcium interplay in the modulation of TRPC5 channel activity. Identification of a novel C-terminal domain for calcium/calmodulin-mediated facilitation. *J Biol Chem* 280 (35), 30788–30796.
- Otsuguro K, Tang J, Tang Y, Xiao R, Freichel M, Tsvilovskyy V, Ito S, Flockerzi V, Zhu MX, Zholos AV, 2008. Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 283 (15), 10026–10036.
- Otsuka Y, Sakagami H, Owada Y, Kondo H, 1998. Differential localization of mRNAs for mammalian trps, presumptive capacitance calcium entry channels, in the adult mouse brain. *Tohoku J Exp Med* 185 (2), 139–146.
- Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B, 2006. Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68, 685–717.
- Paxinos G, Franklin KBJ, 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd Edition. Academic Press.
- Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B, 2005. TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 38 (3-4), 233–252.
- Pellegrini-Giampietro DE, 2003. The distinct role of mGlu₁ receptors in post-ischemic neuronal death. *Trends Pharmacol Sci* 24 (9), 461–470.
- Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L, Schroth G, Freichel M, Murakami M, Cavalié A, Flockerzi V, 1998. A novel capacitance calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* 17 (15), 4274–4282.
- Phillis JW, 1974. The role of calcium in the central effects of biogenic amines. *Life Sci* 14 (7), 1189–1201.
- Pla AF, Maric D, Brazer SC, Giacobini P, Liu X, Chang YH, Ambudkar IS, Barker JL, 2005. Canonical transient receptor potential 1 plays a role in basic fibroblast growth factor (bFGF)/FGF receptor-1-induced Ca²⁺ entry and embryonic rat neural stem cell proliferation. *J Neurosci* 25 (10), 2687–2701.
- Plant TD, Schaefer M, 2003. TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca²⁺-permeable nonselective cation channels. *Cell Calcium* 33 (5-6), 441–450.
- Plant TD, Schaefer M, 2005. Receptor-operated cation channels formed by TRPC4 and TRPC5. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 371 (4), 266–276.

- Poolos N, Jones T, 2004. In: Current Protocols in Neuroscience. John Wiley and Sons, Inc., Kapitel: Patch-clamp recording from neuronal dendrites, S. 1–13.
- Pozzo Miller LD, Petrozzino JJ, Connor JA, 1995. G protein-coupled receptors mediate a fast excitatory postsynaptic current in CA3 pyramidal neurons in hippocampal slices. *J Neurosci* 15 (12), 8320–8330.
- Premkumar LS, Ahern GP, 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408, 985–990.
- Putney Jr. JW, 2004. The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels. *Trends Cell Biol* 14 (6), 282–286.
- Raghu P, Hardie RC, 2009. Regulation of *Drosophila* TRPC channels by lipid messengers. *Cell Calcium* 45 (6), 566–573.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE, 2006. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68, 619–647.
- Riccio A, Li Y, Moon J, Kim K-S, Smith KS, Rudolph U, Gapon S, Yao GL, Tsvetkov E, Rodig SJ, Vant Veer A, Meloni EG, Carlezon Jr. WA, Bolshakov VY, Clapham DE, 2009. Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. *Cell* 137 (4), 761–772.
- Riccio A, Medhurst AD, Mattei C, Kelsell RE, Calver AR, Randall AD, Benham CD, Pangalos MN, 2002. mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 109 (1-2), 95–104.
- Rinke I, Artmann J, Stein V, 2010. CIC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *J Neurosci* 30 (13), 4776–4786.
- Rutecki PA, Sayin U, Yang Y, Hadar E, 2002. Determinants of ictal epileptiform patterns in the hippocampal slice. *Epilepsia* 43 (Suppl 5), 179–183.
- Sacaan AI, Schoepp DD, 1992. Activation of hippocampal metabotropic excitatory amino acid receptors leads to seizures and neuronal damage. *Neurosci Lett* 139 (1), 77–82.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Arnheim N, 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732), 1350–1354.

