



**Charakterisierung eines Bindemotives selektiver
TRPC6-Aktivatoren und verhaltensexperimentelle
Studien an der TRPC6 defizitären Mauslinie
 $B6;129S-Trpc6^{tm1Lbi}/Mmjax$**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Pharmakologie und Toxikologie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

von Apothekerin
Yamina El Hamdaoui
geboren in Bad Kissingen

Mainz, 2022

D77

Dekan:

Erstgutachter:

Zweitgutachter:

Tag der Einreichung:

Datum der mündlichen Prüfung:

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Die vorgelegte Dissertation wurde am Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Wissenschaften (IPBW) der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung eingereicht. Zudem wurden bisher weder die gleiche noch Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht.

Ort, Datum

Yamina El Hamdaoui

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikation:

El Hamdaoui, Y., Zheng, F., Fritz, N. et al. Analysis of hyperforin (St. John's wort) action at TRPC6 channel leads to the development of a new class of antidepressant drugs. *Mol Psychiatry* (2022).

doi: 10.1038/s41380-022-01804-3

KURZFASSUNG

Die Johanniskrautpflanze *Hypericum perforatum* L. ist eine der weltweit am häufigsten eingesetzten Arzneipflanzen und wurde seit Jahrhunderten volksmedizinisch zur Behandlung der Depressionserkrankung eingesetzt. Unter den zahlreichen Inhaltsstoffen befindet sich der bioaktive Hauptinhaltsstoff Hyperforin. Dieses acylierte Phloroglucinol-Derivat vermag nicht nur hauptsächlich für die antidepressive Wirkung von Johanniskrautpräparaten verantwortlich zu sein, sondern verbirgt zugleich die Problematik von klinisch relevanten Arzneimittelinteraktion, indem es den Pregnan-X-Rezeptors (PXR) aktiviert und infolgedessen die Expression des Enzyms CYP3A4 induziert. Darüber hinaus ist Hyperforin durch seine chemische und physikalische Instabilität in seiner therapeutischen Anwendung limitiert. Hyperforin aktiviert selektiv den Ionenkanal TRPC6 (klassischer Transient-Rezeptor-Potential-Kanal 6), während die phylogenetisch verwandten Kanäle TRPC3 und TRPC7 nicht geöffnet werden. Mechanistisch wird angenommen, dass Hyperforin den TRPC6-Kanal über eine Ligand-Target-Interaktion aktiviert, die zu einem regulierten Einstrom von hauptsächlich Ca^{2+} -Ionen führt. Während der gleichzeitige Influx von Na^+ -Ionen zu einer Änderung des Na^+ -Ionengradienten entlang der Plasmamembran führt, wodurch im neuronalen System die Wiederaufnahme von Neurotransmittern reduziert wird, beeinflusst der Ca^{2+} -Influx die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase. Demzufolge kommt es weiter zu einer Auslösung von intrazellulären Signalkaskaden, die neuroprotektive Effekte hervorrufen und die synaptische Plastizität fördern. Ein relevanter Faktor, der in der Depressionserkrankung oftmals gestört vorliegt. 2,4-Diacylphloroglucinole sind Verbindungen mit Hyperforin-ähnlichem Wirkstoffprofil. Anders als Hyperforin zeichnen sich diese Derivate nicht durch eine PXR-Stimulation und Steigerung der CYP3A4-Expression aus. In dieser Arbeit war es daher von besonderem Interesse ein neues 2,4-Diacylphloroglucinol (Hyp13) mit verbesserter Struktureigenschaft in PC12-Zellen und transfizierten HEK293-Zellen hinsichtlich einer selektiven TRPC6-Aktivierung zu prüfen. Die erbrachten Ergebnisse belegen, dass mit Hyp13 ein neues chemisch stabiles Hyperforin-Derivat vorliegt, das sich mit einer Hyperforin vergleichbaren Wirkweise und Effektivität auszeichnet. Im nächsten Schritt dieser vorliegenden Arbeit wurde über eine zielgerichtete Mutagenese ein spezielles Bindemotiv im C-Terminus von TRPC6 durch korrespondierende Aminosäuren in TRPC3 ausgetauscht. Neben einer TRPC6-Mutante wurde ebenfalls eine entsprechende TRPC3-Mutante untersucht. Es folgte eine Ca^{2+} -fluorimetrische und elektrophysiologische Analyse der beiden TRPC-Mutanten in transfizierten HEK293-Zellen. Erstmals konnte anhand dieser TRPC-Mutanten nachgewiesen werden, dass Hyperforin mit dem Bindemotiv in TRPC6 in konzentrationsabhängiger Weise interagiert. Der letzte Teil der Arbeit konzentriert sich auf die phänotypische Charakterisierung des Verhaltens von TRPC6-Knock-out Mäusen. Während für diese Tiere bereits ein depressions- und angstassoziiertes Verhalten ermittelt werden konnte, wurde

hier eine etablierte Verhaltensbatterie angewendet in der Versuchs- und Kontrolltiere in weiteren verschiedenen Verhaltensdomänen untersucht wurden. Dem Ausgang dieses Tierversuchs zufolge führt der Verlust von TRPC6 zu einer Beeinträchtigung der Kognition und somit zu einem Symptom, dass bei depressiven Patienten häufig beobachtet wird.

ABSTRACT

St. John's wort plant *Hypericum perforatum* L. is one of the most widely used medicinal plants in the world and has been used for centuries in folk medicine for the treatment of depression. Among its numerous constituents is the main bioactive ingredient hyperforin. This acylated phloroglucinol derivative is not only responsible for the antidepressant effect of St. John's wort preparations, but also hides the problem of clinically relevant drug interaction by activating the pregnane X receptor (PXR) and consequently inducing the expression of the CYP3A4 enzyme. In addition, hyperforin is limited in its therapeutic application by its chemical and physical instability. Hyperforin activates the ion channel TRPC6 (classical transient receptor potential channel 6) selectively, whereas the phylogenetically related channels TRPC3 and TRPC7 are not opened. Mechanistically, hyperforin is thought to activate the TRPC6 channel via a ligand-target interaction that results in a regulated influx of mainly Ca^{2+} ions. Whereas concomitant influx of Na^+ ions leads to a change in the Na^+ ion gradient along the plasma membrane, reducing neurotransmitter reuptake in the neuronal system, Ca^{2+} influx affects intracellular Ca^{2+} homeostasis. Consequently, there is further a triggering of intracellular signaling cascades that induce neuroprotective effects and promote synaptic plasticity. This is a relevant factor, which is often disturbed in depressive disorders. 2,4-Diacylphloroglucinols are compounds with hyperforin-like drug profiles. Unlike hyperforin, these derivatives are not characterized by PXR stimulation and enhancement of CYP3A4 expression. In this work, it was therefore of particular interest to test a new 2,4-diacylphloroglucinol (Hyp13) with improved structural property in PC12 cells and transfected HEK293 cells with respect to selective TRPC6 activation. The results obtained demonstrate that Hyp13 is a new chemically stable hyperforin derivative with a mode of action and efficacy comparable to hyperforin. In the next step of this present work, a specific binding motif in the C-terminus of TRPC6 was replaced by corresponding amino acids in TRPC3 via targeted mutagenesis. In addition to a TRPC6 mutant, a corresponding TRPC3 mutant was also examined. Ca^{2+} -fluorimetric and electrophysiological analysis of the two TRPC mutants in transfected HEK293 cells followed. For the first time, these TRPC mutants demonstrated that hyperforin interacts with a binding motif in TRPC6 in a concentration-dependent manner. The final part of this work focuses on phenotypic characterization of the behavior of TRPC6 knock-out mice. While depression- and anxiety-associated behavior has already been identified for these animals, an established behavioral battery was applied here in which experimental and control animals were tested in additional different behavioral domains. According to the outcome of this animal experiment, the loss of TRPC6 leads to an impairment of cognition and thus to a symptom that is frequently observed in depressive patients.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	5
1.1 Depression	5
1.1.1 Definition, Symptomatik und Klassifikation der Depression	5
1.1.2 Epidemiologische und gesundheitsökonomische Aspekte	8
1.1.3 Ätiologie der Depression	10
1.1.3.1 Neurotrophie- und Neuroplastizität-Hypothese	11
1.1.4 Pharmakotherapie der Depression	14
1.1.5 Das Phytopharmakon Johanniskraut	17
1.1.5.1 Hyperforin-Derivate	20
1.2 Nichtselektive Kationenkanäle	23
1.2.1 Die TRP-Kanäle	24
1.2.1.1 Entdeckung	24
1.2.1.2 Die Superfamilie der TRP-Kanäle	25
1.2.1.3 Die TRPC-Familie	29
1.2.2 TRPC6	32
1.2.2.1 Struktur	32
1.2.2.2 Physiologische und pathophysiologische Relevanz	35
1.2.2.3 Die Rolle von TRPC6 in der Depressionserkrankung	36
1.2.2.4 TRPC6-Kanal Modulatoren	40
1.2.2.4.1 TRPC6-Aktivatoren	41
1.2.2.4.2 TRPC6-Inhibitoren	45
1.3 Tierverhaltensexperimente in der Depressionsforschung	48
1.3.1 Historische Entwicklung und rechtliche Grundlagen	48
1.3.2 Bedeutung von Tiermodellen in der Depressionsforschung	49
1.3.3 Mausmodelle zur Untersuchung von depressions- und angstähnlichen Verhalten	51
1.3.4 Verhaltensexperimente mit TRPC6-Kanal defizitären Mäusen	54
2. ZIELSETZUNG	55
3. MATERIALIEN UND GERÄTE	56
3.1 Geräte und Instrumente	56
3.2 Verbrauchsmaterialien	57
3.3 Chemikalien, biologische Materialien und Kits	58
3.4 Testsubstanzen	59
3.5 Antikörper	60
3.6 Plasmide	60
3.7 Zellen	60
3.8 Tiere	60
3.9 Puffer und Lösungen	61
3.10 Software	64
4. METHODEN	65
4.1 Zellen	65

