

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

Charakterisierung und Funktion von TRPV2 Ionenkanälen in kortikalen Mikrogliazellen der Maus

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2021
(entsprechend dem Jahr der mündl. Prüf.)

vorgelegt von: Mahsa Malihpour
geb. am: 07.02.1988 im Iran

Tag der Promotion: 14. Oktober 2021

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

Erstgutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ulrich Wissenbach

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Frank Kirchhoff

Wissenschaftlicher Betreuer: Dr. rer. nat. Andreas Beck

Meiner Familie gewidmet

Ich erkenne hiermit die Beiträge der folgenden Kollegen an:

Stefanie Buchholz und Dr. Eva Schwarz: Hilfe bei der Klonierung von mTRPV2-pCAGGS-IRES-GFP, hTRPV2-pCAGGS-IRES-GFP und pCAGGS-IRES-GFP

Jun. Prof. Dr. Daniela Yildiz: Unterstützung bei der Durchflusszytometrie (Guava easyCyte 8HT)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	8
2	Einleitung	12
2.1	Nervensystem	12
2.2	Mikrogliazellen.....	12
2.3	Calcium.....	15
2.4	Ca ²⁺ Kanäle in Mikrogliazellen	16
2.5	TRP-Kanäle	17
2.6	TRPV-Kanäle	19
2.7	TRPV2.....	20
2.8	Zielsetzung der Arbeit	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Präparation und Kultivierung von murinen Mikrogliazellen	24
3.2	HEK293 und COS-7 Zellkulturen	25
3.3	HEK293 und COS-7 Transfektion	26
3.4	BV2-Zellen	26
3.5	Patch Clamp Technik.....	27
3.6	Fluorometrische Messung zytosolischer Ca ²⁺ Änderungen	29
3.7	Migrations-Assay.....	30
3.8	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in BV2 und Mikrogliazellen	31
3.9	Latex Beads Phagozytose Assay mit BV2-Zellen.....	32
3.9.1	Phagozytosemessung mittels Durchflusszytometrie in BV2-Zellen	33
3.9.2	Phagozytosemessung mittels Plate Reader in BV2-Zellen.....	35
3.10	pHrodo® Phagozytose Assay	35
3.11	Bestimmung der Zellviabilität von BV2-Zellen	36
3.12	Lösungen und pharmakologisch wirksame Substanzen	37
3.13	Auswertung, graphische Darstellung und Statistik.....	40
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Funktionelle Charakterisierung von TRPV2 in Mikrogliazellen	42
4.1.1	Mikroglia Stimulation mit möglichen TRPV2 Agonisten und Antagonisten	42
4.1.2	Stimulation der Mikrogliazellen mit IGF1	48
4.1.3	2-APB-induzierte TRPV2 Ströme in LPS-aktivierten Mikrogliazellen	50

Inhaltsverzeichnis

4.1.4	Stimulation der Mikroglia mit Endocannabinoiden	51
4.2	TRPV2 in BV2 Zellen, einer Modellzelllinie für Maus Mikroglia	57
4.3	Rolle von TRPV2 bei der Migration von Mikrogliazellen.....	60
4.3.1	Migration von BV2-Zellen in Ab- und Anwesenheit von TRPV2 Antagonisten	60
4.3.2	Migration von wildtyp und TRPV2 ^{-/-} Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus	62
4.4	Rolle von TRPV2 in der ROS-Produktion von Mikrogliazellen.....	63
4.5	Funktion von TRPV2 bei der Phagozytose in Mikrogliazellen.....	64
4.5.1	Untersuchung der Phagozytose in BV2-Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	64
4.5.2	Phagozytose von pHrodo® Red <i>E.coli</i> BioParticles® in BV2 und Mikrogliazellen ...	65
4.5.3	Untersuchung der Phagozytose von <i>Latex Beads</i> in BV2-Zellen mithilfe des Plate Readers	68
4.6	Effekt der verwendeten Pharmaka auf die Viabilität der BV2-Zellen	69
4.7	Pharmakologie von humanem TRPV2 exprimiert in HEK293 und COS-7 Zellen.....	71
4.7.1	TRPV2-Agonisten	71
4.7.2	TRPV2 Antagonisten.....	74
5	Diskussion.....	77
5.1	Pharmakologische und funktionelle Charakterisierung von TRPV2 in Mikrogliazellen	78
5.2	2-Arachidonylglycerol induziert Ca-Ströme in Mikrogliazellen.....	81
5.3	TRPV2 in Mikrogliazellen nach Stimulation mit LPS	83
5.4	TRPV2 beeinflusst die LPS aktivierte Migration von Mikrogliazelle	84
5.5	Putative Beteiligung des TRPV2-Proteins an der ROS-Produktion in Mikrogliazellen .	85
5.6	Beteiligung des TRPV2-Kanals an der Phagozytose in Mikrogliazellen.....	86
6	Anhang.....	89
6.1	Untersuchung der funktionellen Expression weiterer TRP Kanäle in Mikrogliazellen ..	89
6.1.1	Stimulation möglicher TRPC Ströme	89
6.1.2	Stimulation möglicher TRPM2, TRPM3 und TRPM8 Ströme	90
6.1.3	Stimulation möglicher TRPV4 und TRPA1 Ströme	92
6.1.4	Keine Aktivierung möglicher TRP Ströme in LPS-stimulierten Mikrogliazelle	94
6.2	HEK293 und COS-7 Kontrollexperimente.....	98
7	Abbildungsverzeichnis	100
8	Tabellenverzeichnis	102
9	Abkürzungsverzeichnis	103
	Literaturverzeichnis.....	107

Inhaltsverzeichnis

10 Publikationen	119
11 Danksagung.....	120
12 Lebenslauf	Error! Bookmark not defined.

1 Zusammenfassung

Transkriptomanalysen unter Verwendung FACS-sortierter kortikaler Mikrogliazellen der Maus haben ergeben, dass Transkripte des Ionenkanals *Trpv2* im Vergleich zu anderen Ionenkanälen der TRP-Familie stark exprimiert werden. In meiner Masterarbeit hatte ich bereits mit der pharmakologischen Charakterisierung des Ca^{2+} -permeablen nicht-selektiven TRPV2-Kationenkanals begonnen (Malihpour, 2017). In der vorliegenden Arbeit habe ich diese Charakterisierung fortgesetzt und die Rolle von TRPV2 in den Mikrogliazellen der Maus untersucht. Hierzu wurden Whole-Cell Patch Clamp und Ca^{2+} Imaging Experimente, sowie Migrations- und Phagozytoseversuche, auch unter Verwendung der Mikrogliazelllinie BV2, durchgeführt. Ebenso wurde sowohl das murine als auch das humane TRPV2-Protein in HEK293- und COS-7-Zellen überexprimiert und pharmakologisch charakterisiert.

Die TRPV2 Agonisten 2-APB und THC (Δ^9 -Tetrahydrocannabinol) induzieren sowohl in den Mikrogliazellen der Maus als auch in BV2-Zellen Membranströme, die unabhängig von der Aktivierung von Cannabinoidrezeptoren sind, durch TRPV2 Antagonisten (Ruthenium Rot, Valdecoxib und Tiloron) inhibiert werden und in Mikrogliazellen aus *Trpv2*-defizienten Mäusen nicht auftreten. Ein weiterer TRPV2-Agonist, Cannabidiol, induzierte weder in Mikrogliazellen der Maus noch in HEK293-Zellen, in denen murines TRPV2 überexprimiert wurde, einen messbaren Strom. Im Gegensatz dazu konnte durch Cannabidiol, THC und 2-APB sowohl in HEK293- als auch in COS-7-Zellen, in denen das humane TRPV2 Protein überexprimiert wurde, Ströme induziert werden, die durch Ruthenium Rot, Valdecoxib und Tiloron inhibiert wurden. Das Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) führte nicht zu einer Aktivierung von TRPV2, induzierte aber TRPV2- und Cannabinoidrezeptor-unabhängige Ströme, die sowohl in den Mikrogliazellen als auch in den BV2-Zellen auftraten, nicht jedoch in HEK293-Zellen. Die Grundlage dieser Ströme muss noch untersucht werden.

Mikrogliazellen können *in vivo* durch verschiedene Stimuli wie Traumata oder auch durch bakterielle Infektion aktiviert werden. Dabei ändern sie ihre Morphologie und Genexpression, wandern zum Ort des Geschehens, phagozytieren Zelltrümmer und Bakterien und produzieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Um eine mögliche Beteiligung des TRPV2-Proteins an diesen Mikroglia-spezifischen Reaktionen nachzuweisen, habe ich das Migrationsverhalten, die Phagozytoseaktivität und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, in Ab- bzw. Anwesenheit verschiedener TRPV2 Agonisten und Antagonisten in primären Mikrogliazellen von Wildtyp und *Trpv2*-defizienten Mäusen, sowie in BV2-Zellen untersucht.

Zusammenfassung

Zunächst habe ich, als Modell für eine bakterielle Infektion, Mikrogliazellen mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert und das Migrationsverhalten analysiert. Dabei zeigte sich, dass nach Stimulation mit LPS das Migrationsverhalten sowohl von primären Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus als auch von BV2-Zellen im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen erhöht ist. Dieser Effekt konnte in Mikrogliazellen, die aus *Trpv2*-defizienten Mäusen isoliert waren, nicht beobachtet werden, was darauf hinweist, dass TRPV2 eine Rolle bei der Migration der Mikrogliazellen einnimmt. In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die ROS-Produktion in primären Mikrogliazellen und in BV2-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit LPS signifikant erhöht war und diese Erhöhung durch die TRPV2 Antagonisten Ruthenium Rot und Valdecoxib wieder reduziert werden konnte. Folglich ist das ein Hinweis darauf, dass die Produktion von ROS in Mikrogliazellen ebenfalls von der Aktivität des TRPV2-Proteins abhängt. Desweiteren war die Phagozytoserate der Mikrogliazellen nach Stimulation mit LPS in *Trpv2*^{-/-} Zellen signifikant gegenüber dem Wildtyp reduziert.

Ich konnte in der vorliegenden Arbeit mittels des pharmakologischen Profils und der Verwendung von *Trpv2*-defizienten Mäusen zeigen, dass murine Mikrogliazellen über funktionelle TRPV2 Kanäle verfügen, die an Mikroglia-spezifischen Funktionen wie Migration, Phagozytose und ROS-Produktion signifikant beteiligt sind. Somit könnte TRPV2 in Zukunft ein interessantes Zielmolekül darstellen, um bei pathologischen Ereignissen im zentralen Nervensystem die Aktivität und Funktion von Mikrogliazellen pharmakologisches zu regulieren.

Summary

About the Characterization and function of TRPV2 ion channels in mouse cortical microglial cells

Transcriptome analysis from FACS-sorted cultured murine cortical microglia cells demonstrated that transcripts of the ion channel *Trpv2* are highly expressed compared to other ion channels of the TRP family. During my master thesis I had started to characterize the pharmacological properties of the Ca²⁺-permeable non-selective cation channel TRPV2 (Malihpour, 2017). In the present work, I continued this characterization and investigated the role of TRPV2 in mouse microglia cells. For this purpose, I performed whole-cell patch clamp and Ca²⁺ imaging experiments, as well as migration and phagocytosis assays in the microglial model cell line BV2 and in cultured mouse cortical microglia cells. Furthermore, I characterized the pharmacological properties of murine and human TRPV2 proteins after overexpression in HEK293 and COS-7 cells.

I could show that TRPV2 agonists 2-APB and THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol) induced membrane currents in murine microglial cells and in BV2 cells. These currents are independent of cannabinoid receptor activation and can be inhibited by the TRPV2 antagonists ruthenium red, valdecoxib, and tilorone. Cannabidiol, another TRPV2 agonist, did not induce measurable currents in mouse microglial cells and in HEK293 cells in which murine TRPV2 was overexpressed. In HEK293 and in COS-7 cells, in which the human TRPV2 protein was overexpressed, cannabidiol, THC and 2-APB induced currents which could be inhibited by ruthenium red, valdecoxib and tilorone. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) did not activate TRPV2 but induced TRPV2- and cannabinoid receptor-independent currents in microglial cells and in BV2 cells but not in HEK293 cells. The underlying channel of these currents remains to be investigated.

Microglial cells can be activated *in vivo* by various stimuli such as trauma or bacterial infection. After stimulation microglia cells change their morphology and gene expression, migrate to the site of infection and phagocytose cell debris and bacteria and produce reactive oxygen species (ROS). To demonstrate a possible involvement of TRPV2 protein in these microglia-specific responses, I investigated the migration rate, the phagocytosis activity, and the production of reactive oxygen species, in the absence or presence of different TRPV2 agonists and antagonists in primary microglial cells from wild-type and *Trpv2*-deficient mice, as well as in BV2 cells.

Summary

First, as a model for bacterial infection, I stimulated microglial cells with lipopolysaccharides (LPS) and analyzed the migration behavior. After LPS stimulation the migration behavior of primary microglial cells from mouse cortex and BV2 cells increased in comparison to non-stimulated cells. This increase was not observed in microglial cells isolated from *Trpv2*-deficient mice. The experiments indicate that TRPV2 plays an important role in microglial cell migration. The present work also demonstrates that LPS stimulates the ROS production in primary microglial cells and in BV2 cells. The ROS production could be reduced using the TRPV2 antagonists ruthenium red and valdecoxib. This indicates that the production of ROS in microglial cells also depends on the activity of the TRPV2 protein. Furthermore, the phagocytosis rate of microglial cells after stimulation with LPS was significantly reduced in *Trpv2*^{-/-} cells compared with the wild type.

In the present work, I can demonstrate by the pharmacological profile that murine microglial cells have functional TRPV2 channels. TRPV2 is involved in microglia-specific functions such as migration, phagocytosis, and production of ROS. Thus, TRPV2 may represent a promising pharmacological target protein to influence microglial cell activity during pathological events in the central nervous system.

2 Einleitung

2.1 Nervensystem

Das Nervensystem ist wichtig für das Kontroll-, Regulierungs- und Kommunikationssystem im Körper. Es ist das Zentrum fürs Denken, Lernen und Gedächtnis. Das Nervensystem ist mit dem endokrinen System für die Regulierung und Aufrechterhaltung der physiologischen Homöostase wichtig. Das Nervensystem besteht aus zwei Teilen: (A) Das zentrale Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn und Rückenmark, und (B) das periphere Nervensystem (PNS) bestehend aus Nerven, die sich auf alle Körperteile erstrecken. Letzteres überwacht die Bedingungen innerhalb und außerhalb des Körpers und schickt Informationen an das ZNS.

Die Basiseinheit des Nervensystems ist eine Nervenzelle oder ein Neuron. Sie besteht aus einem Zellkörper und speziellen Ausläufern, die als Dendriten und Axone bezeichnet werden, über die Neurone miteinander kommunizieren. Das menschliche Gehirn besteht aus ungefähr 100 Milliarden Nervenzellen und ebenso viele nicht-neuronale Zellen, die sogenannten Gliazellen (Azevedo *et al.*, 2009). Diese wurden zum ersten Mal von Rudolf Virchow, Santiago Ramón y Cajal und Pío del Río-Hortega in der Mitte des neunzehnten Jahrhunderts beschrieben (Jakel und Dimou, 2017). Die gesamte Gliazellenpopulation kann in vier Hauptgruppen unterteilt werden: (1) Mikroglia, die Immunzellen des ZNS, (2) Astrozyten, welche unter anderem die Blut-Hirn-Schranke bilden, (3) Oligodendrozyten, welche die Myelinscheiden um die Axone der Neurone zur schnelleren Signalweiterleitung ausbilden, und (4) deren Vorläuferzellen, die NG2-Glia (Jakel und Dimou, 2017).

2.2 Mikrogliazellen

Monozyten aus der embryonalen Leber während der Entwicklung und dem Knochenmark bei Erwachsenen gelten als Ursprung der Mikrogliazellen im ZNS. Sie sind die residenten Makrophagen im zentralen Nervensystem und machen 10-15% der Gliazellpopulation im ZNS aus (Ling und Leblond, 1973). Es ist beschrieben, dass Mikrogliazellen nicht wie das ZNS dem Ektoderm entstammen, sondern mesodermalen Ursprungs sind, und während der frühen Entwicklung in das Gehirn einwandern. Über die Blutgefäße gelangen sie in alle Hirnregionen. Sie haben eine ramifizierte Morphologie (Abb. 2.1, links) mit einem kleinen Zellkörper und sind im reifen Gehirn fast gleichmäßig verteilt. Nach einem pathologischen Ereignis erhalten sie

Einleitung

eine amöboide Morphologie und die Fähigkeit zu wandern, sich zu vermehren und zu phagozytieren (Kettenmann *et al.*, 2011). Es gibt verschiedene morphologischen Phänotypen von Mikroglia. Im reifen ZNS sind ramifizierte Mikroglia der häufigste Phänotyp im stationären Zustand. Sie suchen mit ihren Ausläufern die Umgebung ab und kommunizieren direkt mit Neuronen, Astrozyten und Blutgefäßen (Savage *et al.*, 2019). Die meisten Mikroglia existieren im sich entwickelnden Gehirn als rund oder amöboide Zellen, die als Amöboid-Mikrogliazellen (AMCs) bezeichnet werden. Sie sind morphologisch ähnlich zu anderen Makrophagen im Rest des Körpers. Sie haben einen größeren Zellkörper mit kurzen und flachen Ausläufern. Es wird angenommen, dass sie eine Rolle bei der Myelogenese spielen (Savage *et al.*, 2019). Daneben finden sich auch hypertrophe Mikrogliazellen, die als "hyperreaktiv" beschrieben wurden. Sie sind z.B. bei Menschen mit Alzheimer-Krankheit (AD), Schlaganfall, chronischem Stress, Parkinson-Krankheit (PD), Depressionen und traumatischen Hirnverletzungen zu finden (Savage *et al.*, 2019).

Manche Studien zeigen, dass Mikrogliazellen auch in ihrem vermuteten Ruhezustand hoch aktiv sind. Sie interagieren im gesunden Gehirn sowohl strukturell als auch funktionell mit neuronalen und nicht neuronalen Elementen (Tremblay *et al.*, 2011). Wenn Mikroglia aktiviert werden, z.B. durch Infektionen, Traumata, Schlaganfälle, Toxine und andere Reize, erhöhen sie ihre Genexpression und dadurch lösen die Produktion zahlreicher neurotoxischer Mediatoren und die Sekretion von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF) α , Interleukin (IL) -1β und Chemokinen z.B. monocyitisches Chemoattraktionsprotein-1 (MCP-1) aus. Desweiteren sezernieren sie z.B. bei akuten Entzündungen zytotoxische Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS; Superoxid, Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid). Diese proinflammatorischen Effekte sind an verschiedenen Signal-Transduktionskaskaden beteiligt (Kaur *et al.*, 2014). Neurodegenerative Erkrankungen, einschließlich Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit, Huntington-Krankheit (HD), multiple Sklerose (MS) und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) sind assoziiert mit chronischer Neuroinflammation (Venero *et al.*, 2011).

Bei akuten Verletzungen im ZNS ändern „ruhende“ ramifizierte Mikrogliazellen innerhalb von 30–60 min ihre Morphologie und werden amöboid. Durch verletzte Gewebe werden bestimmte Moleküle freigesetzt und diese stimulieren die Motilität der Mikrogliazellen, die dann in Richtung der Verletzung migrieren (Garden und Moller, 2006). Diese Migration kann durch Chemoattraktoren wie Peptide und Proteine (z.B. Chemokine), kleine hydrophile

Einleitung

Moleküle (z.B. Nukleotide) und bioaktive Lipide (z.B. Endocannabinoide) ausgelöst werden (Inoue, 2002).

Neben ihrer morphologischen Unterscheidung können Mikrogliazellen auch anhand ihres molekularen Phänotyps und ihrer Effektorfunktionen in zwei Untergruppen eingeteilt werden. Die "klassisch aktivierte" entzündungsfördernde M1-Mikroglia (Abb. 2.1, oben), aktiviert z.B. durch Bakterienbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS, Zellwand GRAM-negativer Bakterien) oder durch das proinflammatorische Cytokin $\text{IFN-}\gamma$, produziert hohe Mengen an oxidativen Metaboliten und entzündungsfördernden Zytokinen. M1-Mikrogliazellen spielen damit eine zentrale Rolle in der Immunabwehr gegen Pathogene und Tumorzellen, können aber auch gesunde Zellen im ZNS wie Neurone und Astrozyten belasten (Gordon und Martinez, 2010). Im Gegensatz zu den entzündungsfördernden M1-Mikroglia werden M2-Mikroglia (Abb. 2.1, unten) durch IL-4 und IL-13 "alternativ" aktiviert, zeigen entzündungshemmende Eigenschaften und fördern Umbau und Reparatur von Gewebe (Gordon und Martinez, 2010). (Zur Übersicht siehe z.B. (Ashford *et al.*, 2020; Orihuela *et al.*, 2016).

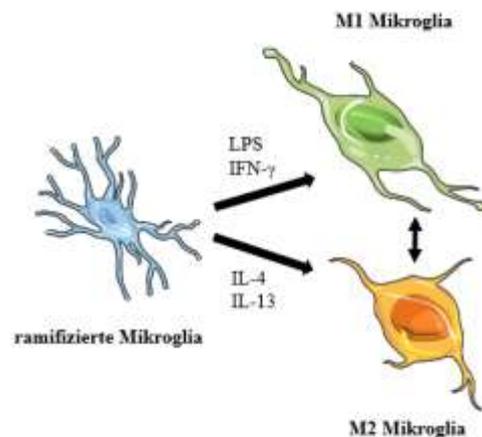


Abbildung 2.1: Die Morphologie der Mikrogliazellen im ZNS. Ramifizierte Mikrogliazellen, die lange unter physiologischen Bedingungen als inaktiv („resting“) angesehen wurden. Sie suchen jedoch unablässig ihre Umgebung ab. Nach Aktivierung zeigen die Mikrogliazellen verschiedene Phänotypen. Der klassische pro-inflammatorische, neurotoxische Phänotyp M1 und anti-inflammatorische Phänotyp M2 (modifiziert nach (Muth, 2018)).

Mikrogliazellen besitzen eine ganze Reihe von Rezeptoren und Ionenkanälen (siehe z.B. (Eder, 1998; Kettenmann *et al.*, 2011), die unter anderem intrazelluläre Signalkaskaden induzieren, die an der Aktivierung, Chemotaxis und Phagozytose der Mikroglia beteiligt sind. Hierzu gehören unter anderem α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isoxazolpropionsäure (AMPA) –Rezeptoren, die durch Glutamat aktiviert werden, P2-Purinozeptoren, die über ATP und

andere Nukleotide stimuliert werden (Sakaba und Neher, 2003), Zytokinrezeptoren, die durch TNF- α und IL-1 β aktiviert werden, sowie Rezeptoren für die Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexs (MHC) (Koizumi *et al.*, 2007). Cannabinoid-Rezeptoren (CB1 und CB2) werden z.B. bei Entzündungszuständen in Mikrogliazellen hochreguliert (Cabral und Marciano-Cabral, 2005). Mikrogliazellen exprimieren auch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) wie Toll-like Rezeptoren (TLRs) (Akira und Takeda, 2004), wobei TLR4 als primärer Rezeptor für LPS in Mikrogliazellen beschrieben wurde (Kaisho und Akira, 2000). LPS löst die entzündlichen Reaktionen, einschließlich der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aus (Chakravarty und Herkenham, 2005). Neben Rezeptoren und Ionkanälen exprimieren Mikrogliazellen diverse spezifische Proteine, die experimentell und klinisch als Marker verwendet werden. Das Zelladhäsionsmolekül CD11b wird z.B. in dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen allgemein und Mikrogliazellen exprimiert. CD68 ist ebenfalls ein Oberflächenprotein auf Zellen der Monozytenlinie und wird in geringen Mengen auch auf nicht aktivierten Mikroglia exprimiert (Hulette *et al.*, 1992). Das ionisierte Calcium-bindende Adaptermolekül-1 (Iba-1) ist ein häufig verwendeter Marker, der selektiv in Mikroglia exprimiert wird (Hirasawa *et al.*, 2005).

Eine der wichtigsten Funktionen von Mikrogliazellen im Gehirn ist die Phagozytose von Zelltrümmern zerstörter Zellen und von ins ZNS eingedrungenen Fremdpartikeln oder Fremdzellen wie z.B. Bakterien. *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien werden z.B. von AMCs im sich entwickelnden Gehirn einer neugeborenen Ratte in weniger als 3 Stunden nach der Injektion fast komplett phagozytiert (Kaur *et al.*, 2004). Desweiteren ist bekannt, dass in Mikrogliazellen sowohl Fc γ RI- als auch Fc γ RIIb-Rezeptoren an der IgG-vermittelten Phagozytose beteiligt sind (Quan *et al.*, 2009).

2.3 Calcium

Das zweiwertige Kation Calcium (Ca²⁺) ist das fünfthäufigste Element und ist in der belebten Natur ein wesentlicher Bestandteil von Knochen und Zähnen. Aber auch auf zellulärer Ebene wie die Freisetzung von Neurotransmittern und die Gentranskription sowie die Zellteilung, Differenzierung, Migration und Apoptose ist Ca²⁺ essentiell. Hier spielt es eine wichtige Rolle als *Second Messenger* bei der Signalübertragung. Desweiteren kann Ca²⁺ selbst als Ladungsträger das Membranpotential der Zelle depolarisieren oder über Ca²⁺-aktivierte

Anionen und Kationenkanäle modulieren (de- oder hyperpolarisieren). Die basale zytoplasmatische Ca^{2+} Konzentration in Zellen liegt zwischen 100 und 200 nM und wird durch Ca^{2+} -Pumpen wie die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) und die Sarko-Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) auf dieses niedrige Niveau reguliert. Die Erhöhung des zytoplasmatischen Ca^{2+} wird durch die Aufnahme von Ca^{2+} in die Zelle aus dem extrazellulären Raum oder die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Ca^{2+} Speichern vermittelt. Das komplette intrazellulär vorhandene Ca^{2+} wird hauptsächlich durch das endoplasmatische Retikulum (ER) bilden und liegt zwischen 100 und 800 μM (Samtleben *et al.*, 2013). Über Gq-gekoppelten Rezeptoren kann Phospholipase C (PLC) aktiviert werden. Hierzu wird Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂) durch PLC in Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) gespalten. Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptorkanäle (IP₃Rs) werden durch IP₃ aktiviert. Ca^{2+} aus dem ER wird bei Öffnung der IP₃Rs und Ryanodin-Rezeptorkanäle (RyR) aufgrund des Konzentrationsgradienten ins Zytoplasma freigesetzt. Eine weitere Ca^{2+} Quelle für die Zelle ist der extrazelluläre Raum, der 1 bis 2 mM Ca^{2+} enthält. Ca^{2+} gelangt über selektive Ca^{2+} Kanäle und Ca^{2+} -permeable nicht selektive Kationenkanäle in die Zelle. Zu den selektiven Ca^{2+} Kanälen zählen spannungs-aktivierte Ca^{2+} Kanäle (CaVs) und speicher-aktivierte Ca^{2+} Kanäle (ORAI). Letztere werden aktiviert, wenn die intrazellulären Ca^{2+} Speicher des ER entleert sind.

2.4 Ca^{2+} Kanäle in Mikrogliazellen

In Mikrogliazellen konnten bisher diverse Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle identifiziert werden. Die Anwesenheit von spannungs-aktivierten Ca^{2+} Kanälen in Mikrogliazellen ist umstritten, es gibt jedoch einige wenige Berichte über die funktionelle Expression von L-Typ Ca^{2+} Kanälen in primären Mikrogliazellen und der Mikroglia-Modellzelllinie BV2 (Colton *et al.*, 1994; Espinosa-Parrilla *et al.*, 2015; Hegg *et al.*, 2000; Silei *et al.*, 1999). Als selektive Ca^{2+} Kanäle ist die funktionelle Expression von speicher-aktivierten Ca^{2+} Kanälen und der dazugehörige Strom (ICRAC, *Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current*) in kultivierten Mikrogliazellen aus Ratte und Maus gezeigt (Beck *et al.*, 2008; Ohana *et al.*, 2009). Daneben konnten auch HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*) in primären Mikrogliazellen der Ratte (Vay *et al.*, 2020) und purinerge P₂X Rezeptorionenkanäle in Mikrogliazellen aus Maus, Ratte und Mensch nachgewiesen werden (McLarnon *et al.*, 1999; Norenberg *et al.*, 1994; Walz *et al.*, 1993).

Weitere in Mikrogliazellen identifizierte Ca^{2+} -permeable nicht-selektive Kationenkanäle gehören zur Gruppe der Transient Rezeptor Potential (TRP) Kanäle (siehe 2.4). Hier wurden TRPC3 in Mikrogliazellen der Ratte (Mizoguchi *et al.*, 2014) und die funktionelle Expression von TRPM2 (Jeong *et al.*, 2017; Kraft *et al.*, 2004), TRPM7 (Jiang *et al.*, 2005; Sato-Kasai *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2014; Siddiqui *et al.*, 2012), TRPV1 (Kim *et al.*, 2006; Schilling und Eder, 2009; Talbot *et al.*, 2012) und TRPV4 (Konno *et al.*, 2012b; Wang *et al.*, 2019) in kultivierten Mikrogliazellen aus dem ZNS von Ratte und Maus nachgewiesen (zur Übersicht siehe auch (Echeverry *et al.*, 2016b). TRPV2 konnte in BV2 Zellen, einer immortalen Maus Mikroglia-modellzelllinie, und in kultivierten Mikrogliazellen der Maus (Cao und Ramsey, 2016; Hassan *et al.*, 2014b; Maksoud *et al.*, 2019; Malihpour, 2017) nachgewiesen werden.

Neben den Ca^{2+} -permeablen TRP Kanälen TRPC3, TRPM2, TRPM7, TRPV1, TRPV2 und TRPV4 (siehe oben) konnten auch Dioazoxid-induzierte TRPM4 bzw. Ca^{2+} -aktivierte TRPM4-ähnliche Ströme in isolierten Mikrogliazellen der Maus gemessen werden (Beck *et al.*, 2008; Kurland *et al.*, 2016).

2.5 TRP-Kanäle

Transient Rezeptor Potential (TRP) Kanäle wurden zuerst in einer Mutante von *Drosophila melanogaster* entdeckt. Bei Lichtreiz zeigten die Lichtrezeptorzellen der Mutante lediglich ein transientes Rezeptorpotential anstelle eines dauerhaften Kationeneinstroms. Das zugehörige Gen, welches die Mutation trägt, wurde als *transient receptor potential = trp* bezeichnet (Minke *et al.*, 1975).

TRP Proteine verfügen über sechs Transmembransegmente, einer Porenregion zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment sowie über N- und C-Termini, die intrazellulär lokalisiert sind. Sie können als Homo- oder Heterotetramere kationenselektive Ionenkanäle bilden (Nilius und Voets, 2005) (Abb. 2.2).

Einleitung

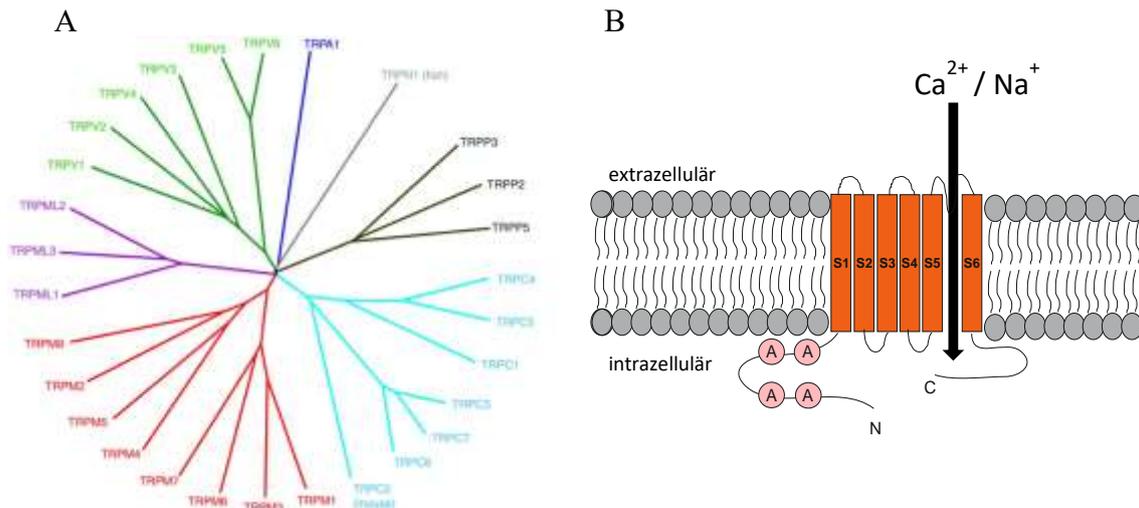


Abbildung 2.2: Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle. (A) Phylogenetischer Stammbaum der TRP Kanäle: TRPC (7 Mitglieder), TRPV (6 Mitglieder), TRPM (8 Mitglieder), TRPA (1 Mitglied), TRPML (3 Mitglieder) und TRPP (3 Mitglieder) (Nilius und Owsianik, 2011). (B) Jedes TRP-Protein hat 6 Transmembransegmente (S1-S6) mit einer Porenregion zwischen S5 und S6. N-terminal lokalisierte Ankyrin-Wiederholungen (A) findet man in den TRPC-, M-, und V-Familien als auch in TRPA1. Die Porenregionen der TRP Proteine sind durchlässig für verschiedene Kationen.

Innerhalb der N-Termini der TRP Familien TRPC, V, M als auch des TRPA1 Proteins befinden sich meist mehrere Sequenzabschnitte mit Homologie zum Ankyrin Protein und werden daher als „Ankyrin repeats“ bezeichnet. An C- oder N-Terminus gibt es sogenannte coiled-coil Regionen, denen eine Rolle bei der Multimerisierung der TRP Proteine zugesprochen wird. Der C-Terminus enthält eine charakteristische Abfolge von 13 Aminosäuren, die als TRP-Box bezeichnet werden. Die TRP Kanäle werden anhand ihrer Sequenzhomologie in sieben Gruppen eingeteilt: Canonical (TRPC1-7), Vanilloid (TRPV1-6), Melastatin (TRPM1-8), Ankyrin (TRPA1), NOMP-C: no mechanoreceptor potential-C (TRPN), Polycystin (TRPP2, 3 und 5) und Mucolipin (TRPML1-3). Außer TRPN konnten Vertreter aus allen anderen Unterfamilien in Säugetieren nachgewiesen werden (Venkatachalam und Montell, 2007).

Alle TRP Proteine bilden Kationenkanäle, wobei die meisten nicht-selektiv permeabel für monovalente und divalente Kationen wie Na^{+} , K^{+} und Ca^{2+} sind. Die meisten TRP-Kanäle sind Ca^{2+} permeabel (Alexander *et al.*, 2004). TRPM4 und TRPM5 sind für Ca^{2+} undurchlässig, werden aber durch intrazelluläres Ca^{2+} aktiviert. TRPV5 und TRPV6 sind die einzigen Ca^{2+} selektiven TRP-Kanäle mit einer Leitfähigkeit $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}} > 100$. Sie leiten Ca^{2+} unter physiologischen Bedingungen jedoch in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} sind sie auch

für einwertige Kationen permeabel (Nilius *et al.*, 2000). Bei Bindung von intrazellulären und extrazellulären Botenstoffen, chemischen Substanzen, osmotischem Stress und mechanischen Reizen werden TRP-Kanäle aktiviert, aber einige scheinen konstitutiv offen zu sein (Clapham, 2003). Einige Mitglieder der TRP-Familie fungieren als intrazelluläre Ca^{2+} Freisetzungskanäle. TRPP-Kanäle sind hauptsächlich in intrazellulären Membranen und TRPML-Kanäle in Lysosomen und Endosomen lokalisiert (Raychowdhury *et al.*, 2004). TRPP2 befindet sich in den ER-Membranen und in primären Zilien (Delmas, 2004). Die meisten TRP Kanäle befinden sich jedoch in der Plasmamembran.

Es gibt diverse Hinweise auf die Beteiligung von *trp* Genen an verschiedenen Krankheiten, wobei ein Zusammenhang zwischen dem Level der Kanalexpression und den Krankheitssymptomen besteht (Nilius *et al.*, 2005). Bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler arterieller Hypertonie (IPAH), die zum Herzversagen führt, wurde eine Zunahme der Häufigkeit von TRPC-Kanälen nachgewiesen (Nilius *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2004). TRPC1 spielt z.B. eine Rolle bei Asthma und chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD), die zu chronischer Bronchitis und Emphysemen führen (Sweeney *et al.*, 2002). Gain- und loss-of-funktion Mutationen von TRPC6 sind z.B. an der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS), einer fatalen Nierenerkrankung beteiligt (Riehle *et al.*, 2016; Winn *et al.*, 2005) und die gain-of-function Mutation von TRPV3 führt zum sogenannten Olmstedt-Syndrom mit palmoplantaren und periorifacialen Keratosen und Haarausfall (Lai-Cheong *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012). Der TRPV1 Kanal scheint allgemein an dysfunktionellen Schmerzempfindungen, Erkrankungen wie neuropathischen Schmerzen, Hyperästhesie (verstärkt Empfindlichkeit bei Berührung oder anderen Sinnesreizen), Hyperalgesie (gesteigerte Schmerzempfindlichkeit), Allodynie (abnorme Schmerzempfindung schon bei normal nicht schmerzhaften Reizen) und spontan brennenden Schmerzen beteiligt zu sein (Nilius *et al.*, 2005). TRPM3 wird als möglicher Auslöser für die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) angesehen (Lee *et al.*, 2003). Diese Beispiele zeigen, dass TRP Kanäle potentielle Zielproteine für die Pharmakotherapie darstellen.

2.6 TRPV-Kanäle

TRPV1 war der erste TRPV Kanal, der als Rezeptor für Vanilloide wie z.B. das Capsaicin, der Unterfamilie den Namen gab (Tominaga *et al.*, 1998). TRPV1 ist relativ selektiv für Ca^{2+} und Mg^{2+} ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^{+}} = 10$ und $P_{\text{Mg}^{2+}}/P_{\text{Na}^{+}} = 5$) und wird durch viele Stimuli wie Capsaicin,

Resiniferatoxin, Olvanil, Hitze (43°C), niedriger pH-Wert (5,9), Cannabinoidrezeptorligand Anandamid, Eicosanoide 12 (S) -HPETE, 15 (S) -HPETE, 5 (S) -HETE, Leukotrien B₄, N-Arachidonoyldopamin, Adenosin und 2-APB (2-Aminoethoxyphenylborat) aktiviert (Alexander *et al.*, 2004). TRPV1 als auch TRPV2, 3 und 4 werden ebenfalls durch Hitze aktiviert. Die Agonisten für TRPV3 sind 2-APB (Chung *et al.*, 2004) und die natürliche Substanz Campher (Moqrich *et al.*, 2005). TRPV4 kann zusätzlich durch Aphorbol, 4 α -Phorbol 12,13-Didecanoat (4 α -PDD), Anandamid und Arachidonsäure aktiviert werden (Nilius *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2003). TRPV4 wird vermehrt in den Atemwegen exprimiert (Jia *et al.*, 2004) und könnte in glatten Bronchialmuskelzellen und sensorischen Nervenenden an bronchialer Hyperreaktivität, einem Kennzeichen von Asthma, beteiligt sein (Liedtke und Simon, 2004). TRPV5 und TRPV6 sind in apikalen Membranen von Epithelzellen des distalen Tubulus der Niere sowie in epithelialen Zellen des Darms und in Trophoblasten der Plazenta exprimiert, und eine Beteiligung am transzellulären Ca²⁺ Transport in diesen Geweben wird diskutiert (den Dekker *et al.*, 2003; Wissenbach *et al.*, 2004).

2.7 TRPV2

TRPV2 ist ein nicht selektiver Kationenkanal, der permeabel für divalente und monovalente Kationen ist. Er ist eng mit TRPV1 verwandt und wurde auch aus Ratte, Maus und Mensch kloniert (Caterina *et al.*, 1999; Kanzaki *et al.*, 1999). Der aus Maus klonierte TRPV2 wurde zunächst als wachstumsfaktorregulierter Kanal (growth factor regulated channel, GRC) bezeichnet, da er abhängig von einer Stimulation mit Insulin-Wachstumsfaktor-1 (IGF-1) einen Calciumeinstrom nach heterologer Expression in CHO-K1 Zellen induziert (Kanzaki *et al.*, 1999). TRPV2 wurde auch als osmotisch bzw. *stretch-activated channel*, der als Mechanosensor in glatten Gefäßmuskelzellen funktioniert, beschrieben (Beech *et al.*, 2004; Muraki *et al.*, 2003). TRPV2 ist relativ selektiv für Ca²⁺ und Na⁺ ($P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}} = 1-3$) (Clapham, 2003) und wird durch 2-APB (Hu *et al.*, 2004), Hitze (>53°C) (Caterina *et al.*, 1999) aktiviert. Wachstumsfaktoren wie IGF-1 fördern möglicherweise die Translokation des Kanals an die Plasmamembran (Boels *et al.*, 2001; Iwata *et al.*, 2003). Obwohl TRPV2 durch potentiell schädliche (>53°C) Hitzereize aktiviert werden kann reagieren TRPV2-Knockout-Mäuse auf so einen Hitzereiz ähnlich wie Wildtyp Mäuse (Park *et al.*, 2011b). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), der psychoaktive Bestandteil aus *Cannabis sativa*, weitere Cannabinoide wie Cannabidiol (CBD) als auch das Urikosurikum Probenecid werden ebenfalls als effektive

Einleitung

Aktivatoren von TRPV2 beschrieben (Bang *et al.*, 2007; Russo, 2011). Daneben wurden auch Lysophospholipide wie Lysophosphatidylcholin (LPC) und Lysophosphatidylinositol (LPI) als TRPV2 Aktivatoren beschrieben (Monet *et al.*, 2009). Dabei führen LPC und LPI über Gq/Go-Proteine und Phosphatidylinositol-3,4-Kinase (PI3,4K) zur Translokation von funktionellen TRPV2-Kanälen an die Plasmamembran.

Tranilast und der unspezifische Kationenkanalblocker Ruthenium Rot werden als TRPV2 Antagonisten verwendet (Benham *et al.*, 2003; Maksoud *et al.*, 2019). Ausserdem scheinen SKF96365, Tetraethylammonium (TEA), 4-Aminopyridin und 1-(2-(Trifluormethyl) Phenyl)imidazol (TRIM) die Aktivität von TRPV2 zu hemmen (Juvin *et al.*, 2007). Die vorhandene Literatur zeigt eindeutig, dass TRPV2 in Abhängigkeit von der Spezies durch verschiedene Agonisten und Antagonisten moduliert werden kann (Neeper *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008); siehe auch Tabelle 3.4 und 3.5). Beispielsweise werden TRPV2 aus Maus und Ratte durch 2-APB aktiviert (Iwata *et al.*, 2018), nicht jedoch TRPV2 aus Mensch (Neeper *et al.*, 2007).

TRPV2 wird in den sensorischen Neuronen des Spinalganglions und in den Geweben wie die Lunge, Milz und Darm (Caterina *et al.*, 1999), in Trigeminalganglien (Ichikawa und Sugimoto, 2000) und im Rückenmark (Lewinter *et al.*, 2004) exprimiert. Auch im Herzen spielt TRPV2 eine wichtige Rolle: zum einen in kardialen Myozyten, wo es möglicherweise an Kardiomyopathie und Herzhypertrophie beteiligt ist (Katanosaka *et al.*, 2014) und zum anderen in kardialen Makrophagen wo TRPV2 bei einer Infektion oder Entzündung an die Plasmamembran gebracht wird und an deren Migration und Phagozytose und damit möglicherweise am Schutz des Herzgewebes beteiligt ist (Iwata *et al.*, 2013). Viele Studien behaupten, dass die Aktivierung von TRPV2 in den Makrophagen im Herzen vorteilhaft sein kann, jedoch Blockade sich ungünstig auswirkt (Entin-Meer und Keren, 2020; Jones *et al.*, 2017). Auch in Zahnpulpa-Stammzellen (HDPCs) und peritubulären Zellen, Sertoli- und Interstitialzellen im Hoden sowie im Endometrium konnte die Expression von funktionellen TRPV2 Kanälen gezeigt werden (De Clercq *et al.*, 2015; De Clercq *et al.*, 2017; Eubler *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019). Die Infektion TRPV2-defizienter Mäuse mit *Listeria monocytogenes* führt zu einer erhöhten Mortalität (Link *et al.*, 2010). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Phagozytose der TRPV2-defizienten Makrophagen signifikant beeinträchtigt ist. Phagozytose von z.B. Bakterien durch Makrophagen ist ein komplexer physiologischer Prozess mit Erkennen der Bakterien durch spezifische Rezeptoren, Umlagerung des Aktin-Zytoskeletts und Internalisierung (Aderem und Underhill, 1999). Dabei spielen Ca^{2+} und Na^{+} eine wichtige Rolle, einschließlich der Ansäuerung der Phagolysosomen (Carrithers *et al.*,

Einleitung

2007). TRPV2 ist permeabel für beide Ionen. Auch in Alveolarmakrophagen in der Lunge konnte TRPV2 detektiert werden, wo es ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Phagozytose spielt (Masubuchi *et al.*, 2019). Makrophagen aus Patienten mit zystischer Fibrose (Mukoviszidose) weisen einen Defekt im *Trpv2* Gen auf mit der Folge einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase sowie einer veränderten Phagozytosekapazität (Leveque *et al.*, 2018).