- Sakmann B, Neher E, 1984. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* 46, 455–472.
- Salido GM, Sage SO, Rosado JA, 2009. TRPC channels and store-operated Ca^{2+} entry. *Biochim Biophys Acta* 1793 (2), 223–230.
- Salonikidis P, 2007. Skript zum biophysikalischen Praktikum (Das Patch-Clamp-Verfahren). Physikalisches Institut, Universität Göttingen.
- Satoh S, Tanaka H, Ueda Y, Oyama J, Sugano M, Sumimoto H, Mori Y, Makino N, 2007. Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca^{2+} channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis. *Mol Cell Biochem* 294 (1-2), 205–215.
- Scartabelli T, Gerace E, Landucci E, Moroni F, Pellegrini-Giampietro DE, 2008. Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K-Akt signaling pathway: A novel postconditioning strategy? *Neuropharmacology* 55 (4), 509–516.
- Schaefer M, Plant TD, Obukhov AG, Hofmann T, Gudermann T, Schultz G, 2000. Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* 275 (23), 17517–17526.
- Schaefer M, Plant TD, Stresow N, Albrecht N, Schultz G, 2002. Functional differences between TRPC4 splice variants. *J Biol Chem* 277 (5), 3752–3759.
- Schilling WP, Goel M, 2004. Mammalian TRPC channel subunit assembly. *Novartis Found Symp* 258, 18–30.
- Selvaraj S, Sun Y, Singh BB, 2010. TRPC channels and their implications for neurological diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9 (1), 94–104.
- Semtner M, 2010. Elektrophysiologische Charakterisierung des klassischen TRP-Kanals TRPC5. Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Semtner M, Schaefer M, Pinkenburg O, Plant TD, 2007. Potentiation of TRPC5 by protons. *J Biol Chem* 282 (46), 33868–33878.
- Shankaranarayana Rao BS, Raju TR, 2004. In: Brain and Behavior. Kapitel: The golgi techniques for staining neurons, S. 108–111.

- Shi J, Ju M, Saleh SN, Albert AP, Large WA, 2010. TRPC6 channels stimulated by angiotensin II are inhibited by TRPC1/C5 channel activity through a Ca^{2+} - and PKC-dependent mechanism in native vascular myocytes. *J Physiol* 588 (Pt 19), 3671–3682.
- Shi J, Mori E, Mori Y, Mori M, Li J, Ito Y, Inoue R, 2004. Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol* 561 (Pt 2), 415–432.
- Shim S, Goh EL, Ge S, Sailor K, Yuan JP, Roderick HL, Bootman MD, Worley PF, Song H, Ming GL, 2005. XTRPC1-dependent chemotropic guidance of neuronal growth cones. *Nat Neurosci* 8 (6), 730–735.
- Sigworth FJ, 1983. In: Single-Channel Recording. New York: Plenum Press, Kapitel: Electronic design of the patch clamp, S. 3–35.
- Singh BB, Liu X, Tang J, Zhu MX, Ambudkar IS, 2002. Calmodulin regulates Ca^{2+} -dependent feedback inhibition of store-operated Ca^{2+} influx by interaction with a site in the C terminus of TrpC1. *Mol Cell* 9 (4), 739–750.
- Singh BB, Lockwich TP, Bandyopadhyay BC, Liu X, Bollimuntha S, Brazer SC, Combs C, Das S, Leenders AG, Sheng ZH, Knepper MA, Ambudkar SV, Ambudkar IS, 2004. VAMP2-dependent exocytosis regulates plasma membrane insertion of TRPC3 channels and contributes to agonist-stimulated Ca^{2+} influx. *Mol Cell* 15 (4), 635–646.
- Singh BB, Zheng C, Liu X, Lockwich T, Liao D, Zhu MX, Birnbaumer L, Ambudkar IS, 2001. Trp1-dependent enhancement of salivary gland fluid secretion: role of store-operated calcium entry. *FASEB J* 15 (9), 1652–1654.
- Soboloff J, Spassova M, Hewavitharana T, He LP, Luncsford P, Xu W, Venkatachalam K, van Rossum D, Patterson RL, Gill DL, 2007. In: Handbook of Experimental Pharmacology: Transient Receptor Potential (TRP) Channels. Vol. 179. Springer Verlag, Berlin, Kapitel: TRPC channels: integrators of multiple cellular signals, S. 575–591.
- Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G, 2002. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295 (5559), 1493–1500.
- Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE, 2001. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29 (3), 645–655.
- Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE, 2003. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* 278 (40), 39014–39019.