4.1.1 PC12-Zellen	65
4.1.2 HEK293-Zellen	65
4.2 Zellkultur	65
4.2.1 Kultivierung	66
4.2.2 Bestimmung der Zellzahl	67
4.2.3 Kryokonservierung	67
4.2.4 Auftauen der Zellen	67
4.2.5 Mykoplasmen-Test	67
4.3 Zielgerichtete Mutagenese	68
4.4 Polymerase Kettenreaktion	69
4.4.1 Herstellung eines PCR-Reaktionsansatzes und Ablauf der PCR	69
4.4.2 DpnI Restriktionsverdau des PCR-Produktes	70
4.5 Transformation und Plasmid Präparation	71
4.6 Sequenzierung der TRPC3/6-Mutanten	72
4.7 Transiente Transfektion	73
4.8 Calcium-Imaging	73
4.8.1 Fluorometrische Messung der intrazellulärer Ca ²⁺ -Konzentration	73
4.8.2 Beladung und Messung von PC12- und HEK293-Zellen mit Fluoreszenzindikator Fura-2AM	74
4.9 Western Blot	76
4.9.1 Prinzip	76
4.9.2 Herstellung von Proteinlysate und Proteinkonzentrationsbestimmung	76
4.9.3 Gießen der Polyacrylamid-Gele	77
4.9.4 Versuchsdurchführung	77
4.10 Elektrophysiologie	78
4.10.1 Messkonfigurationen	79
4.10.2 Messverfahren in der Whole-Cell Konfiguration	80
4.10.3 Prinzip des Verstärkers	81
4.11 Genotypisierung	82
4.12 Tierverhaltensexperimente	84
4.12.1 Die Zucht der B6;129S-Trpc6 ^{tm1Lbi} /Mmjax Mauslinie	84
4.12.2 Versuchstiere und Haltung	85
4.12.3 Cupping, Überprüfung der Vitalität und neurologischer Reflexe	86
4.12.4 Bestimmung des Östruszyklus weiblicher Versuchstiere	87
4.12.5 Tierverhaltensexperimente	87
4.12.5.1 Spontaneous Alternation Behavior Test (SABT)	87
4.12.5.2 Spatial Object Recognition Test (SORT)	90
4.12.5.3 Open Field Test (OFT)	90
4.12.5.4 Novel Object Recognition Test (NORT)	91
4.12.5.5 Sociability Test (ST)	92
4.12.5.6 Light-Dark Box Test (LDBT)	93
4.12.5.7 Bedding Preference Test (BPT)	94
4.12.5.8 Statistische Auswertung	95
5. ERGEBNISSE	97
5.1 Hyperforin Derivat Hyp13 induziert einen TRPC6-vermittelten Ca ²⁺ -Influx und evoziert einen Ionenstrom in verschiedenen Zellsystemen	97
5.1.1 Hyp13 führt zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration im Calcium-Imaging	97

5.1.2 Hyp13 vermittelt über hTRPC6 in HEK293-Zellen eine konzentrationsabhängige Zunahme der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration im Calcium-Imaging	100
5.1.3 Hyp13 ruft eine konzentrationsabhängige Zunahme des Ionenstroms in der Whole-Cell-Aufnahme hervor	101
5.1.4 Sequenzalignment und Expression der dominant negativen Mutante hTRPC6AAA	104
5.1.5 Hyp13 Effektivität auf den Ca ²⁺ Influx ist in PC12-Zellen mit dominant negativer TRPC6-Mutante gehemmt	106
5.1.6 Hyp13 Effekt auf den Ionenstrom ist in PC12-Zellen mit dominant negativer TRPC6-Mutante reduziert	108
5.2. Das Bindemotiv LLKL interagiert mit Hyperforin und potenten Hyp-Derivaten und beeinflusst die Aktivierung des TRPC6-Kanals in HEK293-Zellen	111
5.2.1 Zielgerichtete Mutagenese der hTRPC6 und hTRPC3 Plasmid-DNA führt zur Bildung neuer Mutanten mit veränderten funktionellen Eigenschaften	111
5.2.2 Verifikation der zellulären Lokalisation und der Proteinexpressionsintensität der Mutanten hTRPC6IMRI und hTRPC3LLKL in HEK293-Zellen	114
5.2.3 Die Mutanten hTRPC6IMRI und hTRPC3LLKL beeinflussen die Effekte selektiver TRPC6-Aktivatoren auf den Ca ²⁺ -Influx im Calcium-Imaging	117
5.2.4 Die Mutanten hTRPC6IMRI und hTRPC3LLKL beeinflussen die Effekte selektiver TRPC6-Aktivatoren auf den Ionenstrom in der Whole-Cell-Aufnahme	121
5.2.5 Die Ionenkanäle hTRPC6 und hTRPC3LLKL werden durch selektive TRPC6-Aktivatoren konzentrationsabhängig in der Whole-Cell-Aufnahme stimuliert	125
5.3 Verhaltensexperimente	130
5.3.1 Spontaneous Alternation Behavior Test (SABT)	130
5.3.2 Spatial Object Recognition Test (SORT)	131
5.3.3 Open Field Test (OFT)	132
5.3.4 Novel Object Recognition Test (NORT)	134
5.3.5 Sociability Test (ST)	135
5.3.6 Light-Dark Box Test (LDBT)	136
5.3.7 Bedding Preference TEST (BPT)	136
5.3.8 Zusammenfassung statistisch erhobener Werte	138
5.4 Verhaltensexperimente begleitende Untersuchungen	139
5.4.1 Körpergewicht	139
5.4.2 Defäkationsfrequenz	140
5.4.3 Östruszyklusphasen	140
6. DISKUSSION	142
6.1 Die Aktivierbarkeit von TRPC3/6 durch DAG-Analoga	142
6.2 Die Bindestellen von TRPC6-Modulatoren	146

6.3 Das Hyperforin Bindemotiv LLKL im TRPC6-Kanal	149
6.4 Die selektive Aktivierung des TRPC6-Kanals durch 2,4-Diacylphloroglucinole	151
6.5 Depressions- und angstähnliches Verhalten in TRPC6 defizitärer Tiere	154
6.6 Die antidepressive und anxiolytische Wirkung von Hyperforin und Hyp-Analoga im Tiermodell und Verbindungen zum TRPC6-Kanal	157
6.6.1 TRPC6-vermittelte Effekte beeinflussen die Kognition im Tiermodell	160
6.7 Schnittmengen zwischen der Depressions- und Alzheimer-Erkrankung und die Rolle von TRPC6	162
6.8 Der Einfluss des Geschlechts auf das depressions- und angstähnliche Verhalten im Tiermodell	164
7. ZUSAMMENFASSUNG	166
8. VERZEICHNISSE	169
8.1 Abkürzungsverzeichnis	169
8.2 Abbildungsverzeichnis	175
8.3 Tabellenverzeichnis	178
8.4 Literaturverzeichnis	179
9. ANHANG	197
10. DANKSAGUNG	199

1. EINLEITUNG

1.1 Depression

1.1.1 Definition, Symptomatik und Klassifikation der Depression

Als sich Anfang des Jahres 2020 die Nachrichten in sämtlichen Medien über eine neue schwere pulmonale Infektionskrankheit weltweit überschlugen und Regierungen aller Nationen gezwungen waren ihr politisches Vorgehen nach den immer schneller eintretenden Infektionszahlen und damit verbundenen Todesfällen in der Bevölkerung abzustimmen, sprach die WHO erstmals öffentlich von einer Pandemie durch den Corona-Virus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). Neben den direkten Auswirkungen von COVID-19 hat die Pandemie ein Umfeld geschaffen, in dem viele Determinanten der psychischen Gesundheit ebenfalls betroffen waren und bisweilen noch sind. So wurde zur Vermeidung einer rasanten und unkontrollierten Ausbreitung von COVID-19 das gesellschaftliche Leben auf ein Minimum heruntergefahren, was zu Kontaktverboten, Schulschließungen, Einschränkungen in der Freizeitgestaltung und teilweise zum Verlust des Arbeitsplatzes führte. Diese tiefen Einschnitte im Alltag der Menschen schloss vermehrt psychische Belastungen mit ein.

Die international angelegte Studie „Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic“ bewertete die psychischen Auswirkungen der COVID-19 Pandemie zwischen Anfang 2020 und 2021, indem sie die Prävalenz und die globale Belastung durch die Depressions- und Angsterkrankung anhand von Literaturdaten quantifizierte. Demnach stieg die Anzahl der von affektiven Störungen betroffenen Personen und die damit einhergehenden Gesundheitskosten deutlich an.¹ Bestimmte negative Lebensereignisse wie zum Beispiel der Verlust eines geliebten Menschen oder des sozialen Umfeldes, die eine „deprimierende Gefühlslage“ auslösen können, werden von der Mehrheit der Betroffenen, ohne dass sie eine Depressionserkrankung entwickeln, nach einer Phase überwunden. Dagegen werden Personen dann medizinisch behandlungsbedürftig, wenn nach einer durch Psychiater umfassenden Anamnese und Diagnose das klinische Krankheitsbild einer Depression vorliegt, welches ätiologisch multikausal begründet sein kann. So werden die unipolare Depression und die bipolare Depression, die sich durch einen phasenweisen Wechsel depressiver und manischer Episoden symptomatisch erkenntlich macht, terminologisch den affektiven Störungen der Psyche zugerechnet. In Erscheinung tritt die Depression primär durch die Symptomtrias aus Freud-, Antriebs-

und Interessenlosigkeit. So deutet bereits die Erklärung des Wortes Depression im Duden auf die Hauptsymptome der Störung hin: „De|pres|sion, [frz. *dépression* = Niederdrückung, Senkung]“. Diese psychischen Leitsymptome können zusätzlich von emotionalen, kognitiven oder vegetativen Symptomen wie z.B. Ängstlichkeit, Konzentrations- und Aufmerksamkeitsschwierigkeiten, geringe Aktivitätsrate, Schlafstörungen und/oder Suizidgedanken begleitet werden oder von diesen sogar in ihrem Ausprägungsgrad übertroffen werden. Parallel entscheidend neben dem Auftreten dieser Symptome bleibt, dass sie eine bestimmte Zeitdauer, Persistenz und Intensität überschreiten und sich somit deutlich von einer „depressiven Verstimmung“ im herkömmlichen Sinne unterscheiden. Bei den beiden Klassifikationssysteme ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems tenth edition) der WHO und DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of mental Disorders Fifth Edition) der American Psychiatric Association (APA) handelt es sich um zwei international anerkannte Klassifikationssysteme der Psychiatrie und Psychotherapie, die sich auf die kodifizierte Beschreibung depressiver Symptome mitunter konzentrieren. Nach der in Deutschland gebräuchlichen und von der Fachgesellschaft DPPGN (Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde e. V.) vorgeschlagenen ICD-10 Klassifikation liegt eine depressive Episode leichten Schweregrades dann vor, wenn mindestens zwei Hauptsymptome und mindestens zwei Zusatzsymptome über mindestens zwei Wochen auftreten. Die Ausprägungsform der depressiven Episode mit leichten, mittleren oder schweren Schweregrad resultiert aus der Anzahl der vorliegenden Haupt- und Nebensymptomen. Darüber hinaus kann die schwere depressive Episode mit psychotischen Symptomen (Halluzinationen, Wahnideen, psychomotorische Hemmung oder Stupor) einhergehen und wird nach der ICD-10 Systematik in Abgrenzung zur schweren depressiven Episode ohne psychotische Symptome mit einer eigenen Diagnosegruppe verschlüsselt (ICD-10 Code F32.3).² Durch ausformulierte Klassifizierungssysteme wie das ICD-10 oder DSM-5 können klar definierte Diagnosekriterien erstellt werden. Allerdings bleibt der Weg zu einer Diagnose der Depression aufgrund beträchtlicher individueller Unterschiede, die zu einem heterogenen Erscheinungsbild dieser psychiatrischen Erkrankung beitragen, eine medizinische Herausforderung.