Neben der Phagozytose konnte eine Beteiligung von TRPV2 auch an der Migration von Makrophagen nachgewiesen werden (Link *et al.*, 2010). Die Migration und Invasion immortaler Zelllinien, die aus Brustkrebs (Gambade *et al.*, 2016), Prostatakrebs (Monet *et al.*, 2009; Oulidi *et al.*, 2013) und Blasenkrebs (Liu und Wang, 2013) abgeleitet worden waren, könnte ebenfalls über TRPV2 vermittelte Ca^{2+} -Ströme reguliert werden. In diesem Zusammenhang wurde TRPV2 als Marker bei Magenkrebs (Zoppoli *et al.*, 2019), der eine schlechte Prognose anzeigt, vorgeschlagen, während bei Brustkrebs (Elbaz *et al.*, 2018) ein positives prognostisches Potential diskutiert wird. Ebenso wurde das TRPV2 Protein als mögliches Zielprotein bei der Behandlung von Leukämie (Siveen *et al.*, 2019) vorgeschlagen. Möglicherweise dient TRPV2 als zellulärer Eintrittskanal für Chemotherapeutika wie Doxorubicin (Neumann-Raizel *et al.*, 2019).

TRPV2 wird auch in Mikrogliazellen, den phagozytierenden Zellen im ZNS exprimiert (Maksoud *et al.*, 2019; Malihpour, 2017). In den Anfangsstadien der Phagozytose produzieren Mikrogliazellen über die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) vermehrt Stickstoffmonoxid (NO), wobei primäre Mikroglia aus iNOS Knockout Mäusen eine reduzierte TRPV2 Aktivität und Phagozytosekapazität im Vergleich zu Wildtypmäusen aufwiesen (Maksoud *et al.*, 2020). In BV2 Zellen, einer Modellzelllinie für Mikrogliazellen, konnte gezeigt werden, dass die Stimulation durch Cannabidiol (CBD) zu einer vermehrten Expression von TRPV2 Proteinen an der Plasmamembran, einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration und einer signifikanten Erhöhung der Phagozytoserate führt (Hassan *et al.*, 2014a). Desweiteren wurde vorgeschlagen, dass die Stimulation des Toll-like Rezeptors (TLR-4) durch Lipopolysaccharide (LPS) TRPV2 Kanäle in BV2 Zellen und primären Mikrogliazellen der Maus aktiviert und TRPV2 in Mikrogliazellen möglicherweise als neues anti-inflammatorisches Zielprotein zur Therapie neurodegenerativen Erkrankungen und Hirntraumata in Frage kommt (Cao und Ramsey, 2016).

2.8 Zielsetzung der Arbeit

Es gibt bisher nur eine Hand voll Studien zur Expression von TRPV2 in Mikrogliazellen bzw. in davon abgeleiteten Zelllinien. Die meisten Studien wurden an BV2 Zellen, also einer Modellzelllinie für Mikrogliazellen, durchgeführt. Eine einzige Arbeit zeigt NO induzierte Ströme in primären Mikrogliazellen, die TRPV2 zugerechnet werden, jedoch nicht den typischen Strom-Spannungs-Verlauf von TRPV2 aufweisen (Maksoud *et al.*, 2019).

In meiner Masterarbeit (Malihpour, 2017) habe ich TRPV2 aus der Maus nach heterologer Expression in HEK293 Zellen mithilfe der Patch Clamp Technik pharmakologisch charakterisiert und begonnen elektrophysiologische Messungen von TRPV2 Strömen in kultivierten Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus zu etablieren.

Die vorliegende Arbeit fokussiert auf:

- 1) Die pharmakologische Charakterisierung von TRPV2 in kultivierten Mikrogliazellen aus dem Kortex neugeborener Mäuse
- 2) Die Aktivität von TRPV2 in nicht-stimulierten und mit LPS stimulierten (aktivierten) kultivierten Mikrogliazellen
- 3) Die zelluläre Funktion von TRPV2 in den kultivierten Mikrogliazellen
- 4) Die pharmakologische Charakterisierung des humanem TRPV2 Proteins nach transienter Expression in HEK293 und COS-7 Zellen

Zur pharmakologischen Charakterisierung des TRPV2 Proteins wurden diverse Agonisten (Tab. 3.4) und Antagonisten (Tab. 3.5) appliziert. Die Aktivität von TRPV2 wurde sowohl elektrophysiologisch, mithilfe der Whole-Cell Patch Clamp Technik als auch mikrofluorometrisch unter Verwendung des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 untersucht. TRPV2 wurde in Mikrogliazellen der Maus als auch in einer Zelllinie, BV2, die TRPV2 exprimieren untersucht. Zusätzlich wurde TRPV2 in HEK293 als auch COS-7 Zellen überexprimiert. Zur Untersuchung der zellulären Funktion von TRPV2 wurden Zellviabilität, Migration, Phagozytose und ROS-Produktion von BV2 bzw. kultivierten Mikrogliazellen, die aus dem Kortex der Maus isoliert worden waren, verwendet. Als Kontrolle dienten auch Mikrogliazellen aus TRPV2-defizienten Mäusen .

3 Material und Methoden

3.1 Präparation und Kultivierung von murinen Mikrogliazellen

Die Mikrogliazellen wurden aus neonatalen, 0-3 Tage alten (P0-P3) Wildtyp Mäusen der Linie 129/B6 oder 129S6/C57Bl6/N (gemischter Background) und aus homozygoten TRPV2-defizienten (TRPV2^{-/-}) sowie heterozygoten TRPV2^{+/-} Mäusen der Linie 129/S6 isoliert. Die TRPV2-defizienten Mäuse (Park *et al.*, 2011a) wurden uns von Prof. Dr. Michael Caterina (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) überlassen und von Dr. Petra Weissgerber in die Tierhaltung des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie in Homburg über Embryotransfer eingeführt. Die Isolierung von Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus wurde durchgeführt, wie zuvor beschrieben in (Malihpour, 2017) (Abb. 3.1). Die Mäuse wurden mittels Schere dekapitiert. Die Schädeldecke wurde eröffnet und das Cerebrum entnommen. Das Gehirn wurde in eine mit 1x PBS gefüllten Schale überführt. Die beiden Kortizes Gehirnhälften wurden getrennt und die Meningen und Hippocampus, Amygdala und Thalamus entfernt. Die isolierten Kortexe wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 20 ml kaltem DMEM-Medium (Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium), 1% GlutaMAX (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gesammelt. Das Gewebe wurde in 5 ml Trypsin (1%) (Sigma) überführt und für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um den enzymatischen Verdau von Trypsin zu unterbinden, wurden 12 ml DMEM-Medium mit 10% FKS (fötales Kälberserum) (Gibco) zugegeben und für 5 Minuten bei 200 g und 22°C zentrifugiert (Heareus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde entfernt und die Kortexe wurden anschließend durch wiederholtes Aufsaugen (zehnmals) durch eine 20G-Kanüle (0,90 × 40 mm) (B. Braun) homogenisiert. Die Zellsuspension wurde durch einen 40 µm Zellfilter (BD Falcon) gegeben, um Fibroblasten und Fibrozyten abzutrennen. Dann wurden die gefilterten Zellen aus Astrozyten und Mikrogliazellen in Kulturmedium (10% FKS, 1% GlutaMAX, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) in Poly-L-lysin (P-L-L, 0,1 mg/ml) (Sigma) beschichteten 75 cm² große Kulturflaschen (BD Falcon) ausplattiert und bei 37 °C und 5% CO₂ in einem befeuchteten Inkubator (Binder, Tuttlingen, Deutschland) kultiviert. 2 bis 3 Tage nach der Präparation wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen. Dann wurde jede Woche einmal das Medium gewechselt. Nach ein bis zwei Wochen in der Kultur hatte sich ein konfluenter Astrozytenrasen gebildet, auf dessen Oberfläche Mikroglia als rundliche, lose anhaftende Zellen sichtbar waren. Die Mikrogliazellen wurden durch Aufklopfen der Zellkulturflasche von den Astrozyten gelöst und für Patch Clamp Experimente und Ca²⁺

Imaging subkultiviert. Die Primärkultur konnte mehrfach verwendet werden, da Mikrogliazellen wieder anwachsen.

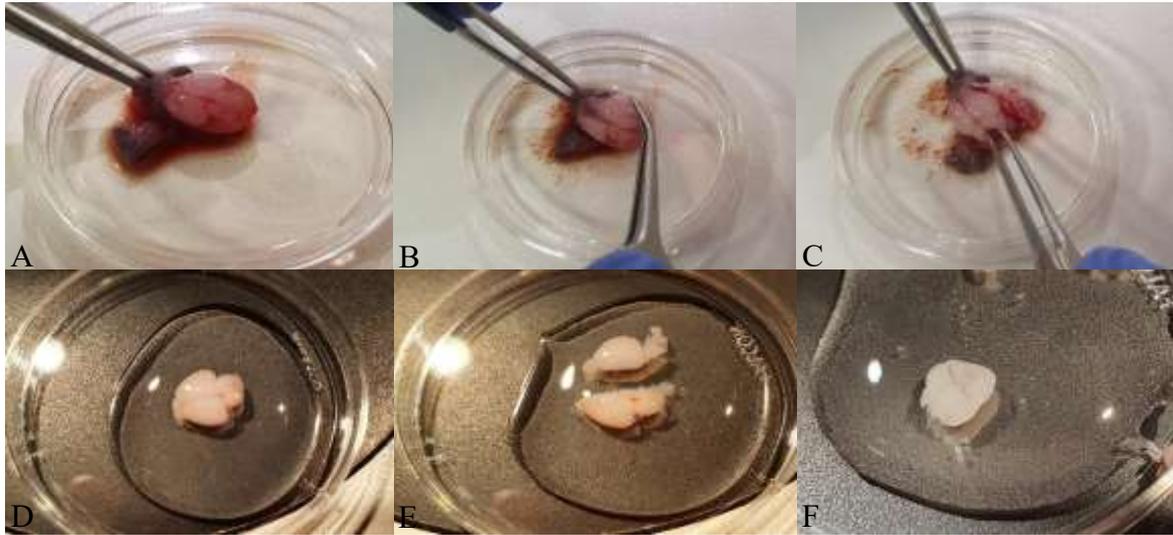


Abbildung 3.1: Präparation der Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus. (A, B, C) Entfernen der Hirnhäute. (D) Extrahiertes Gehirn. (E) Trennen der Hemisphären und Entfernen des Kortex-fremden Gewebes wie Hippocampus, Amygdala und Thalamus. (F) Der abgetrennte Kortex kann für die Kultivierung der Mikrogliazellen verwendet werden.

3.2 HEK293 und COS-7 Zellkulturen

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK293; CRL-1573; LGC Standards, Teddington, UK) und die immortalisierte Nierenfibroblastenzelllinie aus *Chlorocebus aethios* COS-7 (CRL-1651; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig) verwendet. Die Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen mit DMEM Medium (Gibco, Life Technologies, Minimum Essential Medium, Earle's Balanced Salts, L-Glutamine, 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Sie wurden alle 2-3 Tage nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens passagiert, d.h. das Medium wurde verworfen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Dann wurden sie mit 3 ml Trypsin 2-3 Minuten bei Raumtemperatur vom Boden und Nachbarzellen abgelöst und danach wurde 7 ml frisches Medium mit 10% FKS, welches die Wirkung von Trypsin inhibiert, zugegeben. Die Zellen wurden anschliessend in neue Kulturflaschen mit 12 ml frischem Medium verdünnt.

3.3 HEK293 und COS-7 Transfektion

HEK293 Zellen bzw. COS-7 Zellen wurden in 35 mm Petrischälchen ausplattiert und nach Erreichen von 80-90% Konfluenz (i.d.R. 24 h nach Ausplattieren) transfiziert. Das Kulturmedium wurde vor der Transfektion durch frisches Medium (DMEM, ergänzt mit 10% FKS) ersetzt. Zur Transfektion von HEK293-Zellen wurde pro Schälchen 200 µl OptiMEM als reduziertes Medium, 2,5 µg Plasmide (mTRPV2-pCAGGS-IRES-GFP, hTRPV2-pCAGGS-IRES-GFP oder pCAGGS-IRES-GFP) und 2,5 µl Transfektionsreagenz 293 Cell Avalanche (EZ Biosystems, Rockville, USA) zusammen gemischt und für kurze Zeit auf dem Vortex-Mixer geschüttelt. Zur Transfektion von COS-7 Zellen wurde 2,5 µg Plasmid (hTRPV2-pCAGGS-IRES-GFP oder pCAGGS-IRES-GFP) in 250 µl OptiMEM gegeben, gemischt und dann 2 µl Transfektionsreagenz COS-7 Cell Avalanche (EZ Biosystems, Rockville, USA) hinzugegeben. Die verwendeten Plasmide wurden in unserem Labor von Stefanie Buchholz und von Dr. Eva Schwarz (Biophysik, Universität des Saarlandes) kloniert. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen 24 bis 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die HEK293 Zellen wurden 24 bis 72 h und die COS-7 Zellen 24 h nach Transfektion für die Messungen verwendet. Für die Patch Clamp Experimente wurden die Zellen am Tag nach der Transfektion auf mit P-L-L beschichtete 12 mm² runde Glasplättchen vereinzelt ausplattiert.

3.4 BV2-Zellen

Die BV2 Zelllinie (CVCL-0182) ist durch Immortalisierung einer primären Mikrogliazellkultur aus der Maus entstanden (Blasi *et al.*, 1990a) und wurde uns freundlicherweise vom Institut für Neurologie (Frau Letiembre bei Prof. Fassbender) am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg überlassen. BV2 Zellen werden vielfach als Modellzelllinie für Mikrogliazellen verwendet. Die Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen mit DMEM-Medium (Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium), 2% GlutaMAX (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Erreichen von 80-90% Konfluenz wurden sie passagiert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen. Danach wurde 3 ml Trypsin (5 g/L) auf die Zellen gegeben und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 7 ml vom Kulturmedium mit 10% FKS auf die Zellen hinzugegeben, um den enzymatischen Verdau durch Trypsin zu hemmen. Die Zellklumpen in der Zellsuspension wurden gegen den Flaschenboden pipettiert

und dies wiederholte sich 10 Mal. 1 ml Zellsuspension wurde in einer neuen Kulturflasche mit einem Endvolumen von 13 ml Kulturmedium verdünnt. Für die Patch Clamp Experimente wurden die Zellen auf mit P-L-L beschichtete 12 mm² runde Glasplättchen vereinzelt ausplattiert.

3.5 Patch Clamp Technik

Die Patch Clamp Technik ermöglicht die Messung von Ionenströmen und somit die Untersuchung der physiologischen und pathophysiologischen Funktion von Ionenkanälen in Zellen. Diese Technik wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann im Jahr 1991 entwickelt. Es kann verschiedene Konfigurationen in der Patch Clamp Technik verwendet werden, einschließlich des *cell-attached*, *inside-out*, *outside-out* und *whole-cell* Modus. In dieser Arbeit wurde der Whole-Cell Modus verwendet (Abb. 3.2). Das Prinzip ermöglicht die Messung aller aktiven Ionenkanäle in der Plasmamembran.

Die HEK293, COS-7, BV2 und Mikrogliazellen wurden mit dem Deckglas, auf dem sie ausplattiert waren, in eine Messkammer überführt und mit externer Lösung (Tabelle 3.1) bedeckt. Patchpipetten wurden aus Glaskapillaren GB150T-8P (Borosilikat, Innendurchmesser 1,5 mm, Science Products, Hofheim, Deutschland) an einem Pipettenziehgeräte (Narishige, Modell PC-10, Tokyo, Japan) gezogen. Wenn die Patchpipetten mit der internen Standardlösung (Pipettenlösung; Tabelle 3.2) gefüllt waren, hatten sie Widerstände zwischen 2 und 4 M Ω . Um den Whole-Cell Modus zu erreichen wurde die Patchpipette dicht auf die Zellmembran aufgesetzt, so dass keine Lücke zwischen Öffnung der Patchpipette und Zellmembran entstand (*Giga Seal*). In der Giga Seal Konfiguration wurde der Membranflecken (*Patch*) unterhalb der Patchpipettenspitze eingesaugt (*Break-In*), so dass ein Zugang von der Pipette zum Zellinneren entstand (Abb. 3.2A). Anschließend wurden alle 2 Sekunden 400 ms lange Spannungsrampen von -100 mV bis 100 mV generiert und Membranströme im Verlauf dieser Spannungsrampen gemessen (Abb. 3.2B). Hierzu wurde ein computergestütztes Verstärkersystem (EPC-9, HEKA Electronics, Lambrecht, Deutschland) und die Software PatchMaster (HEKA) verwendet. Die angelegten Spannungen wurden gegen ein *liquid junction* Potenzial von 10 mV korrigiert. Um den Strom über die Zeit darzustellen, wurden die Ströme bei -80 mV (Einwärtsströme) und +80 mV (Auswärtsströme) einer jeden Rampe extrahiert und gegen die Zeit aufgetragen. Zwischen den einzelnen Rampen wurde die Zellmembran auf ein

Haltepotential (V_h) von 0 mV geklemmt. Ströme wurden bei 2,9 kHz gefiltert und in Intervallen von 100 μ s aufgezeichnet.

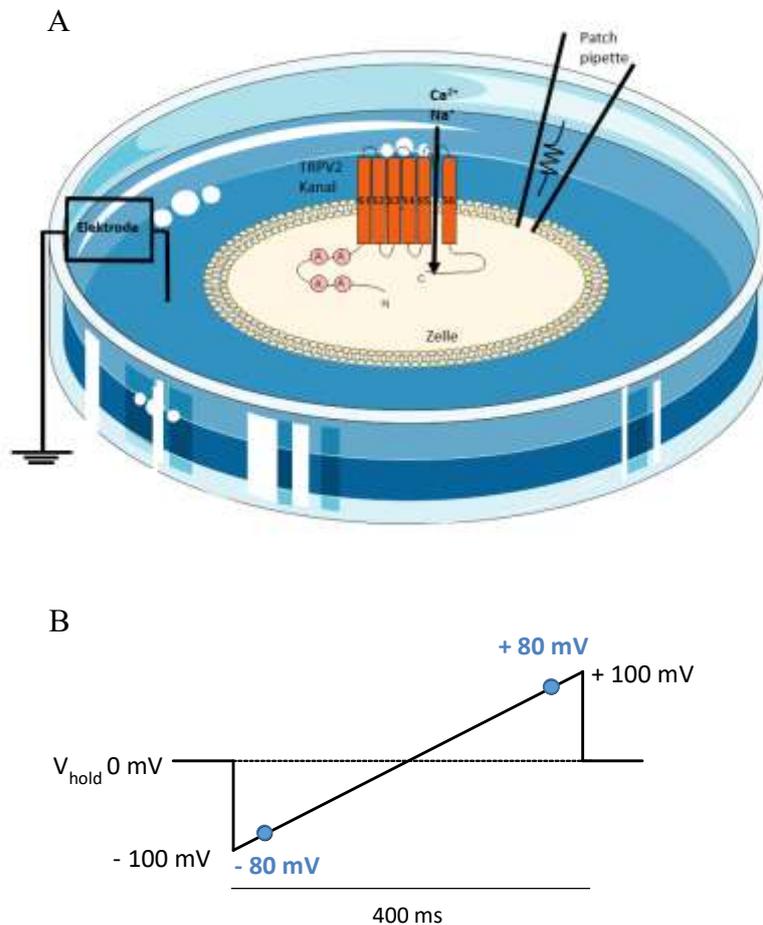


Abbildung 3.2: Whole-Cell Patch Clamp Messung. (A) Schema einer Whole-Cell Patch Clamp Konfiguration mit Badelektrode und Patchpipette (Messelektrode). Der Membranflecken unterhalb der Patchpipette wurde weggesaugt, damit Kontakt zum Zellinneren entsteht. Dadurch kann der Strom über Ionenkanäle in der kompletten Plasmamembran der Zelle gemessen werden. (B) Patch Clamp Protokoll. Alle 2 Sekunden wurden 400 ms lange Spannungsrampen von -100 mV bis 100 mV generiert und Membranströme gemessen. Das Haltepotential (V_{hold}) zwischen den Rampen war 0 mV. Der Strom bei -80 mV und 80 mV wurde dann gegen die Zeit aufgetragen.

Bei Applikationsexperimenten wurden die Stocklösungen der verschiedenen verwendeten Pharmaka entsprechend der einzustellenden Konzentration in der extrazellulären Lösung verdünnt (pharmakologische Substanzen, Tabelle 3.3) und direkt über eine leicht abgebrochene luftdruckgesteuerte Applikationspipette auf die gemessene Zelle appliziert. Die TRPV2 Antagonisten wurden direkt in das Bad gegeben und die Zellen damit inkubiert. Die Osmolarität der intra- und extrazellulären Lösungen waren zwischen 290 und 310 mOsm/ml. Kapazitive Ströme und Serienwiderstände wurden vor jeder Spannungsrampe unter Verwendung der

automatischen Kapazitäts-Kompensation des EPC-9 bestimmt und korrigiert. Um die Stromdichten zu erhalten, wurden die Ströme auf die Kapazität (repräsentiert die Zellgröße) der Zelle normalisiert (pA/pF) und zur Darstellung der Strom-Spannungs-Kurven wurde der Basisstrom abgezogen, um den Nettostrom nach Applikation eines Agonisten zu erhalten. Als Basisstrom diente dabei eine der letzten Strom-Spannungs-Kurven vor Beginn der Applikation.

3.6 Fluorometrische Messung zytosolischer Ca^{2+} Änderungen

Um zytosolische Ca^{2+} Änderungen fluorometrisch zu detektieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 verwendet. Da Fura-2 geladen und daher nicht membranpermeabel ist, wurden die Zellen mit der Zell-permeablen veresterten Form, Fura-2-Acetoxy-methyl (Fura-2-AM) beladen. Die Ester-Gruppen werden durch intrazelluläre Esterasen abgespalten, sobald Fura-2-AM sich in der Zelle befindet (Abb. 3.3A). Das geladene Fura-2 reichert sich in der Zelle an und verändert durch Bindung von Ca^{2+} sein Fluoreszenzspektrum: Nach Bindung von Ca^{2+} steigt die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm an, sinkt aber durch eine Anregungswellenlänge von 380 nm ab (Abb. 3.3B). Nach Anregung durch 340 bzw. 380 nm emittiert Fura-2-AM Licht einer Wellenlänge von 510 nm. Fura-2 hat den Vorteil, dass es als ratiometrischer Farbstoff verwendet werden kann indem man einen Quotienten der Fluoreszenzen betrachtet (F340/F380). Verschiedene Störgrößen, wie unter anderem die Variabilität der Fluoreszenz durch ungleiche Beladungen der Zellen mit dem Farbstoff in individuellen Experimenten, können somit vernachlässigt werden. Verschiedene Störgrößen, wie unter anderem die Variabilität der Fluoreszenz durch ungleiche Beladungen der Zellen mit dem Farbstoff in individuellen Experimenten, können somit vernachlässigt werden. Bei einem Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} wird der Quotient F340/F380 (Ratio F340/F380) größer, bei einer Reduktion des zytosolischen Ca^{2+} nimmt dieser ab. Die Änderungen des Quotienten F340/F380 ist direkt proportional zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und kann über die Zeit verfolgt werden.

Mikroglia und BV2 Zellen wurden für Ca^{2+} Imaging Experimente auf Poly-L-Lysine (P-L-L) beschichteten Deckgläsern ausplattiert. Vor den Experimenten wurden die Zellen für 20 min mit 5 μM Fura-2-AM (Biotium) im Medium bei Dunkelheit, 5% CO_2 und 37 °C im Inkubator beladen. Danach wurden die Deckgläser mit den beladenen Zellen mit Badlösung gewaschen und in einer Messkammer fixiert und mit Badlösung (Tabelle 3.1) bedeckt. Die Ca^{2+} Messungen wurden an einem inversen Mikroskop (Axiovert S100, Carl Zeiss, Deutschland) durchgeführt,

welches mit einem Monochromator ausgestattet war (Polychrome V, TILL-Photonics, Deutschland). Im zeitlichen Abstand von 2 s wurde Fura-2 alternierend für die Dauer von 30 ms mit einer Wellenlänge von Wellenläng 340 nm bzw. 380 nm angeregt und die Fluoreszenz (510 nm) mit einer EMCCD-Kamera (iXon DV-885, Andor) aufgenommen. Aus den Bildern der Fluoreszenz beider Wellenlängen (F340 nm und F380 nm) wurden nach Abzug der Fluoreszenz des Hintergrunds die Fluoreszenzquotienten F_{340}/F_{380} errechnet. Auf diesen korrigierten Bildern wurden alle Einzelzellen markiert und die entsprechenden Ratios (F_{340}/F_{380}) über die Zeit ausgewertet und aufgetragen. Pharmakologische Substanzen zum Stimulieren der Zellen (Tabelle 3.6) wurden in entsprechender Verdünnung ins Bad appliziert. Für die Durchführung und die Analyse der Experimente wurden die Software TILLvisION (TILL-Photonics, Deutschland) und IGOR Pro (WaveMetrics) verwendet.

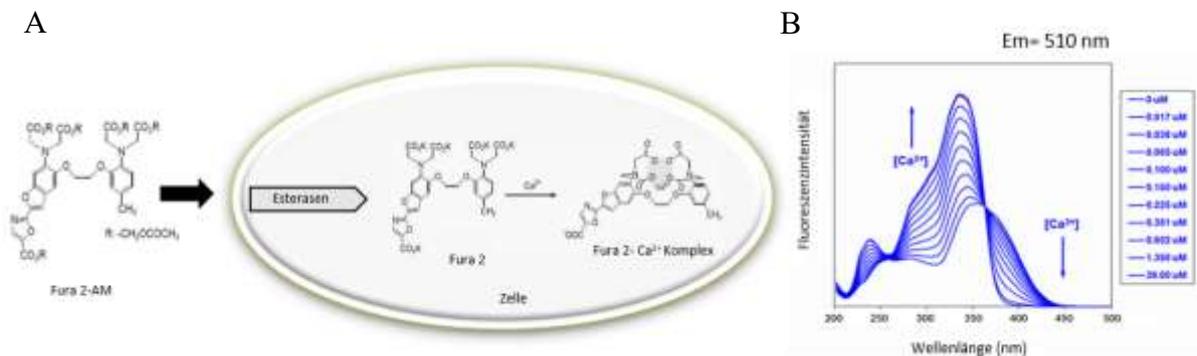


Abbildung 3.3: Zur Ca^{2+} imaging Methode. (A) Fura-2 AM ist unpolar und daher membranpermeabel. Sobald es in der Zelle ist, werden die AM-Gruppen durch intrazelluläre Esterasen abgespalten und Fura-2 kann an freies Ca^{2+} binden. (B) Anregungsspektrum von Fura-2 bei unterschiedlichen Konzentrationen von freiem Ca^{2+} . Die Fluoreszenzintensität für Fura-2 hängt von der Anregungswellenlänge und von der Calciumkonzentration ab. Der Anregungspeak verschiebt sich bei Ca^{2+} Bindung von 380 nm zu 340 nm. Die Fluoreszenzemission bei 360 nm ist unabhängig von der Ca^{2+} Bindung (modifiziert nach Vorlagen von der Homepage von Cayman Chemicals).

3.7 Migrations-Assay

Migrationsexperimente wurden mit BV2 und Mikrogliazellen unter Verwendung von *Costar*[®] *transwell Inserts* (8 μm Porengröße, Falcon) durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer Neubauer Zählkammer (12 mm, Marienfeld) gezählt und in entsprechender Anzahl (BV2 Zellen: 20000, 40000, 60000; Mikrogliazellen 20000) in 24-Well Platten (Falcon[®]) mit sogenannten Transwell-Insert und Medium ohne Serum ausplattiert. Lipopolysaccharid, ein Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien (LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde zur Aktivierung der

Zellmigration in die untere Seite des Transwell-Inserts gegeben. Pharmakologisch wirksame Substanzen wie Ruthenium Rot (RR, 10 μM), Valdecoxib (100 μM) und Cytochalasin D (Cyto D, 5 μM) wurden je nach Experiment gleichzeitig mit LPS in die Wells hinzugegeben. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 wurde die obere Seite der Membran des Transwell-Inserts mit Wattestäbchen von nicht durch die Membran migrierten Zellen befreit. Die Zellen, die innerhalb der 24 h zur unteren Seite der Membran wanderten, wurden mit Fixierungslösung (Methanol) fixiert und für je 5x1 Sekunde in den HAEMA-Färbelösungen Eosin und Azur gefärbt (Abb. 3.4). Die Membranen wurden mit Wasser gespült und für 24 Stunden bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Membranen ausgeschnitten und auf einem Objektträger mittels *DEPEX Mounting Media* (VWR) eingebettet. Von jeder Membran wurde mittels Lichtmikroskopie (Axiovert 40C, ZEISS, bei 10facher Vergrößerung) mit einer Kamera (AxioCam, ZEISS) an fünf zufälligen Stellen Bilder gemacht und die migrierten Zellen mit der Software ImageJ (NIH) quantifiziert. Die Fläche eines Bildes betrug 0,006 cm^2 und die Fläche der Membran insgesamt 0,3 cm^2 . Die mittlere Anzahl der Zellen pro Bild wurde errechnet und auf die Fläche der Gesamtmembran hochgerechnet. Am Ende wurde die Anzahl der migrierten Zellen ins Verhältnis zur Anzahl der insgesamt ausplattierten Zellen gesetzt und die Migrationsrate berechnet.

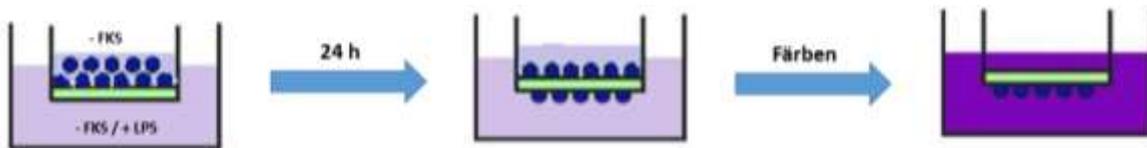


Abbildung 3.4: Migrations-Assay. Die Zellen wurden in Abwesenheit von Serum auf Transwell-Inserts in 24-Well-Platten ausplattiert (links). Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen, die von der oberen Seite zur unteren Seite migrierten (mitte), gefärbt (rechts) und quantifiziert. (modifiziert nach <https://www.biocompare.com>).

3.8 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in BV2 und Mikrogliazellen

Mikrogliazellen und andere immunkompetente Zellen synthetisieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS) um eingedrungene Viren und Bakterien zu eliminieren. Superoxid, Peroxylradikal, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale und Peroxynitrit sind Beispiele für ROS-Verbindungen. 2',7'-Dichloro-Dihydrofluorescein Diazetat (DCFH-DA, Cayman, Deutschland) ist ein membrangangiger fluoreszierender Farbstoff, mit dem die Aktivität von reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle gemessen werden kann. Nach der Diffusion in die Zelle

wird DCFH-DA durch zelluläre Esterasen zu einer nicht-fluoreszierenden Substanz deacetyliert und diese kann durch ROS zu 2', 7' -Dichlorfluorescein (DCF), einer fluoreszierenden Substanz, oxidiert werden. Nach Anregung mit einer Wellenlänge von 485 nm kann die Fluoreszenz-Emission von DCF bei 535 nm gemessen werden (Abb. 3.5). Zur Untersuchung der ROS Produktion wurden 50000 BV2-Zellen bzw. 20000 Mikrogliazellen pro Well in 96-Well-Platten (High Content Imaging Plate with clear 127 µm Bottom, Corning, USA) ausgesät. Am nächsten Tag wurden 1 µg/ml LPS, 10 µM RR oder 100 µM Valdecoxib zu den Zellen pipettiert und diese weitere 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µM DCFH-DA für 1 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Fluoreszenz in einem Sunrise™ Plate Reader (TECAN, Männedorf, Switzerland) gemessen. Zur Hintergrundkontrolle wurde die Fluoreszenz einige Wells nur mit Zellen und/oder nur mit DCFH-DA Reagenz detektiert.

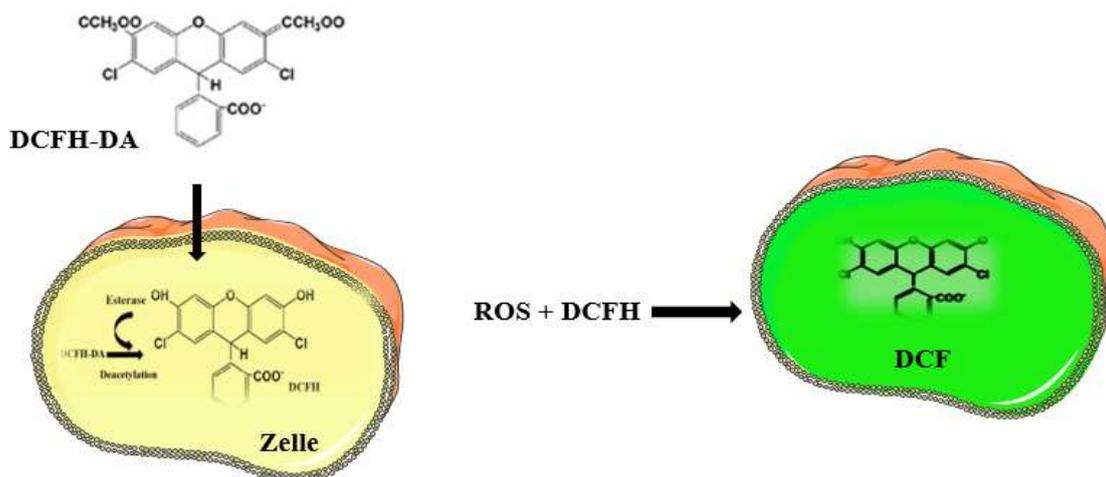


Abbildung 3.5: ROS-Assay. Nach Diffusion in die Zelle wird DCFH-DA durch zelluläre Esterasen zu nicht fluoreszierendem DCFH gespalten, das durch ROS zum fluoreszierenden 2', 7' -Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert wird.

3.9 Latex Beads Phagozytose Assay mit BV2-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die Phagozytoseaktivität der BV2-Zellen von Fluoreszenz-markierten Latex-Beads mit Hilfe des Durchflusszytometer Guava easyCyte 8HT der Firma Merck Millipore (3.9.1) bzw. in einen Sunrise™ Plate Reader (TECAN, Männedorf, Switzerland; 3.9.2) zu messen. Hierfür wurden Latex Beads (0,1 micron Partikelgröße), die mit Fluoreszenz-markierten Kaninchen-Immunglobulin G beschichtet sind (IgG FITC, Biomol

GmbH, Deutschland) verwendet. IgG Antikörper werden von FC γ Rezeptoren erkannt und die gekoppelten Beads von phagozytierenden Zellen internalisiert.

3.9.1 Phagozytosemessung mittels Durchflusszytometrie in BV2-Zellen

Der Begriff Durchflusszytometrie definiert ein Messverfahren, bei dem Zellsuspensionen in hohem Tempo einzeln in einer Kapillare an einem Lichtstrahl bestimmter Wellenlänge vorbeifließen. Die Eigenschaften einer jeden Zelle bezüglich Form, Struktur oder Intensität eines Fluoreszenzfarbstoffes können dabei detektiert und die Zahl der Zellen mit gleichen bzw. unterschiedlichen Eigenschaften quantifiziert werden. Das sogenannte Fluoreszenz-aktivierte Zellsortieren (FACS, engl. fluorescence-activated cell sorting) ermöglicht zudem Fluoreszenz-markierte Zellen aufgrund der entsprechenden Fluoreszenz zu abzutrennen und für weitere Untersuchungen zu verwenden. Die Parameter Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) werden bei dem Durchflusszytometer ausgewertet. Das Vorwärtsstreulicht geschieht mit dem Laserstrahl und zeigt die Zellgröße und ist abhängig vom Volumen der Zelle, da das Licht im flachen Winkel an der Zelle gebrochen wird. Das Seitwärtsstreulicht wird senkrecht zum Laserstrahl von einem Detektor gemessen und zeigt die Granularität der Zelle durch die Beugung des Lichts im rechten Winkel (Abb. 3.6). Wenn die zu untersuchenden Zellen zusätzlich mit fluoreszierenden Markern Zelltyp-spezifischer Strukturen markiert sind, können neben FSC und SSC auch die Emissionen dieser Fluoreszenzen detektiert und zur Charakterisierung bzw. Identifizierung verwendet werden (Abb. 3.6).

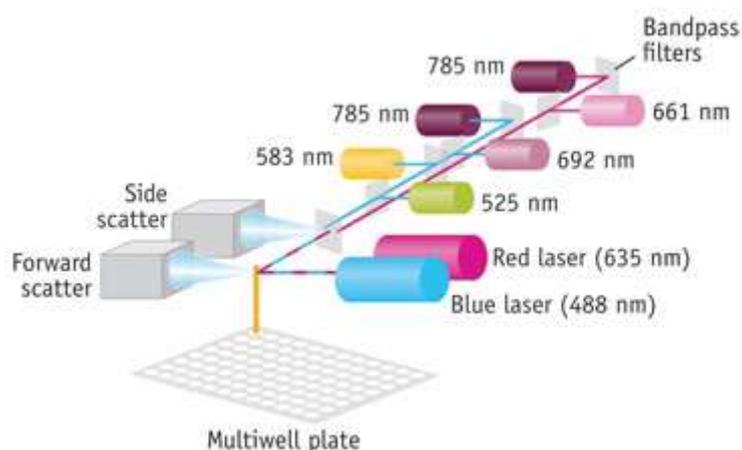


Abbildung 3.6: Durchflusszytometrie. Nach Absaugen der Fluoreszenz-markierten Zellen werden die Zellsuspensionen durch den Laserstrahl angeregt und die Signale durch einen Photomultiplier verstärkt und mittels einer Fotodiode detektiert (modifiziert nach Vorlagen von der Homepage von BioOptics World).

Material und Methoden

Die BV2 Zellen wurden zunächst mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst, welches durch Zugabe von frischem Medium mit 10% FKS inhibiert wurde. Die Zellen wurden mithilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und anschliessend 200000 Zellen pro Well in 24 Well-Platten für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit LPS (1 µg/ml) für 2 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit verschiedenen Pharmaka für 15 min und später mit den FITC-markierten Latex Beads (siehe oben) in einer 1:100 Verdünnung für 2 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert (Abb. 3.7).

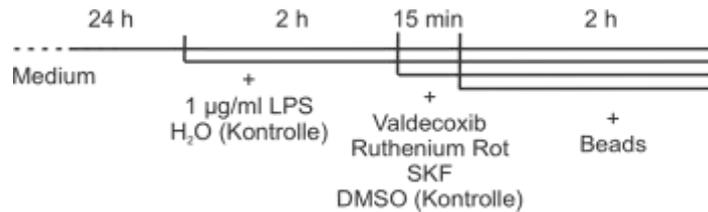


Abbildung 3.7: Die Behandlung der BV2 Zellen mit verschiedenen Pharmaka. 200000 Zellen wurden in 24 Well-Platten für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden mit Valdecoxib, RR, SKF und DMSO für 15 min und danach mit den FITC-markierten Latex Beads für 2 h inkubiert.

Die 24 Well-Platte wurde nach 2 h Inkubation mit den Beads mit dem Zellschaber abgeschabt und anschliessend bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert und mit Trypan Blau (im Latex-Beads Kit von Biomol mitgeliefert) behandelt um die Beads, die phagozytiert wurden von den Beads, die nur an der Oberfläche der Zellen haften zu unterscheiden. Trypan Blau löscht die extrazelluläre FITC Fluoreszenz (*Quenching*) der Beads. Danach wurden 250 µl der behandelten Zellen in jeweils ein Well der 96-Well Platte pipettiert. Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) wurden mithilfe des Guava ExpressPlus-Programms (Software guavaSoft 2.7) eingestellt (Abb. 3.8A). Hierzu wurden die BV2 Zellen markiert (Gating) und diese Zellpopulation ausgezählt. Anschließend wurden grüne Zellen durch 485 nm angeregt und die Emmission bei 535 nm detektiert. In jeder Messung wurden 5000 Zellen analysiert, mit der Guava ExpressPlus-Software quantifiziert und die Mittelwerte der grünen Zellen bestimmt. Die Auswertungen wurden mithilfe der FlowJo-V10 Software (FlowJo LLC) verarbeitet und der relative Anteil phagozytierender Zellen berechnet (Abb. 3.8B).

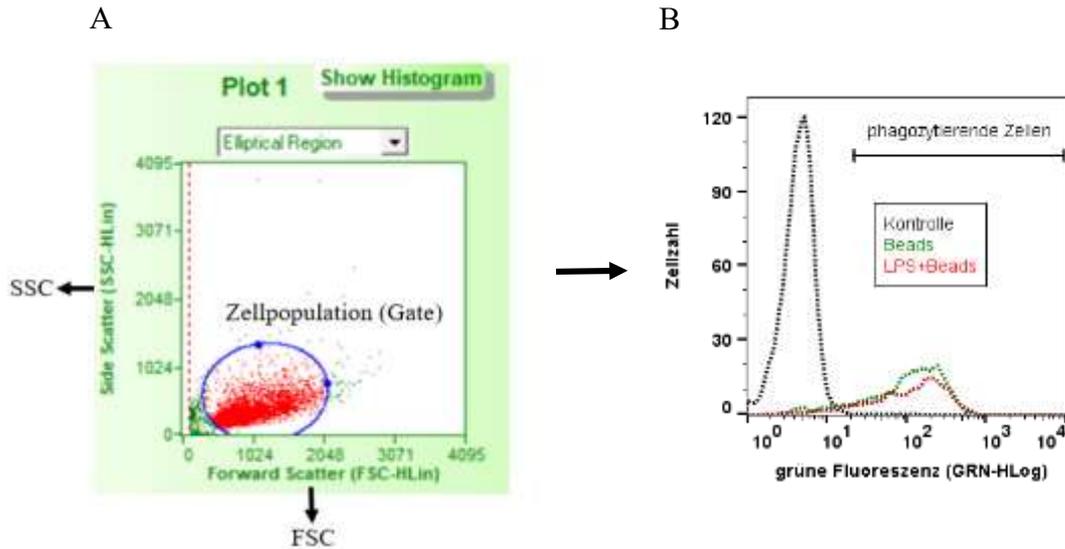


Abbildung 3.8: Guava ExpressPlus-Programm und FlowJo-V10 Software. (A) Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) wurden mithilfe des GuavaSoft 2.7 Software eingestellt. Die BV2 Zellen wurden markiert und als Gate gesetzt (Zellpopulation). (B) der relative Anteil phagozytierender Zellen wurde mithilfe der FlowJo-V10 Software bestimmt.

3.9.2 Phagozytosemessung mittels Plate Reader in BV2-Zellen

BV2-Zellen wurden am Tag vor dem Assay mit einer Zählkammer ausgezählt und zu 50000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte (*Hight Content Imaging Plate with clear 127 µm Bottom*, Corning, USA) ausplattiert. Danach wurden LPS (1 µg/ml), THC (30 µM), RR (10 µM), 2-APB (1 mM) und Cytochalasin D (5 µM) zusammen mit Beads (1:100 Verdünnung) zugesetzt. Nach 1, 2 und 6-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Zellen dreimal mit Assay Puffer (Biomol GmbH, Deutschland) gewaschen. Die Zellen wurden dann 1-2 Minuten mit Trypan Blau inkubiert (siehe oben). Die Fluoreszenz der Zellen wurde in einen Sunrise™ Plate Reader (TECAN, Männedorf, Switzerland) bei 535 nm nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 485 nm gemessen. Zur Hintergrundkontrolle wurden Wells ohne Zellen, nur mit Beads ohne weitere Waschschrte gemessen.

3.10 pHrodo® Phagozytose Assay

In einem weiteren Verfahren zur Messung der Phagozytoseaktivität von BV2- bzw. Mikrogliazellen wurden pHrodo® *E.coli* BioParticles® Konjugate (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) verwendet. Der Farbstoff pHrodo ist dabei mit *E.coli* Partikeln konjugiert. Das pH-abhängige Farbstoffkonjugat ist bei neutralem pH (7.4) außerhalb der Zelle nicht fluoreszent. Werden die Partikel von Zellen aufgenommen und in Lysosomen verpackt, in

denen ein saurer pH-Wert vorherrscht (etwa $\text{pH} = 5$), fluoreszieren sie orange (Abb. 3.9). Die Zellen wurden einen Tag vor der Durchführung des Assays in 96-Well-Platten (*High Content Imaging Plate with clear 127 μm Bottom*, Corning, USA) ausgesät, mit dem Ziel am Tag des Assays etwa 50000 BV2-Zellen und 20000 Mikrogliazellen pro Well zu haben. Verschiedene pharmakologisch wirksame Substanzen (10 μM RR, 30 μM THC, 100 μM Valdecoxib, 5 μM Cytochalasin D, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS) und 100 μl einer vorbereiteten pHrodo Suspension (1 mg/mL pHrodo gelöst in Badlösung (Tabelle 3.1)) wurden auf die Zellen gegeben und diese dann für 3 und 24 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Die Fluoreszenz der Zellen wurde in einen Sunrise™ Plate Reader (TECAN, Männedorf, Switzerland) bei 585 nm (orange) nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 560 nm gemessen. Zur Hintergrundkontrolle wurden ein paar Wells ohne Zellen, nur mit pHrodo oder nur mit RR gemessen. In allen Messungen wurde pHrodo als Hintergrundkontrolle von den Experimenten nicht abgezogen sondern nur dargestellt.