- Strunecká A, Strunecký O, Patocka J, 2002. Fluoride plus aluminum: Useful tools in laboratory investigations, but messengers of false information. *Physiol Rev* 51 (6), 557–564.
- Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B, 1993. Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch: Eur J Physiol* 423 (5-6), 511–518.
- Sweeney M, Yu Y, Platoshyn O, Zhang S, McDaniel SS, Yuan JX, 2002. Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca^{2+} entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283 (1), L144–L155.
- Tai C, Hines DJ, Choi HB, MacVicar BA, 2010. Plasma membrane insertion of TRPC5 channels contributes to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus*, in press.
- Tai Y, Feng S, Du W, Wang Y, 2009. Functional roles of TRPC channels in the developing brain. *Pflugers Arch: Eur J Physiol* 458 (2), 283–289.
- Talavera K, Nilius B, 2006. Biophysics and structure-function relationship of T-type Ca^{2+} channels. *Cell Calcium* 40 (2), 97–114.
- Talavera K, Nilius B, Voets T, 2008. Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends Neurosci* 31 (6), 287–294.
- Tempia F, Alojado ME, Strata P, Knöpfel T, 2001. Characterization of the mGluR(1)-mediated electrical and calcium signaling in Purkinje cells of mouse cerebellar slices. *J Neurophysiol* 86 (3), 1389–1397.
- Tiruppathi C, Freichel M, Vogel SM, Paria BC, Mehta D, Flockerzi V, Malik AB, 2002. Impairment of store-operated Ca^{2+} entry in TRPC4^{-/-} mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ Res* 91 (1), 70–76.
- Tozzi A, Bengtson CP, Longone P, Carignani C, Fusco FR, Bernardi G, Mercuri NB, 2003. Involvement of transient receptor potential-like channels in responses to mGluR-I activation in midbrain dopamine neurons. *Eur J Neurosci* 18 (8), 2133–2145.
- Trebak M, Bird GStJ, McKay RR, Birnbaumer L, Putney Jr. JW, 2003. Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels. *J Biol Chem* 278 (18), 16244–16252.

- Trebak M, Hempel N, Wedel BJ, Smyth JT, Bird GS, Putney Jr. JW, 2005. Negative regulation of TRPC3 channels by protein kinase C-mediated phosphorylation of serine 712. *Mol Pharmacol* 67 (2), 558–563.
- Vaca L, 2010. SOCIC: The store-operated calcium influx complex. *Cell Calcium* 47 (3), 199–209.
- van Rossum DB, Patterson RL, Sharma S, Barrow RK, Kornberg M, Gill DL, Snyder SH, 2005. Phospholipase C γ 1 controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain. *Nature* 434 (7029), 99–104.
- 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 Ca²⁺ entry channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (5), 2060–2064.
- Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney Jr. JW, 2004. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta* 1742 (1-3), 21–36.
- Venkatachalam K, Montell C, 2007. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76, 387–417.
- Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL, 2003. Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* 278 (31), 29031–29040.
- Viard P, Butcher AJ, Halet G, Davies A, Nürnberg B, Hebllich F, Dolphin AC, 2004. PI₃K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat Neurosci* 7, 939–946.
- Villereal ML, 2006. Mechanism and functional significance of TRPC channel multimerization. *Semin Cell Dev Biol* 17 (6), 618–629.
- Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B, 2004. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430 (7001), 748–754.
- Wang GX, Poo M-M, 2005. Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature* 434 (7035), 898–904.
- Wedel BJ, Vazquez G, McKay RR, Bird GS, Putney Jr. JW, 2003. A calmodulin/inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/IP₃ receptor-independent process. *J Biol Chem* 278 (28), 25758–25765.

- Wen Z, Zheng JQ, 2006. Directional guidance of nerve growth cones. *Curr Opin Neurobiol* 16 (1), 52–58.
- 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 USA* 92 (21), 9652–9656.
- Wissenbach U, Schroth G, Philipp S, Flockerzi V, 1998. Structure and mRNA expression of a bovine trp homologue related to mammalian trp2 transcripts. *FEBS Lett* 429 (1), 61–66.
- Wu G, Lu Z-H, Obukhov AG, Nowycky MC, Ledeen RW, 2007. Induction of calcium influx through TRPC5 channels by cross-linking of GM1 ganglioside associated with $\alpha 5\beta 1$ integrin initiates neurite outgrowth. *J Neurosci* 27 (28), 7447–7458.
- Wu L-J, Sweet T-B, Clapham DE, 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* 62 (3), 381–404.
- Wu X, Zagranichnaya TK, Gurda GT, Eves EM, Villereal MLs, 2004. A TRPC1/TRPC3-mediated increase in store-operated calcium entry is required for differentiation of H19-7 hippocampal neuronal cells. *J Biol Chem* 279 (42), 43392–43402.
- Xu SZ, Sukumar P, Zeng F, Li J, Jairaman A, English A, Naylor J, Ciurtin C, Majeed Y, Milligan CJ, Bahnasi YM, Al-Shawaf E, Porter KE, Jiang LH, Emery P, Sivaprasadarao A, Beech DJ, 2008. TRPC channel activation by extracellular thioredoxin. *Nature* 451 (7174), 69–72.
- Yaari Y, Jensen MS, 1989. In: Central cholinergic synaptic transmission. Basel: Birkhäuser, Kapitel: Cholinergic modulation of hippocampal epileptic activity *in vitro*, S. 150–158.
- Yan H-D, Villalobos C, Andrade R, 2009. TRPC channels mediate a muscarinic receptor-induced afterdepolarization in cerebral cortex. *J Neurosci* 29 (32), 10038–10046.
- Yao H, Peng F, Dhillon N, Callen S, Bokhari S, Stehno-Bittel L, Ahmad SO, Wang JQ, Buch S, 2009. Involvement of TRPC channels in CCL2-mediated neuroprotection against tat toxicity. *J Neurosci* 29 (6), 1657–1669.
- Yao X, Kwan H-Y, Huang Y, 2005. Regulation of TRP channels by phosphorylation. *Neurosignals* 14 (6), 273–280.

- Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y, 2006. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol* 2 (11), 596–607.
- Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX, 2004. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (38), 13861–13866.
- Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, Dehoff MH, Schwarz MK, Seeburg PH, Muallem S, Worley PF, 2003. Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP₃ receptors. *Cell* 114 (6), 777–789.
- Zechel S, Werner S, von Bohlen und Halbach O, 2007. Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain. *Cell Tissue Res* 328 (3), 651–656.
- Zhou J, Du W, Zhou K, Tai Y, Yao H, Jia Y, Ding Y, Wang Y, 2008. Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nat Neurosci* 11 (7), 741–743.
- 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 (3), 193–198.
- Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L, 1996. Trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* 85 (5), 661–671.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F, 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucl Acids Res* 32 (12), e103.
- Zitt C, Zobel A, Obukhov AG, Harteneck C, Kalkbrenner F, Lückhoff A, Schultz G, 1996. Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* 16 (6), 1189–1196.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Frauke Kepura
 Geburtsdatum/-ort: 30.10.1979 in Marburg
 Familienstand: ledig

Schulausbildung und wissenschaftlicher Werdegang:

1986 - 1990 Grundschole Bürgeln
 1990 - 1999 Gymnasium, Martin-Luther-Schule, Marburg; Abitur (Note: 2,0)
 1999 - 2005 Studium der Biologie, Philipps-Universität Marburg
 10/2001 Vordiplom (Note: 1,4)
 03/2002 - 09/2002 studienbezogene Praktika (Tierpark Görlitz, Zoo Leipzig)
 10/2002 - 09/2004 Wiederaufnahme des Studiums in Marburg
 10/2004 - 09/2005 Diplomarbeit am FB Biologie bei Prof. Dr. J. Schachtner (Neurobiologie/Ethologie)
 Titel der Diplomarbeit: „*In vivo*-Imaging am sich entwickelnden Antennallobus des Tabakschwärmers *Manduca sexta*.“
 10/2005 Erlangung des Diploms (Note: 1,0)
 10/2005 - 04/2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin, FB Biologie bei Prof. Dr. J. Schachtner (Neurobiologie/Ethologie)
 05/2006 - 06/2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin, FB Medizin bei Prof. Dr. B. Liss (Molekulare Neurobiologie)
 Seit 06/2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin, FB Medizin bei Prof. Dr. T. D. Plant (Pharmakologisches Institut)
 Thema der Promotion: „Die Rolle von TRPC1 in CA1-Neuronen des murinen Hippocampus“
 02/2011 Abschluss der Promotion (Note: 1,0)

Veröffentlichungen

Originalartikel:

Plant TD, Zöllner C, *Kepura F*, Moussa SS, Eichhorst J, Schaefer M, Furkert J, Stein C, Ok-sche A, 2007. Endothelin potentiates TRPV1 via ET_A receptor-mediated activation of protein kinase C. *Molecular Pain* 3:35

Strotmann R, Semtner M, *Kepura F*, Plant TD, Schöneberg T, 2010. Interdomain interactions control Ca²⁺-dependent potentiation in the cation channel TRPV4. *PLoS One* 5 (5): e10580

Dolga A, Terpolilli N, *Kepura F*, Nijholt I, Knaus HG, Eisel U, Plant TD, Plesnila N, Culmsee C, 2010. Pharmacological K_{Ca}2 channel activation attenuates glutamate-induced delayed [Ca²⁺]_i deregulation and exerts neuroprotection *in vitro* and *in vivo*. Manuskript eingereicht

Kepura F, Dietrich A, Braun E, Plant TD, 2010. A receptor-operated, voltage-dependent cation current is increased in CA1 neurons from mice lacking TRPC1. Manuskript in Vorbereitung

Kongressbeiträge (Vorträge und Poster):

Kepura F, Schneider N, Lohr C, Schachtner J, 2005. Ca²⁺ signals in developing antennal lobe neurons of the sphinx moth *Manduca sexta*. 98. DZG Tagung Bayreuth. #7_Po_07