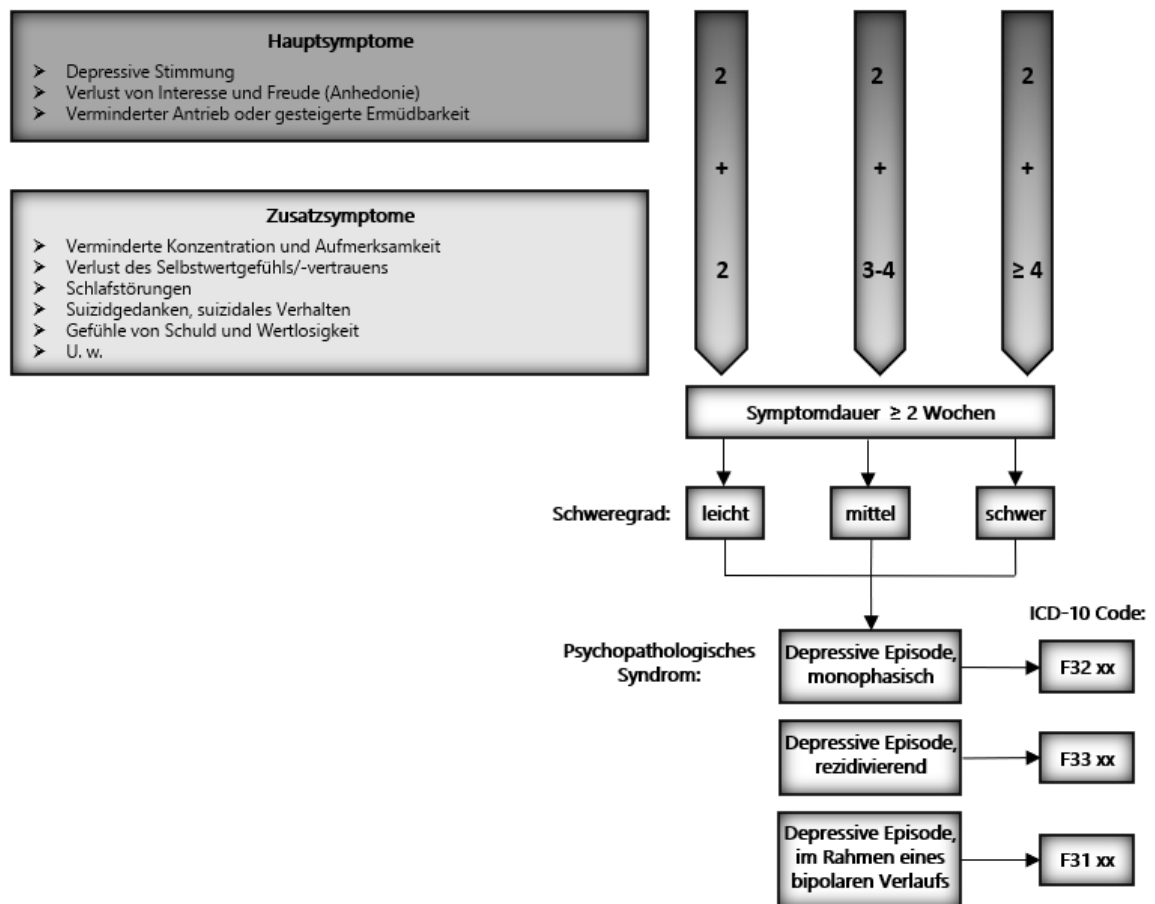


Abb. 1: Grafik mit Symptomen der unipolaren Depression und Einstufung des Schweregrades nach dem ICD-10 Klassifikationssystem.

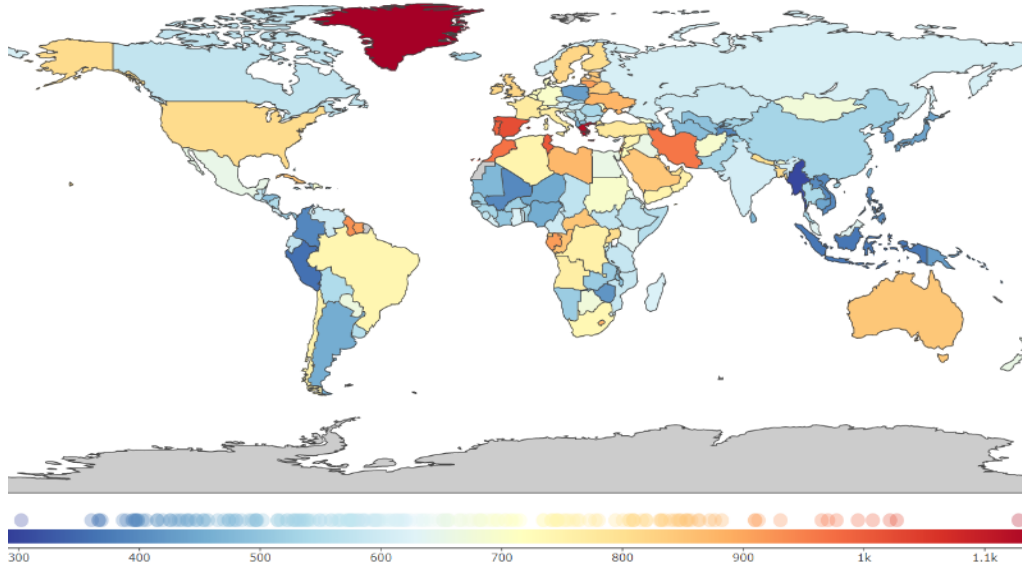
1.1.2 Epidemiologische und gesundheitsökonomische Aspekte

Internationale wissenschaftliche Kollaboration zur Einschätzung von globalen Belastungen und Behinderungen als Folge von Krankheiten, wie das sogenannte „Global Burden of Diseases“ (GBD), erfassen im regelmäßigen Turnus epidemiologische und gesundheitsökonomische relevante Daten zur Depressionserkrankung, auf die mitunter die WHO zurückgreift, um eine Grundlage für die Planung von Prävention und Gesundheitsversorgung in allen Nationen bereitzustellen. Laut der gegenwärtigen und umfangreichen „Global Burden of Diseases Injuries and Risk Factors Study 2017“ lag im Jahr 2017 die Anzahl depressiver Personen bei über 264 Millionen.³ Damit rangieren depressive Erkrankungen auf den zweiten Platz direkt hinter Angststörungen (ca. 284 Millionen) in der Gruppe der psychiatrischen Erkrankungen. Die Mehrheit an Depression erkrankter Menschen litt 2017 an einer *Major Depressive Disorder* (MDD; 93,7 %). Ein Vergleich, der auf die MDD zurückzuführenden Inzidenz-Fälle zwischen 1990 und 2017 zeigt eine deutliche Zunahme von 162 Millionen auf 241 Millionen, was einen Anstieg von 49,29 % bedeutet.⁴ Die Bedeutung der Depression für die allgemeine Krankheitslast in der Bevölkerung wird in GBD-Studien mittels Kennzahlen wie den *disability-adjusted life years* (DALY; verlorene Lebensjahre) oder den in DALYs miteinfließenden *years lived with disability* (YLD; mit Krankheit/Behinderung gelebte Lebensjahre) bewertet. Während 1990 psychiatrische Erkrankungen den 13. Platz bezüglich DALYs belegten, stiegen sie bis 2019 stetig auf den siebten Platz. Diese alarmierenden Zahlen decken sich mit den Prognosen der WHO, die bereits im Jahr 2004 in einem Report zur globalen Krankheitslast auf einen starken Zuwachs von DALYs hingewiesen hatte.⁵ Unter allen Erkrankungen stuft die WHO die Depression als drittgrößte Krankheitslast weltweit ein und prognostizierte, dass sie bis 2030 sogar an erster Stelle stehen wird.⁶

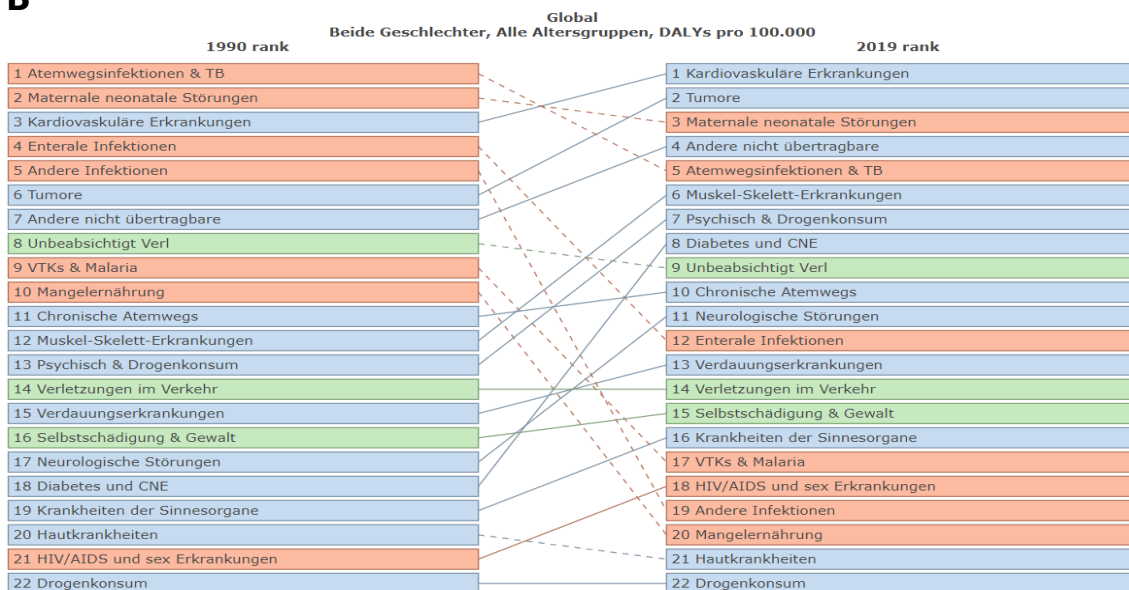
Depressionen nehmen bereits heute verstärkt das Gesundheits- und Sozialsystem in Anspruch und stellen somit eine gesamtgesellschaftliche Herausforderung dar. Nach den letzten Berechnungen des statistischen Bundesamtes entstanden im Jahr 2015 8,7 Milliarden Euro Versorgungskosten aufgrund depressiver Erkrankungen.⁷ Zu diesen direkten Kosten kommen schwieriger zu kalkulierende indirekte Kosten hinzu, die z.B. durch fehlende Arbeitstage und Frühberentung entstehen. Im Psychoreport 2022 der Deutsche Angestellten-Krankenkasse (DAK) hatten Diagnosen mit „Depressionen (F32 + F33)“ im Jahr 2021 108 Arbeitsunfähigkeitstage pro 100 Versicherte zu Folge und stiegen damit im Vergleich zum Jahr 2011 um 33,4 % an.⁸

A

Depressive Störungen
Beide Geschlechter, Alle Altersgruppen, 2019, DALYs pro 100.000



B



- █ Übertragbare, mütterliche, neonatale und ernährungsbedingte Erkrankungen
- █ Nicht übertragbare Krankheiten
- █ Verletzungen

Abb. 2: Global burden diseases (GBD) gemessen in DALYs für das Jahr 2019. (A) Weltweite Verteilung der berechneten DALYs für depressive Störungen in allen Altersgruppen und Geschlechtern. (B) Veränderung in der Rangordnung der DALYs bestimmter Erkrankungen von 1990 bis 2019. Psychische Erkrankungen einschließlich affektiver Störungen klettern von Platz 13 im Jahr 1999 auf Platz sieben im Jahr 2019. Illustrationen aus: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare Data Visualization. Seattle, WA: IHME, University of Washington, 2020.