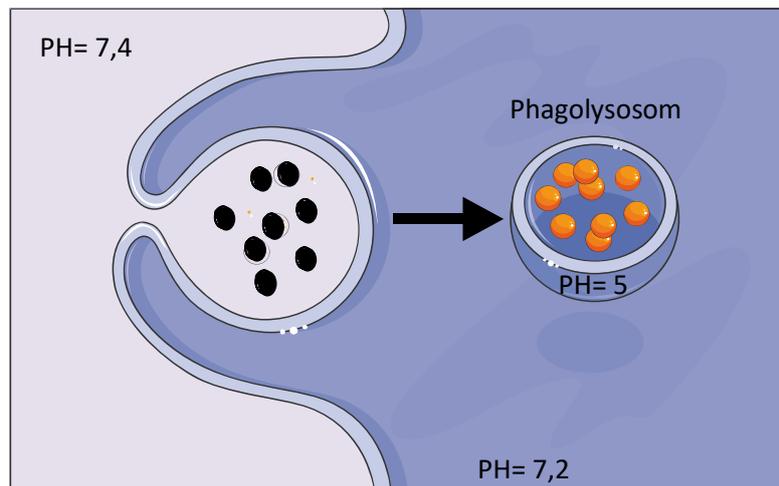


Abbildung 3.9: Phagozytose von pHrodo Red *E.coli* Biopartikeln. Der pH-sensitive pHrodo Farbstoff ist mit *E.coli* Partikel konjugiert. Partikel die in der Lösung bleiben oder unspezifisch an die Zellen gebunden haben, fluoreszieren aufgrund des neutralen pH-Werts der extrazellulären Umgebung nicht. Phagosomen verschmelzen mit Lysosomen zu Phagolysosomen, die einen sauren pH-Wert besitzen, wobei die pHrodo Partikel orange fluoreszieren.

3.11 Bestimmung der Zellviabilität von BV2-Zellen

Da im Phagozytose Assay die Zellen mit verschiedenen Substanzen behandelt wurden, die die Viabilität stark beeinträchtigen, wurde diese zusätzlich untersucht. Zur Bestimmung der Anzahl der lebenden Zellen in Proliferations- oder Zytotoxizitätstests wurde der CellTiter 96® Aqueous One Solution-Zellproliferationstest (Promega Corporation, Madison, USA) verwendet. Das CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagenz ist eine kolorimetrische

Methode und besteht aus 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS] und ein Elektronenkopplungsreagenz (Phenazinethosulfat; PES). MTS-Tetrazolium wird von lebenden Zellen zu farbigem Formazan bioreduziert. Formazan ist löslich im Kulturmedium und kann Licht einer Wellenlänge von 490 nm absorbieren. Diese Umwandlung wird durch NADPH oder NADH ausgelöst, Substanzen die von Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen produziert werden. Die Lösung wird zu Zellen hinzugegeben und Zeitabhängig wird MTS-Tetrazolium in Formazan umgewandelt. Die Menge an entstehendem Formazan ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. 20 µl des CellTiter 96® AQueous One Solution Reagenz wurden direkt zu 100 µl Kulturmedium mit 50000 Zellen gegeben und 1, 2 und 6 h in Anwesenheit von TRPV2-Agonisten wie 2-APB (1 mM), THC (30 µM) und Antagonist RR (10 µM) inkubiert und dann die Absorption bei 490 nm mithilfe eines 96-well-Plate Readers (Sunrise™, TECAN, Männedorf, Switzerland) gemessen.

3.12 Lösungen und pharmakologisch wirksame Substanzen

Alle Badlösungen (externe Lösungen) und Pipettenlösungen (interne Lösungen) für Ca²⁺ Imaging und Patch Clamp Experimente wurden nach Bedarf aus Stocklösungen hergestellt (Tabelle 3.1 und 3.2). Die Lösungen wurden mit NaOH bzw. CsOH auf pH 7,2 eingestellt und hatten eine Osmolarität zwischen 280 und 300 mOsm/L. Die Kombination von BAPTA und Ca²⁺ um 100 nM und 300 nM freies Ca²⁺ zu erhalten wurden mit Webmaxc Standard berechnet (<http://web.stanford.edu/~cpatton/webmaxcS.htm>).

Tabelle 3.1: Badlösungen (externe Lösung) für Patch Clamp und Ca²⁺ Imaging

	Stock (M)	Standard mit Ca ²⁺ (mM)	ohne Ca ²⁺ (0Ca) mM
NaCl	5	140	140
KCl	1	2,8	2,8
MgCl ₂	1	2	3
CaCl ₂	1	1	0
HEPES	1	10	10
Glukose	1	10	10

In einigen Lösungen wurde NaCl äquimolar durch Na-Aspartat oder NMDG-Cl ersetzt.

Tabelle 3.2: Pipettenlösung (interne Lösung) für Patch Clamp

	Stock (M)	0 Ca ²⁺	100 nM freies Ca ²⁺	300 nM freies Ca ²⁺
Cs-Glutamat	0,2	140	140	140
NaCl	5	8	8	8
MgCl ₂	1	1	1	1
Cs-BAPTA	1	10	10	10
CaCl ₂	1	0	3,1	5.7
HEPES	1	10	10	10

Für einige Experimente wurde Cs-Glutamat äquimolar durch K-Glutamat ersetzt.

Tabelle 3.3: Pharmakologische Substanzen

Substanz	Stocklösung	Quelle
1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG)	50 mM in DMSO	Sigma Aldrich
2-Aminoethoxydiphenylborat (APB)	400 mM in Methanol	Sigma Aldrich
2-Arachidonoylglycerol (2-AG)	50 mM in DMSO	Cayman, Biomol
4 α PDD	10 mM in DMSO	Sigma Aldrich
8-Br-cAMP	100 mM in H ₂ O _{entionisiert}	Sigma Aldrich
Adenosindiphosphoribose (ADPR)	100 mM in H ₂ O _{entionisiert}	Sigma Aldrich
Allylisothiocyanat (AITC)	100 mM in DMSO	Sigma Aldrich
AM251	100 mM in DMSO	Sigma Aldrich
Amilorid	100 mM in DMSO	Sigma Aldrich
Anandamid	100 mM in DMSO	Sigma Aldrich
Cannabidiol (CBD)	100 mM in DMSO	LGC Standards GmbH
Cytochalasin D	5 mM in DMSO	Thermo Fisher
DCFH-DA	20 mM in DMSO	Cayman, Biomol
GSK-1016790A	10 μ M in DMSO	Cayman, Biomol
GTP γ S	20 mM in DMSO	Sigma Aldrich
H ₂ O ₂	200 mM in H ₂ O _{entionisiert}	Sigma Aldrich
HC-067047	4 mM in DMSO	Sigma Aldrich
Insulin-like Growth Faktor 1 (IGF1)	10 μ M in H ₂ O _{entionisiert}	Sigma Aldrich
JTE907	100 mM in DMSO	Sigma Aldrich
L- α -Lysophosphatidylcholin (LPC)	10 mM in Methanol	Sigma Aldrich

Material und Methoden

Lipopolysaccharide (LPS)	5 mg/ml in H ₂ O _{ent} ionisiert	Sigma Aldrich
Pertussis Toxin (PTX)	100 µg/ml in DMSO	Sigma Aldrich
pHrodo	1 mg/ml in Badlösung	Thermo Fisher
Pregnenolonsulfat (PregS)	100 mM in DMSO	Sigma Aldrich
Probenecid	1 M in H ₂ O _{ent} ionisiert	Sigma Aldrich
Ruthenium Rot (RR)	10 mM in DMSO	Sigma Aldrich
Tiloron	20 mM in PBS	Sigma Aldrich
Tranilast	100 mM in DMSO	Sigma Aldrich
Valdecoxib	80 mM in DMSO	Cayman, Biomol
Δ ⁹ -Tetrahydrocannabinol (THC)	3 mM in DMSO	Prof. Meyer, Toxikologie, Homburg

Tabelle 3.4: Konzentrationen verwendeter TRPV2 Agonisten

Agonist	Spezies	Konzentration		Quelle
		verwendet	Literatur	
2-Aminoethoxydiphenylborat (APB)	mTRPV2	0,4 u. 1 mM	200 µM	(Iwata <i>et al.</i> , 2018)
	rTRPV2	-	EC ₅₀ 522 µM	(Gao <i>et al.</i> , 2016)
	hTRPV2	1 mM	300 µM	(Neeper <i>et al.</i> , 2007)
Δ ⁹ -Tetrahydrocannabinol (THC)	mTRPV2	10, 30 µM	10 µM	(Hassan <i>et al.</i> , 2014a)
	rTRPV2	-	EC ₅₀ 16 µM	(Neeper <i>et al.</i> , 2007)
	hTRPV2	10, 30 µM	EC ₅₀ 43 µM	(Neeper <i>et al.</i> , 2007)
Cannabidiol (CBD)	mTRPV2	1 mM	10 µM	(Hassan <i>et al.</i> , 2014a)
	rTRPV2	-	EC ₅₀ 3,7 µM	(Qin <i>et al.</i> , 2008)
	hTRPV2	0,1 0,3 u. 1 mM	EC ₅₀ 31,7 u. 22,2 µM	(Qin <i>et al.</i> , 2008) (Nabissi <i>et al.</i> , 2013)
Probenecid	mTRPV2	1 mM	100 µM	(Bang <i>et al.</i> , 2007) (Hassan <i>et al.</i> , 2014a)
	rTRPV2	-	EC ₅₀ 31,9 µM	(Bang <i>et al.</i> , 2007)
	hTRPV2	1 mM	-	-
Insulin-like Growth Faktor 1 (IGF1)	mTRPV2	10 nM	2 nM	(Kanzaki <i>et al.</i> , 1999)
L-α-Lysophosphatidylcholin (LPC)	mTRPV2	20 µM	10 µM	(Monet <i>et al.</i> , 2009)
	hTRPV2	20 µM	10 µM	(Monet <i>et al.</i> , 2009)

Tabelle 3.5: Konzentrationen verwendeter TRPV2 Antagonisten

Antagonist	Spezies	Konzentration		Quelle
		verwendet	Literatur	
Tranilast	mTRPV2	1 mM	75 μ M	(Mihara <i>et al.</i> , 2010)
	hTRPV2	1 mM	100 μ M	(Iwata <i>et al.</i> , 2018)
Ruthenium Rot (RR)	mTRPV2	10 μ M	10 μ M	(Hassan <i>et al.</i> , 2014a)
	rTRPV2	-	IC ₅₀ 22,7 μ M	(Neeper <i>et al.</i> , 2007)
	hTRPV2	10 μ M	IC ₅₀ 16,1 μ M	(Qin <i>et al.</i> , 2008)
Amilorid	mTRPV2	200 μ M	-	-
	rTRPV2	-	100 μ M	(McGahon <i>et al.</i> , 2016)

3.13 Auswertung, graphische Darstellung und Statistik

Die Patch Clamp Experimente wurden mit der Software PatchMaster bzw. FitMaster (HEKA) ausgewertet und die Daten (Strom bei -80 mV, Strom bei +80 mV, Zellkapazität und ausgewählte Strom-Spannungs-Kurven) exportiert und in IGOR Pro (WaveMetrics) weiterverarbeitet. Die Ca²⁺ Imaging Experimente wurden mithilfe der Software TILLvisION (TILL-Photonics) vorausgewertet, die Hintergrund-korrigierte Ratio F340/380 der einzelnen Zellen exportiert und in IGOR Pro weiterverarbeitet. Sowohl Patch Clamp als auch Imaging Abbildungen wurden in IGOR Pro erstellt. Dargestellte Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler (S.E.M.) und n gibt die Anzahl der gemittelten Zellen an. Für Imaging Experimente wurde angegeben, wieviel Zellen (n) aus wieviel unabhängigen Experimenten (x) gemittelt wurden (n/x). Die Daten der Phagozytose mittels Durchflusszytometrie wurden mithilfe der Software FlowJo-V10 (FlowJo LLC) verarbeitet. Daten des Tecan Plate Reader wurden als Excel Dateien gespeichert und in Excel ausgewertet und als Balkendiagramme dargestellt. Zur Überprüfung eines statistisch signifikanten Unterschiedes wurden Student's T-Test (Graph Pad Prism 5) für zwei Gruppen und One way-ANOVA mit Tukey-Test (Graph Pad Prism 5) für mehr als zwei Gruppen verwendet. Der Unterschied wurde als signifikant befunden, wenn der P-Wert <0,05 (*), <0,01 (**), oder <0,001 (***) war.

4 Ergebnisse

Transkriptomanalysen aus FACS-sortierten kultivierten kortikalen Mikrogliazellen der Maus haben gezeigt, dass im Vergleich zu anderen TRPs *Trpv2* sehr stark exprimiert ist (Abb. 4.1; (Malihpour, 2017)). Die Daten stammen aus Analysen von der Arbeitsgruppe um Dr. Andreas Beck an unserem Institut und wurden bisher lediglich in meiner Masterarbeit gezeigt (Malihpour, 2017).

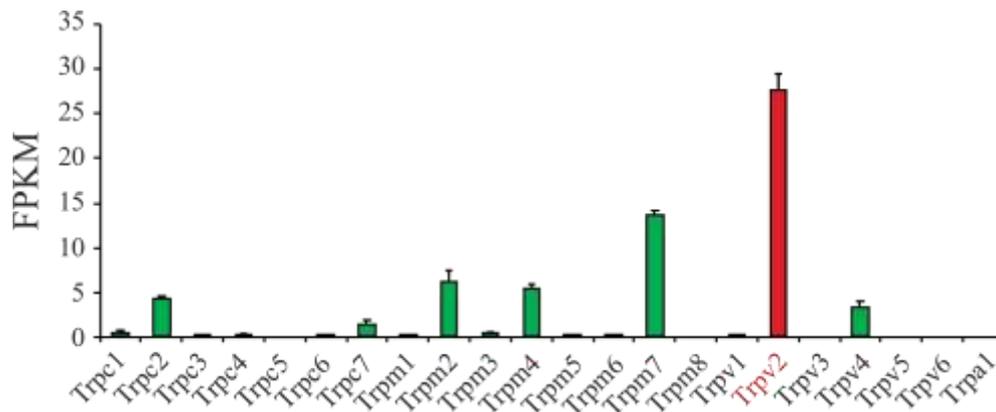


Abbildung 4.1: Transkripte von TRP Genen aus FACS-sortierten kultivierten kortikalen Mikrogliazellen der Maus. Die Höhe der Balken stellt die „fragments per kilobase of transcript per million mapped reads“ (FPKM) als Mittelwert \pm SEM aus drei RNA Sequenzierungen von drei unabhängigen FACS-sortierten Mikroglia-kulturen dar. (Nicht publizierte Transkriptomanalyse aus der Arbeitsgruppe Beck, Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes)

Im Folgenden sind die Ergebnisse der vorausgehend geschilderten Versuche dargestellt. Zu Beginn wurde eine funktionelle Charakterisierung von TRPV2 durch Patch Clamp Experimente und Ca^{2+} Imaging in Mikrogliazellen durchgeführt. Die Aktivierung von TRPV2 kann als Strom mithilfe der Whole Cell-Patch-Clamp-Technik gemessen werden. Hierfür wurde in allen dargestellten Patch Clamp Experimenten alle 2 s eine 400 ms lange Spannungsrampe von -100 mV bis 100 mV verwendet und der Einwärtsstrom bei -80 mV und der Auswärtsstrom bei +80 mV gegen die Zeit aufgetragen. Zwischen den Spannungsrampen wurde ein Haltepotential (V_h) von 0 mV angelegt. Es ist beschrieben, dass TRPV2-Kanäle Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle sind ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^{+}} = 1-3$) (Clapham, 2003). Daher wurden im Folgenden auch intrazelluläre Ca^{2+} Messungen unter Verwendung des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 als Detektionsmethode für die Aktivität von TRPV2 durchgeführt.

4.1 Funktionelle Charakterisierung von TRPV2 in Mikrogliazellen

In meiner Masterarbeit konnte ich bereits zeigen, dass TRPV2 Agonisten wie 2-APB, und THC Dosis-abhängig Ströme in Mikrogliazellen aktivieren (EC_{50} 2-APB 1,18 mM für den Auswärtsstrom und 1,26 mM für den Einwärtsstrom, EC_{50} THC 6,3 μ M für den Auswärtsstrom und 8,1 μ M für den Einwärtsstrom (Malihpour, 2017)). Die 2-APB-abhängigen Ströme in den Mikrogliazellen wurden dosisabhängig durch mehr oder weniger selektive TRPV2 Antagonisten wie Ruthenium Rot (RR) und Compound V (Valdecoxib, Michael Schäfer, Leipzig, bisher noch nicht als Antagonist publiziert) inhibiert (IC_{50} RR 121 nM für den Einwärtsstrom; IC_{50} Valdecoxib 2,0 μ M für den Einwärtsstrom und 7,2 μ M für den Auswärtsstrom).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung von TRPV2 in kultivierten kortikalen Mikrogliazellen der Maus Whole-cell patch clamp Experimente und Messungen zytosolischer Ca^{2+} Veränderungen durchgeführt. Als Kontrolle dienten Mikrogliazellen, die aus heterozygoten (TRPV2^{+/-}) bzw. homozygoten (TRPV2^{-/-}) TRPV2-defizienten Mäusen isoliert wurden.

4.1.1 Mikroglia Stimulation mit möglichen TRPV2 Agonisten und Antagonisten

Abbildung 4.2A zeigt, dass 1 mM 2-APB, ein Agonist von Maus TRPV2, einen Ein- und Auswärtsstrom in kultivierten kortikalen Mikrogliazellen der Maus aktiviert, der in Mikrogliazellen aus heterozygoten TRPV2^{+/-} Mäusen deutlich reduziert war und in Mikrogliazellen aus homozygoten TRPV2-defizienten (TRPV2^{-/-}) Mäusen gänzlich fehlte. Abbildungen 4.2B zeigt die Strom-Spannungs-Kurven der maximalen Netto-Ströme (netto) während der Applikation von 1 mM 2-APB. Der 2-APB-induzierte Strom wies den für TRPV2 typischen Stromspannungsverlauf auf. Abbildung 4.2C zeigt die Strom-Spannungs-Kurven nach Einbruch in die Zellen (schwarz) und vor Beginn der Applikation (rot). Neben dem 2-APB-induzierten Strom wiesen die kultivierten Mikrogliazellen auch eine 2-APB (1 mM) - abhängigen zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg auf, der in Mikrogliazellen aus TRPV2^{+/-} und TRPV2^{-/-} Mäusen deutlich geringer ausfiel (Abb. 4.2D).

Um zu überprüfen, ob extrazelluläres Chlorid einen Einfluss auf den 2-APB-vermittelten Strom in den Mikrogliazellen hatte wurde extrazellulär NaCl äquimolar durch Na-Aspartat ersetzt. Dabei konnte keine Veränderung des 2-APB-induzierten Stromes über die Zeit sowie der Stromspannungsabhängigkeit festgestellt werden (Abb. 4.2E, F).

Ergebnisse

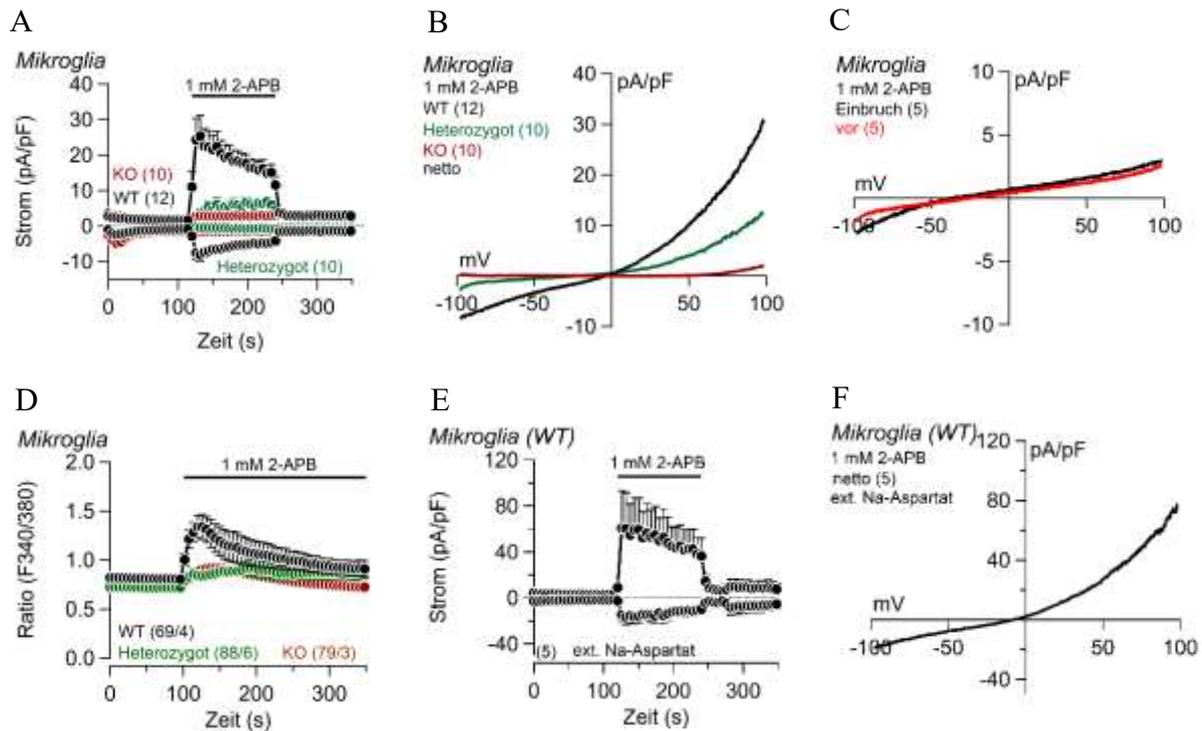
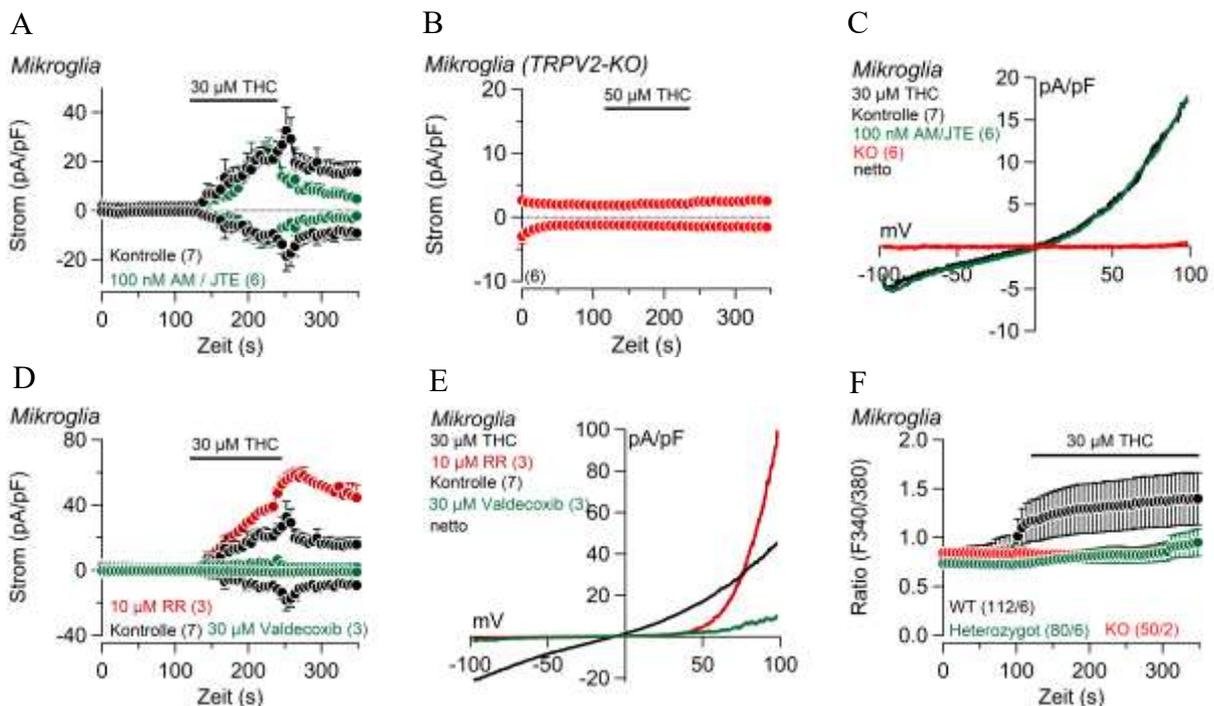


Abbildung 4.2: 2-APB-induzierte Ströme und Ca^{2+} Signale in Mikrogliazellen der Maus. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 1 mM 2-APB (A, E) sowie zytosolische Ca^{2+} Konzentrationen (Fura-2 Ratio F340/F380) vor und während der Applikation, von 1 mM 2-APB (D) in Mikrogliazellen isoliert aus Wildtyp (WT; A, D, E), heterozygoten $\text{TRPV2}^{+/-}$ (Heterozygot; A, D) und homozygoten $\text{TRPV2}^{-/-}$ (KO; A, D) Mäusen. (B, F) Strom-Spannungskurven (IVs) der maximalen 2-APB-induzierten Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in A bzw. E. In E wurde extrazelluläres NaCl äquimolar durch Na-Aspartat ersetzt. (C) IVs des Initialstroms (Einbruch) und vor Beginn der Applikation (vor) in Wildtyp Mikrogliazellen. Balken in A, D und E markieren den Zeitraum der Applikation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für Strom und Ca^{2+} -Signale über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben, wobei für Ca^{2+} Messungen n Zellen aus x Experimenten (n/x) gemittelt wurden.

Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, ein weiterer beschriebener Aktivator von Maus TRPV2, führte ebenfalls zu einem signifikanten Ein- und Auswärtsstrom in den kultivierten Mikrogliazellen der Maus (Abb. 4.3A, C). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Mikrogliazellen CB_1 und CB_2 Cannabinoidrezeptoren besitzen (Cabral und Marciano-Cabral, 2005) und THC ist ein Agonist für CB_1 und CB_2 -Rezeptoren (Stella, 2009). Im Folgenden sollte überprüft werden ob die Cannabinoidrezeptoren einen Einfluss auf den THC-induzierten TRPV2 Strom in Mikroglia haben. Hierzu wurden die CB_1 und CB_2 Inhibitoren AM251 (100 nM) und JTE907 (100 nM) in die Badlösung hinzugegeben. Der TRPV2 Strom war nicht abhängig von der Aktivierung eventuell vorhandener Cannabinoidrezeptoren (CB_1 bzw. CB_2), da die Inkubation der

Ergebnisse

Mikrogliazellen mit AM251 und JTE907 keinen Einfluss auf den THC-induzierten Strom hatte (Abb. 4.3A, C). Genau wie der 2-APB-induzierte Strom trat auch der THC-induzierte Strom in Mikrogliazellen aus TRPV2-defizienten Mäusen nicht auf (Abb. 4.3 B, C). Der THC-induzierte Strom wurde durch den noch nicht publizierten TRPV2 Inhibitor Valdecoxib, einem Arzneistoff aus der Gruppe der Cyclooxygenase-2-Hemmer, komplett gehemmt (Abb. 4.3D, E; grün). Ruthenium Rot (RR), ein nicht-selektiver TRPV2 Inhibitor, hemmte potentialabhängig den THC-induzierten Einwärts- aber nicht den Auswärtsstrom (Abb. 4.3D, E; rot). Wie bei Applikation von 2-APB führte auch 30 μM THC zu einem zytosolischen Ca^{2+} Anstieg in den Mikrogliazellen aus Wildtyp Mäusen, der bei Mikrogliazellen aus TRPV2^{+/-} und TRPV2^{-/-} Mäusen so gut wie nicht vorhanden war (Abb. 4.3F). Wie in meiner Masterarbeit (Malihpour, 2017) gezeigt, führte Cannabidiol (CBD) zu keinem signifikanten Strom in Mikrogliazellen der Maus und in HEK293 Zellen, die Maus TRPV2 heterolog exprimieren. Abbildung 4.3G zeigt, dass 1 mM CBD in den kultivierten Mikrogliazellen der Maus im Vergleich zu 2-APB oder THC lediglich zu einem geringen zytosolischen Ca^{2+} Anstieg führt.



G

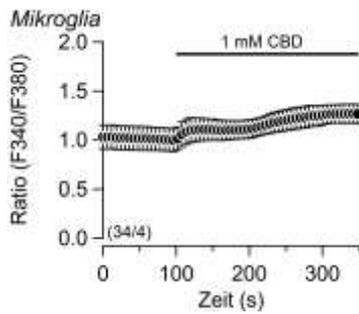


Abbildung 4.3: THC-induzierte Ströme in Abwesenheit und Anwesenheit von TRPV2-Antagonisten und Ca^{2+} Signale in Mikrogliazellen der Maus. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 30 μ M THC in Gegenwart von AM251 und JTE907 (A) bzw. Ruthenium Rot (RR) und Valdecoxib (D) in Mikrogliazellen isoliert aus Wildtyp Mäusen, und 50 μ M THC in Mikrogliazellen aus TRPV2^{-/-} Mäusen (TRPV2-KO; B). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der

maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in A (C) und in D (E). Zytosolische Ca^{2+} Konzentrationen (Fura-2 Ratio F340/F380) vor und während der Applikation von 30 μ M THC in Mikrogliazellen isoliert aus Wildtyp (WT), TRPV2^{+/-} (heterozygot) und TRPV2-KO (KO) Mäusen (F), und 1 mM Cannabidiol (CBD) in Mikrogliazellen aus Wildtyp Mäusen (G). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben, wobei für Ca^{2+} Messungen n Zellen aus x Experimenten (n/x) gemittelt wurden.

Während der Präparation der drei Genotypen Wildtyp, TRPV2^{+/-} und TRPV2^{-/-}, konnte festgestellt werden, dass die neugeborenen TRPV2^{+/-} und TRPV2^{-/-} Mäuse kleiner waren als die gleichaltrigen Wildtyp Mäuse. Die Gewichtsanalyse an Tag 3 ergab ein signifikant geringeres Gewicht der TRPV2^{+/-} und TRPV2^{-/-} Mäuse gegenüber den Wildtyp Mäusen, wobei heterozygote und homozygote TRPV2-defiziente Neugeborene an Tag 3 gleich schwer waren (Abb. 4.4).

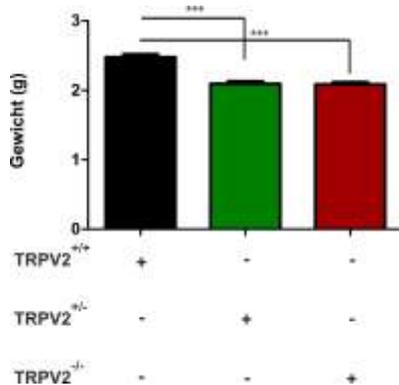


Abbildung 4.4: Gewichtsanalyse neugeborener Mäuse an Tag 3. Körpergewicht (in g) von neugeborenen Wildtyp, TRPV2^{+/-} und TRPV2^{-/-} Mäusen. Die Daten stellen Mittelwerte + s.e.m. aus jeweils 7 gewogenen Mäusen dar (***) p<0.001).

Neben den als TRPV2 Inhibitoren publizierten Ruthenium Rot und Tranilast wurde auch Amilorid, ein Blocker des epithelialen Natriumkanals (ENaC) in Nierentubulusepithelzellen, als nicht-selektiver Antagonist für TRPV2 beschrieben (McGahon *et al.*, 2016). Die Inkubation mit 200 μ M Amilorid für mindestens 15 min hatte jedoch keinen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf, die Stromamplitude und den Verlauf der Stromspannungskurve des 2-APB-induzierten Stromes in den Mikrogliazellen (Abb. 4.5A). Auch auf den 2-APB-induzierten

Ergebnisse

Strom in Maus TRPV2 (mTRPV2) exprimierenden HEK293 Zellen hatte Amilorid keinen hemmenden Effekt (Abb. 4.5B). Dipyridamol, ein Phosphodiesterasehemmer und Inhibitor des Adenosintransports, blockiert Ca^{2+} Signale in glatten Muskelzellen von Blutgefäßen (Saino *et al.*, 2008), von denen berichtet wird, dass sie funktionelle TRPV2 Kanäle besitzen (Muraki *et al.*, 2003). Um zu überprüfen ob die Blockade der Ca^{2+} Signale möglicherweise über die Hemmung von TRPV2 funktioniert, wurden Mikrogliazellen in Anwesenheit von 50 μM Dipyridamol mit 2-APB stimuliert. Der 2-APB-aktivierte Strom in den Mikrogliazellen wurde jedoch durch Dipyridamol nicht beeinflusst (Abb. 4.5C).

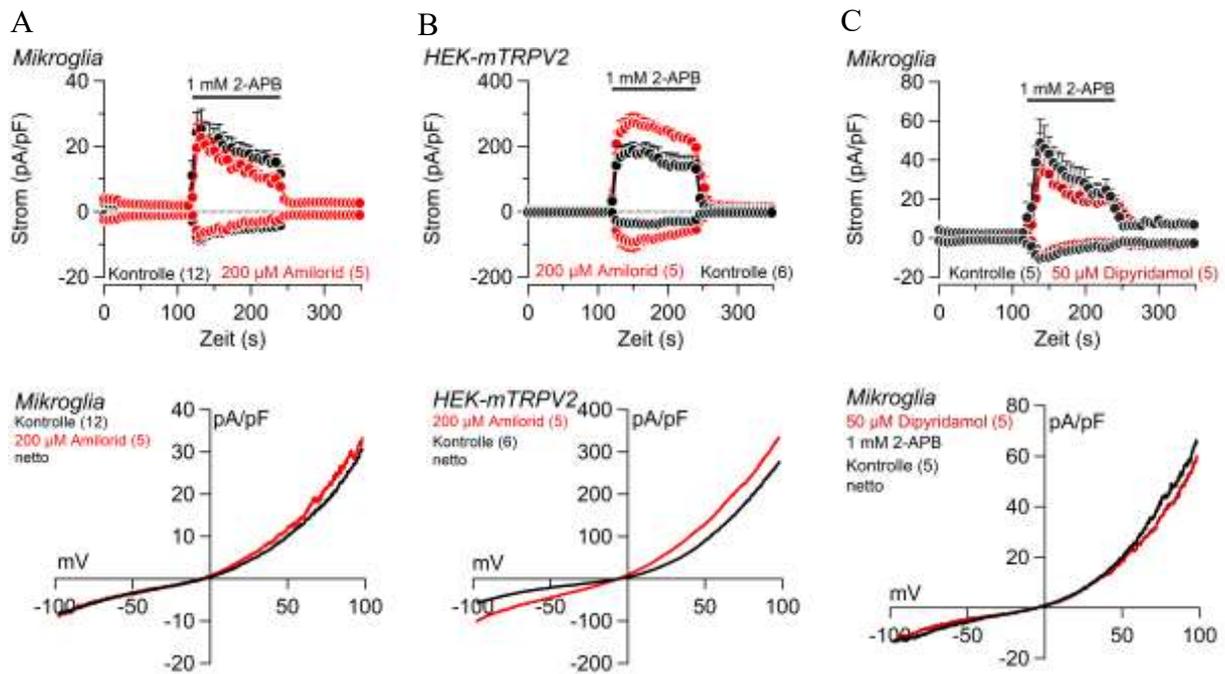


Abbildung 4.5: Effekt von Amilorid und Dipyridamol auf 2-APB-induzierte Ströme in Mikroglia bzw. HEK-mTRPV2-Zellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 1 mM 2-APB in Mikrogliazellen (A, C) und in HEK-mTRPV2-Zellen (B) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von 200 μM Amilorid (A, B) bzw. 50 μM Dipyridamol (C). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungskurven der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) bei Applikation von 2-APB sind jeweils darunter dargestellt. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

Im Gegensatz zu Amilorid konnte die Inkubation mit 50 μM Tiloron, den 2-APB-induzierten Strom in den Mikrogliazellen signifikant reduzieren (Abb. 4.6A). Dabei fiel auf, dass zwar der Auswärtsstrom komplett inhibiert war, jedoch ein zusätzlicher Einwärtsstrom durch 2-APB in Anwesenheit von Tiloron in den Mikrogliazellen auftrat (Abb. 4.6A). Um zu überprüfen ob

Ergebnisse

dieser abhängig war von TRPV2 wurde dasselbe Experiment in TRPV2-defizienten Mikrogliazellen durchgeführt. Hier induzierte die Applikation von 2-APB in Anwesenheit von Tiloron lediglich einen kleinen Auswärtsstrom (Abb. 4.6B). Wie in den Mikrogliazellen aus Wildtyp Mäusen wurde der 2-APB-abhängige Auswärtsstrom in mTRPV2-exprimierenden HEK293 Zellen in Anwesenheit von 50 μM Tiloron inhibiert, wohingegen der Einwärtsstrom potenziert wurde (Abb. 4.6C). Die Experimente weisen darauf hin, dass Tiloron, wie Ruthenium Rot, potentialabhängig TRPV2 moduliert. Während Ruthenium Rot allerdings den Einwärtsstrom inhibiert und den Auswärtsstrom verstärkt (Abb. 4.3D, E), inhibiert Tiloron den Auswärts- und verstärkt den Einwärtsstrom (Abb. 4.6). Tiloron ist ein antivirales Medikament, welches die Produktion von Interferonen aktiviert, und wie Valdecoxib von der Arbeitsgruppe Michael Schäfer in Leipzig als TRPV2 Inhibitor neu identifiziert und noch nicht publiziert wurde.

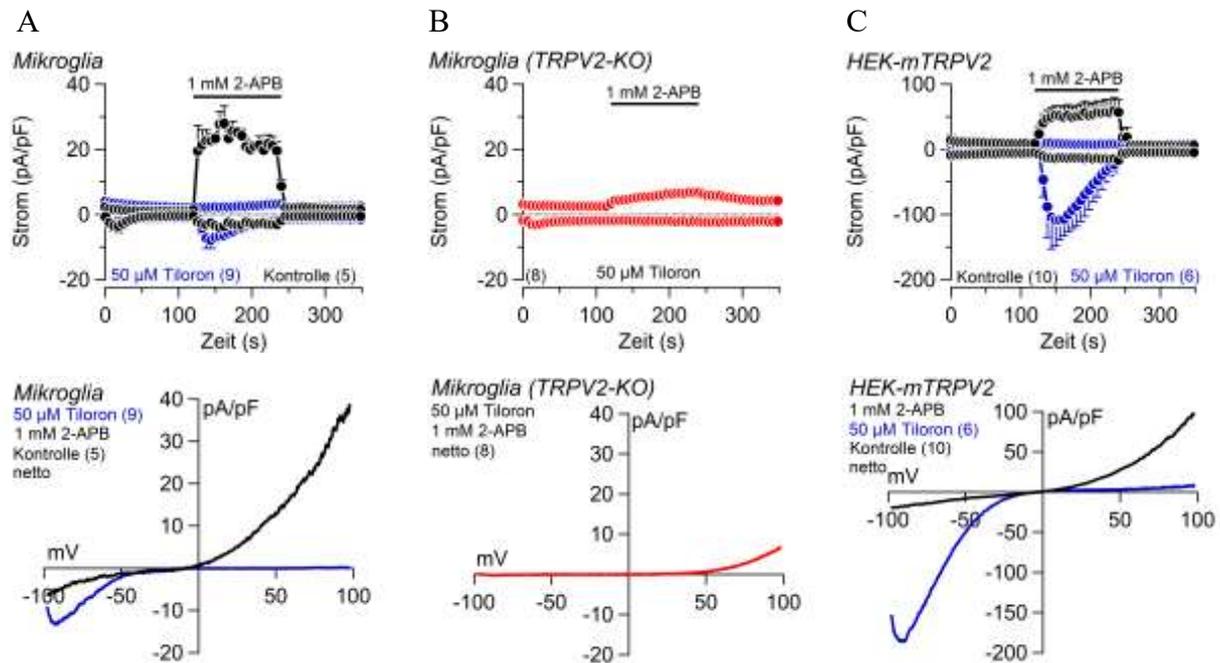


Abbildung 4.6: Effekt von Tiloron auf den 2-APB-induzierten TRPV2 Strom. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 1 mM 2-APB in Mikrogliazellen aus Wildtyp (A) und TRPV2^{-/-} (TRPV2-KO) Mäusen (B) sowie in HEK-mTRPV2-Zellen (C) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Tiloron. Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) bei Applikation von 2-APB sind jeweils darunter dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

Die hier dargestellten Experimente zeigen, wie auch schon die Experimente in meiner Masterarbeit (Malihpour, 2017), dass kultivierte Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus funktionelle TRPV2 Kanäle exprimieren, deren pharmakologische Eigenschaften den Eigenschaften von Maus TRPV2 heterolog exprimiert in HEK293 Zellen entsprechen.

4.1.2 Stimulation der Mikrogliazellen mit IGF1

In einer der ersten Arbeiten zu TRPV2 wurde beschrieben, dass IGF1 über die Stimulation des IGF1 Rezeptors aktive TRPV2 Kanäle in die Plasmamembran von CHO Zellen transloziert (Kanzaki *et al.*, 1999). Daher wurde TRPV2 zunächst als wachstumsfaktorregulierter Kanal (*growth factor regulated channel*, GRC) bezeichnet. In den folgenden Experimenten sollte dieser Aktivierungsmechanismus auch für Mikrogliazellen untersucht werden. Doch weder führte die Applikation von 10 nM IGF1 zu einer Aktivierung eines Stromes (Abb. 4.7A, D) noch zu einem intrazellulären Ca^{2+} Anstieg (Abb. 4.7B) in den kultivierten Mikrogliazellen der Maus, noch wurde der 2-APB-induzierte Strom durch Inkubation mit IGF1 (10 nM für mindestens 15 min) signifikant beeinflusst (Abb. 4.7C, D).

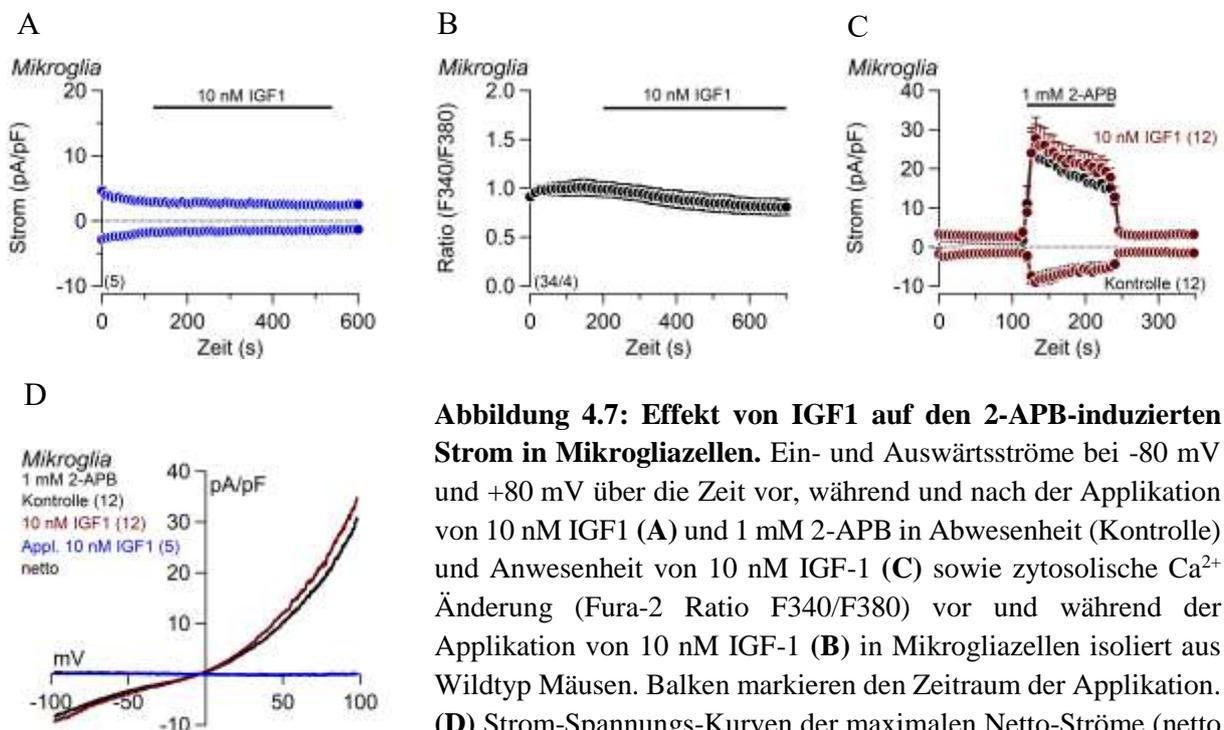


Abbildung 4.7: Effekt von IGF1 auf den 2-APB-induzierten Strom in Mikrogliazellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 10 nM IGF1 (A) und 1 mM 2-APB in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von 10 nM IGF-1 (C) sowie zytosolische Ca^{2+} Änderung (Fura-2 Ratio F340/F380) vor und während der Applikation von 10 nM IGF-1 (B) in Mikrogliazellen isoliert aus Wildtyp Mäusen. Balken markieren den Zeitraum der Applikation. (D) Strom-Spannungskurven der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) bei der Applikation

von IGF1 und 2-APB in A bzw. C. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben, wobei für die Ca^{2+} Messungen in B n Zellen aus x Experimenten (n/x) gemittelt wurden.