Kepura F, Schachtner J, 2006. Acetylcholin und NO/cGMP während der Glomerulibildung im Antennallobus von *Manduca sexta*. 5. Rauschholzhausen Seminar: Entwicklung und Plastizität des Insektennervensystems

Breit A, Damm E, *Kepura F*, Plant TD, Gudermann T, 2009. Regulation of TRPV1 activity by sensory neuron-specific G protein-coupled receptors (SNSR). Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz

Dolga A, *Kepura F*, Nijholt I, Eisel U, Plant TD, Plesnila N, Culmsee C, 2009. Activation of small conductance K_{Ca}2 channels provides neuroprotection against glutamate toxicity *in vitro* and cerebral ischemia *in vivo*. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Jena

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die Rolle von TRPC1 in CA1-Neuronen des murinen Hippocampus“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung



Obwohl ich im Laufe meiner Promotion oftmals den roten Faden  verloren, vor Wut getobt habe und manchmal vor Niedergeschlagenheit Aufmunterung bedurfte, habt ihr mich nie alleine gelassen. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle vielmals bedanken!



Als erstes möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Tim Plant für die Überlassung des Themas bedanken. Weiterhin verdient er meinen Dank für die Zeit und Mühe, die er dieser Arbeit gewidmet hat, für die Diskussionen, die Geduld und die mit schwarzem Humor angehauchten Worte, die er stets parat hatte.

Bei Prof. Dr. Alexander Dietrich (mittlerweile umgezogen in das Walther-Straub-Institut für Pharmakologie der LMU München) möchte ich mich für die Bereitstellung der TRPC1^{-/-}-Maus und für die fruchtbaren Diskussionen rund um die PCR bedanken.

Prof. Dr. Uwe Homberg gilt mein Dank, da er es mir ermöglichte - auch auf Umwegen - unter seiner Schirmherrschaft meine Promotion anzufertigen. Prof. Dr. Roland Brandl und Prof. Dr. Joachim Schachtner danke ich, da sie die Aufgabe der Prüfer übernommen haben.



Des Weiteren möchte ich mich an dieser Stelle bei Eva Braun bedanken, die mich nicht nur in allen molekularbiologischen Belangen tatkräftig unterstützt hat. Ohne Deine Hilfe wäre die Anfertigung dieser Arbeit sehr viel holpriger und langwieriger geworden. Die technische Unterstützung und Betreuung durch die gesamte Werkstattbesetzung des Fachbereichs Medizin unter Hermann Schön, Walter Vollmer und Michael Koch, die mir immer

mit Rat und Tat zur Seite standen, ist unersetzlich. Mein besonderer Dank gilt auch den Tierpflegern Armin Demant und Gotthard Reich, die sich immer mit Hingabe um das Wohl meiner Mäuse gekümmert und mir bei Unsicherheiten stets weitergeholfen haben.



Dem gesamten Team des Pharmakologischen Instituts insbesondere der Arbeitsgruppe Plant und den vielen Ehemaligen möchte ich für das tolle Arbeitsklima danken. Ein schlichtes Danke, insbesondere an Eva Braun, Tanja Pfeffer-Eckel, Max Philipp, Vera Konieczny, Marcus Semtner, Heike Borth, Ellen Damm, Sabrina Höbel (genau so habe ich mir eine Büronachbarin im-

mer vorgestellt) und unglaublich viele mehr, ist nicht ausreichend: vielen lieben Dank für das stets offene Ohr, die vielen langen und fruchtbaren Gespräche und Diskussionen, bei denen mir oft ganze Kronleuchter aufgingen, die aufbauenden Worte und Eure Geduld mit mir!



Ein riesiges Dankeschön gilt auch den Menschen, die mit einer großen, scheinbar unerschöpflichen Portion Geduld, der nötigen Gelassenheit und immer wieder aufblühendem Enthusiasmus mein „Werk“ korrigiert und überarbeitet haben: Tim Plant, Dorle Kepura und Thomas Hofmann.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, insbesondere meiner Mama, Dorle Kepura: Vielen Dank für Eure Unterstützung, Motivation, ununterbrochene Hilfe und Euren Glauben an mich.



An dieser Stelle sollen endlich vier Menschen Erwähnung finden, ohne die ich nicht vollständig wäre: Barbara Lechner, Karina Kunz, Miriam Kreiling - es ist gut zu wissen, dass Ihr immer für mich da seid! Und schlussendlich, Oliver Karl: Vielen Dank für Dein unerschütterliches Vertrauen in mich!

Und Ihr werdet es kaum glauben, aber sie hat es geschafft , mit Eurer Hilfe:

Vielen Dank!