1.1.3 Ätiologie der Depression

Neurobiologische, neurologische, genetische, hormonelle, immunologische und psychosoziale Mechanismen spielen in der Entwicklung einer Depression eine wichtige Rolle.^{9,10} Allerdings können wir bis heute die Depression nicht auf eine bestimmte Ursache zurückführen beziehungsweise den dahinterstehenden Pathomechanismus hinreichend darlegen. Erschwert wird die Ursachenfindung von häufig gleichzeitig auftretenden Komorbiditäten zu denen somatische- und psychiatrische Erkrankungen zählen. Besonders psychiatrische Erkrankungen wie z.B. Angsterkrankungen, Schizophrenie, Substanzmissbrauch, Verhaltens- und Persönlichkeitsstörungen können in den Krankheitsverlauf der Depressionserkrankung zusätzlich hineinwirken und diesen sogar verschlechtern.¹¹ Die Depression wird daher als eine psychiatrische Erkrankung mit einem multifaktoriellen Krankheitskonzept angesehen.

Der Anfang der 1970er Jahre entstandene Erklärungsansatz zur Ätiologie der Depression ist die Monoaminmangel-Hypothese. Diese Hypothese besagt, dass eine beeinträchtigte serotonerge und/oder noradrenerge und/oder dopaminerge Neurotransmission affektive Störungen hervorruft. Unterstützt wird diese Annahme durch den Wirkmechanismus von Antidepressiva wie z.B. Trizyklika (TCA), Selektiven-Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRI) und Serotonin- und Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren (SNRI), der vordergründig in der Erhöhung der Neurotransmitterkonzentration im Gehirn liegt. Jedoch konnte schon früh die Monoaminmangel-Hypothese allein keine zufriedenstellende Antwort auf die Komplexität der Depression geben. Hierzu trägt, um zwei Beispiele zu nennen, die hohe Anzahl therapieresistenter Patienten (über 30 %) und die klinische Latenz von mindestens zwei Wochen bis zum Eintritt der antidepressiven Wirkung bei.¹² Im Laufe der Zeit erbrachten weitere neurologische Untersuchungen bedeutende Kenntnisse zur Ätiologie der Depression, wodurch die Monoaminmangel-Hypothese erweitert und ergänzt werden konnte. Im folgenden Abschnitt wird ein Konzept vorgestellt, dass die Bedeutung von Neurotrophinen für die Neuroplastizität hervorhebt und in den letzten Jahren in der Depressionsforschung zunehmend an Bedeutung erlangte.

1.1.3.1 Neurotrophie- und Neuroplastizität-Hypothese

Folgende Hypothese, die sogenannte Neurotrophie- und Neuroplastizität-Hypothese, rückt die Bedeutung von Neurotrophine, welche eine entscheidende Aufgabe in der Entstehung, im Wachstum, in der Differenzierung, im Überleben und in der Anpassung von Neuronen haben und zudem an der Modulation der synaptischen Transmission beteiligt sind, in den Vordergrund.^{13,14} Sie nimmt primär an, dass verringerte Neurotrophin-Konzentrationen oder eine Fehlregulation in Neurotrophin assoziierten Signalwegen die neurologische Plastizität eingrenzen, was die Pathogenese der Depression begünstigt und die Wirkung von Antidepressiva reduziert.¹⁵ Neurotrophine sind Wachstumsfaktoren zu deren Familie der nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) zählen. Diese Proteine werden post- und präsynaptisch sezerniert und interagieren im parakrinen sowie autokrinen Modus mit den Rezeptoren Tropomyosin-Rezeptorkinase (Trk-Rezeptor) und p75-Rezeptor, worüber sie letztlich ihre biologische Wirkung entfalten.^{16,17} Unter den besagten Neurotrophinen ist BDNF das am stärksten im Rahmen der Depression erforschte Protein und wird sogar als biologischer Marker für Depression und erfolgreicher Depressionstherapie betrachtet.¹⁸⁻²⁰

BDNF, ein ca. 27 kDa großes Protein, ist sowohl im ZNS als auch in peripheren Geweben stark verbreitet.²¹ Die Expression von BDNF wird durch neuronale Aktivität reguliert und kontrolliert.²² Eine neuronale aktivitätsabhängige Expression ereignet sich dann, sobald eine synaptische Stimulation einen einwärts gerichteten Calcium-Influx erzeugt, der Signaltransduktionskaskaden in Gang setzt, die weiter zur Aktivität von Transkriptionsfaktoren im Nucleus führen.²³ Mehrere Promotoren, alternatives Splicing und unterschiedliche Polyadenylierungsstellen führen nach der Transkription der BDNF-DNA-Sequenz zu mindestens 22 diversen BDNF-Transkripte deren anschließende Codierung identische BDNF-Präkursor-Proteine hervorbringt.²⁴ In diesem Zusammenhang wird auch die Relevanz der verschiedenen BDNF-Transkriptvarianten im Gehirn diskutiert. So konnte bereits gezeigt werden, dass einzelne BDNF-Transkriptvarianten die Quantität und Morphologie von Dendriten-Spines in den Hippokampusregionen CA1 und CA3 (Cornu ammonis) unterschiedlich beeinflussen und folglich auch die strukturelle und funktionelle Plastizität mitgestalten.^{25,26} BDNF-Proteine binden selektiv an den TrkB-Rezeptor, der in den Gehirnkompartmenten Kortex, Hirnstamm, Rückenmark und vor allem im Hippokampus am stärksten exprimiert wird.^{27,28} Die Ligand-Rezeptor-Interaktion bewirkt initial eine Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors. Im aktivierten Zustand löst der TrkB-Rezeptor nach der Rekrutierung von Adapterproteinen wie Shc, FRS2 und Phospholipase C- γ die Aktivierung der drei Signaltransduktionskaskaden Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-AKT (PI3K-AKT), Ras-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (Ras-MAPK) und Phospholipase C- γ

(PLC- γ) Proteinkinase C (PKC) aus, die allesamt die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors cAMP response element-binding protein (CREB) im Nucleus zum Ziel haben (vergl. Abb. 3).^{29,30} Die Depression verringert die Expression und Funktion von BDNF in zerebralen Regionen insbesondere im präfrontalen Kortex und im Hippokampus, was in post mortem Gehirnproben und in stressassoziierten Tiermodellen festgestellt werden konnte.^{31,32} Darüber hinaus ist der Mangel an BDNF oder eine minimierte Aktivierbarkeit des TrkB-Rezeptors mit der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA-Achse) gesteuerten Stressantwort verknüpft. Ein erhöhtes Glukokortikoid-Level bei einer HPA-Achsen Dysregulation korreliert mit erniedrigten BDNF-Werten und beeinflusst die von BDNF ausgehenden neurotrophen Effekte auf die Struktur und Funktion von Neuronen negativ.³³⁻³⁵ Bei einer moderaten Steigerung der Glukokortikoid Zugabe scheinen Glukokortikoide allerdings auch als spezifische TrkB-Aktivatoren zu fungieren und gleichzeitig durch die Förderung der genomischen Wirkung aktivierter Glukokortikoid-Rezeptoren BDNF-vergleichbare Effekte anstoßen.³⁶ In einer Reihe von Studien wurde auch der Effekt von Antidepressiva auf die BDNF-vermittelten Modifikation der Neurotransmission untersucht.³⁷ In Tierversuchsstudien konnte bereits dargelegt werden, dass die Gabe von Antidepressiva die Bildung von BDNF im Kortex und Hippokampus steigert was zusätzlich mit einer Verbesserung der synaptischen Plastizität einherging.⁹ Sogar in Gehirnproben depressiver Patienten konnte demonstriert werden, dass im Hippokampus von Probanden, die mit Antidepressiva eingestellt waren, BDNF-Werte signifikant höher vorlagen als jene in der Vergleichsgruppe.³⁸ Typische Antidepressiva wie die SSRIs, TCAs und MAO-Hemmer blockieren die Wiederaufnahme oder den Abbau der Monoamine Serotonin und Noradrenalin im synaptischen Spalt und begründeten damit einst die Monoaminmangel-Hypothese. Das zeitlich verzögerte Ansprechen auf die Therapie ist ein Hinweis darauf, dass auf der molekularen Ebene eine langsam einsetzende Anpassung nachgeschalteter Signalwege und die Regulierung von Zielgenen stattfindet, die in neurobiologischen Prozessen essentiell sind.³⁹ Untersuchungen zeigen, dass nach einer pharmakologischen Intervention mit klassischen Antidepressiva die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB im Hippokampus erhöht vorliegt, was mit der anschließenden Produktion von Proteinen und Faktoren einschließlich von BDNF, die die Neuroprotektion, Neuroplastizität, und Neurogenese vorantreiben, einhergeht.⁴⁰ Damit zeigt sich, dass sowohl Antidepressiva als auch BDNF gemeinsam an wesentlichen neuronalen Signalkaskaden beteiligt sind, die antidepressive Effekte auslösen und unterstützen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie untersuchte im Detail sogar eine mögliche Interaktion von Antidepressiva mit dem TrkB Rezeptor als denkbaren antidepressiven Mechanismus, der in der Wirkung von Antidepressiva mit involviert ist. Casarotto et al. fanden heraus, dass sowohl typische als auch schnell wirkende Antidepressiva wie das SSRI Fluoxetin und der NMDA-

Rezeptor Antagonist Ketamin direkt an den TrkB-Rezeptor binden und dadurch die synaptische Lokalisierung des TrkB-Rezeptors und seine Aktivierung durch BDNF erleichtern. Die Mutation des TrkB-Bindemotivs Y433F (Y = Tyrosin, F = Phenylalanin) beeinträchtigte in vitro und in vivo zelluläre, verhaltens- und synaptische plastizitätsfördernde Reaktionen auf Antidepressiva.⁴¹ Diese Entdeckung wirft ein neues Licht auf den komplexen Wirkmechanismus von Antidepressiva und verdeutlicht einen Zusammenhang zwischen antidepressiver Wirkung und neuronaler Plastizität. Basierend auf diese Entdeckung, könnte die Entwicklung effektiver TrkB-Aktivatoren mit antidepressiven Eigenschaften eine weitere pharmakologische Herangehensweise in der Depressionstherapie bedeuten.⁴² Damit stellt die neurotrophe Hypothese ein bedeutender Erklärungsansatz dar, der neurobiologische Abläufe in der Depression beleuchtet und potenzielle Wirkmechanismen von Antidepressiva aufdeckt.