Ergebnisse

Auch in HEK293 Zellen, die transient heterolog Maus TRPV2 exprimieren (HEK-mTRPV2) führte die Applikation von 10 nM IGF1 nicht zu einer eindeutigen Aktivierung von TRPV2 (Abb. 4.8A, C). Allerdings kam es im Verlauf der Stimulation mit IGF1 zu einem kleinen Anstieg des Auswärtsstromes, was aber auch in HEK293 Zellen geschah, die kein TRPV2 exprimierten (siehe Appendix Abb. 6.5A). Wie in Mikrogliazellen hatte die Inkubation mit 10 nM IGF1 keinen Einfluss auf den 2-APB-induzierten Strom in mTRPV2-exprimierenden HEK293 Zellen (Abb. 4.8B, C).

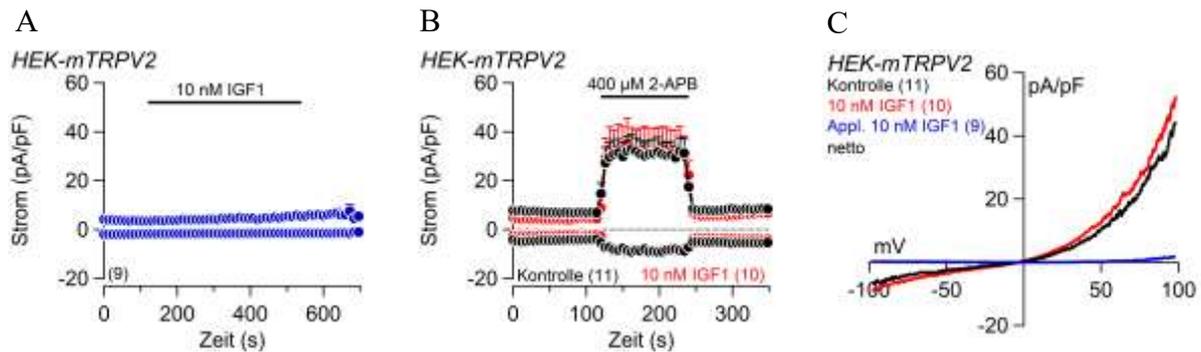


Abbildung 4.8: Effekt von IGF1 auf den 2-APB-induzierten Strom in mTRPV2-exprimierenden HEK293-Zellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 10 nM IGF-1 (A) bzw. 400 μ M 2-APB in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von 10 nM IGF1 (B) in mTRPV2-exprimierenden HEK293-Zellen (HEK-mTRPV2). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. (C) Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) bei Applikation von IGF1 bzw. 2-APB in A bzw. B. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

Das Medium zur Kultivierung der Mikrogliazellen enthält fetales Kälberserum, das unter anderem auch Wachstumsfaktoren enthält (Invitrogen), die möglicherweise einen Einfluss auf die TRPV2 Expression bzw. TRPV2 Proteinmenge in der Plasmamembran haben. Aber auch die Applikation von 10% FKS führte zu keinem Anstieg des zellulären Stromes in den kultivierten Mikrogliazellen der Maus (Abb. 4.9A). Um zu überprüfen, ob während der Kultivierung der Mikrogliazellen die Anwesenheit von FKS mit eventuell enthaltenden Wachstumsfaktoren zu einer Erhöhung der Anzahl von TRPV2 Kanälen in der Plasmamembran der Zellen führte wurden als nächstes die Mikrogliazellen für 24 h in FKS-freiem Medium inkubiert. Auch hier konnte weder die Applikation von 10 nM IGF1 einen Strom induzieren (Abb. 4.9B), noch wurde der 2-APB-induzierte Strom durch die Anwesenheit (Präinkubation mindestens 15 min) von 10 nM IGF1 beeinflusst (Abb. 4.9C).

Ergebnisse

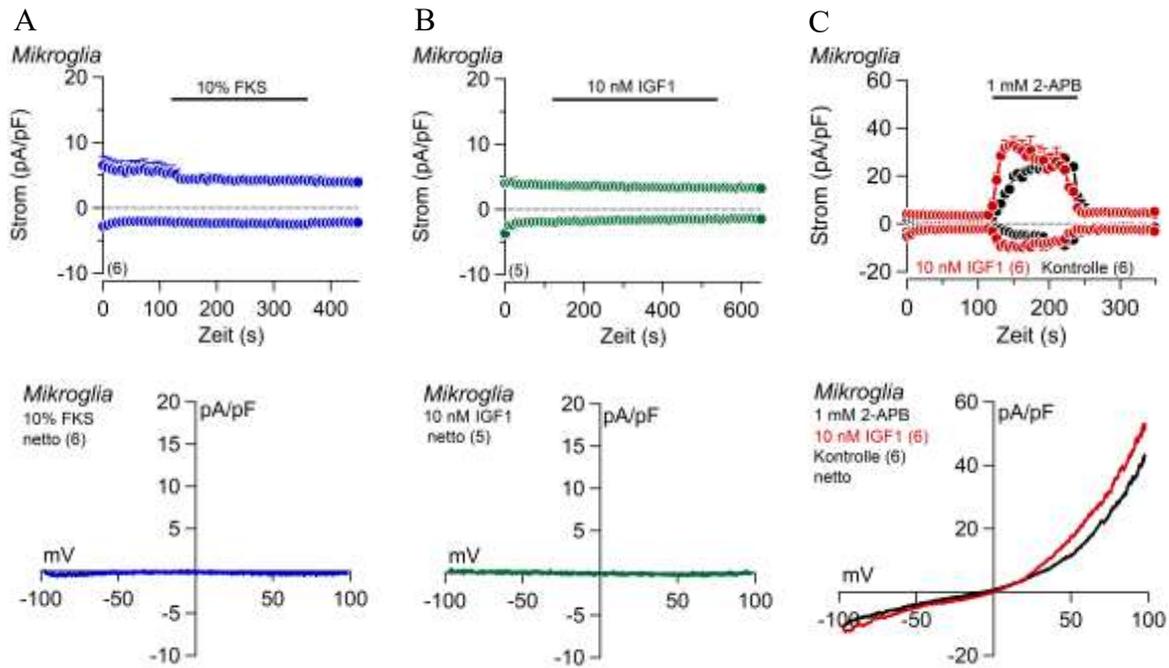


Abbildung 4.9: Effekt von FKS auf 2-APB-induzierte Ströme in Mikrogliazellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 10% FKS (A) und 10 nM IGF1 (B) sowie 1 mM 2-APB in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von IGF1 (C) in Mikrogliazellen der Maus nach 24 h in Kultur ohne FKS. Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in 10% FKS, IGF1 bzw. 2-APB sind jeweils darunter gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

4.1.3 2-APB-induzierte TRPV2 Ströme in LPS-aktivierten Mikrogliazellen

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und vermag Mikrogliazellen effektiv zu aktivieren. Die LPS-induzierte Aktivierung der Mikrogliazellen führt zu morphologischen Veränderungen und Veränderungen in der Genexpression sowie in der Expression von Proteinen. Im Folgenden wurden Mikrogliazellen mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS für verschiedene Zeitpunkte inkubiert und 2-APB zur Aktivierung von TRPV2 in Patch Clamp Experimenten appliziert. Abbildung 4.10 zeigt, dass die Amplitude der 2-APB-induzierten Ströme nach 1 h Inkubation mit LPS ein Maximum erreicht, dann bis 4 h in LPS wieder abnimmt, bevor sie langsam bis 24 h Inkubation mit LPS wieder ansteigt. Wie schon in anderen Arbeiten beschrieben (z.B. (Beck *et al.*, 2008)) ändert sich nicht nur die Morphologie (siehe 2.2 und Abb. 2.1), sondern auch die Größe der Mikrogliazellen nach Inkubation mit LPS, repräsentiert durch die Fläche der Mikrogliazellmembran (Picofarad, pF) (Abb. 4.10C, rot).

Wie für alle Experimente in dieser Arbeit wurde der Strom auch hier als Stromdichte, d.h. normalisiert auf die Größe der Zellen (pA/pF), dargestellt.

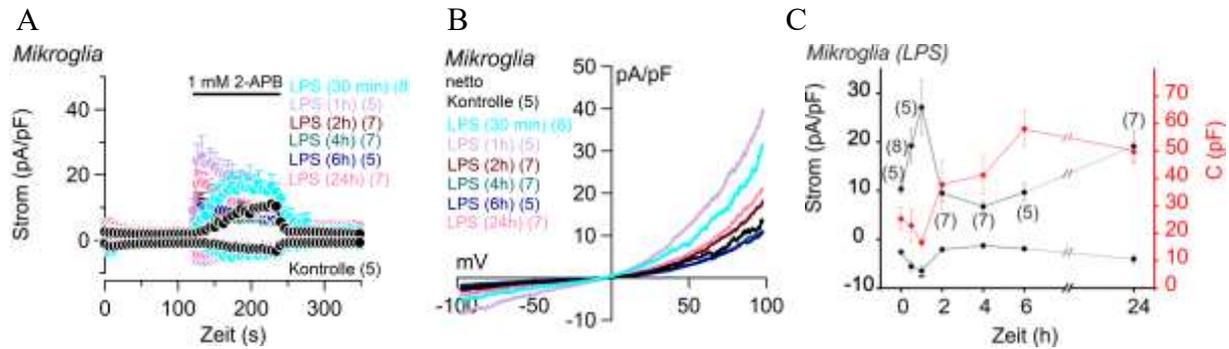


Abbildung 4.10: 2-APB-induzierte TRPV2 Ströme in LPS-aktivierten Mikrogliazellen. (A) Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 1 mM 2-APB 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h nach Inkubationsbeginn mit 1 μ g/ml LPS (Kontrolle ohne LPS). (B) Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen 2-APB-induzierten Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in A. (C) Maximale Stromamplituden (links, schwarz) bei -80 mV und $+80$ mV sowie Zellgröße (Kapazität C in pF, rechts, rot) dargestellt über die LPS Inkubationszeit aus den Experimenten in A. Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für A und C und ohne SEM für die IVs in B. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

Die Experimente weisen darauf hin, dass TRPV2 nach Stimulation mit LPS in den Mikrogliazellen hochreguliert wird.

4.1.4 Stimulation der Mikroglia mit Endocannabinoiden

Diverse Cannabinoide wie THC und CBD aktivieren Maus TRPV2. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob auch endogene Cannabinoide (Endocannabinoide) wie Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) einen aktivierenden Einfluss auf TRPV2 haben.

Anandamid aktivierte weder in Mikrogliazellen noch nach heterologer Transfektion von mTRPV2 in HEK293 Zellen in einer Konzentration von 200 bzw. 100 μ M einen signifikanten Strom (Abb. 4.11A, B).

Ergebnisse

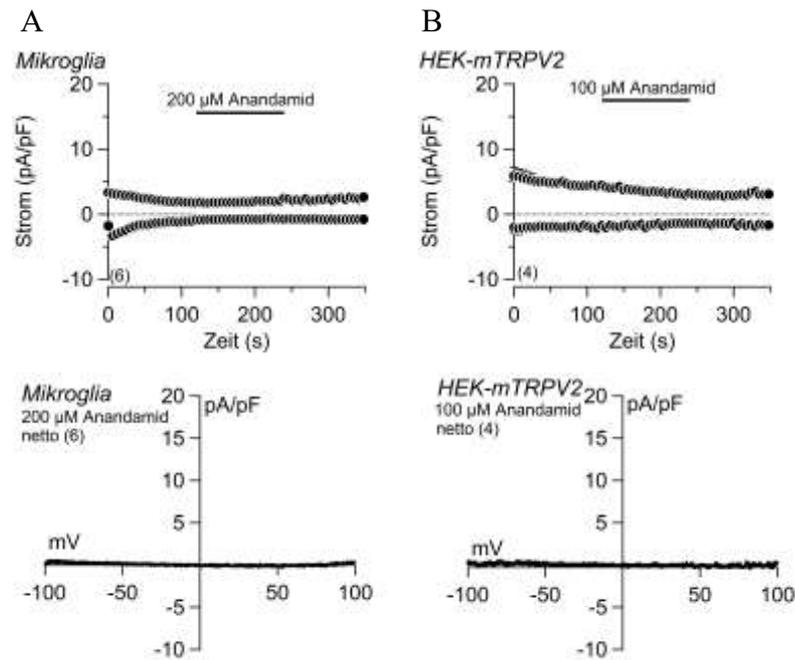


Abbildung 4.11: Kein Effekt von Anandamid auf Mikrogliazellen und mTRPV2-exprimierende HEK293-Zellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 200 µM Anandamid in Mikrogliazellen (A) bzw. 100 µM Anandamid in HEK-mTRPV2-Zellen (B). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in Anandamid sind jeweils darunter gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass 2-AG über die Beeinflussung von Mikrogliazellen neuroprotektiv wirkt und zu einer Abnahme der Anzahl beschädigter Neuronen nach exzitotoxischer Läsion in organotypischen Hippocampus-Schnittkulturen (OHSC) führt (Hohmann *et al.*, 2019). Dabei hatte 2-AG Auswirkungen auf die Morphologie, NO-Produktion und Migration der Mikrogliazellen. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass 2-AG die Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂ aktiviert (Jalin *et al.*, 2015), wobei 2-AG-aktivierte CB₂-Rezeptoren zur Proliferation von Mikrogliazellen aus der Ratte beitragen können (Carrier *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu Anandamid induzierte 2-AG Dosis-abhängig einen signifikanten Ein- und vor allem Auswärtsstrom in Mikrogliazellen aus Wildtyp Mäusen, der allerdings auch in TRPV2-defizienten (KO) Mikrogliazellen, nicht jedoch in HEK-mTRPV2 Zellen auftrat (Abb. 4.12A, B, C). Neben dem Strom induzierte 300 µM 2-AG auch einen zytosolischen Ca²⁺ Anstieg der sowohl in Mikrogliazellen aus Wildtyp als auch aus TRPV2-defizienten Mäusen

Ergebnisse

zu detektieren war (Abb. 4.12D). Die Experimente weisen darauf hin, dass der 2-AG-induzierte Strom nicht von TRPV2 abhängt und in Mikroglia, nicht aber in HEK293 vorkommt.

In einem weiteren Experiment wurden die Mikrogliazellen mindestens 10 Minuten mit 100 μM 2-AG inkubiert und dann Patch-Clamp-Experimente durchgeführt. Abbildung 4.12E zeigt, dass nach dem Einbruch in die Zellen (Beginn Whole-cell Experiment) sich ein Strom über die Zeit entwickelte, der vor dem Einbruch, also in der intakten Zelle, bzw. direkt nach dem Einbruch noch nicht vorhanden war. Dieser Strom scheint sich erst während bzw. nachdem die Pipettenlösung in die Zelle diffundiert und das Zytosol ausgewaschen wird zu entwickeln.

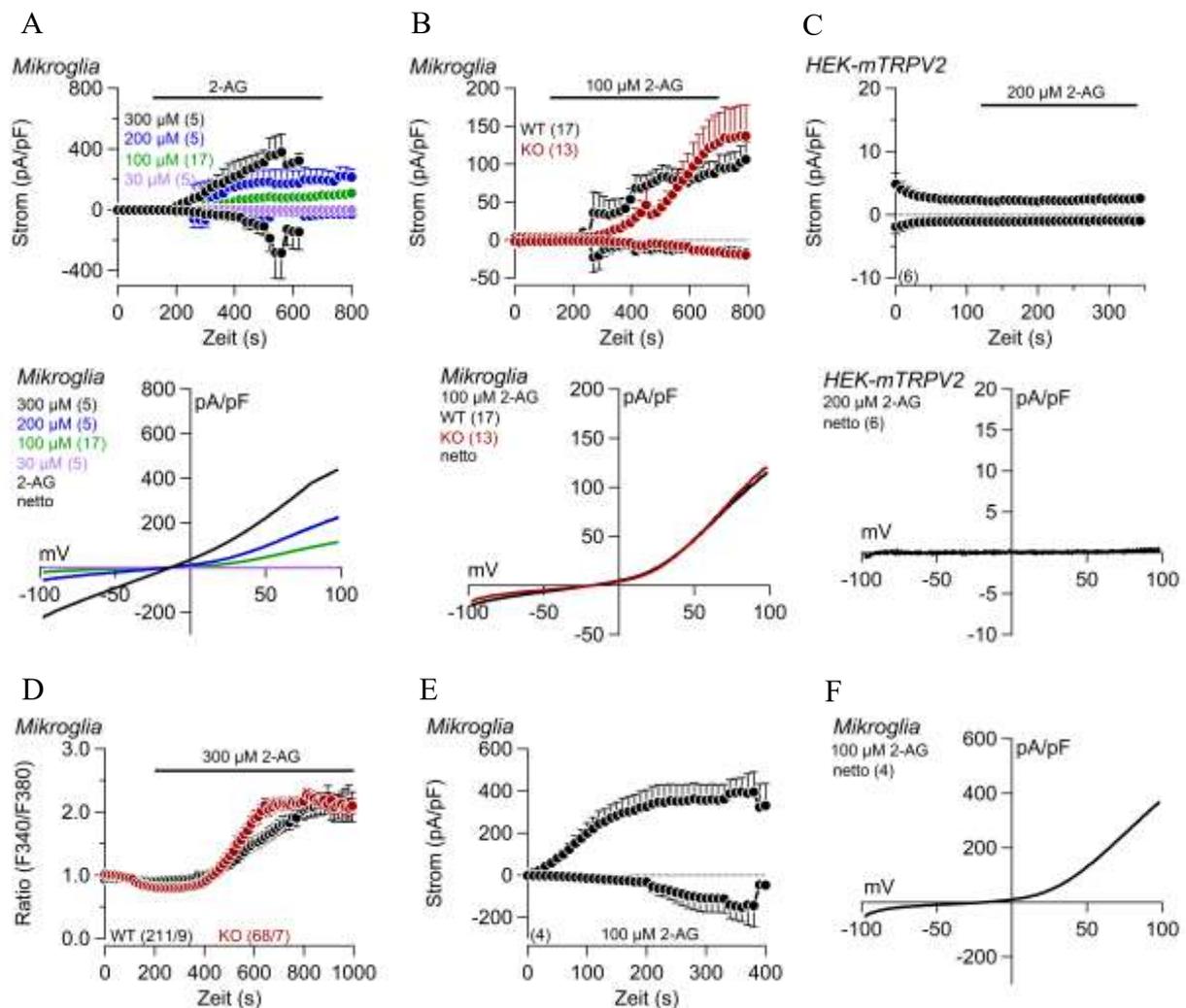


Abbildung 4.12: 2-AG-induzierte Ströme und Ca^{2+} Signale in Mikrogliazellen der Maus. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 30, 100, 200 oder 300 μM 2-AG in Wildtyp (WT; **A**, **B**) und TRPV2^{-/-} (KO) Mikrogliazellen (**B**) sowie 200 μM 2-AG in HEK-mTRPV2-Zellen (**C**), bzw. in WT Mikrogliazellen nach Inkubation mit 100 μM 2-AG (**E**). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in 2-AG sind darunter bzw. in **F** dargestellt. (**D**) Zytosolische Ca^{2+} Konzentrationen (Fura-2 Ratio F340/F380) vor und während der Applikation von 300 μM 2-AG in Mikrogliazellen isoliert aus Wildtyp (WT) und TRPV2^{-/-}

Ergebnisse

^{-/-} (KO) Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben, wobei für die Ca^{2+} Messungen in n Zellen aus x Experimenten (n/x) gemittelt wurden.

Der in den Mikrogliazellen durch 2-AG aktivierte Strom wurde nicht durch den TRPV2 Antagonisten Valdecoxib inhibiert (Abb. 4.13A). Desweiteren war er auch nicht abhängig von der Stimulation endogener CB_1 und CB_2 Rezeptoren in Mikrogliazellen, da sowohl Strom (Abb. 4.13B) als auch zytosolischer Ca^{2+} Anstieg (Abb. 4.13C) in Anwesenheit der CB_1 und CB_2 Inhibitoren AM251 und AM630 bzw. JTE907 nach wie vor auftraten.

In Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} führte 300 μM 2-AG jedoch zu keinem signifikanten zytosolischen Ca^{2+} Anstieg, was für die Aktivierung eines Ca^{2+} -permeablen Kationenkanals in den Mikrogliazellen spricht (Abb. 4.13C). Für Mikrogliazellen aus dem Kortex der Ratte wurde die funktionelle Expression von TRPV4 beschrieben (Konno *et al.*, 2012a). Eine andere Arbeit beschreibt die Aktivierung von TRPV4, überexprimiert in humanen Gefäßendothelzellen, durch 2-AG und dessen Inhibition durch HC-067047 (Ho *et al.*, 2015). Um zu überprüfen ob der 2-AG-induzierte Strom in Mikrogliazellen der Maus von TRPV4 abhängig ist wurden die Mikrogliazellen mit dem TRPV4 Inhibitor HC-067047 (2 μM) inkubiert und 2-AG appliziert. Der 2-AG-abhängige Strom war jedoch nach wie vor vorhanden, so dass die Aktivierung von TRPV4 durch 2-AG in den Mikrogliazellen ausgeschlossen werden konnte (Abb. 4.13D). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch der spezifische TRPV4 Agonist 4 α -PDD keinen Strom in den kultivierten Mikrogliazellen der Maus aktivierte (Anhang Abb. 6.3).

Pertussis-Toxin (PTX) ist ein Inhibitor von $G_{\alpha i}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren. Infolge der Inkubation mit PTX wird die Adenylatcyclase nicht mehr gehemmt und der cAMP-Spiegel in der Zelle erhöht sich (Karimian *et al.*, 2012). Da auch eine 24 h lange Inkubation mit 250 ng/ml Pertussis Toxin keinen inhibitorischen Effekt hatte, scheint der 2-AG-induzierte Strom in Mikrogliazellen auch nicht über PTX-sensitive G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) vermittelt zu sein (Abb. 4.13E).

Ergebnisse

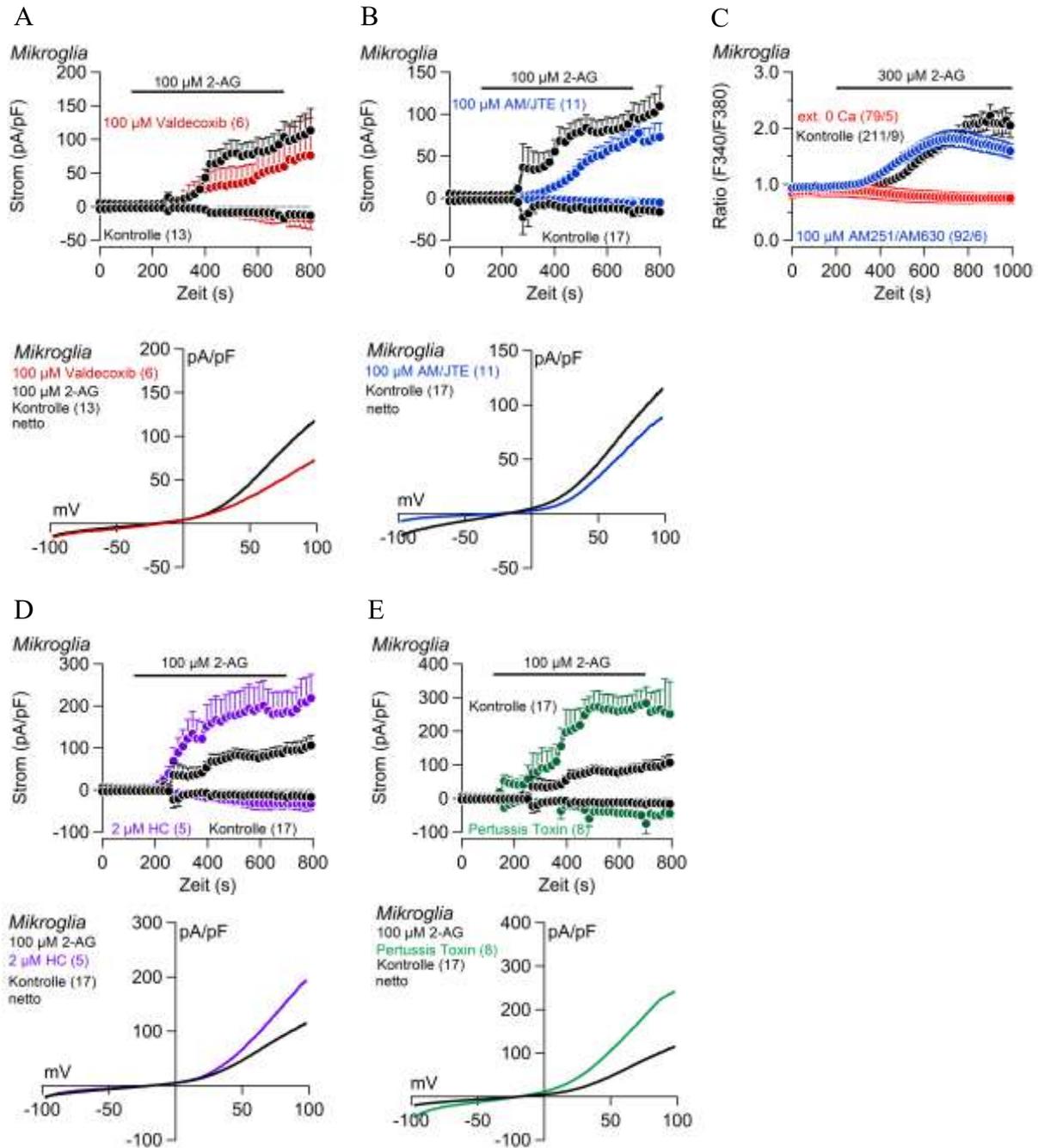


Abbildung 4.13: Kein hemmender Effekt von Valdecoxib und Cannabinoidrezeptor-Antagonisten auf 2-AG-induzierten Strom in Mikrogliazellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von $100 \mu\text{M}$ 2-AG in Anwesenheit von Valdecoxib (A), Cannabinoidrezeptor-Antagonisten (B), HC (D) und Pertussis Toxin (E) in Wildtyp (WT). Zytosolische Ca^{2+} Konzentrationen (Fura-2 Ratio F340/F380) vor und während der Applikation von $300 \mu\text{M}$ 2-AG (C). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in 2-AG sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

Ergebnisse

Um zu überprüfen ob der 2-AG-induzierte Strom in den Mikrogliazellen eventuell durch den zytosolischen Ca^{2+} Anstieg nach 2-AG-Applikation aktiviert wird (siehe Abb. 4.12D und 4.13C), wurde die zytosolische Ca^{2+} Konzentration über die Pipettenlösung mit 10 mM BAPTA gepuffert. Wie in Abb. 4.14A zu erkennen ist tritt der 2-AG-induzierte Strom auch bei intrazellulär massiv gepuffertem Ca^{2+} nach wie vor sehr prominent auf. Zur Identifikation der Ionen, die den 2-AG-induzierten Strom in den Mikrogliazellen tragen, wurde die auf NaCl basierende extrazelluläre Lösung einmal durch Na-Aspartat (Abb. 4.14B) und einmal durch NMDG-Cl (Abb. 4.14C) ausgetauscht. Nach Substitution des extrazellulären Chlorids durch Aspartat war nach wie vor ein prominenter Ein- und Auswärtsstrom bei Applikation von 2-AG zu erkennen, wobei die Amplitude des Auswärtsstromes reduziert und das Umkehrpotential zu positiveren Potentialen verschoben war (Abb. 4.14B, unten). Dies und das negative Umkehrpotential in Anwesenheit von extrazellulärem Cl^- spricht für eine Beteiligung von Cl^- am 2-AG-induzierten Strom. Bei Substitution des extrazellulären Na^+ durch NMDG war der 2-AG-induzierte Einwärtsstrom geringfügig reduziert und der Auswärtsstrom sogar größer (Abb. 4.14C). Der intrazelluläre 2-AG-induzierte Ca^{2+} Anstieg, der in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} in den Mikrogliazellen nicht zu beobachten war (Abb. 4.13C), weist allerdings auch auf die Beteiligung eines Ca^{2+} permeablen Ionenkanals hin.

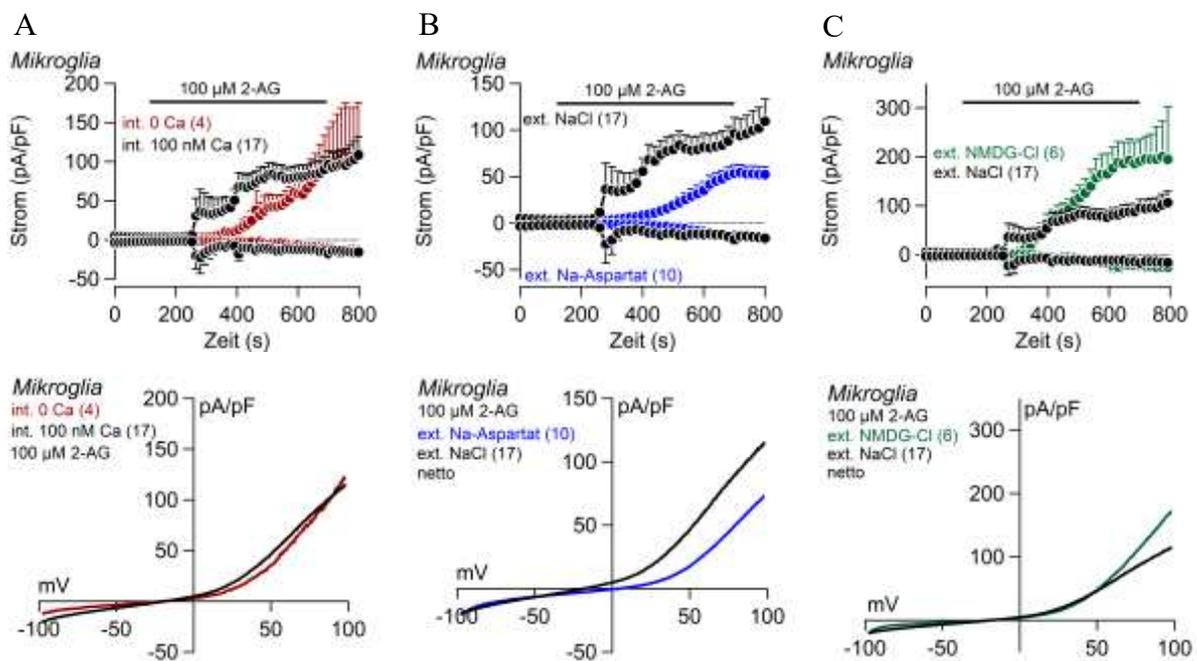


Abbildung 4.14: 2-AG-induzierte Ströme in Abwesenheit von zytosolischem Ca^{2+} , extrazellulärem Cl^- und extrazellulären Na^+ in Mikrogliazellen der Maus. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von $100 \mu\text{M}$ 2-AG in Abwesenheit von zytosolischem Ca^{2+} (A), extrazellulärem Cl^- (B) und extrazellulären Na^+ (C). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto =

Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in 2-AG sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

4.2 TRPV2 in BV2 Zellen, einer Modellzelllinie für Maus Mikroglia

BV2-Mikroglia sind eine immortalisierte Zelllinie, die aus Hirngewebe der Maus isoliert wurde und viele phänotypische Eigenschaften von Mikroglia aufweist (Blasi *et al.*, 1990b). Hassan *et al.* berichtet, dass BV2-Zellen funktionelle TRPV2-Proteine exprimieren, zeigen jedoch keine TRPV2 Ströme (Hassan *et al.*, 2014a). In den folgenden Experimenten sollten TRPV2 Agonisten und Antagonisten verwendet werden, um zu überprüfen, ob, wie in isolierten Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus, TRPV2 Ströme in BV2 Zellen zu messen sind.

Wie in Abbildung 4.15 gezeigt führen die TRPV2 Agonisten 2-APB und THC ebenso wie in kultivierten Mikrogliazellen auch in BV2 Zellen zu einem Ganzzellstrom mit typischer Strom-Spannungsabhängigkeit von TRPV2 und zu einem zytosolischen Ca^{2+} Anstieg. Der 2-APB-induzierte Strom in BV2 Zellen wurde durch Valdecoxib komplett gehemmt (Abb. 4.15A, blau). Genau wie in kultivierten Mikrogliazellen hemmt Ruthenium Rot (RR) potentialabhängig den 2-APB-induzierten Einwärts- aber nicht den Auswärtsstrom (Abb. 4.15A, rot), wohingegen 1 mM Tranilast keinen inhibierenden Effekt aufweist (Abb. 4.15A, grün). Abbildung 4.15B zeigt die Strom-Spannungs-Verläufe unmittelbar nach dem Einbruch (oben) und vor Beginn der Applikation (unten) in den BV2-Zellen. Neben den Ganzzellströmen wurden auch die 2-APB-induzierten zytosolischen Ca^{2+} Anstiege in Anwesenheit von Valdecoxib und Ruthenium Rot inhibiert (Abb. 4.15C). Neben 2-APB führt auch THC in den BV2-Zellen sowohl zu einem Strom mit typischer Stromspannungsabhängigkeit von TRPV2 sowie zu einem intrazellulären Ca^{2+} Anstieg (Abb. 4.15D, E) und genau wie in kultivierten Mikrogliazellen aus der Maus führt die Applikation von 1 mM CBD auch in BV2-Zellen zu keinem messbaren Strom (Abb. 4.15F).

Ergebnisse

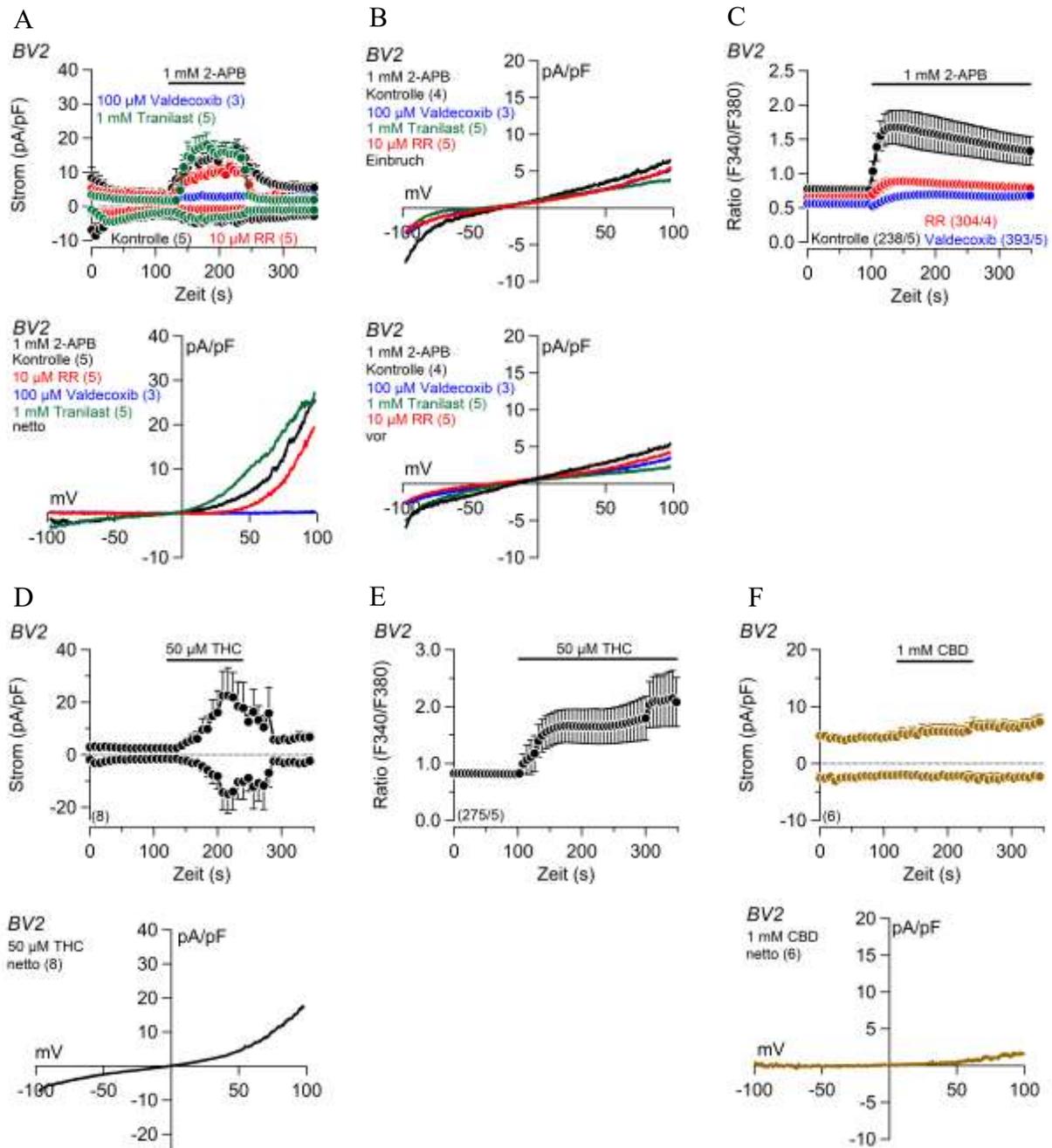


Abbildung 4.15: 2-APB und THC-induzierte Ströme und Ca^{2+} Signale in BV2-Zellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 1 mM 2-APB (A), 50 μ M THC (D) und 1 mM CBD (F), sowie zytosolische Ca^{2+} Konzentrationen (Fura-2 Ratio F340/F380) vor und während der Applikation von 1 mM 2-APB in Abwesenheit (Kontrolle, schwarz) bzw. Gegenwart von RR (rot) und Valdecoxib (blau; C) und 50 μ M THC (E) in BV2-Zellen. Strom-Spannungskurven (IVs) der maximalen 2-APB bzw. THC-induzierten Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) sind jeweils darunter dargestellt. (B) IVs beim Einbruch (oben) und vor Beginn einer Applikation bei 120 s (unten, vor). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für Strom und Ca^{2+} -Signale über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben, wobei für Ca^{2+} Messungen n Zellen aus x Experimenten (n/x) gemittelt wurden.

Ergebnisse

Bei den Experimenten mit 2-AG in Mikrogliazellen aus Wildtyp (WT) und homozygoten TRPV2-defizienten (TRPV2^{-/-}) Mäusen konnte gezeigt werden, dass 2-AG einen Strom induziert, der durch TRPV2-Antagonisten nicht inhibiert wurde und in Maus TRPV2-überexprimierenden HEK293-Zellen nicht auftrat, demnach kein TRPV2 Strom war (Abb. 4.12). In BV2-Zellen wurde durch Applikation von 100 μM 2-AG ebenfalls ein Strom aktiviert (Abb. 4.16A). Auch hier konnte wie in kultivierten Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus ausgeschlossen werden, dass der 2-AG-aktivierte Strom über TRPV4 Kanäle vermittelt wird, da der spezifische TRPV4 Agonist GSK-1016790A weder einen Strom (Abb. 4.16B) noch einen zytosolischen Ca²⁺ Anstieg in den BV2-Zellen auslöste (Abb. 4.16C). Somit scheint TRPV4 in den BV2-Zellen funktionell nicht exprimiert.

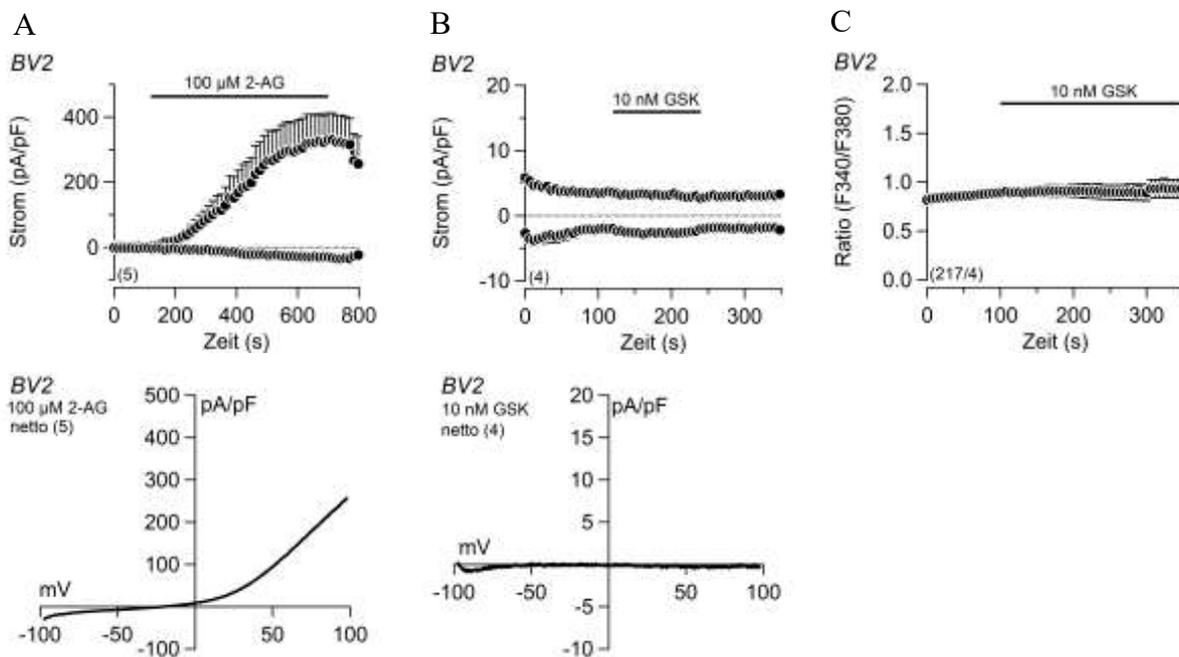


Abbildung 4.16: 2-AG-induzierte Ströme in BV2-Zellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 100 μM 2-AG (A), 10 nM GSK (B) sowie zytosolische Ca²⁺ Änderungen (Fura-2 Ratio F340/F380) vor und während der Applikation von 10 nM GSK (C) in BV2-Zellen. Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungskurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in 2-AG bzw. GSK sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für Strom und Ca²⁺-Signale über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben, wobei für Ca²⁺ Messungen n Zellen aus x Experimenten (n/x) gemittelt wurden.

4.3 Rolle von TRPV2 bei der Migration von Mikrogliazellen

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von TRPV2 am Migrationsverhalten von Mikrogliazellen, wurden *Transwell*-Assays durchgeführt. In Omar Zaki *et al.*, konnte gezeigt werden, dass BV2-Zellen in Anwesenheit eines Stimulus durch LPS migrieren (Omar Zaki *et al.*, 2019). Für das Migrations-Assay wurden die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer zu 20000, 40000 und 60000 für BV2-Zellen und 20000 für Mikrogliazellen ausgezählt und anschließend für 24 Stunden in FKS-freiem Medium mit und ohne LPS (1 µg/ml) bzw. diversen Pharmaka (für BV2-Zellen, siehe unten) in *Costar*[®] *transwell Inserts* in einer 24-Well-Platte bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

4.3.1 Migration von BV2-Zellen in Ab- und Anwesenheit von TRPV2 Antagonisten

Zur Migrationsanalyse von BV2-Zellen wurde in das Medium unterhalb der Inserts die TRPV2-Antagonisten Ruthenium Rot oder Valdecoxib, bzw. Cytochalasin D als Postivkontrolle gleichzeitig mit LPS zugegeben. Nach 24 h wurde nach Entfernen der Zellen auf der Oberseite des Inserts und Färben fünf zufällige Bilder aufgenommen, die migrierten Zellen ausgezählt und auf die gesamte Fläche des Inserts und Gesamtanzahl der eingesetzten Zellen (100%) hochgerechnet. Abbildung 4.17A zeigt repräsentative Bilder der migrierten Zellen (grau) nach Einsatz von 60000 BV2-Zellen unter Kontrollbedingungen (DMSO) und in Anwesenheit von LPS mit und ohne die TRPV2-Antagonisten Ruthenium Rot und Valdecoxib, sowie als Positivkontrolle mit Cytochalasin D. Um zu untersuchen, in welcher Dichte die Zellen am Besten migrieren, wurden verschiedene Zellzahlen (20000, 40000 und 60000) in Anwesenheit und Abwesenheit von LPS ausplattiert und die Prozentzahl der migrierten BV2-Zellen ausgerechnet (Abb. 4.17B). Die Stimulation mit LPS führt zu einer scheinbaren Erhöhung der Migration von etwa 4% auf etwa 7%, was allerdings nicht signifikant und unabhängig von der Zahl der ausplattierten Zellen war. Für die weiteren Migrationsexperimente wurden 60000 BV2-Zellen eingesetzt. Wie in Abbildung 4.17C zu sehen ist, reduzieren Ruthenium Rot (10 µM) und Valdecoxib (100 µM) die Anzahl der migrierten BV2-Zellen ohne Stimulation mit LPS signifikant von etwa 4% auf 2% (n=6) und nach Stimulation mit LPS von 7% auf 1% (n=6). Dies weist auf eine mögliche Beteiligung von TRPV2 an der Migration der BV2-Zellen hin. Cytochalasin D (5 µM), was an Aktinfilamente bindet und dadurch dessen Polymerisation und die Bewegung der Zellen inhibiert, zeigt als Positivkontrolle ebenfalls eine signifikante Reduktion der Anzahl von migrierten Zellen.