A. Anhang

A.1. Ergänzungen der Ergebnisse

A.1.1. Tabellarische Zusammenfassung der Effekte verschiedener La^{3+} -Konzentrationen

DHPG-Applikation in	Mittelwert \pm SEM	P in Bezug auf Basalwert
$I_{-60\text{mV}}$		
basal	-30,34 \pm 5,73 pA/pF, n = 6	
+10 μM La^{3+}	-17,43 \pm 1,86 pA/pF, n = 3	0,1715
+100 μM La^{3+}	-17,87 \pm 6,07 pA/pF, n = 5	0,1706
+1000 μM La^{3+}	-14,88 \pm 3,27 pA/pF, n = 4	0,0769
V_{rev}		
basal	-14,82 \pm 2,11 mV, n = 6	
+10 μM La^{3+}	-11,8 \pm 5,72 mV, n = 3	0,5537
+100 μM La^{3+}	-12,56 \pm 0,94 mV, n = 5	0,3863
+1000 μM La^{3+}	-9,4 \pm 1,41 mV, n = 4	0,0949

A.1.2. Tabellarische Zusammenfassung der hippocampalen TRPC-Expression

Isoform	WT	TRPC1^{-/-}	P
	Angabe in % der β -Aktinexpression		
P10 - P12			
TRPC1	8,42 \pm 1,08 %, n = 7	0,20 \pm 0,17 %, n = 5	***, < 0,0001
TRPC4	9,12 \pm 2,07 %, n = 7	25,36 \pm 14,29 %, n = 5	0,2090
TRPC5	11,48 \pm 1,18 %, n = 7	13,44 \pm 1,98 %, n = 5	0,3887
TRPC3	0,70 \pm 0,11 %, n = 7	1,74 \pm 0,74 %, n = 5	0,1277
TRPC6	0,64 \pm 0,14 %, n = 7	0,85 \pm 0,23 %, n = 5	0,4282
TRPC7	0,13 \pm 0,04 %, n = 7	0,00 \pm 0,00 %, n = 5	*, 0,0309
P14 - P26			
TRPC1	57,15 \pm 13,2 %, n = 12	0,00 \pm 0,00 %, n = 10	***, 0,0008
TRPC4	32,92 \pm 11,2 %, n = 13	27,11 \pm 6,65 %, n = 9	0,695
TRPC5	10,87 \pm 2,88 %, n = 11	13,19 \pm 4,48 %, n = 6	0,6545
TRPC3	1,91 \pm 0,61 %, n = 15	1,00 \pm 0,17 %, n = 7	0,3329
TRPC6	4,10 \pm 1,25 %, n = 10	3,16 \pm 0,79 %, n = 10	0,5351
TRPC7	0,23 \pm 0,05 %, n = 13	0,13 \pm 0,05 %, n = 7	0,2327
P33 - P35			
TRPC1	49,83 \pm 18,72 %, n = 6	0,00 \pm 0,00 %, n = 6	*, 0,0238
TRPC4	20,88 \pm 10,95 %, n = 6	3,62 \pm 0,71 %, n = 6	0,1468
TRPC5	18,69 \pm 10,51 %, n = 5	5,65 \pm 1,22 %, n = 6	0,2066
TRPC3	2,17 \pm 0,86 %, n = 6	0,23 \pm 0,05 %, n = 6	*, 0,0473
TRPC6	6,8 \pm 3,99 %, n = 6	1,06 \pm 0,20 %, n = 5	0,2252
TRPC7	0,06 \pm 0,04 %, n = 4	0,06 \pm 0,02 %, n = 6	0,9489

A.2. Lösungen

A.2.1. Lösungen für elektrophysiologische Experimente

A.2.1.1. Extrazelluläre Lösungen

1. **Saccharose-basierte Präparationslösung** nach Bischofberger *et al.* (2006): 87 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 25 mM D-Glucose, 75 mM Saccharose, 7 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, pH 7,4 mit 95 % O₂ + 5 % CO₂, 290 - 300 mOsm
2. **Aufbewahrungslösung** verändert nach Hetzel (2008) und Abrahamsson *et al.* (2008): 126 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,2 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-Glucose, 4 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1,3 mM Ascorbat, pH 7,4 mit 95 % O₂ + 5 % CO₂, 290 - 300 mOsm
3. **CsCl-basierte extrazelluläre Lösung, Carbogen-gepuffert**, für VC: 126 mM NaCl, 2,5 mM CsCl, 1,4 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-Glucose, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7,4 mit 95 % O₂ + 5 % CO₂, 290 - 300 mOsm

Variationen der CsCl-basierten extrazellulären Lösung:

- a) **CsCl-basierte extrazelluläre Lösung, Carbogen-gepuffert, [Ca²⁺]_e = 0 mM (nominell Ca²⁺-frei)**, für VC: 126 mM NaCl, 2,5 mM CsCl, 1,4 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-Glucose, 1 mM MgCl₂, **0 mM CaCl₂**, pH 7,4 mit 95 % O₂ + 5 % CO₂, 290 - 300 mOsm
 - b) **CsCl-basierte extrazelluläre Lösung, Carbogen-gepuffert, [Mg²⁺]_e = 0 mM**, für VC: 126 mM NaCl, 2,5 mM CsCl, 1,4 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-Glucose, **0 mM MgCl₂**, 2 mM CaCl₂, pH 7,4 mit 95 % O₂ + 5 % CO₂, 290 - 300 mOsm
 - c) **CsCl-basierte extrazelluläre Lösung, Carbogen-gepuffert, [Na⁺]_e = 26,4 mM**, für VC: **126 mM Cholin-Cl**, 2,5 mM CsCl, 1,4 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-Glucose, 1,2 mM MgCl₂, 2,4 mM CaCl₂, pH 7,4 mit 95 % O₂ + 5 % CO₂, 290 - 300 mOsm
4. **KCl-basierte extrazelluläre Lösung, Carbogen-gepuffert**, für CC, nach Hetzel (2008): 126 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,4 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-Glucose, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7,4 mit 95 % O₂ + 5 % CO₂, 290 - 300 mOsm
 5. **CsCl-basierte extrazelluläre Lösung, HEPES-gepuffert**, für VC, nach Semtner *et al.* (2007): 140 mM NaCl, 5 mM CsCl, 10 mM HEPES, 10 mM D-Glucose, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7,4 mit NaOH, 290 - 300 mOsm
 6. **NMDG: Na⁺-, Ca²⁺-, Cs⁺-freie extrazelluläre Lösung, HEPES-gepuffert**, für VC, nach Strübing *et al.* (2001): 140 mM NMDG, 10 mM HEPES, 10 mM D-Glucose, 1 mM MgCl₂, pH 7,4 mit HCl, 290 - 300 mOsm

A.2.1.2. Intrazelluläre Lösungen

1. **CsMeSO₃-basierte Pipettenlösung**, für VC, nach Semtner *et al.* (2007): 110 mM CsMeSO₃, 25 mM CsCl, 30 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 0,362 mM CaCl₂, 1 mM EGTA, pH 7,2 mit CsOH, 290 - 300 mOsm, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} = 100 \text{ nM}$
2. **CsMeSO₃-basierte Pipettenlösung, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ variabel**, für VC, verändert nach Semtner *et al.* (2007): 110 mM CsMeSO₃, 25 mM CsCl, 30 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, pH 7,2 mit CsOH, 290 - 300 mOsm

0,1 mM EGTA mit 100 nM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ (Berechnung mit CaBuF):

- Stocks: 10 mM Ca²⁺-EGTA (pH 7,2 mit CsOH); 10 mM EGTA (pH 7,2 mit CsOH)
 - Verhältnis: 1,8 µl Ca²⁺-EGTA : 3,2 µl EGTA; in 495 µl Pipettenlösung
3. **K-Gluconat-basierte Pipettenlösung**, für CC, nach Hetzel (2008): 135 mM K-Gluconat, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, pH 7,33 mit KOH, 290 - 300 mOsm

A.2.2. Lösungen für molekularbiologische Experimente

1. **DEPC-Wasser, RNase-frei**, zur Aufbereitung von RNA: 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) in 1 l ddH₂O lösen, über Nacht rühren, bei 120 °C zur Inaktivierung des toxischen DEPC autoklavieren
2. **TEA-Puffer**: 40 mM Tris und 1 mM EDTA in ddH₂O , mit konzentrierter Essigsäure (etwa 40 mM) auf pH 8,3 einstellen
3. **Puffer B**: 25 mM EDTA und 75 mM NaCl in 100 ml ddH₂O lösen, mit NaOH auf pH 8,0 einstellen
4. **10 % SDS**: 10 g Natriumlaurylsulfat (SDS) in 100 ml ddH₂O lösen
5. **gesättigte NaCl-Lösung**: 35 g NaCl auf 100 ml ddH₂O
6. **2 %iges Agarosegel**: 1,6 g Agarose in 80 ml TEA-Puffer, mit Glasstab in Mikrowelle aufkochen bis Blasen zusammenfallen (Lösung ist jetzt klar), Gewichts Differenz mit ddH₂O auffüllen und abkühlen lassen, Zugabe 3 µl Ethidiumbromid