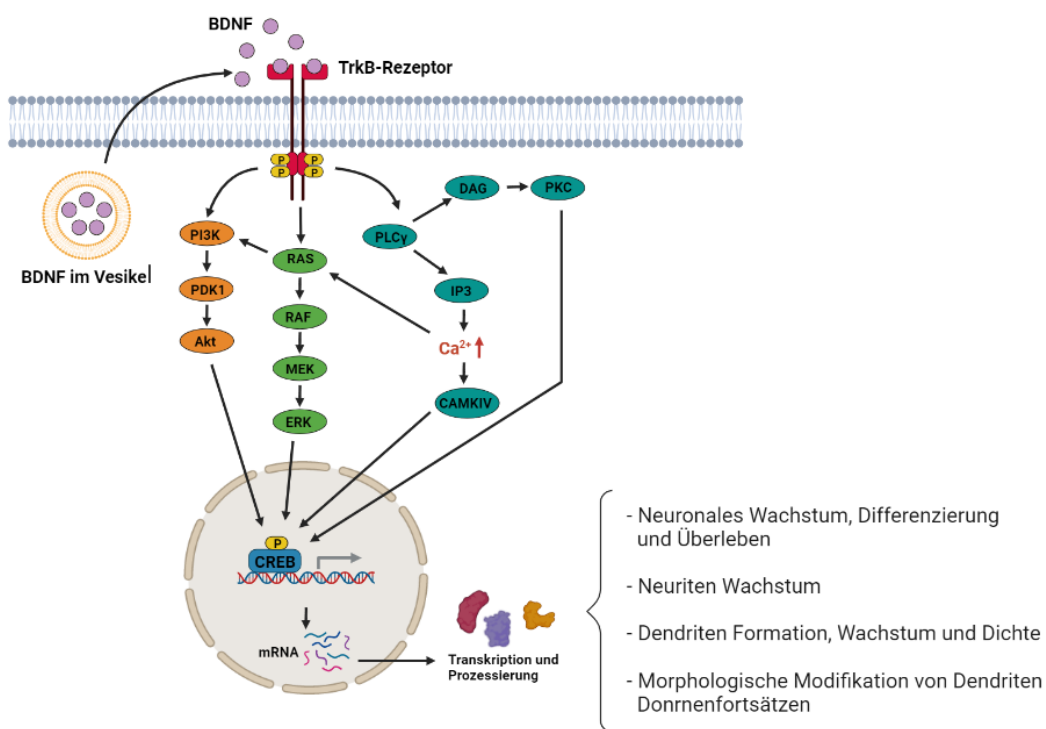


Abb. 3: Intrazelluläre Signaltransduktionskaskade bei TrkB-Rezeptor Aktivierung durch BDNF. Die Bindung von BDNF an den TrkB-Rezeptor führt zu einer Homodimerisierung und löst die Aktivierung von Adapterproteinen wie die Src-Homologiedomäne 2 (SH2) aus. Anschließend führen aktivierte Adapterproteine zu Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) -AKT (PI3K-AKT), Ras-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (Ras-MAPK) und Phospholipase C-γ (PLC-γ) Proteinkinase C (PKC) Signalweges. Die Stimulation dieser Signalkaskaden führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB, wodurch die Expression zahlreicher Proteine initiiert wird, die das neuronale Überleben, die Plastizität, die Differenzierung und das Wachstum von Neuronen vorantreiben.

1.1.4 Pharmakotherapie der Depression

So vielfältig die Depressionserkrankung in Erscheinung tritt, so vielfältig sind auch ihre Behandlungsmöglichkeiten. Dabei stellt die Pharmakotherapie ein entscheidender Baustein in der Therapiekonzeption gegen die Depressionserkrankung dar. Lange bevor das erste Antidepressivum vermarktet werden konnte, schien es unvorstellbar die Depression mit einer chemischen Substanz effektiv zu behandeln. Dem Schweizer Psychiater Roland Kuhn gelang schließlich in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts mit der Entdeckung von Imipramin der Durchbruch.⁴³ Während die älteren Antidepressiva wie die Tri- und Tetrazyklika noch nach ihrer Struktur gekennzeichnet wurden, wurden alle darauffolgenden Antidepressiva nach ihrem Wirkprinzip bezeichnet. Heute stehen der medikamentösen Therapie mit Antidepressiva folgende Substanz(klassen) zur Verfügung:

- Trizyklische Antidepressiva (TCA)
- Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI)
- Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer (SNRI)
- Selektive Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSNRI)
- Selektive Noradrenalin- und Dopamin-Wiederaufnahme-Hemmer (SNDRI)
- Noradrenerge und spezifisch serotonerge Antidepressiva (NaSSA)
- Dual-serotonerge Antidepressiva (DSA)
- Monoaminoxidase-Hemmer (MAO-Hemmer)
- Ketamin
- Johanniskrautextrakt

Im Prinzip führen die Arzneistoffe aus den gelisteten Wirkstoffklassen trotz ihrer verschiedenen Wirkmechanismen zu einem gemeinsamen Ziel, der Erhöhung der Neurotransmitterkonzentrationen von Serotonin und/oder Noradrenalin im synaptischen Spalt und der Stärkung von Adaptionsmechanismen in der Postsynapse, die zu einer Steigerung der Neurotransmitter-Rezeptordichte im ZNS führen. Darüber hinaus wird ihnen eine Beteiligung in der Aktivierung von weiteren Rezeptoren und damit verknüpften Signaltransduktionsprozessen, die für den antidepressiven Outcome eine bedeutende Rolle spielen und nicht zuletzt für die Wirksamkeit der genannten Antidepressiva mit Ausnahme des schnell wirksamen Ketamins verantwortlich sind, zugeschrieben. Die folgende Abbildung präsentiert die Ziele der antidepressiven Wirkung im noradrenergen und serotonergen neuronalen System:

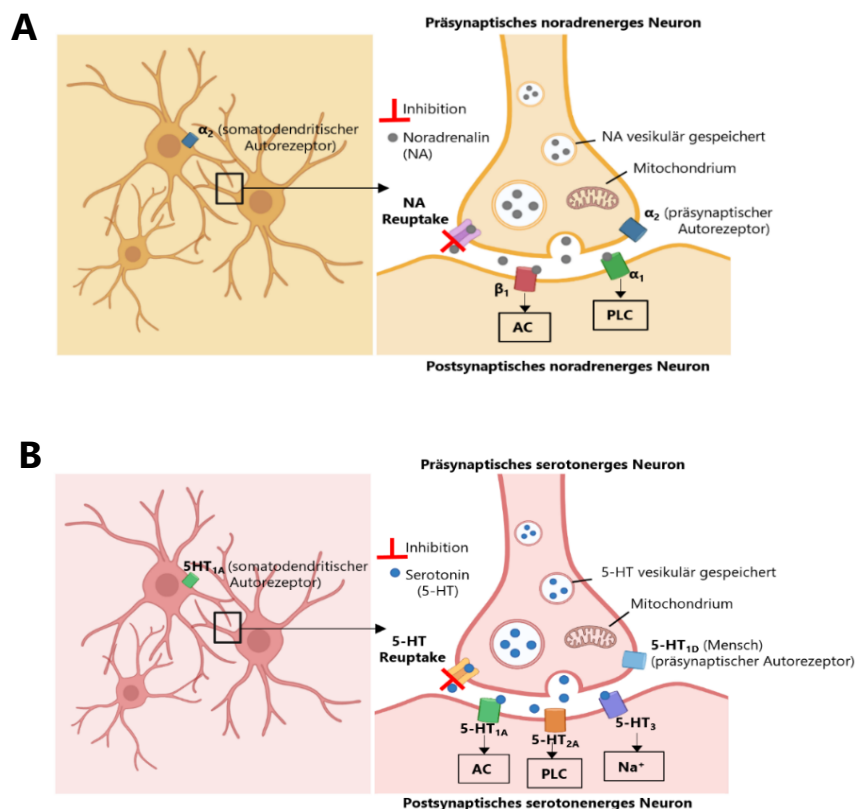


Abb. 4: Grafische Illustration der Prä- und Postsynapse (A) noradrenerger und (B) serotonerger Neuronen einschließlich der Effekte verschiedener Antidepressiva. Trizyklika blockieren die Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin in die Präsynapse durch die unselektive Blockade der Reuptake Transporter NERT und SERT. Wirkstoffe, die zu den SSRIs und SNRIs gezählt werden, hemmen hingegen selektiv den Rücktransport von Serotonin oder Noradrenalin in die Präsynapse. Die SSNRI-Klasse inhibiert selektiv die Wiederaufnahme von sowohl Serotonin als auch Noradrenalin. NaSSA-Wirkstoffe wie Mirtazapin hemmen die Noradrenalin- und spezifisch die Serotonin-Wiederaufnahme. DSA wie Nefazodon inhibieren selektiv die Serotonin-Wiederaufnahme und wirken parallel antagonistisch an 5-HT₂-Rezeptoren. MAO-Hemmer blockieren den Abbau von Serotonin und Noradrenalin in der Präsynapse durch die Deaktivierung der Monoaminoxidase in der mitochondrialen Membran. (Abb. modifiziert nach Efinger et al., 2022)⁴⁴

Trizyklika (z.B. Imipramin, Amitryptilin, Doxepin) antagonisieren den Wiederaufnahmetransporter von Noradrenalin (NERT) und Serotonin (SERT) in der präsynaptischen Membran. Dabei zeichnen sie sich durch eine unselektive Inhibition dieser Transporter aus. Nebenwirkungen resultieren aus der gleichzeitigen Blockade von H₁-, M₁-, α₁- und 5-HT₂-Rezeptoren. Serotonin, Noradrenalin und Dopamin werden von der Monoaminoxidase (MAO) in der Mitochondrienmembran zu unwirksamen Metaboliten abgebaut. An dieser Stelle greifen selektive wie auch unselektive MAO-Hemmer (z.B. Moclobemid, Tranylcypromin) an, um die Konzentration der Neurotransmitter in den Neuronen aufrechtzuerhalten. Beide in den 1950ern entwickelten Substanzklassen werden aufgrund ihrer geringen therapeutischen Breite noch der ersten Generation der Antidepressiva zugerechnet.