Ergebnisse

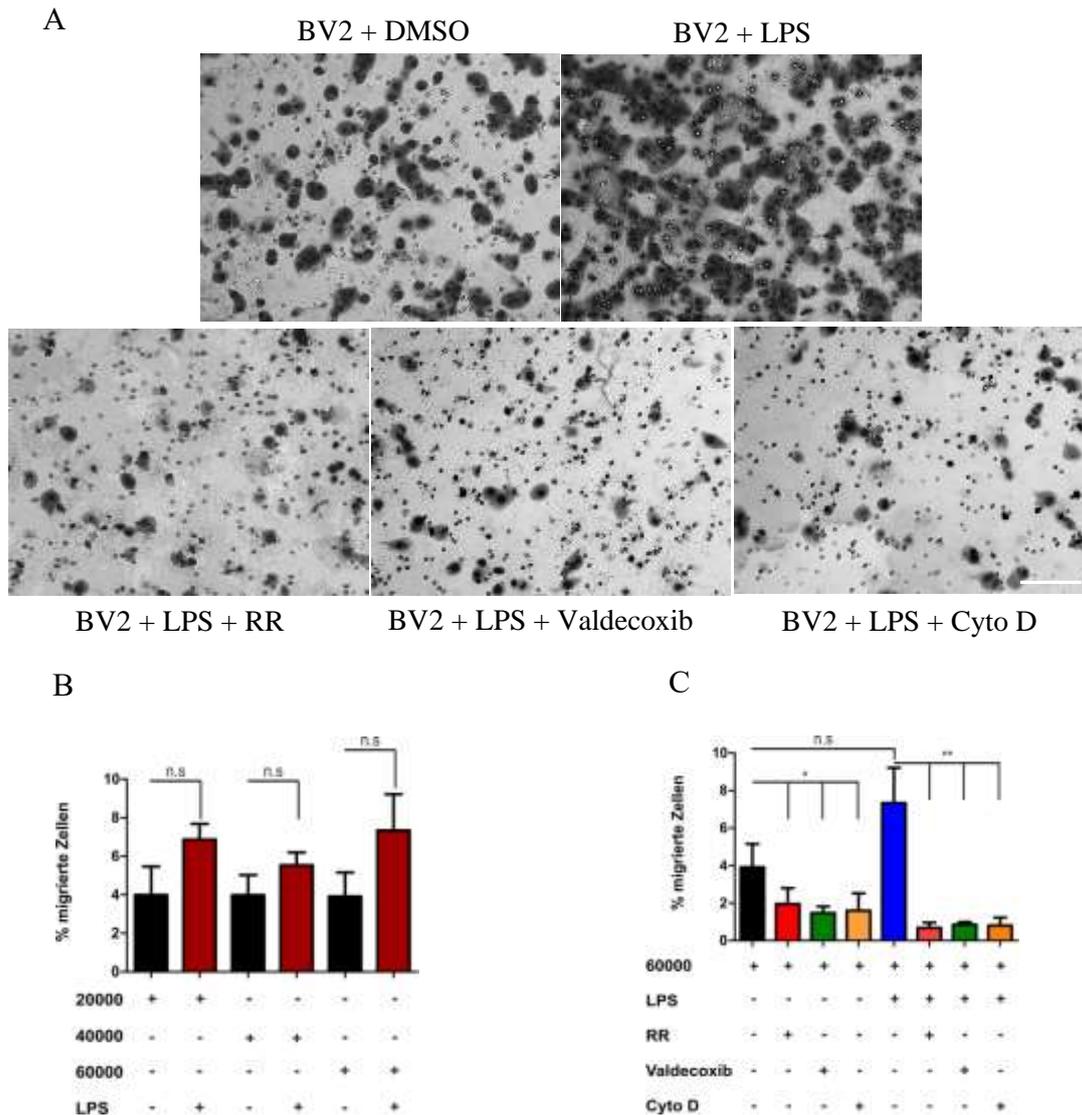


Abbildung 4.17: Migration von BV2-Zellen in Gegenwart von RR und Valdecoxib. Repräsentative Bilder der Unterseite von Transwell-Inserts 24 h nach Ausplattieren von 60000 BV2-Zellen in Ab- (Kontrolle, DMSO) und Anwesenheit von 1 µg/ml LPS und Ruthenium Rot (RR, 10 µM), Valdecoxib (100 µM) bzw. Cytochalasin D (Cyto D, 5 µM). **(B)** Prozentsatz migrierter Zellen nach Ausplattieren verschiedener Zellzahlen in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von LPS. **(C)** Prozentsatz migrierter Zellen nach Ausplattieren von 60000 BV2-Zellen in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von LPS sowie RR (10 µM), Valdecoxib (100 µM) und Cyto D (5 µM). Die Daten stellen Mittelwerte +S.E.M. aus jeweils 6 Wells aus 3 unabhängigen Experimenten dar. * p < 0,05, ** p < 0,01). Der Maßstabsbalken in A unten rechts entspricht 40 µm.

4.3.2 Migration von wildtyp und TRPV2^{-/-} Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus

Abbildung 4.18A zeigt repräsentative Bilder der migrierten Mikrogliazellen (grau) aus wildtyp (WT) und TRPV2-defizienten Mäusen (KO) nach Einsatz von 20000 Zellen unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von LPS. Im Gegensatz zu den BV2-Zellen (Abb. 4.17) führte die Stimulation der kultivierten Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus mit 1 µg/ml LPS zu einer signifikanten Erhöhung der Migrationsrate von etwa 8% (Kontrolle ohne LPS, WT) auf etwa 28% (LPS, WT; n=3; Abb. 4.18B). Die Mikrogliazellen aus TRPV2-defizienten Mäusen (KO) migrierten unter Kontrollbedingungen (ohne LPS) deutlich weniger als wildtyp Mikrogliazellen, was jedoch nicht signifikant war. Außerdem war die Migrationsrate nach Stimulation durch LPS im Gegensatz zu den Mikrogliazellen aus den wildtyp Mäusen nicht signifikant erhöht gegenüber den Kontrollbedingungen ohne LPS. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass TRPV2 auch an der Migration der Mikrogliazellen beteiligt ist.

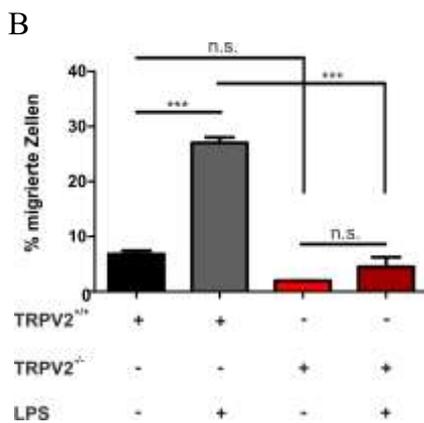
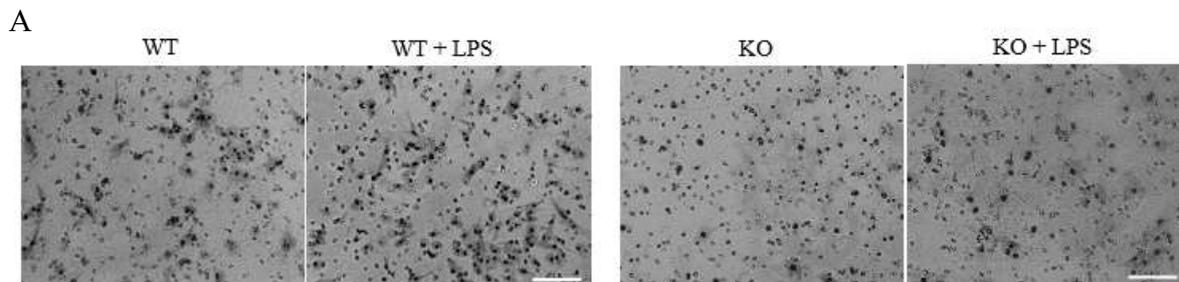


Abbildung 4.18: Beeinträchtigte LPS-stimulierte Migration in TRPV2^{-/-} (KO) Mikroglia. (A) Repräsentative Bilder der Unterseite von Transwell-Inserts 24 h nach Ausplattieren von 20000 Mikrogliazellen aus wildtyp (WT) und TRPV2-defizienten (KO) Mäusen in Abwesenheit und Anwesenheit von 1 µg/ml LPS. (B) Prozentsatz migrierter Zellen in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von LPS. Die Daten stellen Mittelwerte +S.E.M. dar. (3 insert aus 3 unabhängigen Experimenten; *** p<0.001). Der Maßstabsbalken unten rechts entspricht 40 µm.

4.4 Rolle von TRPV2 in der ROS-Produktion von Mikrogliazellen

Lipopolysaccharid (LPS), der Hauptbestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, kann eine Vielzahl von entzündlichen Reaktionen, einschließlich der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokine und reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) auslösen (Chakravarty und Herkenham, 2005). Oxidationsmittel Chloramin-T (ChT), ultraviolettes A-Licht und Photosensibilisierungsmittel produzieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und aktivieren TRPV2 (Fricke *et al.*, 2019). Um den Effekt von TRPV2 auf die LPS-induzierte ROS-Produktion zu untersuchen, wurden 50000 BV2-Zellen und 20000 Mikrogliazellen mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in 96-Well-Platten ausplattiert. Nach 24 h wurden TRPV2-Antagonisten wie RR (10 μM) und Valdecoxib (100 μM) in Anwesenheit von LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) zu den Zellen hinzugegeben und für 24 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 50 μM DCFH-DA für 1 h bei 37 °C inkubiert. DCFH-DA leuchtet in Anwesenheit von ROS in der Zelle grün. Die grüne Fluoreszenz (535 nm) wurde mit einem Sunrise™ Plate Reader gemessen. Um zu kontrollieren, ob DCFH-DA und TRPV2-Antagonisten allein oder zusammen auf die Zellen einen Effekt haben, wurden die Zellen mit dem Farbstoff (als Hintergrund-Kontrolle) und TRPV2-Antagonisten inkubiert und gemessen. Wie in Abbildung 4.19A zu sehen ist, hat eine LPS-Stimulation nach 24 h die Produktion von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies in den BV2-Zellen signifikant erhöht. In Anwesenheit der TRPV2-Antagonisten Ruthenium Rot und Valdecoxib war die LPS-induzierte ROS-Produktion um mehr als 50% reduziert. Dies weist darauf hin, dass TRPV2 in den BV2-Zellen an der LPS-induzierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt ist. Die gleichen Experimente wurden auch in primären Mikrogliazellen durchgeführt (Abb. 4.19B). Wie in den BV2-Zellen nahm die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies nach Stimulation mit LPS signifikant zu und wurde durch die TRPV2-Inhibitoren Ruthenium Rot und Valdecoxib um mehr als 50% inhibiert (Abb. 4.19B). Somit scheint neben den BV2-Zellen auch in den kultivierten Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus TRPV2 eine Rolle bei der ROS Produktion zu spielen.

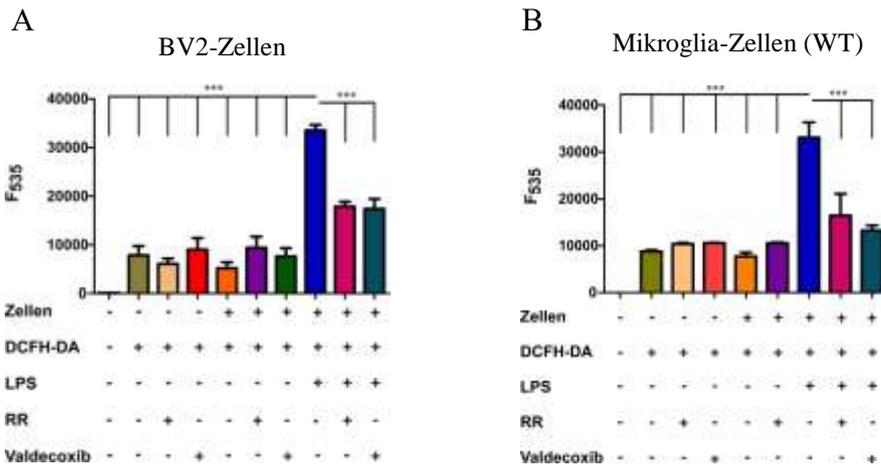


Abbildung 4.19: Inhibitoren von TRPV2 reduzieren die LPS-induzierte ROS-Produktion in BV2 und Mikrogliazellen. ROS-Produktion (DCFH-DA Fluoreszenz bei 535 nm) in BV2-Zellen (A) und wildtyp Mikroglia (WT, B) nach 24 h Inkubation mit den TRPV2-Antagonisten Ruthenium rot (RR 10 µM) und Valdecoxib (100 µM) in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von LPS (1 µg/ml). Die Daten stellen Mittelwerte +S.E.M. von jeweils 36 Wells aus 5 unabhängigen Experimenten mit BV2-Zellen und 4 Wells aus 3 unabhängigen Experimenten mit Mikrogliazellen dar. (***) $p < 0.001$.

4.5 Funktion von TRPV2 bei der Phagozytose in Mikrogliazellen

Es ist bekannt, dass der TRPV2-Kanal bei der Phagozytose in Makrophagen eine Rolle spielt (Link *et al.*, 2010). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob TRPV2 auch in BV2-Zellen und Mikrogliazellen an der Phagozytoseaktivität beteiligt ist. Hierfür wurden Experimente mit FITC-markierten Kaninchen-Immunglobulin G (IgG) beschichteten Latex Beads bzw. mit pHrodo® Red *E.coli* BioPartikeln® an einem Durchflusszytometer und einem Fluoreszenz Platten Lesegerät (Tecan Plate Reader) an BV2-Zellen und kultivierten Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus durchgeführt.

4.5.1 Untersuchung der Phagozytose in BV2-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die BV2-Zellen wurden mit verschiedenen Pharmaka und grün fluoreszierenden Beads in Anwesenheit von LPS und Abwesenheit von LPS inkubiert und der prozentuale Anteil der Zellen, die Latex Beads phagozytiert haben mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden FITC-markierte Kaninchen-Immunglobulin G beschichtete Beads mit einem Durchmesser von 100 nm verwendet. Die graue Kurve in der repräsentativen Abbildung 4.20A zeigt die nicht mit Beads behandelten Kontrollzellen. Nach Inkubation mit den Beads ist die Kurve nach rechts verschoben, und zeigt die grünen Zellen, die Beads phagozytiert haben. Wie in Abbildung 4.20B und C zu erkennen ist, war der Anteil der phagozytierenden Zellen

Ergebnisse

unabhängig von der Inkubation mit LPS, DMSO (Kontrolle), den TRPV2 Inhibitoren Valdecoxib und Ruthenium Rot (RR) oder dem nicht-selektiven TRP Inhibitor SKF96365 (SKF) immer bei etwa 60% (jeweils n=4). Weder bei LPS-stimulierten noch bei nicht-stimulierten Zellen konnte in Ab- oder Anwesenheit der TRPV2 bzw. TRP Antagonisten ein signifikanter Unterschied detektiert werden.

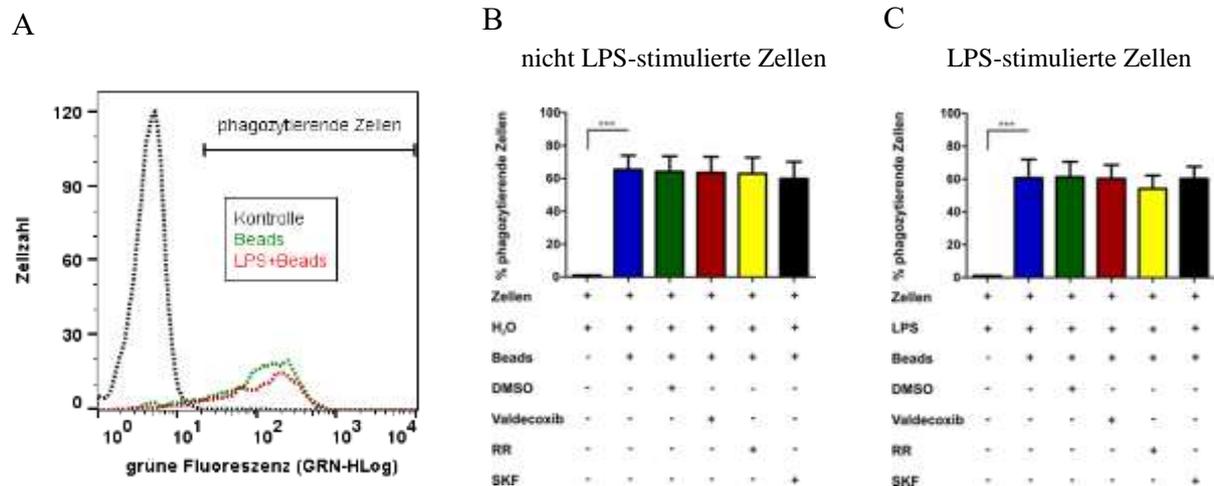


Abbildung 4.20: Phagozytosedetektion mittels Cell counter in BV2-Zellen. (A) Repräsentative Darstellung der Analyse grün fluoreszierender Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie von Kontrollzellen (Kontrolle, ohne grüne Beads, grau) und Zellen, die mit Beads inkubiert wurden und in Ab- (grün) bzw. Anwesenheit von 1 µg/ml LPS (rot) grüne Beads phagozytiert haben. Es wurden jeweils 5000 Zellen analysiert. (B, C) Prozentualer Anteil der in der Durchflusszytometrie bestimmten Zellen, die in Abwesenheit von LPS (B) und Anwesenheit von 1 µg/ml LPS (C) und An- bzw. Abwesenheit von DMSO (Kontrolle), Valdecoxib, Ruthenium Rot (RR) oder SFK96365 (SKF) grüne Beads phagozytiert haben. Die Daten stellen Mittelwerte +S.E.M. dar. (jeweils 4 wells aus 4 unabhängigen Experimenten; *** p<0.001).

4.5.2 Phagozytose von pHrodo® Red *E.coli* BioParticles® in BV2 und Mikrogliazellen

50000 BV2-Zellen bzw. 20000 Mikrogliazellen wurden mit 1 mg/mL pHrodo™ *E. coli* BioParticles® allein oder in Anwesenheit verschiedener TRPV2 Antagonisten oder Agonisten für 3 h und 24 h bei 37 °C inkubiert und die rote Fluoreszenz (F585) mit einem Plate reader gemessen. Abbildung 4.21A zeigt repräsentative Bilder der pHrodo-Partikel, die durch BV2-Zellen (links) und Mikrogliazellen (rechts) phagozytiert wurden.

Wie in Abbildung 4.21B und C zu sehen ist, haben die BV2-Zellen nach 3 und 24 h pHrodo-Partikel phagozytiert. Deswegen ist die Fluoreszenz-Intensität im Vergleich zu den Zellen ohne pHrodo angestiegen. Nach 24 h Inkubation haben die BV2-Zellen mehr pHrodo als nach 3 h

Ergebnisse

phagozytiert. Die Fluoreszenz-Intensität der Zellen war in Anwesenheit von RR nach 3 h und 24 h signifikant reduziert, was auf eine signifikante Reduktion der Phagozytose hinweist. Valdecoxib hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose nach 3 h (Abb. 4.21B), aber nach 24 h ist die Phagozytose durch Valdecoxib signifikant reduziert (Abb. 4.21C). Dass die beiden TRPV2-Antagonisten die Phagozytose inhibieren könnte auf die Beteiligung von TRPV2 bei der Phagozytose von BV2-Zellen hinweisen.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die BV2-Zellen mehr pHrodo-Partikel phagozytieren, wenn sie mit LPS (100 ng/ml oder 1 µg/ml) für 3 h und 24 h inkubiert und aktiviert werden. Überraschenderweise haben die Zellen nach Stimulation mit LPS weniger pHrodo Partikel phagozytiert (Abb. 4.21B, C). RR hat auch hier die Phagozytose der LPS-stimulierten Zellen nach 3 h und 24 h signifikant inhibiert (Abb. 4.21B, C).

Als nächstes sollte untersucht werden ob THC als Agonist für TRPV2 einen Effekt auf die Phagozytose hat. Die BV2-Zellen wurden mit 30 µM THC in An- und Abwesenheit von LPS (1 µg/ml) für 3 h und 24 h behandelt (Abb. 4.21D, E). Wie in Abbildung 4.21D, E zu erkennen ist, führt THC alleine zu einer signifikanten Inhibition der Phagozytose in den BV2-Zellen. LPS und THC-Inkubation hatten zusammen keinen zusätzlichen Effekt auf die Phagozytose. Cannabidiol (1 mM) hatte ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die Phagozytose in BV2-Zellen.

Desweiteren wurden die BV2-Zellen mit RR alleine oder zusammen mit pHrodo inkubiert, um zu testen, ob RR oder pHrodo aufgrund ihrer rötlichen Färbung einen Effekt auf die Messungen bzw. auf den Hintergrund haben (Abb. 4.21F). Es konnte gezeigt werden, dass RR einen kleinen Effekt auf die Messungen hat. Um zu untersuchen, ob pHrodo® Red *E.coli* BioParticles®-Assay überhaupt funktioniert, wurde der pH des Assay-Puffer auf 5 eingestellt und pHrodo dazugegeben. Wie in Abbildung 4.21F zu sehen ist, hat die Fluoreszenz-Intensität dadurch, dass pH von neutral auf sauer (pH=5) gesunken ist, zugenommen. Der pHrodo Assay funktioniert also.

Aufgrund der hohen Anzahl an benötigten Zellen wurden die bisherigen Experimente zur Phagozytose an der BV2-Zelllinie durchgeführt. Die nachfolgenden Experimente mit 20000 kultivierten Mikrogliazellen aus dem Kortex von wildtyp und TRPV2-defizienten Mäusen pro Well zeigen, dass nach 3 h wildtyp Mikroglia (TRPV2^{+/+}) signifikant mehr pHrodo Partikel phagozytiert hatten als die TRPV2-defizienten (TRPV2^{-/-}) Mikrogliazellen. Dies weist wiederum auf die Beteiligung von TRPV2 an der Phagozytoseaktivität von Mikrogliazellen

Ergebnisse

hin. Als Hintergrundkontrolle wurde pHrodo allein gemessen und in Abbildung 4.21F und G dargestellt.

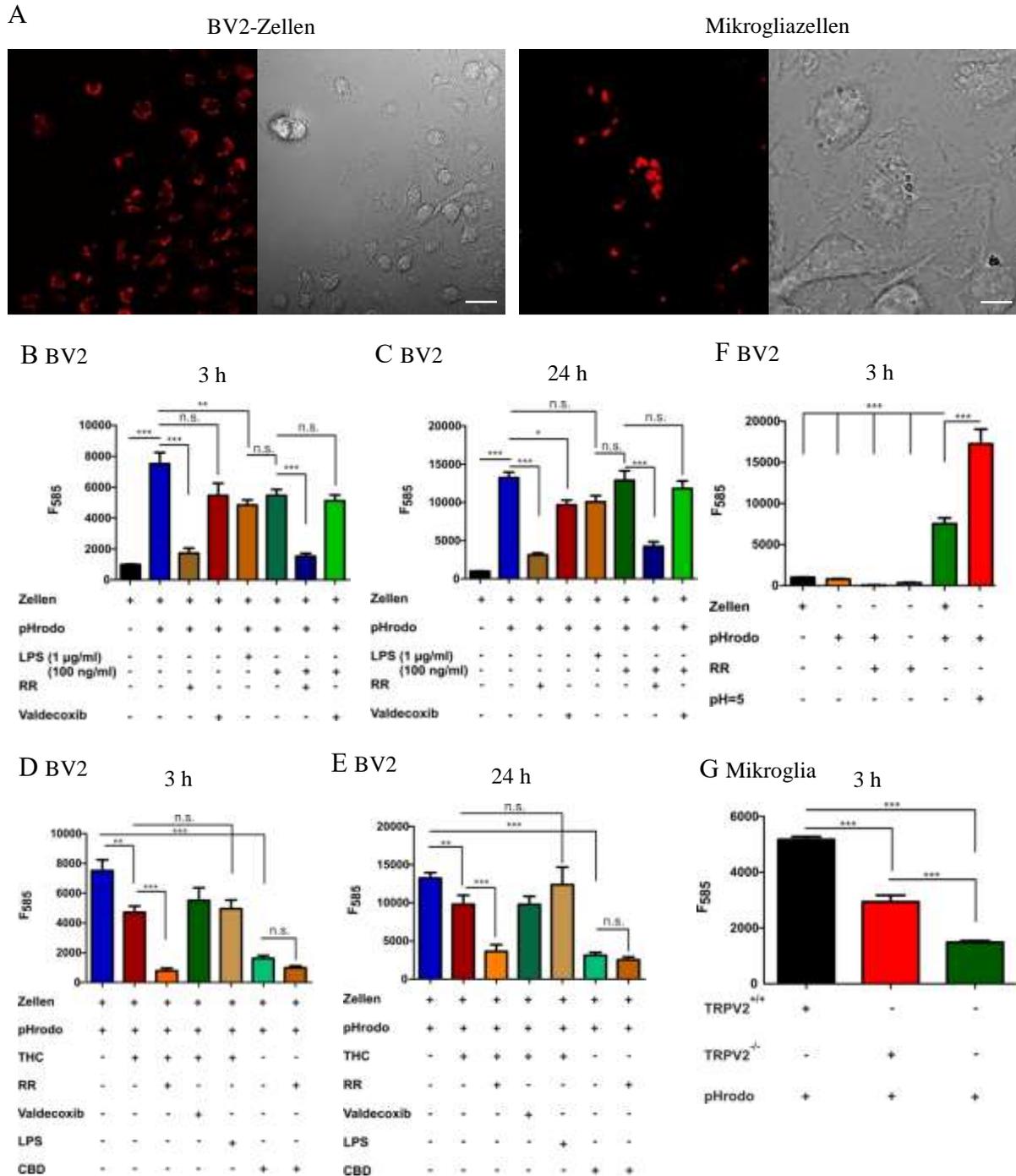


Abbildung 4.21: Phagozytose der pHrodo® Red *E.coli* BioParticles in BV2 und Mikrogliazellen. (A) Repräsentative Fluoreszenzbilder und Durchlichtaufnahmen von BV2-Zellen und Mikrogliazellen nach der Phagozytose der pHrodo Partikel (rote Partikel). (B-E) Fluoreszenzmessungen (F585) in BV2-Zellen, die 3 h (B, D) bzw. 24 h (C, E) mit pHrodo-Partikeln in Anwesenheit von Ruthenium Rot (RR, 10 μ M), Valdecoxib (100 μ M), LPS (1 μ g/ml), THC (30 μ M) bzw. CBD (1 mM) inkubiert wurden. (F) Fluoreszenzmessungen (F585) von BV2-Zellen bzw. von Wells ohne Zellen mit und ohne RR oder pHrodo (Kontroll-Experimente). (G) Fluoreszenzmessungen (F585) von kultivierten Mikrogliazellen

aus wildtyp (TRPV2^{+/+}) und TRPV2-defizienten (TRPV2^{-/-}) Mäusen 3 h nach Inkubation mit pHrodo. Die Daten stellen Mittelwerte \pm S.E.M. dar. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils für BV2 16 wells aus 4 unabhängigen Experimenten und für Mikroglia 4 wells aus 2 unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Maßstabsbalken entsprechen 40 μm für BV2 Zellen und 15 μm für Mikrogliazellen.

4.5.3 Untersuchung der Phagozytose von *Latex Beads* in BV2-Zellen mithilfe des Plate Readers

Neben der Analyse mittels Durchflusszytometrie (4.5.1) wurde die Phagozytose von FITC-markierten Latex Beads in BV2-Zellen auch mittels SunriseTM Plate Reader durchgeführt. Um zu untersuchen, ob die Phagozytose sich nach LPS-Stimulation erhöht, wurden die Zellen (50000 Zellen) mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) für 1 h, 2 h und 6 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden mit TRPV2-Agonisten wie 2-APB und THC und dem TRPV2-Antagonisten Ruthenium Rot (RR) behandelt und die grüne Fluoreszenz (F535) mit dem Plate Reader gemessen. Um zu schauen, ob bei Stimulation der Zellen mit THC auch Effekte über die CB₁ und CB₂ Rezeptoren auftreten, wurden auch CB₁/CB₂ Blocker (AM/JTE 100 nM) verwendet.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Fluoreszenz bzw. die Phagozytose der BV2-Zellen nach 2 h größer war als nach 1 h, sich aber nach 6 h Inkubation mit LPS, 2-APB bzw. THC nicht weiter erhöhte (Abb. 4.22A, B, C). Nach 1 h war die Phagozytose unabhängig von der Zugabe von LPS bzw. der TRPV2 Agonisten und Antagonisten nicht signifikant verändert (Abb. 4.22A). 2 h nach Inkubation mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) war die Phagozytose im Vergleich zu Kontrollzellen ohne LPS erhöht (Abb. 4.22B). Diese LPS-stimulierte Phagozytose wurde durch RR (10 μM) signifikant reduziert. THC (30 μM) hatte keinen zusätzlichen Effekt auf die Phagozytose und 2-APB (1 mM) führte zu einer Inhibition (Abb. 4.22B). Als Positivkontrolle führte Cytochalasin D (5 μM) ebenfalls zu einer signifikanten Fluoreszenzreduktion und somit zu einer Inhibition der Phagozytose. Es konnte auch gezeigt werden, dass CB₁ und CB₂-Blocker keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose der Latex Beads in BV2-Zellen hatte (Abb. 4.22B). 6 h nach Inkubation waren wieder keine signifikanten Unterschiede zu detektieren (Abb. 4.22C).

Ergebnisse

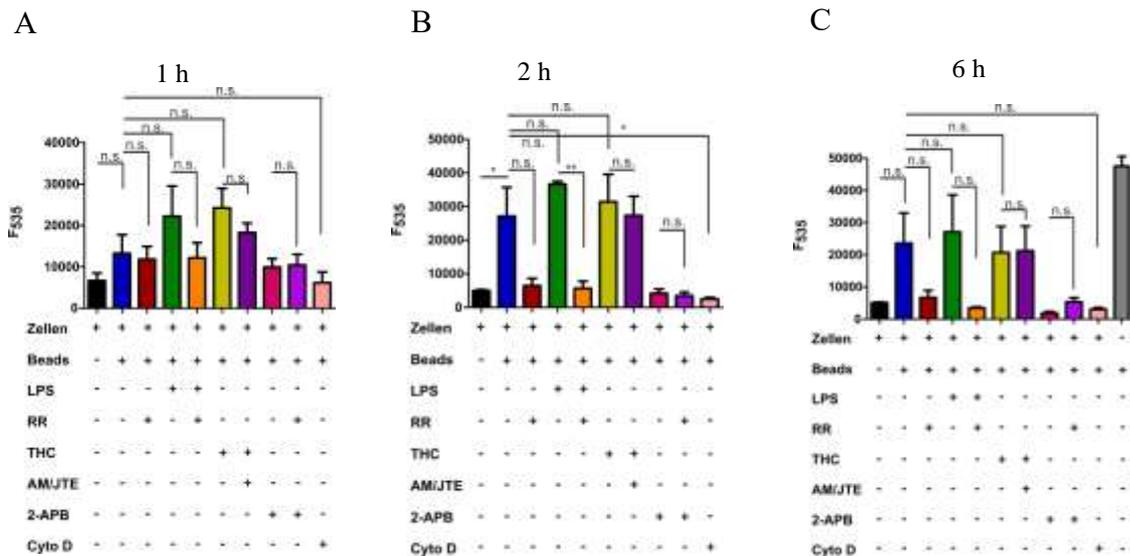


Abbildung 4.22: Phagozytose von Latex Beads in BV2-Zellen gemessen im Plate Reader. Fluoreszenzmessungen (F535) in BV2-Zellen, die mit FITC-markierten Latex-Beads in Ab- und Anwesenheit von LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), RR (10 μM), 2-APB (1 mM), THC (30 μM), AM/JTE (100 nM) bzw. Cyto D (5 μM) für 1 h (A), 2 h (B) und 6 h (C) inkubiert wurden. Die Daten stellen Mittelwerte +S.E.M. dar. (jeweils 3 Wells in 3 unabhängigen Experimenten; * p < 0,05, ** p < 0,01)

4.6 Effekt der verwendeten Pharmaka auf die Viabilität der BV2-Zellen

Im Rahmen der Phagozytoseexperimente viel auf, dass nach 2 und vor allem 6 h Inkubation mit den verschiedenen Agonisten und Antagonisten die Zahl der lebenden Zellen beeinträchtigt schien. Daher wurde im Folgenden untersucht welchen Einfluss die verwendeten Substanzen auf die Viabilität der BV2-Zellen hatten. Zellviabilität beschreibt in der Zellbiologie den Anteil lebender Zellen in einer Zellpopulation. Der *CellTiter 96® Aqueous One Solution-Zellproliferationstest (MTS)* von Promega ist eine farbmessende Methode zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einer Zellkultur. Die Lösung enthält eine Tetrazolium Substanz, die bei Reduktion einen gefärbten Formazanprodukt erzeugen kann, das in Kulturmedium löslich ist und Licht bei 490 nm absorbieren kann. Die Lösung wird einfach zu den Zellen gegeben und im Laufe der Zeit wird Formazan hergestellt. Die Menge an Formazan, die produziert wird, ist direkt proportional zur Anzahl lebensfähiger Zellen. Dieser Assay kann verwendet werden, um die Zytotoxizität zu testen. Hierfür wurden 20 μl des CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagenz direkt in die 100 μl Kulturmedium mit 50000 Zellen zugegeben und 1 h, 2 h und 6 h in Anwesenheit von Latex Beads, 2-APB (1 mM), THC (30 μM), CB₁ und CB₂-Blocker

Ergebnisse

(AM/JTE 100 nM), RR (10 μ M), LPS (1 μ g/ml) und Cytochalasin D (5 μ M) bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und dann die Absorption bei 490 nm mit einem 96-well-Plate Reader gemessen.

Wie in Abbildung 4.23A zu sehen ist, war die BV2-Zellviabilität schon nach 1 h Inkubationszeit mit 2-APB (1 mM) signifikant reduziert, was darauf hindeutet, dass 2-APB einen schädlichen Effekt auf die Zellen hat. Cytochalasin D hatte nach 1 h Inkubation ebenfalls einen kleinen, aber signifikanten zytotoxischen Effekt auf die BV2-Zellen (Abb. 4.23A). Nach 2 h bzw. 6 h waren insgesamt weniger lebendige BV2-Zellen vorhanden als nach 1 h, unabhängig von der Inkubation mit den verschiedenen Substanzen, was sich aber zwischen 2 h und 6 h nicht mehr großartig veränderte (Abb. 4.23A, B, C). Lediglich der Anteil der lebenden Zellen nach Inkubation mit 2-APB nahm nach 6 h weiter ab (Abb. 4.23C).

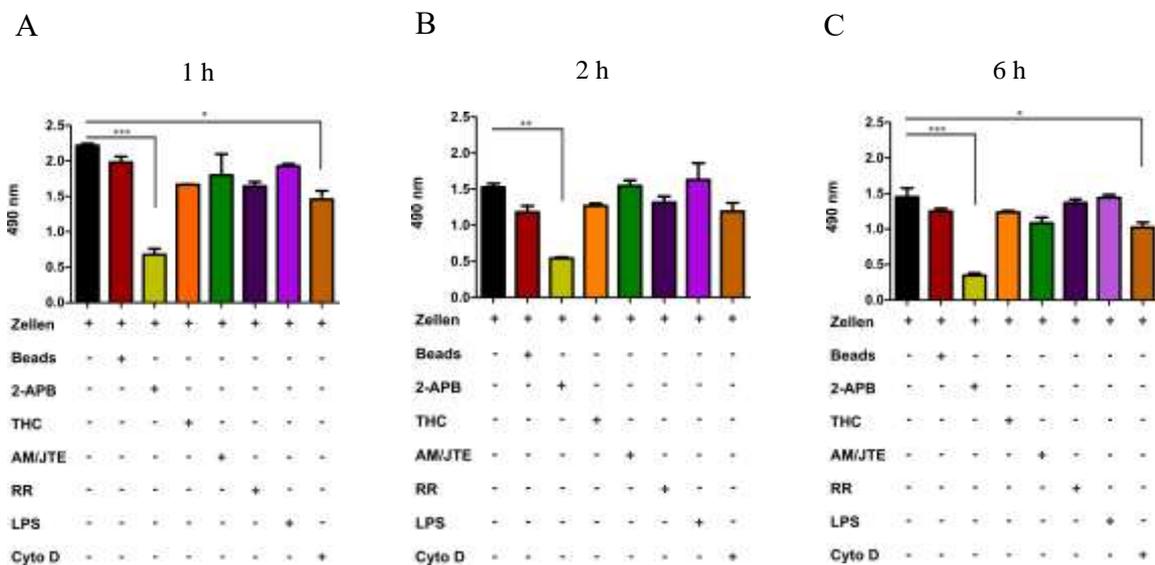


Abbildung 4.23: Zellviabilität von BV2-Zellen. Zellviabilität von BV2-Zellen, gemessen als Absorption bei 490 nm in *MTS*-Puffer nach 1 h (A), 2 h (B) und 6 h (C) Inkubation mit Latex Beads, 2-APB (1 mM), THC (30 μ M), CB₁ und CB₂-Blocker (AM/JTE 100 nM), RR (10 μ M), LPS (1 μ g/ml) und Cytochalasin D (5 μ M). Die Daten stellen Mittelwerte +S.E.M. dar. (jeweils 2 Wells in 2 unabhängigen Experimenten; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001)

4.7 Pharmakologie von humanem TRPV2 exprimiert in HEK293 und COS-7 Zellen

4.7.1 TRPV2-Agonisten

TRPV2 wird durch 2-APB (Hu *et al.*, 2004), THC und CBD Speziespezifisch aktiviert (Qin *et al.*, 2008). Laut Literatur wurde hTRPV2 durch 300 μM 2-APB aktiviert (Neeper *et al.*, 2007). Abbildungen 4.24 zeigt, dass 1 mM 2-APB (Abb. 4.24A), 10 μM THC (Abb. 4.24B) und 1 mM CBD (Abb. 4.24C) einen Strom in human TRPV2-überexprimierenden HEK293-Zellen (HEK-hTRPV2) aktiviert. Bei Applikation von 2-APB und THC ging der induzierte Strom zunächst hoch und dann auch rasch wieder zurück. Lediglich bei 1 mM CBD gab es einen langsam steigenden Ein- und Auswärtsstrom, dessen Ausgangswert nach Ende der Applikation nicht wieder erreicht wurde (Abb. 4.24C). In HEK293 Zellen ohne TRPV2 war kein Strom durch CBD, 2-APB oder THC (Anhang Abb. 6.5B, C und D) zu messen. Anhang Abbildungen 6.5C und D wurden aus meiner Masterarbeit (Malihpour, 2017) entnommen.

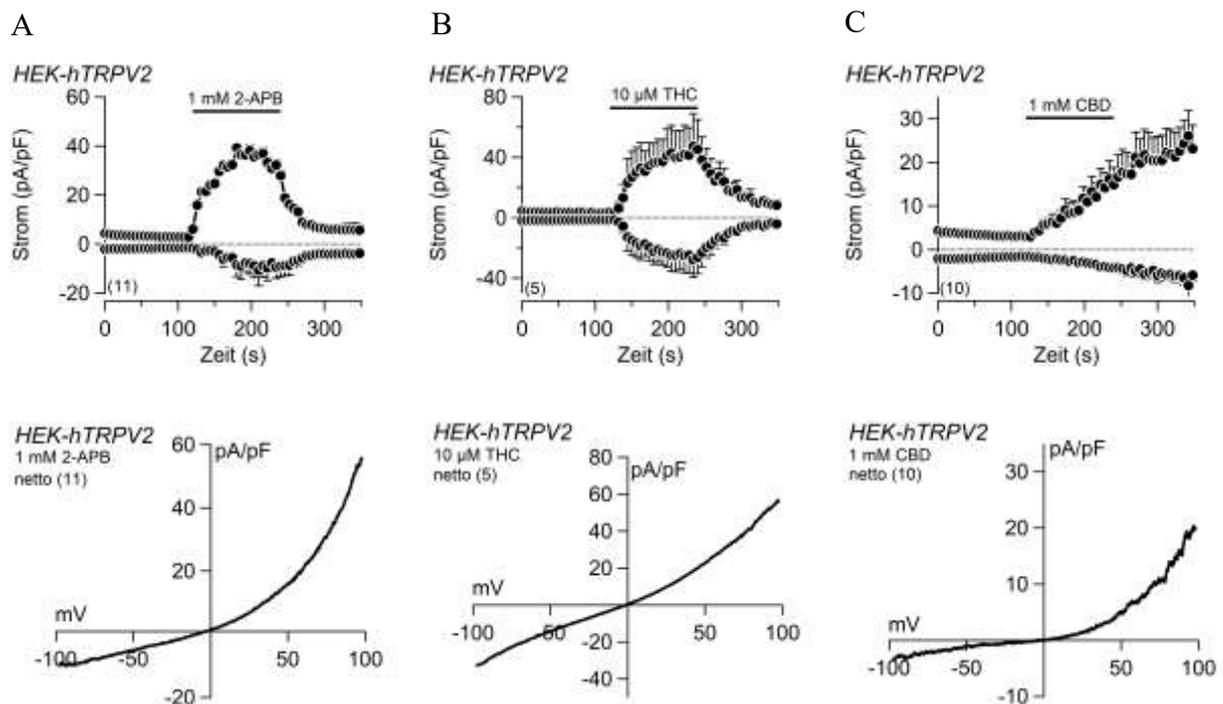


Abbildung 4.24: 2-APB, THC und CBD aktivieren TRPV2 Ströme in hTRPV2-exprimierenden HEK293-Zellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 1 mM 2-APB (A), 10 μM THC (B) und 1 mM CBD (C). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungskurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in 2-APB, THC bzw. CBD sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

Ergebnisse

Da hTRPV2 durch Cannabinoide (THC, CBD) aktiviert wird (Abb. 4.24), sollte nachfolgend untersucht werden, ob hTRPV2 auch durch Endocannabinoide wie 2-Arachidonylglycerol (2-AG) aktiviert wird, was bei Applikation von 100 μM 2-AG jedoch nicht der Fall war (Abb. 4.25A). Monet *et al.* haben gezeigt, dass Lysophosphatidylcholin (LPC) einen Calciumeinstrom über den TRPV2-Kanal induziert und TRPV2 Proteine durch Translokation an die Plasmamembran gebracht werden (Monet *et al.*, 2009). Doch weder in HEK293 Zellen, die humanes TRPV2 exprimieren, noch in HEK293 Zellen, die Maus TRPV2 exprimieren konnte ein Strom durch 20 μM LPC gemessen werden (Abb. 4.25B, C). Neben THC und Cannabidiol wurde in der Literatur beschrieben, dass TRPV2 auch durch Probenecid aktiviert werden kann (Bang *et al.*, 2007). Aber auch 1 mM Probenecid konnte keinen Strom in hTRPV2-exprimierenden HEK293 Zellen auslösen (Abb. 4.24D).