A.2.3. Lösungen für die Histochemie

1. **Fixativ**, nach Shankaranarayana Rao und Raju (2004): 5 g K-Dichromat, 5 g Chloralhydrat, 8 ml Glutaraldehyd, 6 ml Formaldehyd, 10 Tropfen Dimethylsulfoxid (DMSO) in 100 ml ddH₂O lösen, jeden zweiten Tag frisch ansetzen
2. **0,75 % Silbernitratlösung**, nach Shankaranarayana Rao und Raju (2004): 0,75 g Silbernitrat in 100 ml ddH₂O
3. **30 % Saccharoselösung**, nach Gibb und Kolb (1998): 30 g Saccharose in 100 ml ddH₂O
4. **6 % Saccharoselösung**, nach Gibb und Kolb (1998): 6 g Saccharose in 100 ml ddH₂O

A.3. Chemikalien

Substanz	Hersteller/Bezug
Agarose NEEO, ultra	Roth, D
Ascorbat, L-Ascorbic acid	Sigma-Aldrich, D
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, D
Carbogen (95 % O ₂ + 5 % CO ₂)	Aire Liquide, Düsseldorf, D
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, D
Cholin-Cl	Sigma-Aldrich, D
CsCl	Sigma-Aldrich, D
CsMeSO ₄ , Cs-Methansulfonat	Sigma-Aldrich, D
CsOH	Sigma-Aldrich, D
DEPC	Sigma-Aldrich, D
DMSO	Sigma, Taufkirchen, D
EDTA	Roth, D
EGTA	Sigma-Aldrich, D
Essigsäure	Roth, D
Ethidiumbromid, 1 %	Roth, D
Formaldehyd	Roth, D
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, D
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, D
HEPES	Sigma-Aldrich, D
KCl	Sigma-Aldrich, D
K-Dichromat	Sigma-Aldrich, D
K-D-Gluconat	Sigma-Aldrich, D
KOH	Sigma-Aldrich, D
MgCl ₂ Hexahydrat	Sigma-Aldrich, D
NaCl	Roth, D
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, D
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, D
NaOH	Sigma-Aldrich, D
NMDG-Cl	Sigma-Aldrich, D
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Roth, D
Silbernitrat	Merck, Hamburg, D
D(+)-Saccharose	Roth, D
Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, D

A.4. Primer

A.4.1. Primerpaare für quantitative real-time PCR

Gen	Forward- / Reverseprimer	Produktlänge (bp)
TRPC1	1921-for 5'-GCAACCTTTGCCCTCAAG-3' 2079-rev 5'-CTGCAGTGGGCCCAAATAGAG-3' (Dietrich <i>et al.</i> , 2007)	179
TRPC3	1451-for 5'-AGGCGCAGCAGTATGTGG-3' 1639-rev 5'-GGCCAAAGCTCTCGTTTGC-3' (Hartmann <i>et al.</i> , 2008)	207
TRPC4	1654-for 5'-CTCCGCCTAATCTCTCTGT-3' 1850-rev 5'-AAACGCGTTGTTCTGTTTCT-3' (Hartmann <i>et al.</i> , 2008)	216
TRPC5	2606-for 5'-ATGAGGGGCTAACAGAAGA-3' 2797-rev 5'-TGCAGCCTACATTGAAAGA-3' (Hartmann <i>et al.</i> , 2008)	210
TRPC6	565-for 5'-CAAGCCTGTCTATTGAGGAA-3' 755-rev 5'-CCCAACTCGAGACAAGTTT-3' (Hartmann <i>et al.</i> , 2008)	209
TRPC7	1668-for 5'-CCTACGCCAGGGATAAGTG-3' 1854-rev 5'-AAGGCCACAAATACCATGA-3' (Hartmann <i>et al.</i> , 2008)	205
β Aktin	420-for 5'-CCAACCGTGAAAAGATGACC-3' 505-rev 5'-GTGGTACGACCAGAGGCATAC-3' (Hartmann <i>et al.</i> , 2008)	106

A.4.2. Primerpaare zur Genotypisierung der Mäuse

Gen	Forward- / Reverseprimer	Produktlänge (bp)
TRPC1 ^{+/+}	for 5'-GGCAACCTTTGCCCTCAAAGTGGTGGC-3' rev 5'-AGTGAATATATATATATCAGACATAGATTT GGG-3' (Dietrich <i>et al.</i> , 2007)	150
TRPC1 ^{-/-}	for 5'-TCTATGGCTTCTGAGGCGGA-3' rev 5'-GCATTATTAATATCTGAGTCATTTTCTTATT GGCAAATGAGG-3' (Dietrich <i>et al.</i> , 2007)	180