Arzneistoffe der zweiten Generation zeichnen sich durch ihre selektivere Affinität für die Neurotransmitter Rücktransporter NERT und SERT aus. SSRI (z.B. Fluoxetin, Citalopram), SNRI (z.B. Reboxetin) und SSNRI (z.B. Venlafaxin, Duloxetin) bewirken eine Zunahme der noradrenergen und/oder serotonergen Transmission. Antidepressiva der Wirkstoffklasse DSA (z.B. Nefazodon) besitzen einen dualen Mechanismus zur Erhöhung der Serotonin Konzentration im synaptischen Spalt, indem sie den SERT und den postsynaptischen Serotonin-Rezeptor 5-HT₂ blockieren. Die Hemmung des 5-HT₂-Rezeptors hat zur Folge, dass die durch die Depression hervorgerufene Reduktion der 5-HT_{1A}-Rezeptorsensibilität und damit verbundene kompensatorische Hyperaktivität des 5-HT₂-Rezeptors reguliert wird.⁴⁵ Daneben existieren Antidepressiva, die ebenfalls serotonerge und noradrenerge Neurone stimulieren, indem sie wie im Falle der NaSSAs (z.B. Mirtazapin, Mianserin) durch die Blockade des α_2 -Autorezeptors das negative Feedback der Noradrenalin Freisetzung verhindern.⁴⁶ Durch die Arzneistoffe der SNDRI-Gruppe (z.B. Bupropion) werden zusätzlich dopaminerge Effekte erlangt. Ein Antidepressivum mit einem andersartigen Wirkstoffprofil und komplexer Neuropharmakologie ist der NMDA-Rezeptor Antagonist Ketamin. Einst als Anästhetikum entdeckt erfährt heute Ketamin in subanästhetischen Dosen als rapid und besonders bei therapieresistenter Depression wirksamer Arzneistoff großes Interesse in der neuropsychiatrischen Forschung. Jüngst schaffte das S-Enantiomer Esketamin (Spravato®) in Form eines Nasensprays als Antidepressivum zugelassen zu werden, das bedingt durch sein Missbrauchspotential und ausgeprägten Nebenwirkungsprofil, was mitunter Halluzinationen und Albträume betrifft, nur unter ärztlicher Aufsicht therapeutisch angewendet werden darf. Es wird postuliert, dass Ketamin seine antidepressive Wirkung dadurch entfaltet, indem es an den Glutamat-Bindungsstellen des NMDA-Rezeptors bindet und in die glutamaterge Neurotransmission eingreift. Demnach hemmt Ketamin GABAerge Interneurone mit hoch tonischen Entladungsfrequenzen, wodurch es infolgedessen zu einer verstärkten Enthemmung von exzitatorischen Neuronen kommt, die einen Glutamat-Schub erzeugen. Der resultierende Glutamat-Schub stimuliert AMPA-Rezeptoren und spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle, was über eine Vielzahl von Downstream-Signalen zur gesteigerten Bildung von BDNF und Stimulation seines Rezeptors TrkB führt. Durch die von BDNF stimulierten mTORC1-Signalweg kommt es schließlich zu einer erhöhten Synthese von Proteinen (z.B. GluR1 und PSD95), die für die Reifung und Bildung von Synapsen erforderlich sind.¹⁰ Seine ebenfalls potenten Metaboliten zeigen darüber hinaus weitere Effekte, die neben dem glutamatergen auch das serotonerge, noradrenerge und dopaminerge System betreffen und ihre antidepressive Wirkung beeinflussen. Studienergebnissen zufolge induzierte (R)-Ketamin eine stärkere Zunahme der 5-HT-Freisetzung als vergleichsweise (S)-Ketamin, das wiederum einen robusten Anstieg der Dopaminfreisetzung herbeiführt. Der Ketamin-Metabolit (2R,6R)-Hydroxynorketamin induzierte einen leichten Anstieg der 5-HT- und Noradrenalin-Ausschüttung und (S)-Norketamin erhöhte die

Dopamin- und Noradrenalin-Freisetzung.⁴⁷ Das nächste Antidepressivum ist das Johanniskrautextrakt. Dieser Naturstoff zählt heute zu den bestuntersuchten Phytopharmaka, der seine pharmakologische Wirkung über den Hauptinhaltsstoff Hyperforin entfaltet. Im folgenden Kapitel wird die Bedeutung dieses Phytopharmakons näher beleuchtet.

1.1.5 Das Phytopharmakon Johanniskraut

Seit der Antike wird das Johanniskraut *Hypericum perforatum L.* aus der Familie der Hypericaceae volksmedizinisch aufgrund seiner antiphlogistischen, analgetischen, antimikrobiellen, antiviralen und antidepressiven Eigenschaften angewendet.⁴⁸ Über die darauffolgenden Jahrhunderten hinweg nahm seine therapeutische Bedeutung zur Behandlung von psychiatrische Erkrankungen, insbesondere der Depression stetig zu.⁴⁹⁻⁵¹ Demnach wurde die Erforschung seines einzigartigen pharmakologischen Profils und seiner chemischen Zusammensetzung erforderlich. Beheimatet war das Johanniskraut einst in Europa, Nordafrika und Westasien und ist heute weltweit vorzufinden. Äußerlich tritt diese bis zu einem Meter hochwachsende Pflanze durch ihre perforierten mit ätherischen Ölen befüllten ovalförmigen Blättern und durch die dunkel punktierten goldgelben Blüten in Erscheinung.⁵² In einer Reihe von Tier- und Patientenstudien konnte der antidepressive Effekt des Johanniskrauts wissenschaftlich belegt werden. So wurden beispielsweise in anfänglichen Experimenten, die zur Identifizierung eines depressionsähnlichen Verhaltens in Nagern herangezogen wurden, wie im *Forced Swim Test* (FST) und *Tail Suspension Test* (TST) eine signifikante Verbesserung jenes Verhaltens nach der Gabe von Johanniskrautextrakt festgestellt.⁵³⁻⁵⁵ In weiteren Untersuchungen konnten z.B. in Ratten, die chronischen unvorhersagbaren Stress ausgesetzt waren und erhöhte Kortikosteroid-Levels aufzeigten, Johanniskraut zu einer Minimierung dieses stressassoziierten Parameters führen.⁵⁶ In zahlreichen Vergleichs- sowie placebokontrollierten Studien wurde zudem eine klinische Wirksamkeit, wie sie durch die Einnahme von SSRIs z.B. Fluoxetin oder Trizyklika z.B. Amitriptylin erreicht wird, ermittelt.^{57,58} Des Weiteren präsentiert eine weitere Studie, dass Johanniskraut über seine Wirkung gegen milde bis moderate Verlaufsformen der Depression ebenso gegen die schwere Verlaufsform wie der MDD aktiv ist.⁵⁹ Heute zählt dieses Naturprodukt zu einem der pharmakologisch besterforschten Phytopharmaka, das zur Behandlung der Depression angewendet wird.⁶⁰ In der medizinischen Praxis werden zur Therapie depressiver Patienten primär Antidepressiva wie SSRIs oder TCAs eingesetzt.⁶¹ Das Vorgehen mit klinisch etablierten Antidepressiva wird oft von Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme, sexuelle Dysfunktion oder fehlendes Ansprechen begleitet, wodurch die Adhärenz gefährdet wird. In diesem Punkt spielen Johanniskraut-Präparate aufgrund ihres vorteilhafteren Nebenwirkungsprofils bei einer Standarddosis

von drei Mal 300 mg/täglich eine bedeutende Rolle und gelten daher als adäquate Alternativen pflanzlichen Ursprungs.⁵⁷ Das Johanniskraut-Extrakt setzt sich aus einer Vielzahl komplexer bioaktiver Inhaltsstoffe zusammen. Darunter fallen Phloroglucinol-Derivate (Hyperforin und Adhyperforin), Naphthodianthrone (Hypericin und Pseudohypericin), Flavonoide (Rutin, Hyperosid, Isoquercitrin, Quercitrin und Quercetin), Biflavonoide (Biapigenine), Proanthocyanidine und Chlorogensäure für die ein antidepressiver Effekt beschrieben wurde.⁶²⁻⁶⁶ Hauptinhaltsstoff des Johanniskraut-Extrakts und wirksamkeitsbestimmend ist, wie gleichwegs in zahlreichen Studien belegt wurde, das Phloroglucinol-Derivat Hyperforin.⁶⁷ In tierexperimentellen Studien mit verschiedenen Verhaltenstests führte die Gabe von Hyperforin im Ergebnis zu einer klaren Verbesserung des depressions- und angstassoziierten Verhaltens. Parallel dazu konnte im Tiermodell auch eine enge Korrelation zwischen der Wirkung verschiedener Johanniskraut-Extrakte und dem Hyperforin-Gehalt gemessen werden.⁶⁷⁻⁷⁰ Zudem zeigen klinische Untersuchungen, dass eine Reduktion des Hyperforin Gehaltes in Johanniskraut-Extrakten von 5 % auf 0,5 % zu einer Abnahme der antidepressiven Wirkung bei depressiven Patienten führt, was die Bedeutung von Hyperforin als antidepressiver und damit pharmakologisch relevanter Inhaltsstoff des Johanniskrautes nochmals unterstreicht.⁷¹

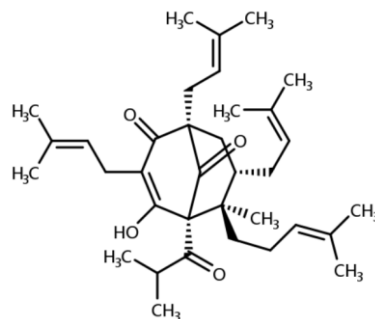


Abb. 5: Chemische Struktur von Hyperforin. Hyperforin ist ein bityklisches polyprenyliertes Acylphloroglucinol Derivat.

Erste Publikationen zum Aktivierungsmechanismus von Hyperforin konnten in nanomolaren Konzentrationen eine Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme von Serotonin (205 nM), Noradrenalin (102 nM), Dopamin (80 nM), GABA (184 nM) und L-Glutamat (143 nM) in Synaptosomen von Ratten nachweisen.⁷²⁻⁷⁶ Den genannten Neurotransmittern wird eine Beteiligung an der Pathogenese der Depression im Falle ihrer Dysregulation zugesprochen.⁷⁷ Im Vergleich zu den synthetischen Antidepressiva, die ebenfalls durch eine Hemmung des Neurotransmitter-Reuptakes ihren Wirkmechanismus begründen, konnte für Hyperforin keine Interaktion mit Neurotransmitter-Rücktransportern in der Präsynapse identifiziert werden. So bewirkt Hyperforin eine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Ionenkonzentration und verursacht auf diesen Weg, dass entlang der Membran sich kein Na^+ -Gradient aufbauen kann, der als Triebkraft für die Funktion von Monoamintransporter benötigt wird.^{78,79} Weitere nachfolgende Studien zeigten, dass die Hyperforin-induzierte Zunahme der intrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration nicht durch spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle ausgelöst wird sondern durch die Aktivierung von unselektiven TRP-Ionenkanäle (transient receptor potential channel, vergl. Kapitel 1.2.1 und 1.2.2).⁸⁰ Aufbauend auf diese Ergebnisse zeigten später Leuner et al. das Hyperforin konkret über eine selektive Bindung an den unselektiven TRP-Ionenkanal TRPC6 (transient receptor potential channel classical 6, vergl. Kapitel 1.2.2), dessen Aktivierung zu einem Ca^{2+} - und Na^+ -Influx in Neuronen führt, die intrazellulären Na^+ -Konzentration erhöht, wodurch letztlich der Rücktransport von Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt vermindert wird. Eine Aktivierung der homologen Ionenkanäle TRPC3 und TRPC7 durch Hyperforin konnte in verschiedenen Bioassays nicht bestätigt werden.^{81,82} Daran anschließende Untersuchungen verdichteten die Annahme, dass Hyperforin TRPC6-vermittelt über einen Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase neurotrophinähnliche Effekte in Neuronen stimuliert, die für die synaptische Plastizität von Relevanz sind und worum es sich selbst um eine wichtige neuronale Eigenschaft handelt, die bei der Depressionserkrankung beeinträchtigt vorliegt. An dieser Stelle sei auf Kapitel 1.2.2.3 verwiesen, das sich auf die antidepressiven Effekte von Hyperforin in Zusammenhang mit der Aktivierung des TRPC6-Kanals konzentriert.