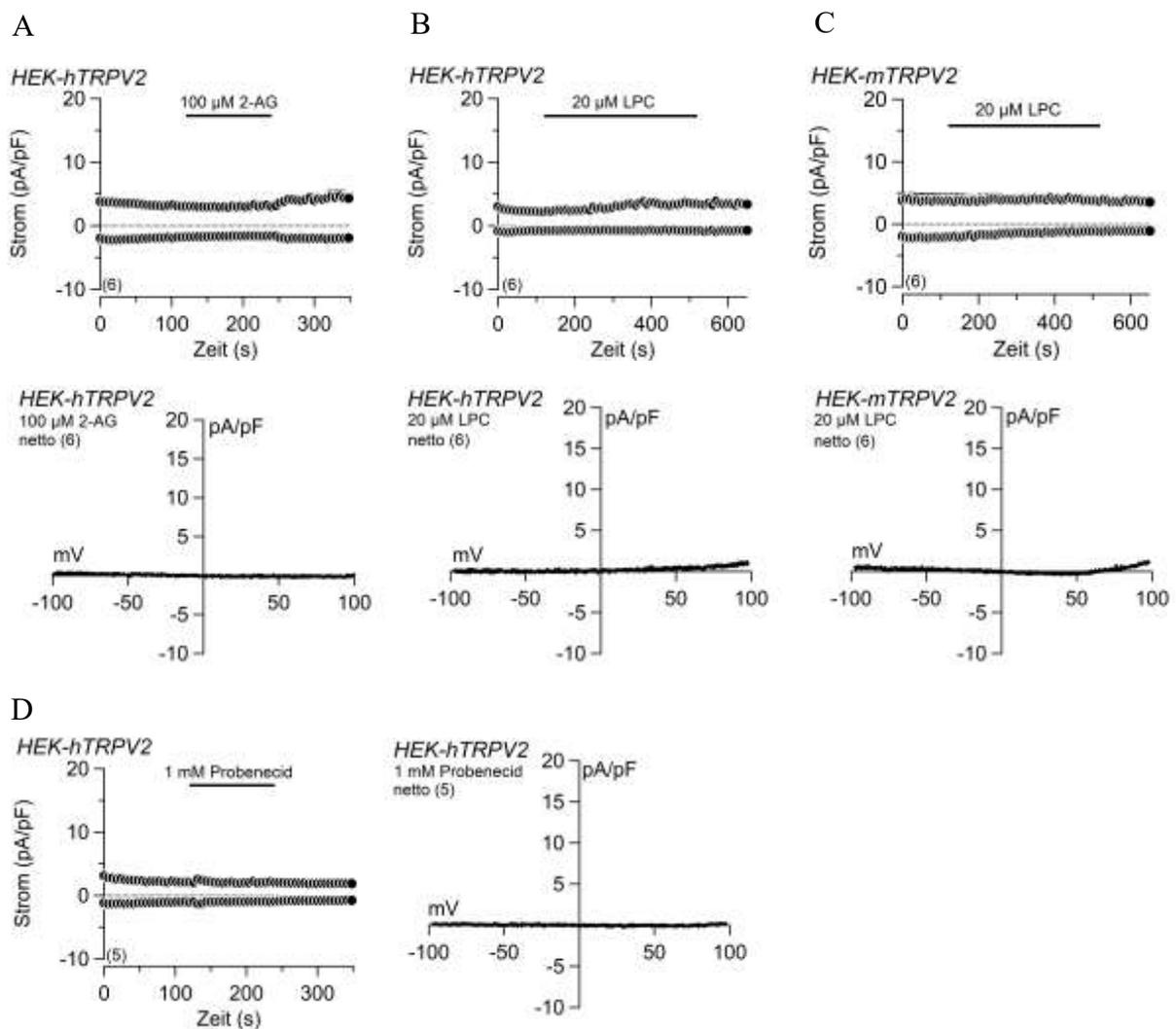


Abbildung 4.25: 2-AG, LPC und Probenecid aktivieren keine Ströme in hTRPV2-exprimierenden HEK293-Zellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 100 μ M 2-AG (**A**), 20 μ M LPC (**B, C**) und 1 mM Probenecid (**D**) in HEK293 Zellen die humanes (h)TRPV2 (**A, B, D**) und Maus (m)TRPV2 (**B**) exprimieren. Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in 2-AG, LPC und Probenecid sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

COS-7 Zellen sind eine Zelllinie, die aus den immortalisierten CV-1-Zellen einer afrikanischen grünen Meerkatze (*Chlorocebus aethiops*) hervorgegangen sind. Humanes TRPV2 wurde in COS-7 Zellen transfiziert und Patch-Clamp-Messungen durchgeführt. Wie in human TRPV2-exprimierenden HEK293-Zellen konnte auch in human TRPV2-exprimierenden COS-7 Zellen Ströme nach Applikation von 2-APB (Abb. 4.26A), THC (Abb. 4.26B) und CBD (Abb. 4.26C) gemessen werden. Die THC-aktivierten Ströme waren unabhängig von der Aktivierung eventuell in COS-7 Zellen exprimierter Cannabinoidrezeptoren (CB₁ und CB₂), da jeweils 100 μ M der Cannabinoidrezeptor Antagonisten AM251 (CB₁) und JTE907 (CB₂) keinen Effekt auf den THC-aktivierten Strom hatten (Abb. 4.26B). Cannabidiol führte bei Applikation von 100 μ M, 300 μ M und 1 mM zu einer Dosis-abhängigen hTRPV2 Aktivierung, wobei auch hier die Cannabinoidrezeptor Antagonisten AM251 (CB₁) und JTE907 (CB₂) keinen Effekt auf den 300 μ M CBD-aktivierten Strom aufwiesen (Abb. 4.26C). In COS-7 Zellen ohne Expression von hTRPV2 konnte kein Strom bei Applikation von 1 mM 2-APB, 30 μ M THC oder 1 mM CBD gemessen werden (Anhang Abb. 6.6).

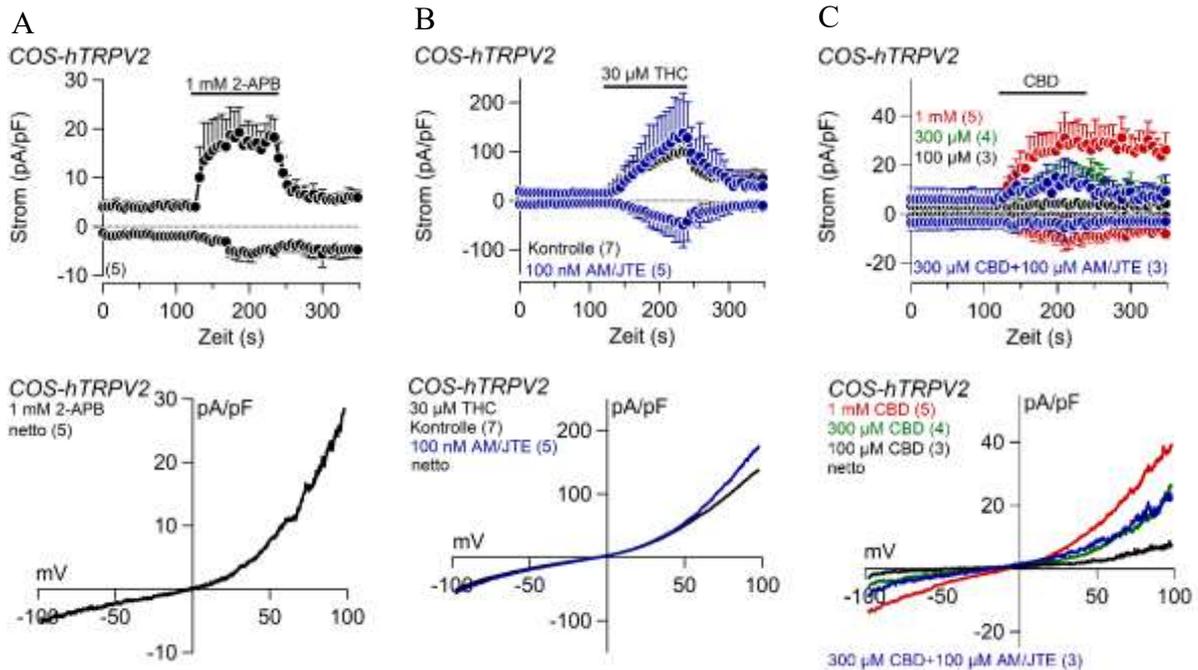


Abbildung 4.26: 2-APB, THC und CBD aktivieren TRPV2 Ströme in hTRPV2-exprimierenden COS-7-Zellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 1 mM 2-APB (A), 30 μ M THC (B) und 100 μ M, 300 μ M und 1 mM CBD (C) in Abwesenheit (A, B Kontrolle, C) und Anwesenheit (B und C blaue Kurven) von 100 μ M AM251 und 100 μ M JTE907. Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannung-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in 2-APB, THC bzw. CBD sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

4.7.2 TRPV2 Antagonisten

Ruthenium Rot (RR) ist ein nicht kompetitiver Inhibitor aller TRP Kanäle, auch von TRPV2. Benham *et al.* konnten eine IC_{50} von 0,6 μ M RR zur Inhibition von Maus und Human TRPV2 messen und ich in meiner Masterarbeit von 121 nM für Maus TRPV2 in Mikrogliazellen (Benham *et al.*, 2003; Malihpour, 2017). Um den inhibitorischen Effekt von RR auf den humanen TRPV2 zu testen, wurde 10 μ M RR in die Badlösung gegeben und 1 mM 2-APB über die Applikationspipette auf die HEK293-hTRPV2 Zellen appliziert. Dabei wurde der 2-APB-aktivierte Strom signifikant inhibiert (Abb. 4.27). Wie in kultivierten Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus inhibierten auch 100 μ M Valdecoxib und 50 μ M Tiloron, beides noch nicht publizierte TRPV2 Blocker (siehe 4.1.1), den 2-APB-induzierten Strom in HEK-hTRPV2-Zellen. Tranilast, das in mehreren Arbeiten als TRPV2-spezifischer Antagonist beschrieben wurde (Peralvarez-Marin *et al.*, 2013), hatte keine inhibitorische Wirkung auf den 2-APB-induzierten Strom in hTRPV2-exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 4.27).

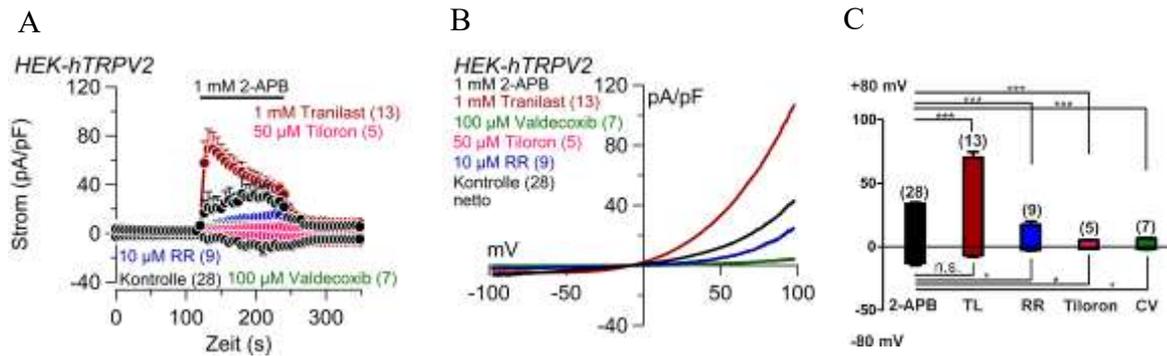


Abbildung 4.27: Inhibition von TRPV2 Strömen in hTRPV2-exprimierenden HEK-Zellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 1 mM 2-APB in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von 10 µM RR, 1 mM Tranilast, 100 µM Valdecoxib und 50 µM Tiloron (A). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in A. (C) Statistischer Vergleich der Amplituden der 2-APB-induzierten Ein- (unten) und Auswärtsströme (oben) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von 1 mM Tranilast (TL), 10 µM RR, 50 µM Tiloron und 100 µM Valdecoxib (CV). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit in A und die Stromamplituden in C und Mittelwerte ohne SEM für die IVs in B. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Als nächstes wurde der Effekt von Ruthenium Rot auf THC- und CBD-induzierte Ströme in COS-7 Zellen untersucht, die humane TRPV2 Proteine exprimieren. Die Zellen wurden mit 10 µM RR inkubiert und 30 µM THC (Abb. 4.28A) bzw. 300 µM CBD appliziert (Abb. 4.28B). Sowohl der der THC- als auch der CBD-induzierte Einwärtsstrom wurde durch RR im Vergleich zu Kontrollzellen komplett inhibiert, wobei sich die Amplitude des Auswärtsstroms nicht änderte. Die Strom-Spannungs-Kurven der maximalen Netto-Ströme während der Applikation von 30 µM THC (Abb. 4.28A, unten) und 300 µM CBD (Abb. 4.28B, unten) in Anwesenheit von 10 µM RR weisen eine veränderte Stromspannungsabhängigkeit auf: Während der Einwärtsstrom komplett inhibiert ist, ist der Auswärtsstrom nicht inhibiert, zeigt aber eine stärkere Auswärtsrektifizierung als unter Kontrollbedingungen ohne RR (Abb. 4.28A, B).

Ergebnisse

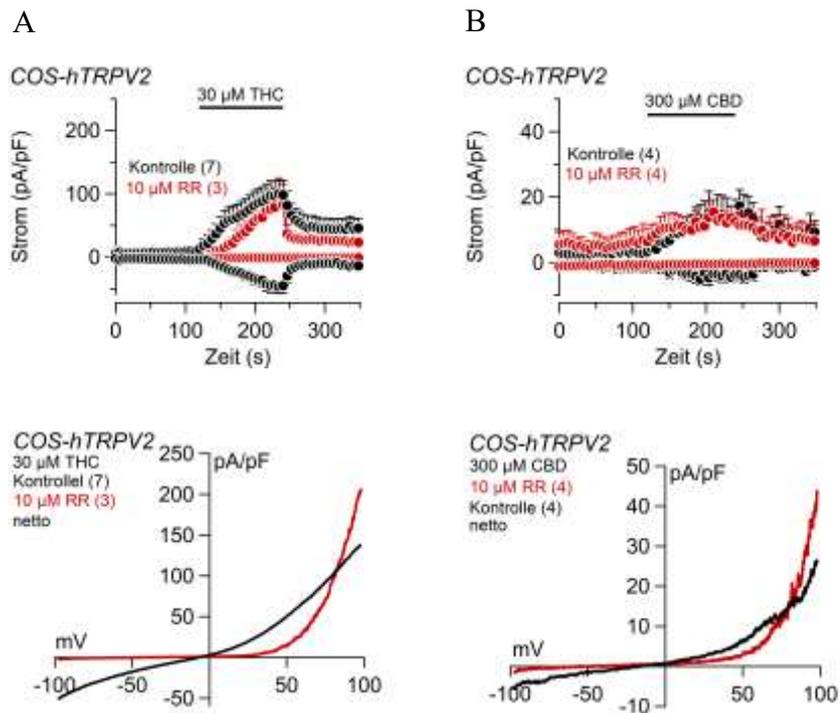


Abbildung 4.28: RR inhibiert Einwärtsströme in hTRPV2-exprimierenden COS-7-Zellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 30 μM THC (A) und 300 μM CBD (B) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Rutehnium Rot (RR). Balken markieren den Zeitraum der Applikation von THC bzw. CBD. Strom-Spannungskurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) ohne und in RR sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

5 Diskussion

Mikrogliazellen sind die Immunzellen im zentralen Nervensystem. Ihre Funktion hängt von ihrer Aktivität ab, die durch intrazelluläre Ca^{2+} Signale moduliert wird. TRPV2 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal und Ca^{2+} permeabler Ionenkanal ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^{+}} = 1-3$) ((Clapham, 2003), den wir und mittlerweile auch andere (Maksoud *et al.*, 2019) in Mikrogliazellen identifiziert haben, und den ich in meiner Masterarbeit begonnen habe pharmakologisch zu charakterisieren (Malihpour, 2017). In der vorliegenden Arbeit habe ich die pharmakologische Charakterisierung von TRPV2 in kultivierten Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus fortgesetzt und die Funktion von TRPV2 in Mikrogliazellen untersucht. Aufgrund begrenzter Mengen an kultivierten primären Mikrogliazellen wurde in dieser Arbeit auch die immortalisierte permanente BV2-Zelllinie verwendet, die vielfach als Modellzelllinie für Maus Mikrogliazellen zum Einsatz kommt. Es gab bereits Hinweise, dass BV2 Zellen funktionelle TRPV2 Kanäle exprimieren (Hassan *et al.*, 2014a), diese Ergebnisse konnten wir in der vorliegenden Arbeit bestätigen. Zur funktionellen Charakterisierung von TRPV2 in den BV2-Zellen wurden Whole-Cell Patch Clamp und Ca^{2+} Imaging Experimente durchgeführt. Um die Rolle von TRPV2 in der Funktion der Mikrogliazellen zu untersuchen habe ich die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS-Assay), das Migrationsverhalten (Migration-Assay) und die Phagozytoseaktivität (Phagozytose-Assays) in Ab- und Anwesenheit verschiedener TRPV2 Agonisten und Antagonisten sowie in primären Mikrogliazellen aus Wildtyp und TRPV2-defizienten Mäusen untersucht.

Bei der Präparation neugeborener TRPV2-defizienter Mäuse fiel auf, dass diese deutlich kleiner waren als Wildtyp Mäuse und demzufolge auch ein geringeres Gewicht aufwiesen. Ähnliche Beobachtungen wurden schon von Park und Mitarbeitern publiziert, die die TRPV2-defiziente Mauslinie generiert hatten (Park *et al.*, 2011b). Desweiteren konnten die Autoren beobachten, dass die Anzahl der homozygoten TRPV2^{-/-} Nachkommen bei heterozygoter Verpaarung reduziert war und nicht den zu erwartenden Mendel'schen 25% entsprach (Link *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011b). Auch diese Beobachtung konnten wir bestätigen. Dies weist darauf hin, dass TRPV2 möglicherweise bei der embryonalen Entwicklung der Maus eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Plazenta TRPV2-defizienter Mäuse ein geringeres Gewicht im Vergleich zu Wildtyp Mäusen aufweist (De Clercq und Vriens, 2018). Zudem konnte in unserer Arbeitsgruppe funktionelle TRPV2 Kanäle in der Plazenta und Synzytiotrophoblasten nachgewiesen werden (Belkacemi *et al.*, noch nicht publizierte Daten).

5.1 Pharmakologische und funktionelle Charakterisierung von TRPV2 in Mikrogliazellen

In meiner Masterarbeit (Malihpour, 2017) und in der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass in den Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus Ströme durch die TRPV2 Agonisten 2-APB und THC aktiviert werden konnten, die in Anwesenheit von TRPV2 Antagonisten Ruthenium Rot, Valdecoxib und Tiloron nicht auftraten bzw. reduziert waren. Die Blockade durch Ruthenium Rot ist spannungsabhängig, d.h. im Fall von Ruthenium Rot, dass der Einwärtsstrom gehemmt wird, der Auswärtsstrom jedoch nicht. 2-APB aktiviert z.B. auch Kanäle wie TRPV1 und TRPV3 und hat einen inhibitorischen Einfluss auf TRPM8 (Gao *et al.*, 2016). Da die 2-APB bzw. THC-aktivierten Ströme in kultivierten Mikrogliazellen aus dem Kortex von TRPV2-defizienten Mäusen jedoch nicht auftraten, konnten sie in Wildtyp Mikrogliazellen eindeutig als TRPV2 Ströme identifiziert werden. Es wurde bereits publiziert, dass 2-APB Calciumeinströme (EC_{50} 130 μ M) in Maus TRPV2-transfizierten Zellen induziert (Hu *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 2-APB und THC zu einem zytosolischen Ca^{2+} Anstieg in WT-Mikrogliazellen führt, nicht aber in Mikrogliazellen die aus TRPV2^{+/-} und TRPV2^{-/-} Mäusen isoliert worden waren. Probenecid und Amilorid, die als TRPV2 Agonist bzw. Antagonist bereits publiziert worden waren, zeigten keinen Effekt (Bang *et al.*, 2007; McGahon *et al.*, 2016). Laut Bang *et al.* aktiviert Probenecid ein intrazelluläres Ca^{2+} Signal mit einer EC_{50} von 31.9 μ M in TRPV2 (Ratte) -exprimierenden HEK-Zellen. In der Arbeit von McGahon und Mitarbeitern konnte intrazelluläres Ca^{2+} Signal durch Amilorid in *Retinal VSMCs* (*retinal vascular smooth muscle cells*) der Ratte inhibiert werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die unterschiedliche Wirkungseffizienz von Probenecid und Amilorid in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu schon publizierten Daten an den unterschiedlichen Spezies (Ratte, Maus, Human) liegen könnte.

Für Maus TRPV2 konnten 2-APB, THC, CBD, Probenecid als Agonisten und RR als auch Tranilast als Antagonisten in heterologer Überexpression in HEK293 bzw. COS-7 Zellen nachgewiesen werden. Die Substanzen zeigen ähnliche Effekte auf BV2 Zellen, die endogen TRPV2 Kanäle exprimieren (Bang *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2014a; Iwata *et al.*, 2018; Mihara *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden HEK293-Zellen verwendet, die transient Maus TRPV2 exprimieren. Murine TRPV2 Kanäle werden durch 2-APB aktiviert und diese so aktivierten Auswärtsströme können durch Tiloron (50 μ M) inhibiert werden. Im Gegensatz dazu können 2-APB induzierte Einwärtsströme durch 50 μ M Tiloron potenziert werden. Eine

Diskussion

Erklärung hierfür wäre, dass Tiloron einen sogenannten Spannungs-abhängigen Block von Maus TRPV2 verursacht. D.h. bei positiven Membranpotentialen wird Maus TRPV2 durch Tiloron inhibiert und bei negativen Potentialen potenziert. Es könnte sein, dass es zwei Tiloron Bindungsstellen im murinen TRPV2 Protein gibt. Tiloron könnte TRPV2-Kanal von innen blockieren und dadurch wird keine Kationen aus der Zellen hinaus. Hier sollte weitere Experimente in Anwesenheit von Tiloron in die Pipettenlösung durchgeführt werden. Laut Literatur aktiviert CBD (10 μM) sowohl humane als auch TRPV6 Kanäle der Ratte (Qin *et al.*, 2008). In dieser Arbeit konnte durch CBD nur ein geringer zytosolischen Ca^{2+} Anstieg in Zellen, die murines TRPV2 exprimieren, induziert werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass potentielle Bindungsstellen für CBD im murinen TRPV2 Protein nicht konserviert sind.

TRPV2 aus der Ratte wurde nach Überexpression in HEK293-Zellen bzw. endogen im Spinalganglion durch 2-APB, THC, CBD, Probenecid aktiviert und durch RR und Amilorid inhibiert (Bang *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2016; McGahon *et al.*, 2016; Neeper *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008). Bei Ca^{2+} Imaging und Whole-Cell Patch Clamp Experimenten in Spinalganglion-Zellen der Ratte, die TRPV2 exprimieren, konnte eine halbmaximale effektive aktivierende Konzentration (EC_{50}) von 14 μM THC und 3,7 μM CBD ermittelt werden (Qin *et al.*, 2008). Mithilfe elektrophysiologischer und Calcium-Imaging-Techniken konnte gezeigt werden, dass Probenecid TRPV2 aus der Ratte exprimiert in HEK293T-Zellen aktivieren kann (Bang *et al.*, 2007). Dabei betrug die EC_{50} von Probenecid 31,9 μM und die maximale Effizienz wurde bei 1 mM erreicht. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass TRPV2 aus der Ratte durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle aktiviert werden kann (Fricke *et al.*, 2019). Fricke und Mitarbeiter identifizierten konservierte Methioninreste in humanem als auch in TRPV2 der Ratte, die durch ROS oxidiert werden. Die Oxidation bewirkt eine Modulation der TRPV2 Aktivität. Wie in der Literatur beschrieben wurde, inhibiert Ruthenium Rot (10 μM) 2-APB-induzierte TRPV2-Einwärtsströme (Hu *et al.*, 2004). Die Experimente wurden an Spinalganglien der Ratte durchgeführt.

Für humanes TRPV2 wurden THC, CBD als Agonisten und RR, Tranilast als Antagonisten nach heterologer Expression in HEK293-Zellen, CHO-Zellen und endogen in Makrophagen von Patienten mit zystische Fibrose beschrieben (Iwata *et al.*, 2018; Leveque *et al.*, 2018; Neeper *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden HEK293-Zellen und COS-7-Zellen verwendet, die transient humanen TRPV2 exprimierten, die ebenfalls nach Applikation von 2-APB, THC und CBD Ströme aufwiesen. Im Gegensatz zu Maus und Ratte TRPV2 konnte in Human TRPV2-transfizierten HEK293-Zellen keine Aktivierung durch 2-

Diskussion

APB beobachtet werden (Juvin *et al.*, 2007; Neeper *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnte durch 1 mM 2-APB humanes TRPV2 aktiviert werden und Möglicherweise lag die hTRPV2-Aktivierung durch 2-APB in der vorliegenden Arbeit daran, dass hier 1 mM 2-APB und nicht 300 μ M 2-APB, wie in Neeper *et al.* verwendet wurde. In Human Glioblastom Zelllinie (U87MG) löste CBD ($EC_{50} = 22,2 \mu$ M) die Human TRPV2-Ströme aus und diese Aktivierung wurde durch RR ($IC_{50} = 3,25 \mu$ M) inhibiert (Nabissi *et al.*, 2013). CBD und THC-induzierten Ströme sind in dieser Arbeit durch RR, Valdecoxib und Tiloron inhibiert. Tranilast, was als TRPV2 Antagonist bekannt ist (Iwata *et al.*, 2018; Peralvarez-Marin *et al.*, 2013; Nie *et al.*, 1997), führte zu keiner Inhibierung von hTRPV2-Strom. Zur Übersicht über die Speziespezifischen Agonisten und Antagonisten siehe auch Tabelle 3.4 und 3.5. Laut Monet *et al.* (2009) induzierte die Applikation von 10 μ M LPC nach wenigen Minuten einen anhaltenden Ca^{2+} Anstieg in CHO-mTRPV2-Zellen und HEK-hTRPV2 Zellen (Monet *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde 20 μ M LPC auf Human und Maus TRPV2 exprimierende HEK293-Zellen appliziert, aber es konnte kein Strom gemessen werden (Abb 4.25B, C). Der Unterschied könnte daran liegen, dass in dieser Arbeit 1-Acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (LPC) aus Eigelb verwendet wurde aber in der Arbeit von Monet *et al.* (Monet *et al.*, 2009) wurde 1-Acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin aus Sojabohnen verwendet. Es wurden 1 mM Probenecid auf Human TRPV2-exprimierende HEK293-Zellen getestet, jedoch hatte die Applikation von Probenecid keinen Effekt auf die HEK-hTRPV2-Zellen und auch auf HEK-mTRPV2 (Malihpour, 2017). In der Arbeit von Hassan *et al.* (Hassan *et al.*, 2014a) konnte die Phagozytose in BV2-Zellen durch 1 mM Probenecid signifikant erhöht werden aber in dieser Arbeit wurde durch Probenecid mithilfe elektrophysiologischer-Techniken kein TRPV2-Strom gemessen. Dieser Unterschied kann an den unterschiedlichen Methoden oder Spezies (Maus, Human) liegen.

Wie in der Literatur beschrieben, aktiviert THC auch die G-Protein-gekoppelten Cannabinoidrezeptoren CB_1 und CB_2 (Matsuda *et al.*, 1990) und es ist belegt, dass Mikrogliazellen diese Rezeptoren exprimieren (Cabral und Marciano-Cabral, 2005). Da CB_1 und CB_2 Rezeptorblocker keinen Einfluss auf den THC-induzierten Strom in Mikrogliazellen hatten kann davon ausgegangen werden, dass THC wie auch die anderen Cannabinoide TRPV2 in Mikrogliazellen direkt aktivieren. Auch nach heterologer Expression von humanem TRPV2 in COS-7 Zellen führten THC und CBD zu einer Aktivierung von TRPV2 (Abb. 4.26B, C).

In einer der ersten Arbeiten zu TRPV2 wurde beschrieben, dass IGF1 über die Stimulation des IGF1 Rezeptors aktive TRPV2 Kanäle aus der Maus nach Überexpression in CHO-K1

Zellen in die Plasmamembran transloziert. Folglich konnte direkt nach Einbruch der Plasmamembran der Zellen TRPV2 Ströme gemessen werden (Kanzaki *et al.*, 1999). Daher wurde TRPV2 zunächst als wachstumsfaktorregulierter Kanal (*growth factor regulated channel*, GRC) bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch weder in Mikrogliazellen noch nach Überexpression von Maus TRPV2 in HEK293-Zellen ein Strom durch Applikation von IGF1 aktiviert werden. Auch hatte eine Inkubation mit IGF1 keinen Einfluss auf den 2-APB-induzierten Strom in Mikroglia und mTRPV2-exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 4.7, 4.8). Laut Literatur besitzen Mikrogliazellen IGF1 Rezeptoren und diese Rezeptoren haben einen Antiinflammatorischen Effekt auf die Mikrogliazellen (Labandeira-Garcia *et al.*, 2017; Palin *et al.*, 2007; Rodriguez-Perez *et al.*, 2016). Es ist auch bekannt, dass HEK293 Zellen und CHO-K1 Zellen die IGF1 Rezeptoren exprimieren (El-Shewy *et al.*, 2007; Kanzaki *et al.*, 1999). Der Unterschied zwischen die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit und Kanzaki *et al* konnte nicht begründet werden und hierzu bedarf es noch weiterführender Experimente.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch BV2-Zellen als Modellzelllinie für Maus Mikrogliazellen eingesetzt. BV2-Mikroglia sind eine immortalisierte Zelllinie, die aus Hirngewebe der Maus isoliert wurden und viele phänotypische Eigenschaften von Mikroglia aufweisen (Blasi *et al.*, 1990b). In seiner Arbeit zeigte Hassan, dass BV2-Zellen das TRPV2-Protein exprimieren und CBD die TRPV2-Translokation in die Plasmamembran verstärkt (Hassan *et al.*, 2014a). In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass BV2-Zellen Ströme aufweisen, die dieselben pharmakologischen Eigenschaften wie TRPV2 in den primären Mikrogliazellen besitzen. Im Gegensatz zu Hassan *et al.* konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Cannabidiol-induzierten zellulären Signale in den BV2-Zellen detektiert werden. Auch die primären Mikrogliazellen der Maus reagierten nicht auf die Applikation von CBD.

5.2 2-Arachidonylglycerol induziert Ca-Ströme in Mikrogliazellen

Anandamid und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) sind natürlich vorkommende Endocannabinoide. 2-AG konnte im Gehirn, als auch in Leber, Lunge, Milz und Niere der Ratte nachgewiesen werden (Kondo *et al.*, 1998). Es konnte in den verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Cannabinoide eine neuroprotektive Wirkung haben. 2-Arachidonoylglycerin (2-AG) oder Palmitoylethanolamid (PEA) können Mikrogliazellen beeinflussen und die Anzahl geschädigter Neuronen nach exzitotoxischer Läsion in OHSC (organotypic hippocampal slice cultures) verringern (Hohmann *et al.*, 2019). Laut Qin *et al.* können Endocannabinoide wie 2-

Arachidonylglycerol (2-AG) und Anandamid (AEA) in Spinalganglien der Ratte endogene TRPV2-Ströme aktivieren (Qin *et al.*, 2008). In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass auch in BV2-, Mikrogliazellen oder nach Überexpression in HEK293 Zellen durch 2-AG, Einwärtsströme aktiviert werden können. Allerdings zeigen auch Mikrogliazellen aus TRPV2 defizienten Mäusen ähnliche Ströme, die wiederum durch TRPV2 Antagonisten nicht inhibiert werden konnten. Dies weist darauf hin, dass der 2-AG-induzierte Strom nicht von TRPV2 abhängt, und lediglich in den Mikrogliazellen, nicht aber endogen in HEK293 Zellen auftritt.

In der Literatur ist beschrieben, dass 2-AG die Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂ aktiviert (Reggio, 2010). Jedoch hatte die Inkubation der Mikrogliazellen mit Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten keinen inhibitorischen Effekt auf den 2-AG-induzierten Strom in Mikrogliazellen. Da auch eine Inkubation mit Pertussis Toxin (PTX) keinen großen Effekt hatte, scheint der 2-AG-induzierte Strom in Mikrogliazellen auch nicht über andere PTX-sensitive G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt zu sein. In Mikrogliazellen aus der Ratte wurde die funktionelle Expression von TRPV4 beschrieben (Konno *et al.*, 2012a) und 2-AG wurde als Aktivator von TRPV4 in humanen Gefäßendothelzellen postuliert (Ho *et al.*, 2015). Der 2-AG-abhängige Strom war jedoch in Anwesenheit des TRPV4 Inhibitors HC-067047 nach wie vor vorhanden, so dass auch die Aktivierung von TRPV4 durch 2-AG in den Mikrogliazellen ausgeschlossen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass 2-AG neben dem Strom auch einen intrazellulären Ca²⁺ Anstieg verursacht. Dieser war abhängig von extrazellulärem Ca²⁺. Die Substitution von extrazellulärem Na⁺ durch NMDG führte zu keiner Veränderung der Stromspannungskurve des 2-AG-aktivierten Stromes in Mikrogliazellen, lediglich zu einer minimalen Reduktion des Einwärtsstromes. Dies weist darauf hin, dass der Einwärtsstrom nur zu einem kleinen Teil durch Na⁺ getragen wird. Die Substitution von extrazellulärem Cl⁻ durch Aspartat führte lediglich zu einer leichten Verschiebung des Umkehrpotentials und weist zumindest auf eine Beteiligung von Cl⁻ am 2-AG-aktivierten Strom hin. Die experimentellen Ergebnisse lassen bisher noch keine eindeutigen Erkenntnisse zu den molekularen und mechanistischen Grundlagen des 2-AG-induzierten Stromes in den Mikrogliazellen zu. Hierzu bedarf es noch weiterführender Experimente.

5.3 TRPV2 in Mikrogliazellen nach Stimulation mit LPS

Es ist seit langem bekannt, dass Mikrogliazellen an Pathomechanismen neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sind. Wie in der Einleitung beschrieben können Mikrogliazellen aus einem nicht-aktivierten Zustand in einen aktivierten Zustand versetzt werden. Mikrogliazellen können hierbei durch einzelne oder mehrere Stimuli aktiviert werden wie beispielsweise durch die Aktivierung durch Lipopolysaccharide oder durch neuronale Schädigung (Lull und Block, 2010). Es ist bekannt, dass aktivierte Mikrogliazellen zu einer fortschreitenden Schädigung von Neuronen führen und sie eine chronische Quelle für Tumornekrosefaktor- α , Stickstoffmonoxid, Interleukin-1 β und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind (Lull und Block, 2010). Wenn Mikrogliazellen aktiviert werden, spielen sie eine wichtige Rolle bei z.B. pathologischen Zuständen wie Verletzungen des ZNS, Schlaganfall, neurodegenerative Erkrankungen, Tumor oder neuropathischem Schmerz (Cao und Zhang, 2008; Watters *et al.*, 2005). Mikrogliazellen können experimentell durch die Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, aktiviert werden und durch die Aktivierung nimmt ihre Zellgröße zu (Beck *et al.*, 2008). Sie verändern ihre Morphologie, ihre Genexpression sowie ihren Bestand an Ionenkanälen durch LPS-Stimulation (Franco und Fernandez-Suarez, 2015; Farber und Kettenmann, 2005). In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nach 24-stündiger Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS die meisten Zellen eine amöboide Morphologie (Spiegelei-förmig) mit einer 62%-igen Erhöhung der Zellgröße (Zellkapazität) haben (Beck *et al.*, 2008; Lively und Schlichter, 2013). Wie die Autoren in der Arbeit von Beck *et al.* (Beck *et al.*, 2008) zeigen konnten, wird z.B. der Speicher-aktivierte I_{CRAC} (Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} current) nach Stimulation mit LPS reduziert, wohingegen der Ca^{2+} -aktivierte TRPM4-ähnliche Strom nicht beeinflusst war. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch die Zellgröße (Zellkapazität) nach 24 stündiger Inkubation von 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS zugenommen hatte (Abb. 4.10) und die ermittelten Werte mit denen von Beck *et al.*, gut übereinstimmen. Unsere Experimente weisen darauf hin, dass die funktionelle Expression von TRPV2, gemessen durch die Aktivierung mit 1 mM 2-APB, nach Inkubation mit LPS nach einer Stunde sein Maximum erreicht, dann zunächst wieder sinkt und nach weiterer Inkubation mit LPS nach 4 h wieder langsam ansteigt (Abb. 4.10). Es scheint als ob TRPV2 besonders in der frühen Phase der Aktivierung durch LPS eine besondere Rolle spielt. Es ist auch bekannt, dass LPS Stimulation die Expression von Kaliumkanälen (Kv1.3) in BV2 Zellen und Natriumkanäle (Nav1.6) in Mikrogliazellen und Makrophagen aus der Maus stimuliert (Rangaraju *et al.*, 2017; Craner *et al.*, 2005). Lively und Schlichter (2018) konnten z.B. zeigen, dass in primären

Mikrogliazellen aus der Ratte die Expression der Transkripte von *Trpm4* und *Trpm5* durch 24 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS um den Faktor 2-3 erhöhte, während die Expression von *Trpm2* relativ konstant bleibt (Lively und Schlichter, 2018).

5.4 TRPV2 beeinflusst die LPS aktivierte Migration von Mikrogliazelle

Aktivierte Mikrogliazellen weisen eine amöboide Morphologie auf, ihre Migrationsfähigkeit ist erhöht und sie erhalten die Fähigkeit zur extensiven Phagozytose (Echeverry *et al.*, 2016a). In diesem Zusammenhang konnte z.B. gezeigt werden, dass BV2-Mikrogliazellen nach LPS-Behandlung eine signifikant erhöhte Migration zeigen (Hui *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2014; Nam *et al.*, 2018). Eine andere Arbeitsgruppe konnte sowohl in Wundheilungs (Scratch)- als auch in Transwell-Migrations-Assays zeigen, dass LPS-stimulierte BV2-Zellen eine vierfach erhöhte Migrationsrate aufweisen (Do *et al.*, 2020). Primäre Mikrogliazellen der Ratte zeigen nach LPS Behandlung (1 µg/ml) eine schnellere Wundheilung (Ding *et al.*, 2018).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit LPS zu einer Erhöhung der Migrationsrate von BV2-Zellen als auch von kultivierten primären Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen führt. Dabei verursacht LPS in BV2-Zellen eine Vermehrung der über ein Transwell migrierten Zellen von etwa 4% auf 7% (Abb. 4.17). Die TRPV2-Antagonisten Ruthenium Rot (10 µM) und Valdecoxib (100 µM) inhibieren die Migration der BV2-Zellen in nicht LPS-stimulierte Zellen von etwa 4% auf 2% und in LPS-stimulierte Zellen von 7% auf 1%. Auch primäre Wildtyp Mikrogliazellen weisen nach Stimulation mit LPS eine signifikant erhöhte Migrationsrate im Vergleich zu TRPV2-defizienten Mikrogliazellen auf (Abb. 4.18). Die Experimente weisen darauf hin, dass TRPV2 die Migration von Mikrogliazellen beeinflusst.

Für periphere Makrophagen wurde aufgrund von Migrations-inhibitorischen Effekten des TRPV2-Antagonisten Ruthenium Rot bzw. TRPV2-Silencing bereits vorgeschlagen, dass der TRPV2-Kanal an der Migration beteiligt ist (Nagasawa *et al.*, 2007). Außerdem zeigten TRPV2-defiziente Makrophagen in einem Transwell-Migrations-Assay eine geringere Migrationsrate (Link *et al.*, 2010; Nagasawa *et al.*, 2007). Ähnliches wurde auch von humanen PC3 Prostatakrebs-Zellen und Adenomakarzinomzellen berichtet, die nach TRPV2-Silencing eine verringerte bzw. nach TRPV2 Überexpression eine erhöhte Migration zeigten (Monet *et al.*, 2010). Schließlich konnten Entin-Meer *et al.* zeigen, dass durch TRPV2 vermittelte

Modulation der intrazellulären Calciumkonzentration, die Migration von Makrophagen beeinflusst wird (Entin-Meer *et al.*, 2017).

5.5 Putative Beteiligung des TRPV2-Proteins an der ROS-Produktion in Mikrogliazellen

Lipopolysaccharid (LPS) ist der Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und kann die entzündlichen Reaktionen, einschließlich der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) auslösen (Chakravarty und Herkenham, 2005; Chuang *et al.*, 2015). Bei der Aktivierung von den Mikrogliazellen werden ROS, Stickstoffmonoxid (NO) und proinflammatorische Zytokine, die zu den Entzündungsreaktionen beitragen, produziert (Chuang *et al.*, 2015). Aktivierte Mikrogliazellen können die inflammatorische Antwort durch die ROS-Produktion modulieren und dadurch die Pathogene beseitigen (Colton, 2009; Gordon, 2003; Loane und Kumar, 2016). Obwohl die ROS-Produktion für die Abwehr der Gewebe vor Pathogenen wichtig ist, können solche Substanzen zur Schädigung von Neuronen führen und sind möglicherweise an neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt (Heneka *et al.*, 2015; Tonnies und Trushina, 2017). Die Reaktion auf oxidativen Stress durch Mikrogliazellen spielt demnach eine wichtige Rolle bei Pathomechanismen neurodegenerativer Erkrankungen (Peterson und Flood, 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ROS-Produktion in BV2-Zellen und in primären Mikrogliazellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit 1 µg/ml LPS signifikant erhöht wird (Abb. 4.19 und 4.20). In beiden Zelltypen wurde die LPS-induzierte ROS-Produktion durch die TRPV2-Antagonisten Ruthenium Rot und Valdecoxib um mehr als 50% reduziert. Das weist darauf hin, dass TRPV2 möglicherweise an der LPS-induzierten ROS-Produktion in den Mikrogliazellen beteiligt ist. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TRPV2 der Ratte durch ROS aktiviert werden (Fricke *et al.*, 2019). Dies könnte bedeuten, dass in Mikrogliazellen einerseits die Produktion von ROS von der Aktivität von TRPV2 abhängt und andererseits ROS-Moleküle wiederum durch positiven Feedback die Aktivität von TRPV2 erhöhen.

5.6 Beteiligung des TRPV2-Kanals an der Phagozytose in Mikrogliazellen

Die Makrophagen vermittelte Phagozytose von Bakterien ist als ein Teil des angeborenen Immunsystems entscheidend an der Abwehr von pathogenen Keimen beteiligt. Mikrogliazellen erkennen Krankheitserreger mittels spezifischer Rezeptoren und können durch Umlagerung des Aktin-Zytoskeletts und durch Clusterbildung von Proteinen Partikel internalisieren (Aderem und Underhill, 1999). Calcium- und Natriumionen sind wichtig für die Phagozytose, einschließlich der Ansäuerung von Phagolysosomen (Carrithers *et al.*, 2007). Ein cytosolischer Ca^{2+} -Gradient (von außen nach innen) ist für die durch Fc γ -Rezeptoren vermittelte Phagozytose erforderlich (Carrithers *et al.*, 2011; Young *et al.*, 1984). Es ist bekannt, dass TRPV2 an der Phagozytose als Reaktion auf Zymosan, Immunglobulin G (IgG) und Komplement-vermittelte Partikelbindung in murinen Makrophagen beteiligt ist und diese Beteiligung umfasst die PI3K-abhängige Rekrutierung von TRPV2 zur Plasmamembran sowie anschließender Zell-Depolarisation, mit der Folge einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Link *et al.*, 2010). Dabei weisen murine TRPV2-defiziente Makrophagen eine beeinträchtigte phagozytische Aktivität auf während in Wildtyp Makrophagen nach TRPV2-Stimulation durch den Antagonisten RR (10 μM) die phagozytische Aktivität wieder erniedrigt werden kann. Die Infektion mit *P. aeruginosa* induziert ein Calciumsignal in primären menschlichen Makrophagen, welches durch die TRPV2 Antagonisten Tranilast und Ruthenium Rot blockiert werden kann und wie beschrieben die Phagozytoseaktivität signifikant reduziert (Leveque *et al.*, 2018). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Phagozytose von FITC-Dextran in TRPV2KO-abgeleiteten Maus Alveolarmakrophagen signifikant geringer war als in den entsprechenden Wildtyp Zellen (Masubuchi *et al.*, 2019).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Phagozytose von Mikrogliazellen bzw. BV2-Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie und fluoreszierenden Latex Beads untersucht. In den Experimenten am Durchflusszytometer konnte allerdings lediglich gezeigt werden, dass etwa 60% der BV2-Zellen Latex Beads phagozytiert hatten. Die Rate der phagozytierenden Zellen wurde allerdings weder durch Inkubation mit LPS (2 h), noch durch die Anwesenheit der TRPV2 Antagonisten Ruthenium Rot, Valdecoxib oder SKF96365 beeinflusst (Abb. 4.20). Im Gegensatz dazu zeigte die Untersuchung der Phagozytose der Latex Beads mit Hilfe des Plate Readers nach 2 h eine signifikante Reduktion der Phagozytoserate bei Inkubation mit Ruthenium Rot (Abb. 4.22). Diese Unterschiede könnten daran liegen, dass viele BV2-Zellen durch den Zellschaber in der Durchflusszytometrie gestorben sind. LPS und TRPV2 Agonisten führten jedoch zu keiner signifikanten Veränderung der Phagozytoserate. Lediglich 2-APB

fürte zu einer deutlich reduzierten Phagozytose, was allerdings eher aus der reduzierten Viabilität der BV2-Zellen nach Inkubation mit 2-APB resultierte (siehe Abb. 4.23). Während Hassan *et al.* zeigen konnten, dass die Aufnahme von Latex-Beads in Gegenwart von LPS (100 ng/ml) in BV2-Zellen verstärkt war (Hassan *et al.*, 2014a), konnte in der vorliegenden Arbeit weder im Durchflusszytometer, noch im Plate Reader eine signifikante Erhöhung der Phagozytoserate nach Inkubation mit LPS (2 h bis 6 h) in BV2-Zellen detektiert werden. Der Unterschied in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Hassan *et al.* (Hassan *et al.*, 2014a) war die Inkubationszeit mit LPS. In der Arbeit von Hassan *et al.* sind die Zellen mit LPS 24 h inkubiert aber in dieser Arbeit sind die Zellen mit LPS 2 h bis 6 h inkubiert. Möglicherweise ist dies der Grund warum keine erhöhte Phagozytoserate in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden konnte.

Die Phagozytose von pHrodo *E.coli* Partikeln, gemessen im Plate Reader, war 24 h nach Inkubation in Anwesenheit der TRPV2 Antagonisten Ruthenium Rot und Valdecoxib signifikant reduziert (Abb. 4.21). Fricke *et al.* konnten in Makrophagen zeigen, dass die Hemmung von TRPV2 durch RR (10 μ M) zur Verringerung der Phagozytose von fluoreszierenden *E.coli*-Biopartikeln führt (Fricke *et al.*, 2019). Die TRPV2 Agonisten THC und CBD führten in der vorliegenden Arbeit wie die TRPV2 Antagonisten zu einer Inhibition der Phagozytose in BV2-Zellen. Eine Erklärung wäre möglicherweise, dass Cannabinoide einen antiinflammatorischen Effekt auf die BV2-Zellen haben, der über Cannabinoidrezeptoren vermittelt wird (Nagarkatti *et al.*, 2009). Möglicherweise sind die TRPV2 Kanäle unter den gegebenen Bedingungen auch schon maximal stimuliert, so dass eine weitere Stimulation durch THC keinen zusätzlichen Effekt hat.

Nach 3 h und 24 h Stimulation mit LPS (1 μ g/ml und 100 ng/ml) weisen BV2-Zellen im Vergleich zu den nicht stimulierten-Zellen eine geringere Phagozytoserate von pHrodo Partikel auf (Abb. 4.21). Hier ist anzumerken, dass der pHrodo-Farbstoff mit *E. coli* Partikeln konjugiert ist und LPS Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien wie *E.coli* darstellen. Der Rezeptor für LPS in den Mikrogliazellen ist der sogenannte Toll-like Rezeptor 4 (Kaisho und Akira, 2000). Dieser ist im ZNS auch vornehmlich in Mikroglia exprimiert (Milanski *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass LPS und *E. coli*-Partikel beide an TLR4 binden. Durch Zugabe von beiden, *E.coli*-Partikeln und LPS, treten diese an TLR4 in Konkurrenz, so dass weniger pHrodo *E.coli*-Partikel binden und in die Mikrogliazellen internalisiert werden kann.

Diskussion

Die Phagozyoseexperimente mit pHrodo E.coli Biopartikeln an kultivierten primären Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus weisen ebenfalls auf die Beteiligung von TRPV2 bei der Phagozytose hin. Mikrogliazellen aus TRPV2-defizienten Mäusen weisen eine um etwa 40% reduzierte Phagozytoserate auf (Abb. 4.21G). Für Mikrogliazellen wurde beschrieben, dass über Stickstoffmonooxidsynthetase (iNOS) produziert wird und die Phagozytose durch Erhöhung von TRPV2 an der Plasmamembran über Proteinkinase G (PKG)- und Phosphoinositidkinase (PI3K)-abhängige Signalwege reguliert wird (Maksoud *et al.*, 2019).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass wie in peripheren Makrophagen auch in Mikrogliazellen TRPV2 maßgeblich an der Phagozytose beteiligt ist.

6 Anhang

6.1 Untersuchung der funktionellen Expression weiterer TRP Kanäle in Mikrogliazellen

Die Transkriptomanalyse in Abbildung 4.1 zeigt, dass neben TRPV2 auch Transkripte für TRPC1, TRPC2, TRPC4, TRPC7, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM7 und TRPV4 in kultivierten kortikalen Mikrogliazellen der Maus identifiziert werden konnten. Im Folgenden wurde mit Hilfe verschiedener spezifischer als auch relativ spezifischer Agonisten mittels Whole-cell Patch clamp Technik und Ca^{2+} Imaging untersucht ob andere TRP-Kanäle funktionell detektierbar sind.

6.1.1 Stimulation möglicher TRPC Ströme

Oleoyl-1-acetyl-sn-glycerin (OAG) ist ein membranpermeables Analogon von Diacylglycerin (DAG) und aktiviert TRPC2, TRPC3, TRPC6 und TRPC7-Kanäle (Hofmann *et al.*, 1999). Um den Effekt von OAG zu untersuchen, wurde 100 μM OAG auf die Kontrollzellen (interne Lösung mit 100 nM Ca^{2+} und externe Lösung mit 1 mM Ca^{2+}) appliziert, dabei konnte kein Strom gemessen werden (Abb. 6.1A). Um zu testen, ob die Abwesenheit von intrazellulärem und extrazellulärem Ca^{2+} einen Einfluss auf TRPC2, TRPC3, TRPC6 und TRPC7-Aktivierung haben, wurden die interne und externe Lösung ohne Ca^{2+} verwendet und 100 μM OAG auf die Mikrogliazellen appliziert. Wie in Abb. 6.1 zu sehen ist, gab es keine Aktivierung eines Stromes.

$\text{GTP}\gamma\text{S}$ ist ein sehr langsam hydrolysierbares G-Protein-aktivierendes Analogon von Guanosintriphosphat (GTP), welches alle heterotrimere G-Proteine der Zelle und alle damit verbundenen Signalwege aktiviert. $\text{GTP}\gamma\text{S}$ aktiviert TRPC4 und TRPC5-Kanäle (Sung *et al.*, 2011). Im Folgenden sollte untersucht werden inwieweit die Stimulation von G-Proteinen in Mikrogliazellen *TRPCs* zu aktivieren vermag. $\text{GTP}\gamma\text{S}$ wurde in einer Konzentration von 200 μM in die Pipettenlösung, da es nicht membranpermeabel ist, hinzugegeben (Abb. 6.1B). Es konnte kein Strom mit $\text{GTP}\gamma\text{S}$ aktiviert werden.

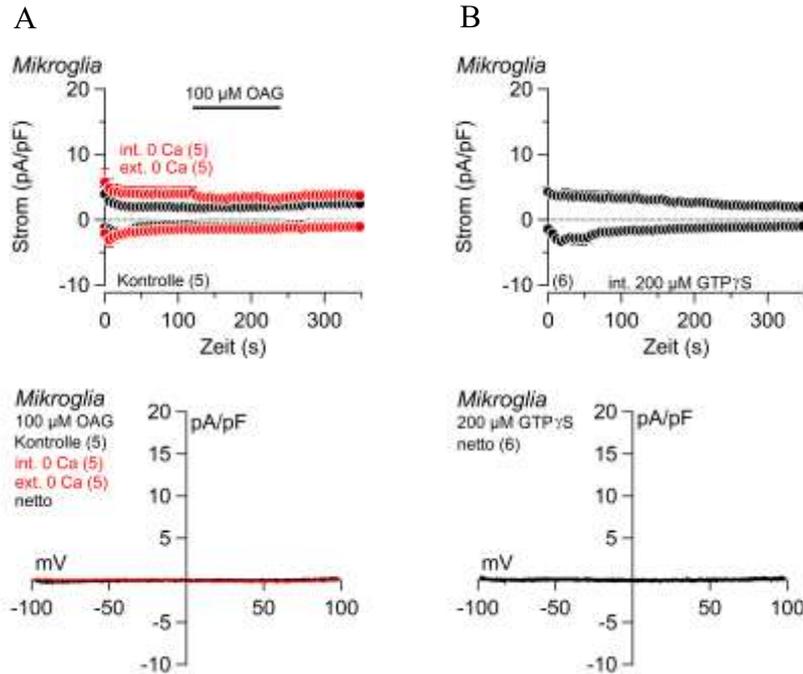


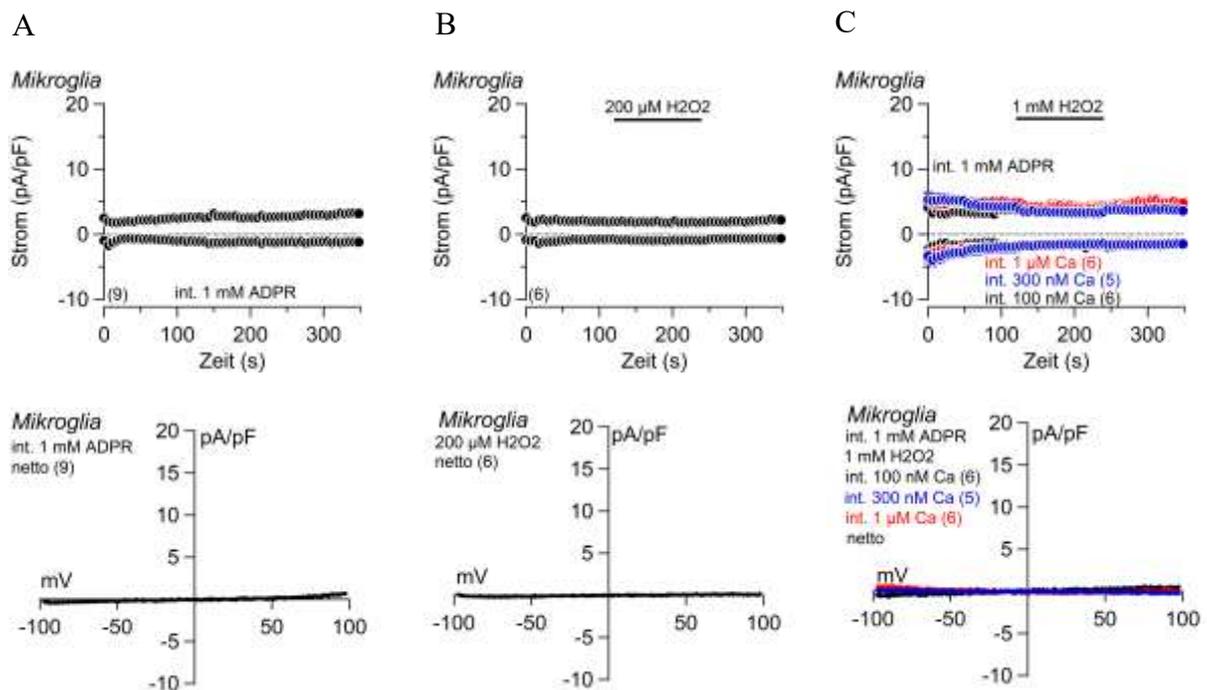
Abbildung 6.1: Keine Aktivierung von TRPC-Ströme durch guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate (GTPγS) und 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) in Mikrogliazellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 100 μM OAG (A) und int. 200 μM GTPγS (B). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in OAG und GTPγS sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte ±S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

6.1.2 Stimulation möglicher TRPM2, TRPM3 und TRPM8 Ströme

Adenosine diphosphate ribose (ADPR) kann an TRPM2-Kanäle binden und die oxidative Stress-vermittelte Signalisierung in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen steuern. Es ist bekannt, dass ADPR TRPM2-Kanäle aktiviert (Yu *et al.*, 2019). TRPM2-Kanäle können ebenfalls durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) aktiviert werden. Oxidativer Stress stimuliert die intrazelluläre ADP-Ribose-Bildung durch die Erzeugung von H₂O₂, die wiederum TRPM2-Kanäle öffnet (Hecquet und Malik, 2017). H₂O₂ ist auch ein Agonist für TRPV1- und TRPV4-Kanäle (Yoshida *et al.*, 2006). Um zu testen, ob ADPR einen Effekt auf Mikrogliazellen hat, wurde 1 mM ADPR in die Pipettenlösung hinzugegeben, weil ADPR als 2-fach negativ geladenes Molekül Membran-impermeabel ist (Abb. 6.2A). Wie die Abbildung 6.2A zeigt, konnte nach ADPR Applikation kein zusätzlicher Strom gemessen werden. Danach wurde 200 μM H₂O₂ auf die Mikrogliazellen appliziert (Abb. 6.2B). Um zu

Anhang

untersuchen, ob ADPR von innen und H_2O_2 von außen der Zellen zusammen besser wirken und den TRPM2-Kanal aktivieren können, wurde 1 mM ADPR in die Pipettenlösung und 1 mM H_2O_2 auf die Zellen appliziert. Hier wurden ADPR mit der verschiedenen Ca^{2+} Konzentrationen in die Pipettenlösung hinzugegeben (1 μM Ca^{2+} , 300 nM Ca^{2+} und 100 nM Ca^{2+}). Wie in Abbildung 6.2C zu sehen ist, konnte ebenfalls kein Strom aktiviert werden. Bei den Experimenten in Abbildung 6.2D wurde 1 mM ADPR mit 140 mM Kalium-Glutamat (statt 140 mM Cs-Glu) in die Pipettenlösung hinzugegeben und 1 mM H_2O_2 auf die Zellen appliziert, um zu testen, ob Cs^+ einen inhibitorischen Effekt auf TRPM2-Kanäle hat. AMP reguliert die Aktivität einiger TRP-Kanäle durch Aktivierung der Proteinkinasen C und A (PKC und PKA) und damit durch Katalyse der Ser / Thr-Phosphorylierung von TRP-Kanälen (De Petrocellis *et al.*, 2007). Die TRPM8-Aktivität wird durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) moduliert. 8-Br-cAMP aktiviert den PKA-Weg und moduliert indirekt TRPM8-Kanäle (De Petrocellis *et al.*, 2007). TRPM3 ist ein Calcium-durchlässiger Kationenkanal, der durch Wärme und durch das Neurosteroid Pregnenolonsulfat (PregS) aktiviert wird (Toth *et al.*, 2015). Hier sollte untersucht werden, ob funktionelle TRPM8 und/oder TRPM3 in Mikroglia zu finden sind. Um zu untersuchen, ob 8-Br-cAMP von außen der Zellen oder von innen besser auf den TRPM8-Kanäle wirkt, wurde 50 μM 8-Br-cAMP in die Pipettenlösung gegeben (Abb. 6.2F) oder, da 8-Br-cAMP auch membrangängig ist, von außen auf die Zellen (500 μM) appliziert (Abb. 6.2G). Es konnten weder durch PregS (50 μM) noch durch 8-Br-cAMP zusätzliche Ströme aktiviert werden (Abb. 6.2E, G).



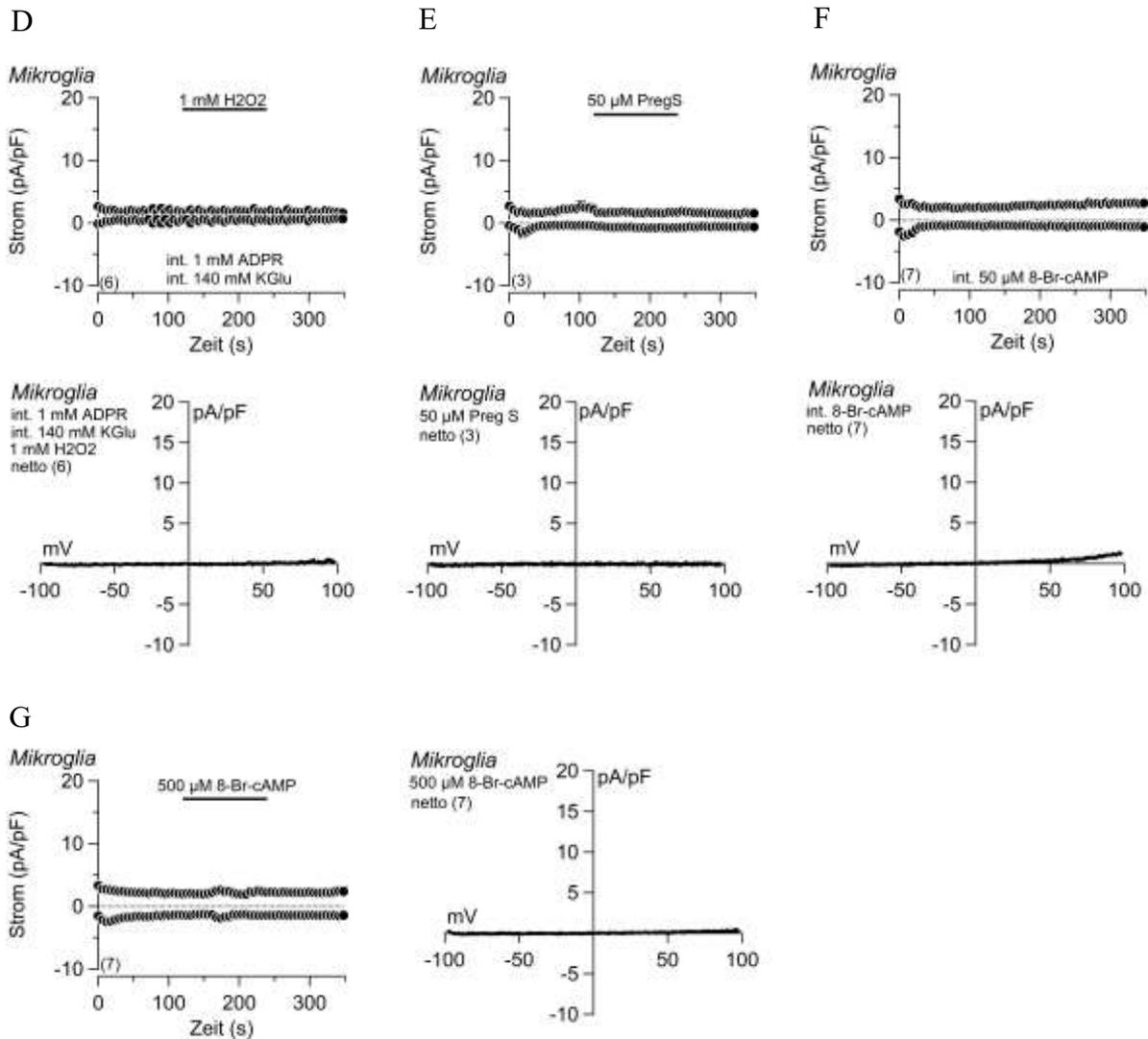


Abbildung 6.2: Die TRPM Agonisten Adenosine diphosphate ribose (ADPR), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) Pregnenolonsulfat (PregS) und 8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (8-Br-cAMP) aktivieren keine Ströme in Mikrogliazellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 200 μM H₂O₂ (B), 1 mM H₂O₂ in Anwesenheit von int. ADPR (C, D), 50 μM PregS (E), 500 μM 8-Br-cAMP (G), int. 50 μM 8-Br-cAMP (F) und int. 1 mM ADPR (A). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungskurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in ADPR, H₂O₂, PregS und 8-Br-cAMP sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte ±S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

6.1.3 Stimulation möglicher TRPV4 und TRPA1 Ströme

Es ist bekannt, dass die Mikrogliazellen aus dem Kortex der Ratte funktionelle TRPV4-Kanäle exprimieren. Es wurde gezeigt, dass der TRPV4-Kanäle durch 4α-phorbol 12,13-didecanoate (4αPDD) aktiviert werden. Die TRPV4 Aktivierung mit 4α-PDD induziert eine

Membrandepolarisation hauptsächlich durch Erhöhung des Na^+ Einstromes, der durch TRPV4-Antagonisten inhibiert werden kann (Konno *et al.*, 2012a). Hier soll untersucht werden, ob auch murine kortikale Mikrogliazellen funktionelle TRPV4-Kanäle exprimieren. Die Applikation von 4 α PDD (30 μM) führte zu keiner Aktivierung zusätzlicher Ströme (Abb. 6.3A). Ebenfalls GSK-1016790A ein weiterer selektiver TRPV4 Agonist (Baratchi *et al.*, 2019) konnte nach Applikation (10nM) auf BV2-Zellen keine Ströme aktivieren (Abb. 6.3B). Allylisothiocyanat ist Hauptbestandteil des Senföls des schwarzen Senfs und verursacht Schmerzen durch Aktivierung von TRPA1, einem exzitatorischen Ionenkanal an sensorischen Nervenenden. AITC aktiviert TRPA1-Kanäle durch die kovalente Modifikation von Cysteinresten im cytoplasmatischen N-Terminus des Kanals (Hinman *et al.*, 2006). Wie in Abbildung 6.3C zu sehen ist, wurde nach Applikation von AITC (100 μM) auf Mikrogliazellen keine meßbaren Ströme induziert.

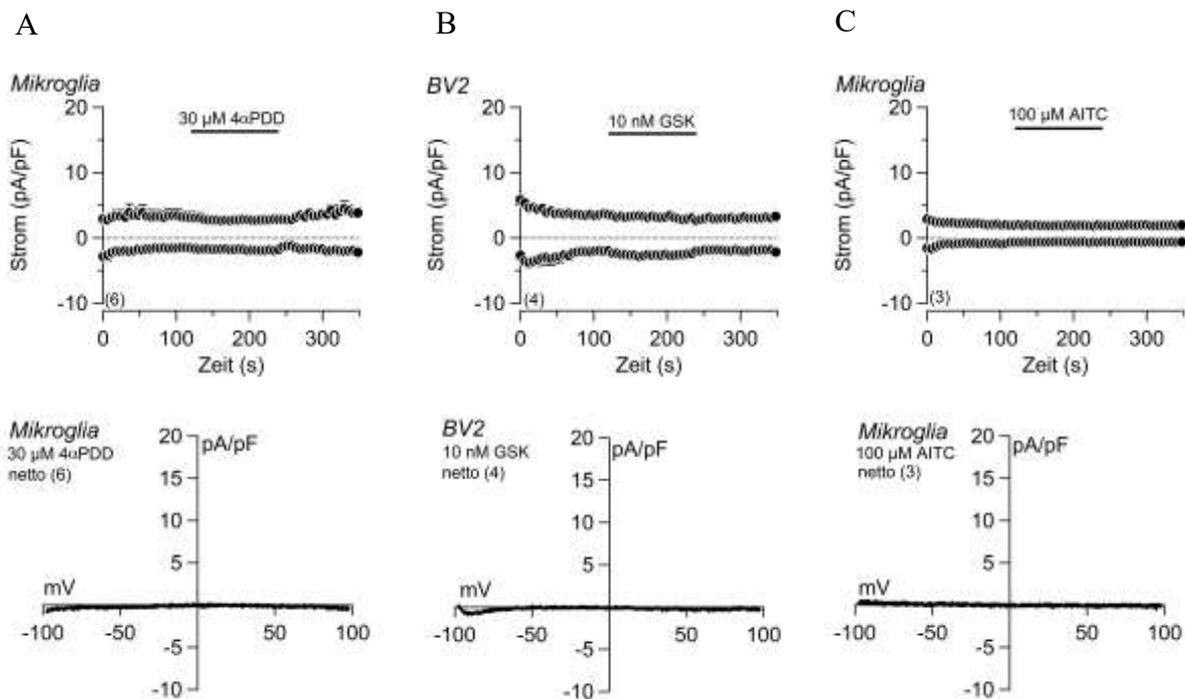


Abbildung 6.3: 4 α -Phorbol 12-13-Dicaprinat (4 α PDD), GSK-1016790A und Allylisothiocyanat (AITC) aktivieren keine TRPV4 und TRPA1-Ströme in Mikrogliazellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 30 μM 4 α PDD (A), 10 nM GSK (B) und 100 μM AITC (C). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in 4 α PDD, GSK und AITC sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

6.1.4 Keine Aktivierung möglicher TRP Ströme in LPS-stimulierten Mikrogliazelle

Nach Stimulation ändern Mikrogliazellen ihre Genexpression und regulieren möglicherweise auch TRP Kanäle. Jedoch führten auch nach 24 h Inkubation und Mikroglia stimulation mit LPS die in 6.1.1 – 6.1.3 verwendeten Agonisten zu keinem eindeutigen Strom in den kultivierten kortikalen Mikrogliazellen der Maus.

OAG aktiviert TRPC6 und TRPC3-Kanäle (Hofmann *et al.*, 1999). GTP γ S aktiviert TRPC4 und TRPC5-Kanälen (Sung *et al.*, 2011). Um zu testen, ob GTP γ S und OAG einen Strom in LPS-aktivierte Mikrogliazellen induzieren, der darauf hinweisen würde, dass nach Aktivierung funktionelle TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC3 Kanäle in den Mikrogliazellen exprimiert werden, wurde die Mikrogliazellen mit LPS für 24 h inkubiert. Durch 200 μ M GTP γ S konnte kein Strom gemessen werden (Abb. 6.4C). Um zu untersuchen, ob Abwesenheit von intrazellulären und extrazellulären Ca²⁺ einen Einfluss auf die Aktivierung des Stromes in den LPS-aktivierten Mikrogliazellen haben, wurde die interne und externe Lösung ohne Ca²⁺ verwendet und 100 μ M OAG auf den LPS-aktivierten Mikrogliazellen appliziert (Abb. 6.4A). Gleiche Experimente wurden in Anwesenheit von 100 nM Ca²⁺ in der Pipettenlösung und 1 mM Ca²⁺ im Badlösung durchgeführt (Abb. 6.4B). Wie zu sehen ist, gab es keine Aktivierung. Es sollte untersucht werden, ob ADPR, H₂O₂ und PregS einen Strom in den LPS-aktivierten Mikrogliazellen induzieren. Wie in Abbildungen 6.4D, E, F zu erkennen ist, führte die Applikation von H₂O₂, PregS und Zugabe von ADPR in die Pipettenlösung zu keinerlei Aktivierung eines Stromes.

Anhang

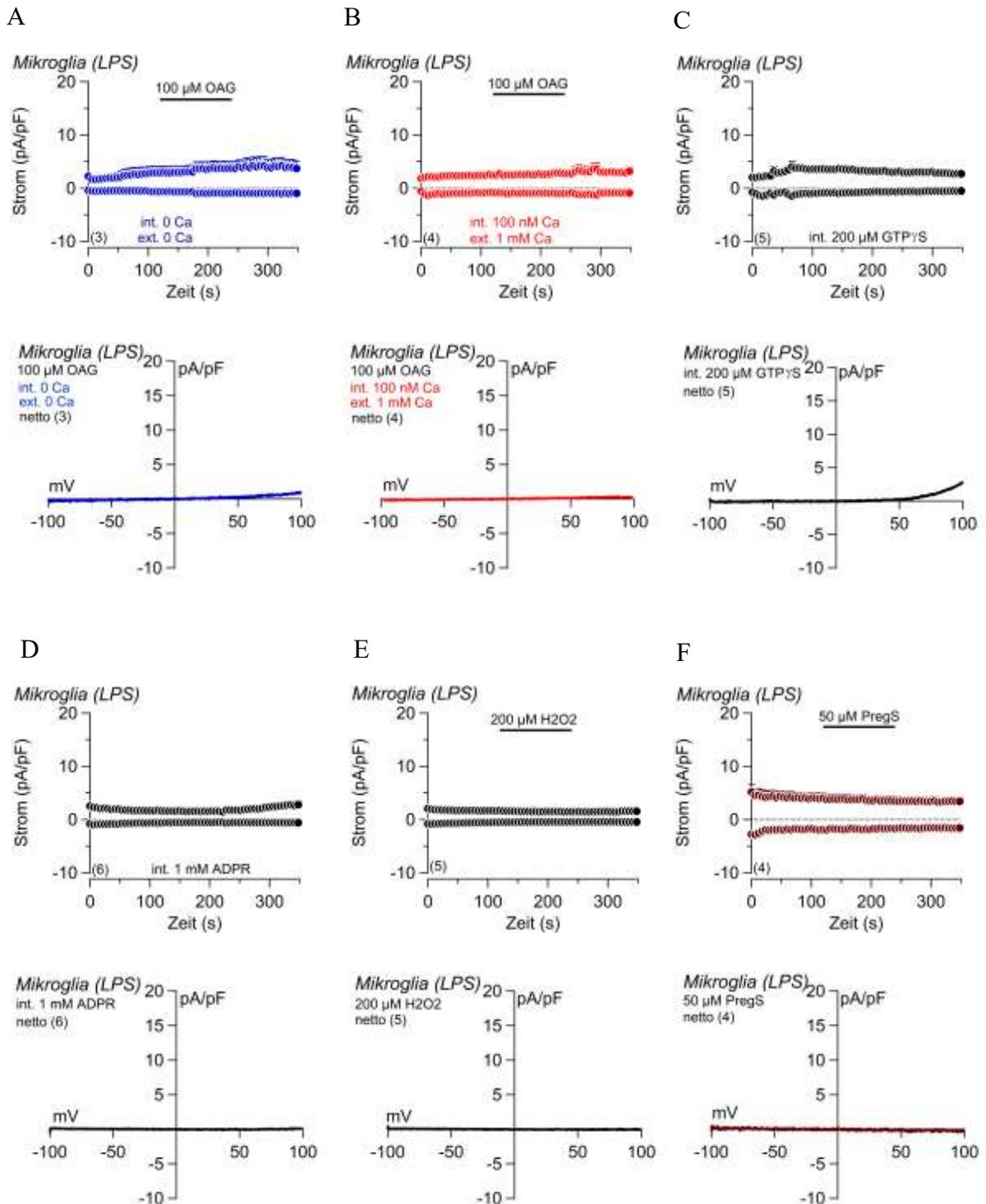


Abbildung 6.4: Die TRP Agonisten OAG, GTP γ S, ADPR, H₂O₂ und PregS induzieren in LPS-stimulierten Mikrogliazellen keine zusätzlichen Ströme. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 100 μ M OAG (**A**, **B**), 200 μ M H₂O₂ (**E**), 50 μ M PregS (**F**), in Anwesenheit von 200 μ M GTP γ S in die Pipettenlösung (**C**) und 1 mM ADPR (**D**). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in OAG, GTP γ S, ADPR, H₂O₂,

Anhang

PregS sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

Es sollte auch untersucht werden, ob 8-Br-cAMP, 4 α PDD und AITC einen Strom in den LPS-aktivierten Mikrogliazellen induzieren. Wie in Abbildungen 6.5A, C, D zu erkennen ist, führte die Applikation von 500 μ M 8-Br-cAMP, 30 μ M 4 α PDD und 100 μ M AITC zu keinerlei Aktivierung von Ströme. Wie in Abbildung 6.5B zu sehen ist, stieg der Strom über die Zeit bei der intrazellulären Verwendung von 50 μ M 8-Br-cAMP an.

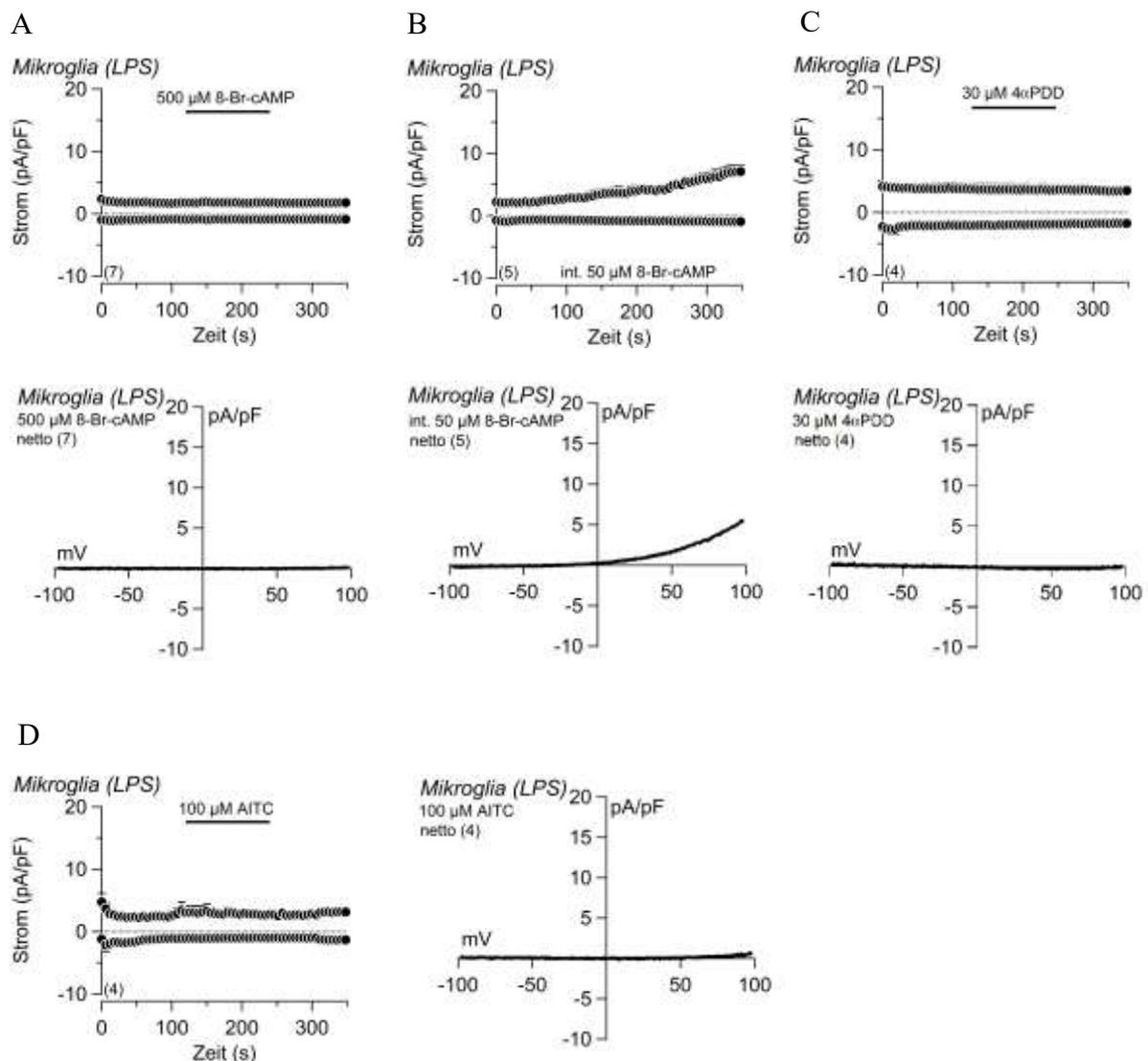


Abbildung 6.5: 8-Br-cAMP, 4 α PDD und AITC aktivieren keine Ströme in LPS-stimulierte Mikrogliazellen. Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 500 μ M 8-Br-cAMP (A), 30 μ M 4 α PDD (C), 100 μ M AITC (D) und in Anwesenheit von 50 μ M 8-Br-cAMP in die Pipettenlösung (B). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom

minus Strom vor Applikation) in 8-Br-cAMP, 4 α PDD und AITC sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

In dieser Arbeit konnten die TRP-Kanäle TRPC4, TRPC5, TRPC3, TRPC6, TRPM2, TRPV4, TRPM8, TRPM3 und TRPA1 weder vor noch nach Applikation mit LPS in kortikalen Mikrogliazellen stimuliert werden. Wie in der Literatur bekannt ist, aktivieren OAG die TRPC6 und TRPC3-Kanäle (Hofmann *et al.*, 1999) und GTP γ S die TRPC4 und TRPC5-Kanäle (Sung *et al.*, 2011). Es wurden TRPC3-Kanäle in kultivierten Mikrogliazellen der Ratte nachgewiesen (Mizoguchi *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte durch OAG und GTP γ S keine TRPC-Ströme weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit von intrazellulärem und extrazellulärem Ca²⁺ gemessen werden. Die Unterschiede könnten sich darin begründet sein, dass Mizoguchi *et al.* Ratten-Mikrogliazellen verwendet, während in der vorliegenden Arbeit Maus-Mikrogliazellen verwendet wurden. Es ist bekannt, dass ADPR und H₂O₂ den TRPM2-Kanäle aktivieren (Hecquet und Malik, 2017; Yu *et al.*, 2019). 8-Br-cAMP aktiviert den PKA-Weg und moduliert indirekt TRPM8-Kanal (De Petrocellis *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnten durch ADPR, H₂O₂ und 8-Br-cAMP keine TRPM-Ströme induziert werden. Die funktionelle Expression von TRPM2 wurde in kultivierten Mikrogliazellen der Ratte nachgewiesen (Jeong *et al.*, 2017; Kraft *et al.*, 2004). In der Arbeit von Kraft *et al.* (Kraft *et al.*, 2004) wurde kultivierten Mikrogliazellen aus der Ratte verwendet aber in dieser Arbeit wurde kultivierten Mikrogliazellen aus der Maus benutzt. Außerdem haben Kraft *et al.* 100 μ M H₂O₂ für 15 min und 5 mM H₂O₂ für 4 min appliziert, jedoch in der vorliegenden Arbeit wurde 200 μ M und 1 mM H₂O₂ für 2 min appliziert. Die Unterschiede können daran liegen, dass in meiner Arbeit unterschiedliche Konzentration von H₂O₂ im Gegensatz zu der publizierten Arbeit verwendet ist. Durch GSK-1016790A und 4 α PDD konnte in der vorliegenden Arbeit kein TRPV4-Strom gemessen werden, wobei jedoch zu beachten ist, dass die funktionelle Expression von TRPV4-Kanäle in kultivierten Mikrogliazellen der Ratte nachgewiesen werden konnten (Konno *et al.*, 2012b; Wang *et al.*, 2019). Die Unterschiede können sich an den verschiedenen Spezies (Ratte, Maus) liegen.

6.2 HEK293 und COS-7 Kontrollexperimente

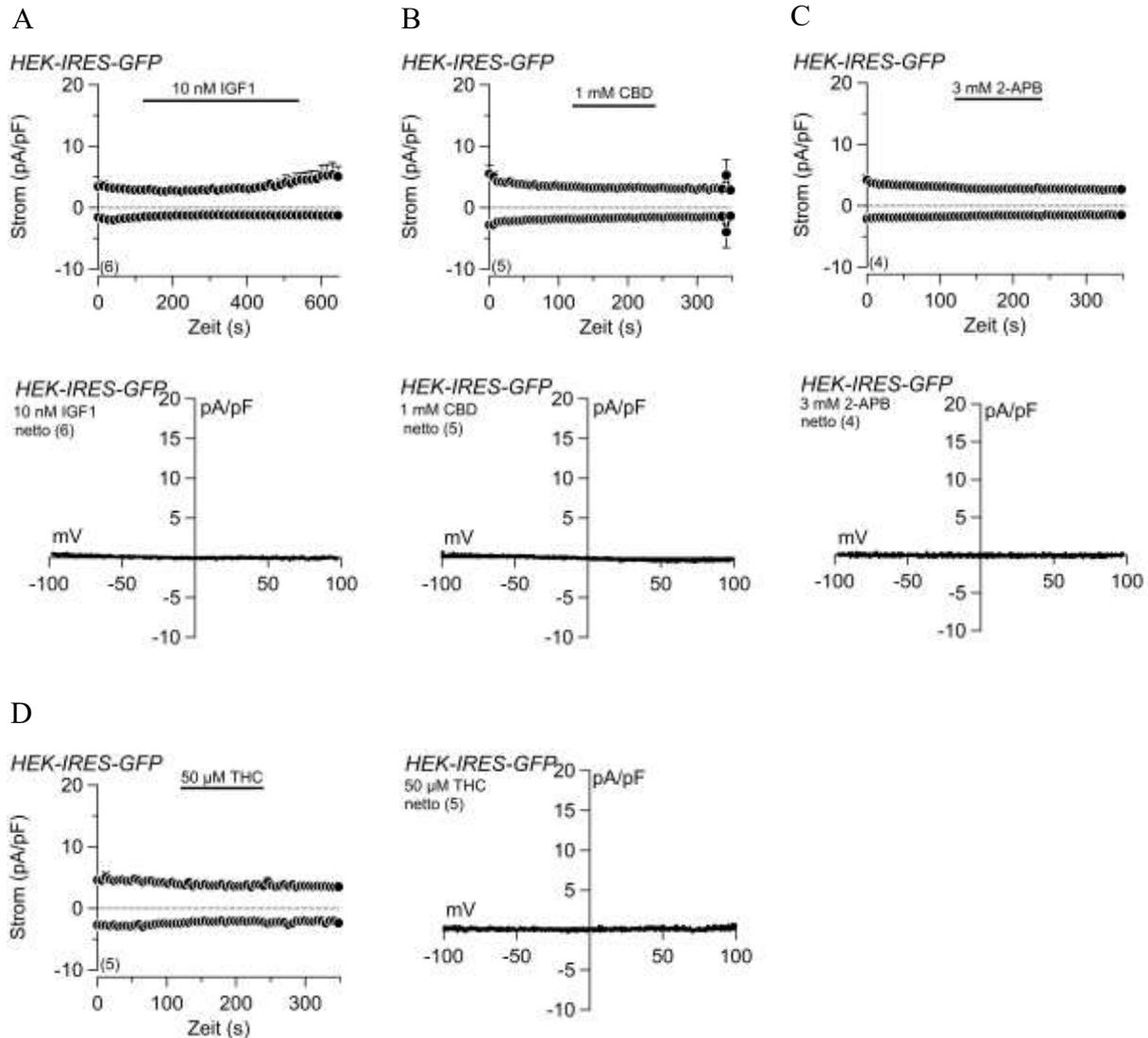


Abbildung 6.6: Keine Aktivierung von Strömen nach Applikation von IGF1, CBD, 2-APB und THC in GFP-exprimierende HEK293-Zellen (HEK-IRES-GFP). Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und +80 mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 10 nM IGF1 (A), 1 mM CBD (B), 3 mM 2-APB (C) und 50 μM THC (D). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungs-Kurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in IGF1, CBD, 2-APB und THC sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben. Die Abbildungen C und D wurden aus meiner Masterarbeit entnommen (Malihpour, 2017).