1.1.5.1 Hyperforin-Derivate

Ungleich der antidepressiven Wirksamkeit von Hyperforin ist seine Wirksamkeit stark von seiner chemischen Stabilität abhängig. Der Kontakt mit Einflussfaktoren wie Luftsauerstoff, Licht, niedrigen pH-Werten (potentia Hydrogenii, dekadische Logarithmus der Konzentration von Hydronium-Ionen in wässriger Lösung) und Wasser lässt Hyperforin strukturell zu größtenteils inaktiven Metaboliten degradieren. In entsprechenden Untersuchungen stellte sich bei oxidativ modifizierten Hyperforin-Derivaten heraus, dass insbesondere das enolisierte β -dicarbonyl System in der Molekülstruktur, das als Tautomer vorliegt, vom oxidativen Umbauprozessen betroffen ist.⁸³ Aufgrund seiner Eigenschaft an den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) zu binden und die Transkription von Enzyme des Cytochrom-P450-Systems (meistens CYP3A4) sowie die Aktivierung des P-Glykoprotein (P-gp) Transporter zu induzieren, besitzt Hyperforin zusätzlich den klinisch relevanten Nachteil vermehrt unerwünschten Arzneimittelinteraktionen hervorzurufen.⁸⁴⁻⁸⁶ Die Suche nach chemisch stabilen Hyperforin-Derivaten mit pharmakologischer Wirksamkeit führte zur Synthese verschiedener Verbindungen wie Aristoforin, Tetrahydrohyperforin und 2,4-Diacylphloroglucinole (Hyp-Derivate). In bisherigen Studien wurde die Wirkung von Aristoforin hinsichtlich von Krebserkrankungen wie z.B. Lymphknotenkrebs untersucht, während die von Tetrahydrohyperforin ausgehenden Effekte hinsichtlich der Alzheimer-Erkrankung (AD) betrachtet wurden (vergl. Kapitel 1.2.2.4.1).^{87,88}

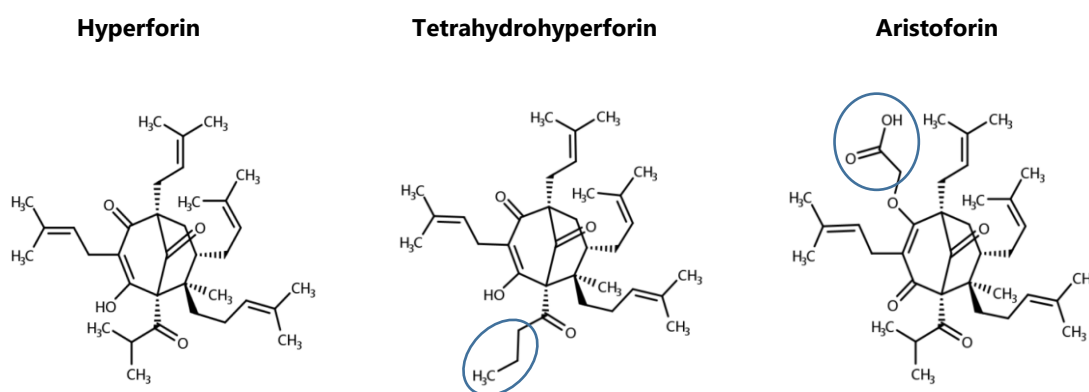


Abb. 6: Chemische Struktur von Hyperforin, Tetrahydrohyperforin und Aristoforin. Den gezeigten Verbindungen ist ein Phloroglucinol Grundgerüst gemein. Unterschiede zu Hyperforin sind in der Modifikation einzelner Acyl-Resten (blau eingekreist) vorzufinden.

Leuner et al. präsentierten im Jahr 2010, dass unter einer Auswahl verschiedener 2,4-Diacylphloroglucinol Derivate (Hyp-Derivate), die in ihrer Struktur das Hyperforin Pharmakophor Phloroglucinol und essentielle Strukturelemente des endogenen TRPC3/6/7 Aktivaors Diacylglycerol (DAG) vereinen, selektive und chemisch stabile TRPC6-Aktivatoren sind, die nicht mit dem PXR interagieren.^{82,89} Als potente Hyp-Derivate haben sich im Calcium-Imaging Experiment vorrangig Substanzen wie z.B. Hyp1 ($EC_{50} = 2,71 \mu\text{M}$), Hyp5 ($EC_{50} = 1,66 \mu\text{M}$) und Hyp9 ($EC_{50} = 1,26 \mu\text{M}$) in PC12-Zellen gezeigt, die zu Hyperforin ($EC_{50} = 1,51 \mu\text{M}$) vergleichbare EC_{50} -Werte erreichten. Es wird angenommen, dass für die Hyperforin-ähnlichen Effekte dieser synthetischen Analoga hauptsächlich ein enolisiertes β -dicarbonyl System verantwortlich ist. Strukturell unterscheiden sich die oben genannten Hyp-Derivate im Gegensatz zu weiteren im Ca^{2+} -Fluoreszenzassay getesteten und weniger effektiven Hyp-Derivaten durch Acylketten, die aus eins bis fünf Kohlenstoffatomen bestehen oder durch Acylketten, die aus eins bis zwei Kohlenstoffatomen mit einem Benzolring substituiert bestehen.

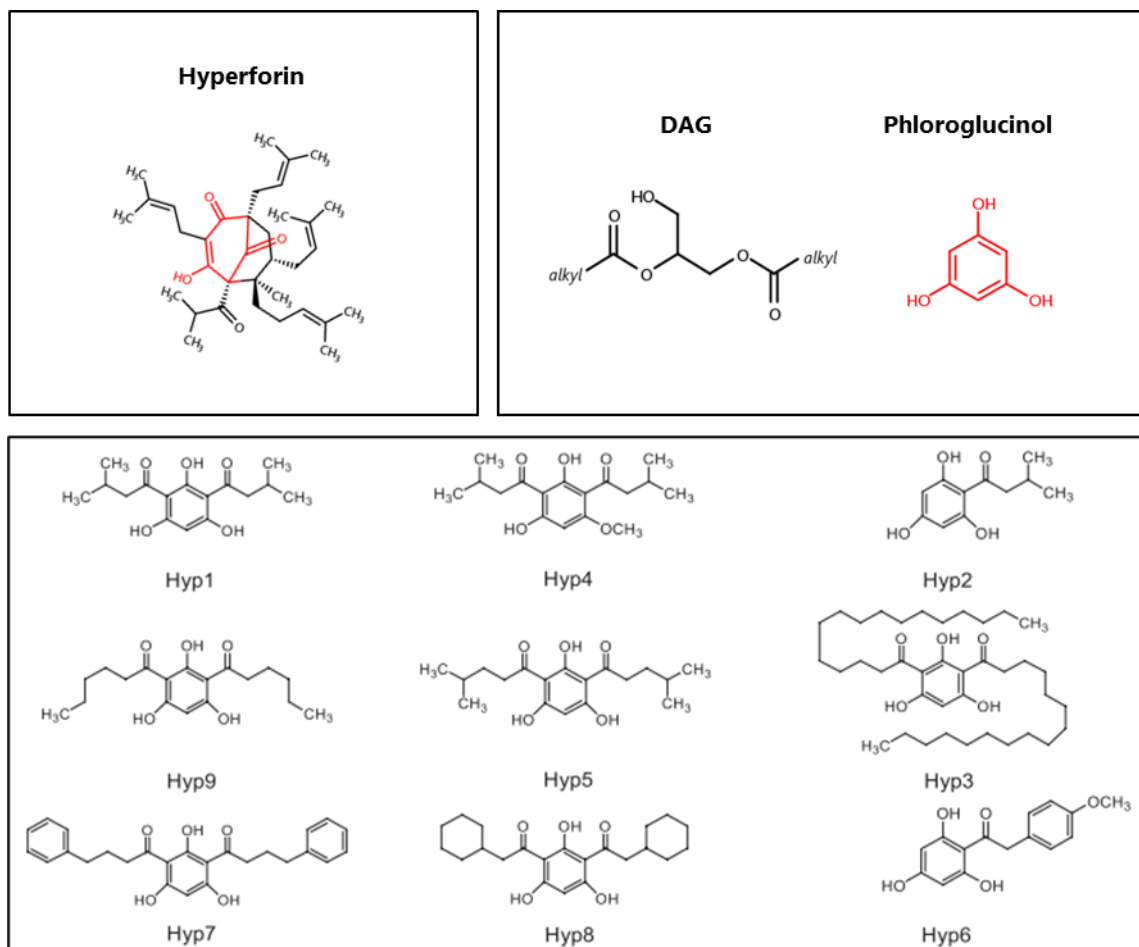


Abb. 7: Chemische Strukturen von Hyperforin, DAG, Phloroglucinol und Hyp-Derivaten. Phloroglucinol Pharmakophor in der Hyperforin-Struktur ist rot markiert. (Abb. modifiziert nach Leuner et al. 2010)⁸²

Über die selektive Aktivierung des TRPC6-Kanals hinaus konnte eine darauffolgende Untersuchung demonstrieren, dass Hyp-Derivate in einer zu Hyperforin vergleichbaren Weise antidepressiv auf neuronale Prozesse wirksam sind. Nach Anwendung von Hyp2 konnte festgestellt werden, dass dieses Hyp-Derivat analog zu BDNF in Pyramidenneuronen der CA1- und CA3-Region im Ratten-Hippokampus neurotrophe Effekte nachahmt. So führte die Applikation von Hyp2 in diesem Experiment dazu, dass verstärkt Neurotransmitter aus CA1 und CA3 Neuronen freigesetzt wurden, die die Frequenzen von Miniatur-Erregungspotentialen auslösten.⁹⁰

1.2 Nichtselektive Kationenkanäle

Zellen aller Lebewesen besitzen die Fähigkeit Ionen aus ihrer äußeren Umgebung aufzunehmen und in diese wieder abzugeben, um wichtige physiologische Prozesse aufrechtzuerhalten. Da die Plasmamembran aufgrund ihrer hydrophoben Lipid-Doppelschicht nur für bestimmte ungeladenen Moleküle wie O_2 , CO_2 , H_2O oder Harnstoff permeabel ist, erfolgt dieser stetige Ionenaustausch über spezielle Transportproteine und Ionenkanäle. Im Gegensatz zu der Rezeptor-vermittelten Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden zeichnen sich insbesondere Ionenkanäle durch die Herbeiführung rascher und kontrollierter ein- oder auswärts gerichteter Ionenströme aus. Initialisiert wird dieser Ionenstrom in den meisten Fällen durch die Bindung eines Liganden an den Ionenkanal (ligandengesteuerter Ionenkanal) oder durch die Änderung des Membranpotentials bzw. bei der Bildung eines Aktionspotentials (spannungsabhängiger Ionenkanal). Dabei durchläuft der Ionenkanal basierend auf eine Konformationsänderung seiner Proteinstruktur verschiedene Stadien vom geschlossenen in den geöffneten Zustand und wieder zurück zum inaktiven Anfangszustand. Die Triebkraft für den einwärtsgerichteten Ionenfluss entspringt aus dem elektrochemischen Gradienten, der sich aus dem Membranpotential und dem Konzentrationsgradienten des entsprechenden Ions zusammensetzt. Im aktiv geöffneten Zustand bildet der Ionenkanal eine enge, wassergefüllte und mit einem sog. Selektivitätsfilter ausgestattete Pore durch die eine spezifische Ionensorte wie z.B. Na^+ , Ca^{2+} oder Cl^- (selektiver Kationen- bzw. Anionenkanal) passiv entlang des elektrochemischen Gradienten die Membran durchqueren kann. Nichtselektive Kationenkanäle teilen die gemeinsame Eigenschaft nach einer Aktivierung ebenfalls mono- und divalente Kationen durch die Membran zu leiten und zeichnen sich anders als selektive Ionenkanälen durch eine partielle Selektivität für bestimmte Ionen aus, wobei die relative Permeabilität für einzelne Ionen je nach vorliegenden Ionenkanal-Subtyp und Aktivierungsmechanismus unterschiedlich ausfallen kann. Mitglieder der umfangreichen Superfamilie der TRP-Ionenkanäle (transient receptor potential channel) zählen zu den wichtigsten Vertretern der nichtselektiven Kationenkanäle und sind für monovalente und bivalente Ionen nichtselektiv und zeichnen sich von vereinzelt Ausnahmen ausgenommen durch eine vorwiegende Permeabilität für Ca^{2+} gegenüber Na^+ mit einem Selektivitätsverhältnis von $P_{Ca}/P_{Na} < 10$ aus. Um einen Einblick in ihre physiologische Rolle und Struktureigenschaften, insbesondere die des TRP-Kanal Mitglieds TRPC6 zu gewähren, wird in den folgenden Kapiteln umfassend darauf eingegangen.