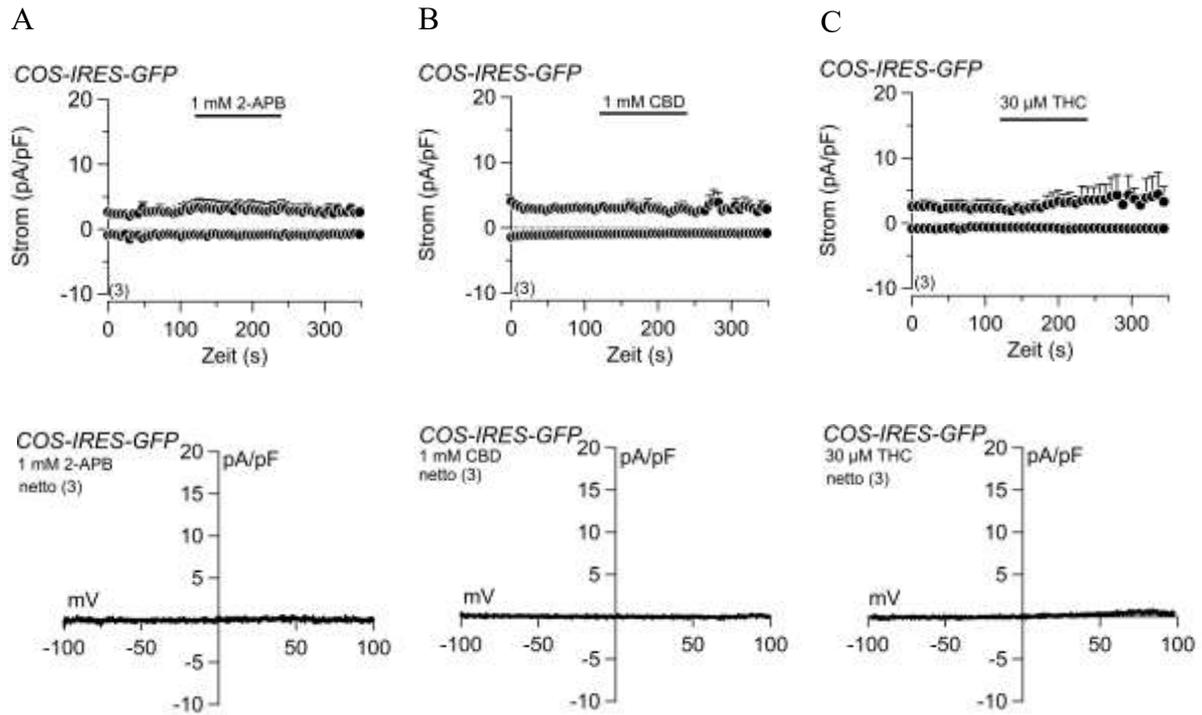


Abbildung 6.7: 2-APB, CBD und THC aktivieren keinen Strom in GFP-exprimierenden COS-7-Zellen (COS-IRES-GFP). Ein- und Auswärtsströme bei -80 mV und $+80$ mV über die Zeit vor, während und nach der Applikation von 1 mM 2-APB (A), 1 mM CBD (B) und $30 \mu\text{M}$ THC (C) in GFP-exprimierenden COS-7 Zellen (COS-IHRES-GFP). Balken markieren den Zeitraum der Applikation. Strom-Spannungskurven (IVs) der maximalen Netto-Ströme (netto = Maximalstrom minus Strom vor Applikation) in 2-APB, CBD und THC sind jeweils darunter dargestellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M für den Strom über die Zeit und Mittelwerte ohne SEM für die IVs. Die Anzahl der gemittelten Experimente ist jeweils in Klammern angegeben.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Die Morphologie der Mikrogliazellen im ZNS.....	14
Abbildung 2.2: Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle.....	18
Abbildung 3.1: Präparation der Mikrogliazellen aus dem Kortex der Maus.....	25
Abbildung 3.2: Whole-Cell Patch Clamp Messung.....	28
Abbildung 3.3: Zur Ca ²⁺ imaging Methode.....	30
Abbildung 3.4: Migration Assay.....	31
Abbildung 3.5: ROS-Assay.....	32
Abbildung 3.6: Durchflusszytometrie.....	33
Abbildung 3.7: Die Behandlung der BV2-Zellen mit verschiedenen Pharmaka.....	34
Abbildung 3.8: Guava ExpressPlus-Programm und FlowJo-V10 Software.....	35
Abbildung 3.9: Phagozytose von pHrodo Red <i>E.coli</i> Biopartikeln.....	36
Abbildung 4.1: Transkripte von TRP Genen aus FACS-sortierten kultivierten kortikalen Mikrogliazellen der Maus.....	42
Abbildung 4.2: 2-APB-induzierte Ströme und Ca ²⁺ Signale in Mikrogliazellen der Maus.....	44
Abbildung 4.3: THC-induzierte Ströme in Abwesenheit und Anwesenheit von TRPV2-Antagonisten und Ca ²⁺ Signale in Mikrogliazellen der Maus.....	46
Abbildung 4.4: Gewichtsanalyse neugeborener Mäuse an Tag 3.....	46
Abbildung 4.5: Effekt von Amilorid und Dipyridamol auf den 2-APB-induzierten Strom in Mikrogliazellen und in HEK-mTRPV2-Zellen.....	47
Abbildung 4.6: Effekt von Tiloron auf den 2-APB-induzierten TRPV2 Strom.....	48
Abbildung 4.7: Effekt von IGF1 auf den 2-APB-induzierten Strom in Mikrogliazellen.....	49
Abbildung 4.8: Effekt von IGF1 auf den 2-APB-induzierten Strom in mTRPV2-exprimierenden HEK293-Zellen.....	50
Abbildung 4.9: Effekt von FKS auf 2-APB-induzierte Ströme in Mikrogliazellen.....	51
Abbildung 4.10: 2-APB-induzierte TRPV2 Ströme in LPS-aktivierten Mikrogliazellen.....	52
Abbildung 4.11: Kein Effekt von Anandamid auf Mikrogliazellen und mTRPV2-exprimierende HEK293-Zellen.....	53
Abbildung 4.12: 2-AG-induzierte Ströme und Ca ²⁺ Signale in Mikrogliazellen der Maus.....	54
Abbildung 4.13: Kein hemmender Effekt von Valdecoxib und Cannabinoidrezeptor-Antagonisten auf 2-AG-induzierten Strom in Mikrogliazellen.....	56
Abbildung 4.14: 2-AG-induzierte Ströme in Abwesenheit von zytosolischen Ca ²⁺ , extrazellulärem Cl ⁻ und extrazellulären Na ⁺ in Mikrogliazellen der Maus.....	57
Abbildung 4.15: 2-APB und THC-induzierte Ströme und Ca ²⁺ Signale in BV2-Zellen.....	59
Abbildung 4.16: 2-AG-induzierte Ströme in BV2-Zellen.....	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.17: Migration von BV2-Zellen in Gegenwart von RR und Valdecoxib.....	62
Abbildung 4.18: Beeinträchtigte LPS-stimulierte Migration in TRPV2 ^{-/-} (KO) Mikroglia.....	63
Abbildung 4.19: Inhibitoren von TRPV2 reduzieren die LPS-induzierte ROS-Produktion in BV2 und Mikrogliazellenreaktive.....	65
Abbildung 4.20: Phagozytosedetektion mittels Cell counter in BV2-Zellen.....	66
Abbildung 4.21: Phagozytose der pHrodo® Red <i>E.coli</i> BioParticles in BV2 und Mikrogliazellen.....	68
Abbildung 4.22: Phagozytose von Latex Beads in BV2-Zellen gemessen im Plate Reader.....	70
Abbildung 4.23: Zellviabilität von BV2-Zellen.....	71
Abbildung 4.24: 2-APB, THC und CBD aktivieren TRPV2 Strömen in hTRPV2-exprimierenden HEK293-Zellen.....	72
Abbildung 4.25: 2-AG, LPC und Probenecid aktivieren keine Strömen in hTRPV2-exprimierenden HEK293Zellen.....	74
Abbildung 4.26: 2-APB, THC und CBD aktivieren TRPV2 Ströme in hTRPV2-exprimierenden COS-7-Zellen.....	75
Abbildung 4.27: Inhibition von TRPV2 Strömen in hTRPV2-exprimierenden HEK-Zellen.....	76
Abbildung 4.28: RR inhibiert Einwärtsströme in hTRPV2-exprimierenden COS-7-Zellen.....	77
Abbildung 6.1: Keine Aktivierung von TRPC-Ströme durch guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate (GTP γ S) und 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) in Mikrogliazellen.....	91
Abbildung 6.2: Die TRPM Agonisten Adenosine diphosphate ribose (ADPR), Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), Pregnenolonsulfat (PregS) und 8-Bromo-adenosine 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (8-Br-cAMP) aktivieren keine Ströme in Mikrogliazellen.....	93
Abbildung 6.3: 4 α -Phorbol 12-13-Dicaprinat (4 α PDD), GSK-1016790A und Allylisothiocyanat (AITC) aktivieren keine TRPV4 und TRPA1-Ströme in Mikrogliazellen.....	94
Abbildung 6.4: Die TRP Agonisten OAG, GTP γ S, ADPR, H ₂ O ₂ und PregS induzieren in LPS-stimulierten Mikrogliazellen keine zusätzlichen Ströme.....	96
Abbildung 6.5: 8-Br-cAMP, 4 α PDD und AITC aktivieren keine Ströme in LPS-stimulierte Mikrogliazellen.....	97
Abbildung 6.6: Keine Aktivierung von Ströme nach Applikation von IGF1, CBD, 2-APB und THC in GFP-exprimierende HEK293-Zellen (HEK-IRES GFP).....	99
Abbildung 6.7: 2-APB, CBD und THC aktivieren keinen Strom in GFP-exprimierenden COS-7-Zellen (COS-IRES-GFP).....	100

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Badlösungen (externe Lösung) für Patch Clamp und Ca ²⁺ Imaging.....	38
Tabelle 3.2: Pipettenlösung (interne Lösung) für Patch Clamp.....	38
Tabelle 3.3: Pharmakologische Substanzen.....	38
Tabelle 3.4: Konzentrationen verwendeter TRPV2 Agonisten.....	39
Tabelle 3.5: Konzentrationen verwendeter TRPV2 Antagonisten.....	40

9 Abkürzungsverzeichnis

AMCs	Amöboid-Mikrogliazelle (engl. amoeboid microglia cells)
ARD	Ankyrin Repeat Domain
AD	Alzheimer-Krankheit (engl. Alzheimer's disease)
ADPR	Adenosindiphosphat (ADP) Ribose
ATP	Adenosintriphosphat
2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl Borat
2-AG	2-Arachidonoyl Glycerol
AITC	Allylithiocyanat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isoxazolpropionsäure
AM	Acetoxymethylester
BAPTA	1,2-Bis(o-Aminophenoxy)Ethan-N,N,N',N' Tetraessigsäure
8-Br-cAMP	8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic adenosine monophosphate
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Ca²⁺	Calciumion
Ca²⁺-Imaging	fluorometrische Messung der intrazellulärer Ca ²⁺ -Änderung
CB₁ / CB₂	Cannabinoidrezeptor 1 und 2
CBD	Cannabidiol
COS-7	immortale Nierenfibroblastenzelllinie aus <i>Chlorocebus aethios</i>
CF	Mukoviszidose
COPD	chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (engl. Chronic obstructive pulmonary disease)
°C	Grad Celsius
C5a	complement component
cm²	quadratcentimeter
Cl⁻	Chloridionen
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DCFH-DA	Dihydro-Dichlorfluorescein diacetat
d.h.	das heißt
EC₅₀	halbmaximale effektive aktivierende Konzentration
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Era	Estrogenrezeptoren (engl. Estrogen receptors)
et al.	<i>et alii</i>
ext.	extrazellulär
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fätales Rinderserum (engl. Fetal bovine serum)
FKS	fätales Kälberserum (engl. fetal calve serum)
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter)
FcR	fragment crystallizable Rezeptor
g	gramm

Abkürzungsverzeichnis

GRC	wachstumsfaktorregulierter Kanal (engl. growth-factor-regulated channel)
GTPγS	Guanosin-5'-O-[gamma-thio]triphosphate
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. green fluorescent protein)
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HD	Huntington-Krankheit (Huntington disease)
HEK293	Human Embryonic Kidney Zelllinie
HF	Herzinsuffizienz
h	Stunde
HTPCs	human testicular peritubular cells
hTRPV2	humanes TRPV2
IC₅₀	halbmaximale inhibierende Konzentration
Iba-1	Adaptermolekül-1
IFNγ	Interferon gamma
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
int.	intrazellulär
iNOS	Stickstoffmonoxidsynthase (engl. inducible Nitric oxide synthases)
IP₃(R)	Inositol-1,4,5-trisphosphat (Rezeptor)
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
IP₃	Inositol 1,4,5-trisphosphat
IPAH	idiopathischer pulmonaler arterieller Hypertonie
IV-Kurve	Strom-Spannungs-Kennlinie
KO	Knockout Mäusen
LBCs	Leukämie Blastzellen
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPI	Lysophosphatidylinositol
LPS	Lipopolysaccharid
IL-1β	Interleukin
mTRPV2	Maus TRPV2
min	Minute
MCP-1	monocytisches Chemoattraktionsmittel Protein-1
mM	millimolar
MS	multiple Sklerose
mV	millivolt
ml	milliliter
mm	millimeter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP2	Matrix-Metalloproteinase 2
ms	millisekunde
μM	micromolar
μg	mikrogramm
μl	mikroliter

Abkürzungsverzeichnis

µm	mikrometer
nm	nanometer
Na⁺	Natriumionen
nM	nanomolar
NMDG	N-Methyl-D-glucamin
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	nucleotide oligomerization domain
n.s.	nicht signifikant
OAG	1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
pA	pikoamper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC3	Prostata Krebszelllinie
PD	Parkinson-Krankheit
4α-PDD	4α-Phorbol 12,13-Didecanoat
pHrodo	pHrodo® Red <i>E.coli</i> BioParticles® Konjugate
PLC	Phospholipase C
P-L-L	Poly-L-Lysin
PregS	Neurosteroid Pregnenolonsulfat
PRRs	pattern recognition receptors
pF	pikofarad
pH	pH-Wert
PIP₂	Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
PNS	peripheres Nervensystem
qRT-PCR	quantitative „real-time“ Polymerasekettenreaktion
rTRPV2	Ratte TRPV2
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RR	Ruthenium Rot
RpM	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S.E.M.	Standard Error of the Mean
SKF	SKF96365
SRBCs	sheep erythrocytes
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter)
SERCA	sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
TEA	Tetraethylammonium
TER	transepithelialer Widerstand
THC	Δ ⁹ -Tetrahydrocannabinol
TL	Tranilast
TRP	Transient Receptor Potential
TRIM	1- (2- (Trifluormethyl) Phenyl) imidazol
TS	Transmembransegment
TNF-α	Tumornekrosefaktor
TLRs	Toll-like Rezeptor
V_h	Haltepotential

Abkürzungsverzeichnis

VRL-1	Vanilloid-Rezeptor-1
WT	Wildtyp
Whole Cell Patch Clamp	Spannungsklemme im Ganzzell-Modus
Z.B.	Zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Literaturverzeichnis

1. Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17: 593-623
2. Akira S, Takeda K (2004) Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol* 327: 581-589
3. Alexander SP, Mathie A, Peters JA (2004) Guide to receptors and channels, 1st edition. *Br J Pharmacol* 141 Suppl 1: S1-126
4. Ashford BA, Boche D, Cooper-Knock J, Heath PR, Simpson JE, Highley JR (2020) Review: Microglia in motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*
5. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513: 532-541
6. Bang S, Kim KY, Yoo S, Lee SH, Hwang SW (2007) Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neurosci Lett* 425: 120-125
7. Baratchi S, Keov P, Darby WG, Lai A, Khoshmanesh K, Thurgood P, Vahidi P, Ejendal K, McIntyre P (2019) The TRPV4 Agonist GSK1016790A Regulates the Membrane Expression of TRPV4 Channels. *Front Pharmacol* 10: 6
8. Beck A, Penner R, Fleig A (2008) Lipopolysaccharide-induced down-regulation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ currents (I_{CRAC}) but not Ca²⁺-activated TRPM4-like currents (I_{CAN}) in cultured mouse microglial cells. *J Physiol* 586: 427-439
9. Beech DJ, Muraki K, Flemming R (2004) Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. *J Physiol* 559: 685-706
10. Benham CD, Gunthorpe MJ, Davis JB (2003) TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium* 33: 479-487
11. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F (1990a) Immortalization of Murine Microglial Cells by a V-Raf/V-Myc Carrying Retrovirus. *Journal of Neuroimmunology* 27: 229-237
12. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F (1990b) Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27: 229-237
13. Boels K, Glassmeier G, Herrmann D, Riedel IB, Hampe W, Kojima I, Schwarz JR, Schaller HC (2001) The neuropeptide head activator induces activation and translocation of the growth-factor-regulated Ca(2+)-permeable channel GRC. *J Cell Sci* 114: 3599-3606
14. Cabral GA, Marciano-Cabral F (2005) Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *J Leukoc Biol* 78: 1192-1197
15. Cao H, Zhang YQ (2008) Spinal glial activation contributes to pathological pain states. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 972-983
16. Cao TX, Ramsey IS (2016) Toll-Like Receptor 4 Activation by LPS Stimulates TRPV2 Channel Activity in Microglia. *Biophysical Journal* 110: 286a-286a
17. Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65: 999-1007
18. Carrithers LM, Hulseberg P, Sandor M, Carrithers MD (2011) The human macrophage sodium channel NaV1.5 regulates mycobacteria processing through organelle polarization and localized calcium oscillations. *FEMS Immunol Med Microbiol* 63: 319-327

19. Carrithers MD, Dib-Hajj S, Carrithers LM, Tokmoulina G, Pypaert M, Jonas EA, Waxman SG (2007) Expression of the voltage-gated sodium channel NaV1.5 in the macrophage late endosome regulates endosomal acidification. *J Immunol* 178: 7822-7832
20. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-441
21. Chakravarty S, Herkenham M (2005) Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci* 25: 1788-1796
22. Chuang DY, Simonyi A, Kotzbauer PT, Gu Z, Sun GY (2015) Cytosolic phospholipase A2 plays a crucial role in ROS/NO signaling during microglial activation through the lipoxygenase pathway. *J Neuroinflammation* 12: 199
23. Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci* 24: 5177-5182
24. Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517-524
25. Colton CA (2009) Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 4: 399-418
26. Colton CA, Jia M, Li MX, Gilbert DL (1994) K⁺ modulation of microglial superoxide production: involvement of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Am J Physiol* 266: C1650-1655
27. Craner MJ, Damarjian TG, Liu S, Hains BC, Lo AC, Black JA, Newcombe J, Cuzner ML, Waxman SG (2005) Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS. *Glia* 49: 220-229
28. De Clercq K, Held K, Van Bree R, Meuleman C, Peeraer K, Tomassetti C, Voets T, D'Hooghe T, Vriens J (2015) Functional expression of transient receptor potential channels in human endometrial stromal cells during the luteal phase of the menstrual cycle. *Hum Reprod* 30: 1421-1436
29. De Clercq K, Van den Eynde C, Hennes A, Van Bree R, Voets T, Vriens J (2017) The functional expression of transient receptor potential channels in the mouse endometrium. *Hum Reprod* 32: 615-630
30. De Clercq K, Vriens J (2018) Establishing life is a calcium-dependent TRiP: Transient receptor potential channels in reproduction. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865: 1815-1829
31. De Petrocellis L, Starowicz K, Moriello AS, Vivese M, Orlando P, Di Marzo V (2007) Regulation of transient receptor potential channels of melastatin type 8 (TRPM8): effect of cAMP, cannabinoid CB(1) receptors and endovanilloids. *Exp Cell Res* 313: 1911-1920
32. Delmas P (2004) Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell* 118: 145-148
33. den Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ (2003) The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium* 33: 497-507
34. Ding X, Gu R, Zhang M, Ren H, Shu Q, Xu G, Wu H (2018) Microglia enhanced the angiogenesis, migration and proliferation of co-cultured RMECs. *BMC Ophthalmol* 18: 249
35. Do HTT, Bui BP, Sim S, Jung JK, Lee H, Cho J (2020) Anti-Inflammatory and Anti-Migratory Activities of Isoquinoline-1-Carboxamide Derivatives in LPS-Treated BV2 Microglial Cells via Inhibition of MAPKs/NF-kappaB Pathway. *Int J Mol Sci* 21

36. Echeverry S, Rodriguez MJ, Torres YP (2016a) Transient Receptor Potential Channels in Microglia: Roles in Physiology and Disease. *Neurotox Res* 30: 467-478
37. Echeverry S, Rodriguez MJ, Torres YP (2016b) Transient Receptor Potential Channels in Microglia: Roles in Physiology and Disease. *Neurotoxicity Research* 30: 467-478
38. Eder C (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am J Physiol* 275: C327-342
39. El-Shewy HM, Lee MH, Obeid LM, Jaffa AA, Luttrell LM (2007) The insulin-like growth factor type 1 and insulin-like growth factor type 2/mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells. *J Biol Chem* 282: 26150-26157
40. Elbaz M, Ahirwar D, Xiaoli Z, Zhou X, Lustberg M, Nasser MW, Shilo K, Ganju RK (2018) TRPV2 is a novel biomarker and therapeutic target in triple negative breast cancer. *Oncotarget* 9: 33459-33470
41. Entin-Meer M, Cohen L, Hertzberg-Bigelman E, Levy R, Ben-Shoshan J, Keren G (2017) TRPV2 knockout mice demonstrate an improved cardiac performance following myocardial infarction due to attenuated activity of peri-infarct macrophages. *PLoS One* 12: e0177132
42. Entin-Meer M, Keren G (2020) Potential roles in cardiac physiology and pathology of the cation channel TRPV2 expressed in cardiac cells and cardiac macrophages: a mini-review. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 318: H181-H188
43. Espinosa-Parrilla JF, Martinez-Moreno M, Gasull X, Mahy N, Rodriguez MJ (2015) The L-type voltage-gated calcium channel modulates microglial pro-inflammatory activity. *Mol Cell Neurosci* 64: 104-115
44. Eubler K, Herrmann C, Tiefenbacher A, Kohn FM, Schwarzer JU, Kunz L, Mayerhofer A (2018) Ca(2+) Signaling and IL-8 Secretion in Human Testicular Peritubular Cells Involve the Cation Channel TRPV2. *Int J Mol Sci* 19
45. Farber K, Kettenmann H (2005) Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 133-143
46. Franco R, Fernandez-Suarez D (2015) Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 131: 65-86
47. Fricke TC, Echtermeyer F, Zielke J, de la Roche J, Filipovic MR, Claverol S, Herzog C, Tominaga M, Pumroy RA, Moiseenkova-Bell VY, Zygmunt PM, Leffler A, Eberhardt MJ (2019) Oxidation of methionine residues activates the high-threshold heat-sensitive ion channel TRPV2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 24359-24365
48. Gambade A, Zreika S, Gueguinou M, Chourpa I, Fromont G, Bouchet AM, Burlaud-Gaillard J, Potier-Cartreau M, Roger S, Aucagne V, Chevalier S, Vandier C, Goupille C, Weber G (2016) Activation of TRPV2 and BKCa channels by the LL-37 enantiomers stimulates calcium entry and migration of cancer cells. *Oncotarget* 7: 23785-23800
49. Gao L, Yang P, Qin P, Lu Y, Li X, Tian Q, Li Y, Xie C, Tian JB, Zhang C, Tian C, Zhu MX, Yao J (2016) Selective potentiation of 2-APB-induced activation of TRPV1-3 channels by acid. *Sci Rep* 6: 20791
50. Garden GA, Moller T (2006) Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 1: 127-137
51. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35
52. Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32: 593-604
53. Hassan S, Eldeeb K, Millns PJ, Bennett AJ, Alexander SP, Kendall DA (2014a) Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (TRP) channel activation. *Br J Pharmacol* 171: 2426-2439

54. Hassan S, Eldeeb K, Millns PJ, Bennett AJ, Alexander SPH, Kendall DA (2014b) Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (TRP) channel activation. *British Journal of Pharmacology* 171: 2426-2439
55. Hecquet C, Malik A (2017) Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thrombosis and Haemostasis* 101: 619-625
56. Hegg CC, Hu S, Peterson PK, Thayer SA (2000) Beta-chemokines and human immunodeficiency virus type-1 proteins evoke intracellular calcium increases in human microglia. *Neuroscience* 98: 191-199
57. Heneka MT, Carson MJ, Khoury JE, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* 14: 388-405
58. Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D (2006) TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 19564-19568
59. Hirasawa T, Ohsawa K, Imai Y, Ondo Y, Akazawa C, Uchino S, Kohsaka S (2005) Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *J Neurosci Res* 81: 357-362
60. Ho WS, Zheng X, Zhang DX (2015) Role of endothelial TRPV4 channels in vascular actions of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol. *Br J Pharmacol* 172: 5251-5264
61. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397: 259-263
62. Hohmann U, Pelzer M, Kleine J, Hohmann T, Ghadban C, Dehghani F (2019) Opposite Effects of Neuroprotective Cannabinoids, Palmitoylethanolamide, and 2-Arachidonoylglycerol on Function and Morphology of Microglia. *Front Neurosci* 13: 1180
63. Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD, Zhu MX (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* 279: 35741-35748
64. Hui B, Yao X, Zhang L, Zhou Q (2020) Dexamethasone sodium phosphate attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in microglia BV2 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 393: 1761-1768
65. Hulette CM, Downey BT, Burger PC (1992) Macrophage markers in diagnostic neuropathology. *Am J Surg Pathol* 16: 493-499
66. Ichikawa H, Sugimoto T (2000) Vanilloid receptor 1-like receptor-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal nervous system. *Neuroscience* 101: 719-725
67. Inoue K (2002) Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40: 156-163
68. Iwata Y, Katanosaka Y, Arai Y, Komamura K, Miyatake K, Shigekawa M (2003) A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol* 161: 957-967
69. Iwata Y, Katayama Y, Okuno Y, Wakabayashi S (2018) Novel inhibitor candidates of TRPV2 prevent damage of dystrophic myocytes and ameliorate against dilated cardiomyopathy in a hamster model. *Oncotarget* 9: 14042-14057

70. Iwata Y, Ohtake H, Suzuki O, Matsuda J, Komamura K, Wakabayashi S (2013) Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* 99: 760-768
71. Jakel S, Dimou L (2017) Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci* 11: 24
72. Jalin AM, Rajasekaran M, Prather PL, Kwon JS, Gajulapati V, Choi Y, Kim C, Pakh K, Ju C, Kim WK (2015) Non-Selective Cannabinoid Receptor Antagonists, Hinokiresinols Reduce Infiltration of Microglia/Macrophages into Ischemic Brain Lesions in Rat via Modulating 2-Arachidonolyglycerol-Induced Migration and Mitochondrial Activity. *PLoS One* 10: e0141600
73. Jeong H, Kim YH, Lee Y, Jung SJ, Oh SB (2017) TRPM2 contributes to LPC-induced intracellular Ca(2+) influx and microglial activation. *Biochem Biophys Res Commun* 485: 301-306
74. Jia Y, Wang X, Varty L, Rizzo CA, Yang R, Correll CC, Phelps PT, Egan RW, Hey JA (2004) Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L272-278
75. Jiang J, Li M, Yue L (2005) Potentiation of TRPM7 inward currents by protons. *J Gen Physiol* 126: 137-150
76. Jones S, Mann A, Worley MC, Fulford L, Hall D, Karani R, Jiang M, Robbins N, Rubinstein J, Koch SE (2017) The role of transient receptor potential vanilloid 2 channel in cardiac aging. *Aging Clinical and Experimental Research* 29: 863-873
77. Juvin V, Penna A, Chemin J, Lin YL, Rassendren FA (2007) Pharmacological characterization and molecular determinants of the activation of transient receptor potential V2 channel orthologs by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Mol Pharmacol* 72: 1258-1268
78. Kaisho T, Akira S (2000) Critical roles of Toll-like receptors in host defense. *Crit Rev Immunol* 20: 393-405
79. Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H, Li L, Shibata H, Kojima I (1999) Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* 1: 165-170
80. Karimian G, Buist-Homan M, Faber KN, Moshage H (2012) Pertussis toxin, an inhibitor of G(alpha) PCR, inhibits bile acid- and cytokine-induced apoptosis in primary rat hepatocytes. *PLoS One* 7: e43156
81. Katanosaka Y, Iwasaki K, Ujihara Y, Takatsu S, Nishitsuji K, Kanagawa M, Sudo A, Toda T, Katanosaka K, Mohri S, Naruse K (2014) TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. *Nature Communications* 5
82. Kaur C, Sivakumar V, Zou Z, Ling EA (2014) Microglia-derived proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta induce Purkinje neuronal apoptosis via their receptors in hypoxic neonatal rat brain. *Brain Struct Funct* 219: 151-170
83. Kaur C, Too HF, Ling EA (2004) Phagocytosis of Escherichia coli by amoeboid microglial cells in the developing brain. *Acta Neuropathol* 107: 204-208
84. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91: 461-553
85. Kim EA, Han AR, Choi J, Ahn JY, Choi SY, Cho SW (2014) Anti-inflammatory mechanisms of N-adamantyl-4-methylthiazol-2-amine in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. *Int Immunopharmacol* 22: 73-83
86. Kim SR, Kim SU, Oh U, Jin BK (2006) Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca2+-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release. *J Immunol* 177: 4322-4329

87. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K (2007) UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446: 1091-1095
88. Kondo S, Kondo H, Nakane S, Kodaka T, Tokumura A, Waku K, Sugiura T (1998) 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA²⁺-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett* 429: 152-156
89. Konno M, Shirakawa H, Iida S, Sakimoto S, Matsutani I, Miyake T, Kageyama K, Nakagawa T, Shibasaki K, Kaneko S (2012a) Stimulation of transient receptor potential vanilloid 4 channel suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide. *Glia* 60: 761-770
90. Konno M, Shirakawa H, Iida S, Sakimoto S, Matsutani I, Miyake T, Kageyama K, Nakagawa T, Shibasaki K, Kaneko S (2012b) Stimulation of transient receptor potential vanilloid 4 channel suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide. *Glia* 60: 761-770
91. Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, Harteneck C (2004) Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C129-137
92. Kurland DB, Gerzanich V, Karimy JK, Woo SK, Vennekens R, Freichel M, Nilius B, Bryan J, Simard JM (2016) The Sur1-Trpm4 channel regulates NOS2 transcription in TLR4-activated microglia. *J Neuroinflammation* 13: 130
93. Labandeira-Garcia JL, Costa-Besada MA, Labandeira CM, Villar-Cheda B, Rodriguez-Perez AI (2017) Insulin-Like Growth Factor-1 and Neuroinflammation. *Front Aging Neurosci* 9: 365
94. Lai-Cheong JE, Sethuraman G, Ramam M, Stone K, Simpson MA, McGrath JA (2012) Recurrent heterozygous missense mutation, p.Gly573Ser, in the TRPV3 gene in an Indian boy with sporadic Olmsted syndrome. *British Journal of Dermatology* 167: 440-442
95. Lee N, Chen J, Sun L, Wu S, Gray KR, Rich A, Huang M, Lin JH, Feder JN, Janovitz EB, Levesque PC, Blonar MA (2003) Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem* 278: 20890-20897
96. Leveque M, Penna A, Le Trionnaire S, Belleguic C, Desrues B, Brinchault G, Jouneau S, Lagadic-Gossmann D, Martin-Chouly C (2018) Phagocytosis depends on TRPV2-mediated calcium influx and requires TRPV2 in lipid rafts: alteration in macrophages from patients with cystic fibrosis. *Sci Rep* 8: 4310
97. Lewinter RD, Skinner K, Julius D, Basbaum AI (2004) Immunoreactive TRPV-2 (VRL-1), a capsaicin receptor homolog, in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 470: 400-408
98. Liedtke W, Simon SA (2004) A possible role for TRPV4 receptors in asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L269-271
99. Lin ZM, Chen Q, Lee MY, Cao X, Zhang J, Ma DL, Chen L, Hu XP, Wang HJ, Wang XW, Zhang P, Liu XZ, Guan LP, Tang YQ, Yang HZ, Tu P, Bu DF, Zhu XJ, Wang KW, Li RY, Yang Y (2012) Exome Sequencing Reveals Mutations in TRPV3 as a Cause of Olmsted Syndrome. *American Journal of Human Genetics* 90: 558-564
100. Ling EA, Leblond CP (1973) Investigation of glial cells in semithin sections. II. Variation with age in the numbers of the various glial cell types in rat cortex and corpus callosum. *J Comp Neurol* 149: 73-81

101. Link TM, Park U, Vonakis BM, Raben DM, Soloski MJ, Caterina MJ (2010) TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat Immunol* 11: 232-239
102. Liu J, Zhao Z, Wen J, Wang Y, Zhao M, Peng L, Zang C, Que K (2019) TNF-alpha differently regulates TRPV2 and TRPV4 channels in human dental pulp cells. *Int Endod J* 52: 1617-1628
103. Liu Q, Wang X (2013) Effect of TRPV2 cation channels on the proliferation, migration and invasion of 5637 bladder cancer cells. *Exp Ther Med* 6: 1277-1282
104. Lively S, Schlichter LC (2013) The microglial activation state regulates migration and roles of matrix-dissolving enzymes for invasion. *J Neuroinflammation* 10: 75
105. Lively S, Schlichter LC (2018) Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Front Cell Neurosci* 12: 215
106. Loane DJ, Kumar A (2016) Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol* 275 Pt 3: 316-327
107. Lull ME, Block ML (2010) Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 7: 354-365
108. Maksoud MJE, Tellios V, An D, Xiang YY, Lu WY (2019) Nitric oxide upregulates microglia phagocytosis and increases transient receptor potential vanilloid type 2 channel expression on the plasma membrane. *Glia* 67: 2294-2311
109. Maksoud MJE, Tellios V, Xiang YY, Lu WY (2020) Nitric oxide signaling inhibits microglia proliferation by activation of protein kinase-G. *Nitric Oxide* 94: 125-134
110. Malihpour M (2017) Elektrophysiologische Charakterisierung von TRPV2 in HEK Zellen und in kultivierten Mikrogliazellen der Maus. In *Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie*, Published: Homburg Place
111. Masubuchi H, Ueno M, Maeno T, Yamaguchi K, Hara K, Sunaga H, Matsui H, Nagasawa M, Kojima I, Iwata Y, Wakabayashi S, Kurabayashi M (2019) Reduced transient receptor potential vanilloid 2 expression in alveolar macrophages causes COPD in mice through impaired phagocytic activity. *BMC Pulm Med* 19: 70
112. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-564
113. McGahon MK, Fernandez JA, Dash DP, McKee J, Simpson DA, Zholos AV, McGeown JG, Curtis TM (2016) TRPV2 Channels Contribute to Stretch-Activated Cation Currents and Myogenic Constriction in Retinal Arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57: 5637-5647
114. McLarnon JG, Zhang L, Goghari V, Lee YB, Walz W, Krieger C, Kim SU (1999) Effects of ATP and elevated K⁺ on K⁺ currents and intracellular Ca²⁺ in human microglia. *Neuroscience* 91: 343-352
115. Mihara H, Boudaka A, Shibasaki K, Yamanaka A, Sugiyama T, Tominaga M (2010) Involvement of TRPV2 activation in intestinal movement through nitric oxide production in mice. *J Neurosci* 30: 16536-16544
116. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 29: 359-370
117. Minke B, Wu C, Pak WL (1975) Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258: 84-87

118. Mizoguchi Y, Kato TA, Seki Y, Ohgidani M, Sagata N, Horikawa H, Yamauchi Y, Sato-Kasai M, Hayakawa K, Inoue R, Kanba S, Monji A (2014) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces sustained intracellular Ca²⁺ elevation through the up-regulation of surface transient receptor potential 3 (TRPC3) channels in rodent microglia. *J Biol Chem* 289: 18549-18555
119. Monet M, Gkika D, Lehen'kyi V, Pourtier A, Vanden Abeele F, Bidaux G, Juvin V, Rassendren F, Humez S, Prevarsakaya N (2009) Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochim Biophys Acta* 1793: 528-539
120. Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firlej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, Gkika D, Pourtier A, Bidaux G, Slomianny C, Delcourt P, Rassendren F, Bergerat JP, Ceraline J, Cabon F, Humez S, Prevarsakaya N (2010) Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res* 70: 1225-1235
121. Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, Andahazy M, Story GM, Patapoutian A (2005) Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307: 1468-1472
122. Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93: 829-838
123. Muth C (2018) Charakterisierung und Isoform-abhängige Funktionsuntersuchung des Apolipoprotein E in Mikroglia-Zellen im Kontext der Alzheimer-Erkrankung. In Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg, Published: Hamburg Place
124. Nabissi M, Morelli MB, Santoni M, Santoni G (2013) Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis* 34: 48-57
125. Nagarkatti P, Pandey R, Rieder SA, Hegde VL, Nagarkatti M (2009) Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med Chem* 1: 1333-1349
126. Nagasawa M, Nakagawa Y, Tanaka S, Kojima I (2007) Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages. *J Cell Physiol* 210: 692-702
127. Nam HY, Nam JH, Yoon G, Lee JY, Nam Y, Kang HJ, Cho HJ, Kim J, Hoe HS (2018) Ibrutinib suppresses LPS-induced neuroinflammatory responses in BV2 microglial cells and wild-type mice. *J Neuroinflammation* 15: 271
128. Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Wang Y, Flores CM, Qin N (2007) Activation properties of heterologously expressed mammalian TRPV2: evidence for species dependence. *J Biol Chem* 282: 15894-15902
129. Neumann-Raizel H, Shilo A, Lev S, Mogilevsky M, Katz B, Shneur D, Shaul YD, Leffler A, Gabizon A, Karni R, Honigman A, Binshtok AM (2019) 2-APB and CBD-Mediated Targeting of Charged Cytotoxic Compounds Into Tumor Cells Suggests the Involvement of TRPV2 Channels. *Front Pharmacol* 10: 1198
130. Nie L, Oishi Y, Doi I, Shibata H, Kojima I (1997) Inhibition of proliferation of MCF-7 breast cancer cells by a blocker of Ca(2+)-permeable channel. *Cell Calcium* 22: 75-82
131. Nilius B, Owsianik G (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 12: 218
132. Nilius B, Vennekens R, Prenen J, Hoenderop JG, Bindels RJ, Droogmans G (2000) Whole-cell and single channel monovalent cation currents through the novel rabbit epithelial Ca²⁺ channel ECaC. *J Physiol* 527 Pt 2: 239-248

133. Nilius B, Voets T (2005) TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch* 451: 1-10
134. Nilius B, Voets T, Peters J (2005) TRP channels in disease. *Sci STKE* 2005: re8
135. Nilius B, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2004) TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C195-205
136. Norenberg W, Langosch JM, Gebicke-Haerter PJ, Illes P (1994) Characterization and possible function of adenosine 5'-triphosphate receptors in activated rat microglia. *Br J Pharmacol* 111: 942-950
137. Ohana L, Newell EW, Stanley EF, Schlichter LC (2009) The Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current (I_{CRAC}) mediates store-operated Ca²⁺ entry in rat microglia. *Channels (Austin)* 3: 129-139
138. Omar Zaki SS, Kanesan L, Leong MYD, Vidyadaran S (2019) The influence of serum-supplemented culture media in a transwell migration assay. *Cell Biol Int* 43: 1201-1204
139. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ (2016) Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* 173: 649-665
140. Oulidi A, Bokhobza A, Gkika D, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, Ouafik L, Mauroy B, Prevarskaya N (2013) TRPV2 mediates adrenomedullin stimulation of prostate and urothelial cancer cell adhesion, migration and invasion. *PLoS One* 8: e64885
141. Palin K, Bluthé RM, McCusker RH, Moos F, Dantzer R, Kelley KW (2007) TNF α -induced sickness behavior in mice with functional 55 kD TNF receptors is blocked by central IGF-I. *J Neuroimmunol* 187: 55-60
142. Park U, Vastani N, Guan Y, Raja SN, Koltzenburg M, Caterina MJ (2011a) TRP Vanilloid 2 Knock-Out Mice Are Susceptible to Perinatal Lethality But Display Normal Thermal and Mechanical Nociception. *Journal of Neuroscience* 31: 11425-11436
143. Park U, Vastani N, Guan Y, Raja SN, Koltzenburg M, Caterina MJ (2011b) TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J Neurosci* 31: 11425-11436
144. Peralvarez-Marin A, Donate-Macian P, Gaudet R (2013) What do we know about the transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) ion channel? *FEBS J* 280: 5471-5487
145. Peterson LJ, Flood PM (2012) Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators Inflamm* 2012: 401264
146. Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM (2008) TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 28: 6231-6238
147. Quan Y, Moller T, Weinstein JR (2009) Regulation of Fc γ receptors and immunoglobulin G-mediated phagocytosis in mouse microglia. *Neurosci Lett* 464: 29-33
148. Rangaraju S, Raza SA, Pennati A, Deng Q, Dammer EB, Duong D, Pennington MW, Tansey MG, Lah JJ, Betarbet R, Seyfried NT, Levey AI (2017) A systems pharmacology-based approach to identify novel Kv1.3 channel-dependent mechanisms in microglial activation. *J Neuroinflammation* 14: 128
149. Raychowdhury MK, Gonzalez-Perrett S, Montalbetti N, Timpanaro GA, Chasan B, Goldmann WH, Stahl S, Cooney A, Goldin E, Cantiello HF (2004) Molecular pathophysiology of mucopolidosis type IV: pH dysregulation of the mucolipin-1 cation channel. *Hum Mol Genet* 13: 617-627
150. Reggio PH (2010) Endocannabinoid binding to the cannabinoid receptors: what is known and what remains unknown. *Curr Med Chem* 17: 1468-1486
151. Riehle M, Buscher AK, Gohlke BO, Kassmann M, Kolatsi-Joannou M, Brasen JH, Nagel M, Becker JU, Winyard P, Hoyer PF, Preissner R, Krautwurst D, Gollasch M,

- Weber S, Harteneck C (2016) TRPC6 G757D Loss-of-Function Mutation Associates with FSGS. *Journal of the American Society of Nephrology* 27: 2771-2783
152. Rodriguez-Perez AI, Borrajo A, Diaz-Ruiz C, Garrido-Gil P, Labandeira-Garcia JL (2016) Crosstalk between insulin-like growth factor-1 and angiotensin-II in dopaminergic neurons and glial cells: role in neuroinflammation and aging. *Oncotarget* 7: 30049-30067
153. Russo EB (2011) Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology* 163: 1344-1364
154. Saino T, Misaki T, Matsuura M, Shikanai T, Satoh Y (2008) Dipyrindamole inhibits intracellular calcium transients in isolated rat arteriole smooth muscle cells. *Arch Histol Cytol* 71: 235-247
155. Sakaba T, Neher E (2003) Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* 424: 775-778
156. Samtleben S, Jaepel J, Fecher C, Andreska T, Rehberg M, Blum R (2013) Direct imaging of ER calcium with targeted-esterase induced dye loading (TED). *J Vis Exp*: e50317
157. Sato-Kasai M, Kato TA, Ohgidani M, Mizoguchi Y, Sagata N, Inamine S, Horikawa H, Hayakawa K, Shimokawa N, Kyuragi S, Seki Y, Monji A, Kanba S (2016) Aripiprazole inhibits polyI:C-induced microglial activation possibly via TRPM7. *Schizophr Res* 178: 35-43
158. Savage JC, Carrier M, Tremblay ME (2019) Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease. *Methods Mol Biol* 2034: 13-26
159. Schilling T, Eder C (2009) Importance of the non-selective cation channel TRPV1 for microglial reactive oxygen species generation. *J Neuroimmunol* 216: 118-121
160. Siddiqui T, Lively S, Ferreira R, Wong R, Schlichter LC (2014) Expression and contributions of TRPM7 and KCa2.3/SK3 channels to the increased migration and invasion of microglia in anti-inflammatory activation states. *PLoS One* 9: e106087
161. Siddiqui TA, Lively S, Vincent C, Schlichter LC (2012) Regulation of podosome formation, microglial migration and invasion by Ca(2+)-signaling molecules expressed in podosomes. *J Neuroinflammation* 9: 250
162. Silei V, Fabrizi C, Venturini G, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F, Lauro GM (1999) Activation of microglial cells by PrP and beta-amyloid fragments raises intracellular calcium through L-type voltage sensitive calcium channels. *Brain Res* 818: 168-170
163. Siveen KS, Prabhu KS, Parray AS, Merhi M, Arredouani A, Chikri M, Uddin S, Dermime S, Mohammad RM, Steinhoff M, Janahi IA, Azizi F (2019) Evaluation of cationic channel TRPV2 as a novel biomarker and therapeutic target in Leukemia- Implications concerning the resolution of pulmonary inflammation. *Sci Rep* 9: 1554
164. Stella N (2009) Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1: 244-253
165. Sung TS, Jeon JP, Kim BJ, Hong C, Kim SY, Kim J, Jeon JH, Kim HJ, Suh CK, Kim SJ, So I (2011) Molecular determinants of PKA-dependent inhibition of TRPC5 channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C823-832
166. Sweeney M, McDaniel SS, Platoshyn O, Zhang S, Yu Y, Lapp BR, Zhao Y, Thistlethwaite PA, Yuan JXJ (2002) Role of capacitative Ca²⁺ entry in bronchial contraction and remodeling. *Journal of Applied Physiology* 92: 1594-1602
167. Talbot S, Dias JP, Lahjouji K, Bogo MR, Campos MM, Gaudreau P, Couture R (2012) Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional kinin B(1) receptor in rat spinal cord microglia. *J Neuroinflammation* 9: 16

168. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543
169. Tonnes E, Trushina E (2017) Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 57: 1105-1121
170. Toth BI, Konrad M, Ghosh D, Mohr F, Halaszovich CR, Leitner MG, Vriens J, Oberwinkler J, Voets T (2015) Regulation of the transient receptor potential channel TRPM3 by phosphoinositides. *J Gen Physiol* 146: 51-63
171. Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31: 16064-16069
172. Vay SU, Flitsch LJ, Rabenstein M, Moniere H, Jakovcevski I, Andjus P, Bijelic D, Blaschke S, Walter HL, Fink GR, Schroeter M, Rueger MA (2020) The impact of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) and voltage-gated potassium KCNQ/Kv7 channels on primary microglia function. *J Neuroinflammation* 17: 100
173. Venero JL, Burguillos MA, Brundin P, Joseph B (2011) The executioners sing a new song: killer caspases activate microglia. *Cell Death Differ* 18: 1679-1691
174. Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76: 387-417
175. Walz W, Ilschner S, Ohlemeyer C, Banati R, Kettenmann H (1993) Extracellular ATP activates a cation conductance and a K⁺ conductance in cultured microglial cells from mouse brain. *J Neurosci* 13: 4403-4411
176. Wang Z, Zhou L, An D, Xu W, Wu C, Sha S, Li Y, Zhu Y, Chen A, Du Y, Chen L, Chen L (2019) TRPV4-induced inflammatory response is involved in neuronal death in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Cell Death Dis* 10: 386
177. Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B (2003) Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424: 434-438
178. Watters JJ, Schartner JM, Badie B (2005) Microglia function in brain tumors. *J Neurosci Res* 81: 447-455
179. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howel DN, Vance JM, Rosenberg PB (2005) A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308: 1801-1804
180. Wissenbach U, Niemeyer B, Himmerkus N, Fixemer T, Bonkhoff H, Flockerzi V (2004) TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca²⁺ channel expression. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 1359-1363
181. 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: 596-607
182. Young JD, Ko SS, Cohn ZA (1984) The increase in intracellular free calcium associated with IgG gamma 2b/gamma 1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5430-5434
183. Yu P, Liu Z, Yu X, Ye P, Liu H, Xue X, Yang L, Li Z, Wu Y, Fang C, Zhao YJ, Yang F, Luo JH, Jiang LH, Zhang L, Zhang L, Yang W (2019) Direct Gating of the TRPM2 Channel by cADPR via Specific Interactions with the ADPR Binding Pocket. *Cell Rep* 27: 3684-3695 e3684
184. Yu Y, Fantozzi L, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JXJ (2004) Enhanced expression of transient

Literaturverzeichnis

- receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 13861-13866
185. Zoppoli P, Calice G, Laurino S, Ruggieri V, La Rocca F, La Torre G, Ciuffi M, Amendola E, De Vita F, Petrillo A, Napolitano G, Falco G, Russi S (2019) TRPV2 Calcium Channel Gene Expression and Outcomes in Gastric Cancer Patients: A Clinically Relevant Association. J Clin Med 8

10 Publikationen

Veröffentlichungen in Bearbeitung

Belkacemi A, Fecher-Trost C, Tinschert R, Flormann D, **Malihpour M**, Wagner C, R Meyer M, Beck A, Flockerzi V (2020) The TRPV2 Channel Mediates Ca²⁺-Influx in Red Blood Cells, Dehydration and Δ⁹-THC-Induced Decrease in Osmotic Fragility. In Bearbeitung.

Malihpour M, Belkacemi T, Flockerzi V, Weißgerber P, Beck A (2021) The Characterization and function of TRPV2 ion channels in mouse cortical microglial cells. In Bearbeitung.

Poster:

Malihpour M, Flockerzi V, Belkacemi T, Beck A (2019) Electrophysiological characterization of TRPV2 in mouse microglia. 85.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) Stuttgart, Germany.

Malihpour M, Belkacemi T, Flockerzi V, Beck A (2020) Characterization and function of TRPV2 in mouse microglia. 86.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) Leipzig, Germany.

11 Danksagung

Danke sagen möchte ich besonders Andreas Beck, der mich fachlich und menschlich über die gesamte Zeit betreut hat und sich immer viel Zeit genommen hat. Mein Herzlichen Dank gilt besonders Veit Flockerzi für die Möglichkeit eine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Herzlichen Dank geht an Immo Czerlinski für das korrigieren der Arbeit. Ich danke ebenfalls Stefanie Buchholz, Heidi Löhr, Thabet Belkacemi, Petra Weißgerber, Martin Simon-Thomas, Ute Soltek und Claudia Ecker und allen Mitarbeitern der Pharmakologie. Ich danke ebenfalls Ulrich Wissenbach für die Übernahme des Erstgutachtens dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich vor allem bei meinem Reza, dass ich mich immer auf ihn verlassen kann. Danke, für moralische Unterstützung während meines gesamten Studiums. Ich danke meinen Eltern und meiner Familie für ihre Unterstützung. Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr für jegliches Anliegen hatten bzw. immer noch haben! Ich könnte hier noch mehr Leuten danken. Damit geht an alle „nicht-erwähnten“, aber trotzdem für mich wichtigen Leuten: Vielen Dank euch allen! Herzlichen Dank der deutsche Hochschulverband für Ihre Unterstützung und Förderung.

Nichts ist mir unmöglich, weil der, der bei mir ist, mich stark macht.

Philipper 4.13

Lebenslauf