1.2.1 Die TRP-Kanäle

1.2.1.1 Entdeckung

TRP-Kanäle wurden erstmalig 1969 von Cosens und Manning beschrieben, die die komplexen biochemischen Mechanismen hinter der Phototransduktion in der Fruchtfliege *Drosophila Melaogaster* näher untersuchten. Die Phototransduktion beschreibt einen sensorischen Vorgang, bei dem das durch Photorezeptoren in der Netzhaut aufgenommene Licht in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. In der Wildtyp-Fruchtfliege erfolgt die Phototransduktion durch eine PLC-vermittelte Aktivierung von Membrankanälen, die zu einer langanhaltenden Depolarisation des Photorezeptorpotentials bis zum Eintreten der Repolarisationsphase führt. Cosens und Manning konnten damals beobachten, dass bei einer mutierten Fruchtfliege die Licht-Stimulation zu einer transienten Zelldepolarisation, die von schnell aufeinanderfolgenden Repolarisationen begleitet wurde, zum Verlust des Sehvermögens führte.^{91,92} In Analogie zu dieser experimentellen Beobachtung wurde der neu entdeckte Ionenkanal „TRP“ genannt (transient receptor potential). 20 Jahre nach der Entdeckung des TRP-Ionenkanals wurde das dTRP-Gen erstmals von Montell und Rubin vollständig sequenziert.⁹³ Bei darauffolgenden DNA-Sequenzanalysen von Proteinen mit hoher DNA-Sequenz-Homologie zum TRP-Kanal rückten weitere TRP-Proteine in das Blickfeld der Forschung und die Bildung einer einheitlichen Nomenklatur wurde zunehmend angestrebt.⁹⁴⁻⁹⁶ TRP-Kanäle wurden nicht nur in der Retina der *Drosophila Melanogaster* entdeckt, sondern auch in Organen und Gewebe weiterer Spezies wie Hefen, Würmern und Säugetiere. 1995 wurde der erste Humane TRP-Kanal veröffentlicht.⁹⁷ Die Aufschlüsselung der Gensequenzen ermöglichte auch die Vergleichbarkeit mit weiteren Ionenkanalsequenzen. So wurden beispielsweise sequentielle Übereinstimmungen zwischen dem TRPL-Kanal („L“ = like), einem Homologen des TRP-Proteins und dem spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanal entdeckt.⁹⁸ Das TRP-Kanäle darüber hinaus über eine mögliche Ca²⁺-Leitfähigkeit verfügen wurde 1992 anhand von Strukturanalysen sowie elektrophysiologische Untersuchungen herausgefunden und ergaben Aufschluss darüber, dass TRP-Proteine membranintegrierte Kationenkanäle sind, die entsprechend ihrer Klassifizierung sich durch verschiedene Selektivitäten für Kationen unterschiedlicher Valenzen auszeichnen und multimodalen Aktivierungsmechanismen unterliegen.^{99,100}

1.2.1.2 Die Superfamilie der TRP-Kanäle

TRP-Kanäle werden in Plasma- und intrazellulären Membranen unterschiedlicher Zellen und Organismen exprimiert. Heute werden die kanalbildenden TRP-Proteine, die im Menschen von 28 Genen kodiert werden, primär basierend auf DNA-Sequenz-Homologien in sechs Familien eingeteilt:

- TRPC (klassische oder kanonische Familie)
- TRPV (Vanilloid Familie)
- TRPM (Melastatin Familie)
- TRPML (Mucolipin Familie)
- TRPP (Polycystin Familie)
- TRPA (Ankyrin Familie)

Die TRPN (no mechanoreceptor potential C) Familie wird nicht in Säugetieren, sondern beispielsweise im Zebrafischen oder Nematoden exprimiert. Vor einigen Jahren wurde im Hefepilz zusätzlich eine weitere TRP-Kanal Familie entdeckt und TRPY bezeichnet.¹⁰¹

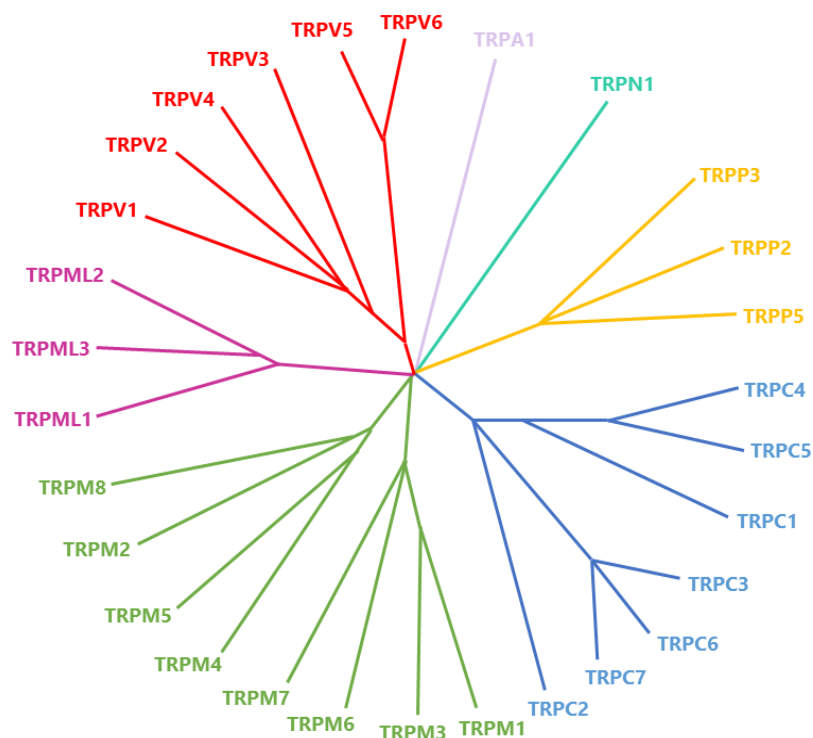


Abb. 8: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Superfamilie. Die Einteilung der TRP-Kanäle in den hier sieben farblich gekennzeichneten Familien erfolgte anhand von Sequenzhomologien. Bis auf TRPC2, das im Menschen als Pseudogen existiert und in der Maus exprimiert wird sowie TRPN, das im Zebrafisch und Nematoden exprimiert wird, werden alle weiteren 27 dargestellten TRPs im Menschen exprimiert. (Abb. modifiziert nach Nilius et al., 2012)¹⁰²

Die TRP-Kanal Familien können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Dabei zählen zur Gruppe 1 fünf TRPs (TRPC, TRPV, TRPM, TRPN und TRPA) und zur Gruppe 2 noch zwei weitere TRPs (TRPP und TRPML). Diese Separation basiert auf sequenzielle und topologische Differenzen. So weist im Vergleich zur zweiten Gruppe die erste Gruppe am stärksten Ähnlichkeiten zum TRP-Kanal der *Drosophila* Fruchtfliege auf. Der TRP-Kanal verfügt über einen intrazellulär gelegenen N- und C-Terminus und sechs helikal geformte und konservierte membranumspannende Segmente (S1 - S6) innerhalb der transmembranären Domäne (TMD). Zwischen Segment 5 und 6 befindet sich eine Porenschleife entlang dieser die Passage ausgewählter Ionen in das Zellinnere erfolgt. Ein funktionsfähiger TRP-Kanal liegt allerdings erst dann vor, wenn vier homomere oder heteromere TRP-Einheiten, die primär aus der eigenen TRP-Familie stammen, zu einem Proteinkomplex sich vereinen und durch das Übereinanderlagern der Porenschleifen eine vollständige Pore bilden. Diese strukturelle Besonderheit teilen sich TRP-Kanäle mit den ihnen strukturell verwandten spannungsabhängigen Kaliumkanälen.¹⁰³ Trotz dieser Gemeinsamkeit unterscheiden sich die TRP-Kanäle strukturell und funktionell hinsichtlich ihre extra- und intrazytosolischen Strukturelemente entscheidend voneinander, was Auswirkungen auf die Permeabilität für bestimmte Ionen hinsichtlich Selektivität und Leitfähigkeit, die Lokalisation und Form der Ligandenbindestellen und die ionenabhängige Regulation hat.¹⁰⁴

Angehörige der TRPC-, TRPA- und TRPV- Familie besitzen N-Terminus eine lange Kette sich mehrfach wiederholender Strukturmotiven den Ankyrin-repeats (ARs), die für Protein-Protein-Interaktionen, Signaling, Transkription und zelluläre Lokalisation bedeutend sind.¹⁰⁵ Beispielsweise bindet MxA, ein Mitglied der Dynamine (GTPasen) Superfamilie spezifisch an die zweite AR Einheit, wodurch die Aktivität des TRPC6-Kanals bei einem Aktivator-induzierten Ca^{2+} -Influx verstärkt wird.¹⁰⁶ Die Linker Region verbindet die ARs mit der Pre-S1 Helix. In TRPM- und TRPC-Kanälen ist die Pre-S1 Helix zusätzlich noch mit einem in der Membran eingebetteten Strukturelement dem Pre-S1 elbow verknüpft, der im direkten Kontakt zum ersten transmembranären Segment (S1) steht.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ TRPM-Kanäle zählen zu den einzigen Mitgliedern der Gruppe 1, die N-Terminus mit der sogenannten melastatin homology region (MHR) anstelle mit ARs und der Linker Domäne ausgestattet sind.¹¹⁰ Für TRPP wurde bisher kein Strukturelement im N-Terminus vorgestellt. Zu Beginn des C-Terminus taucht die konservierte TRP-Helix (EWKFAR) auch TRP-Box genannt auf, die mit dem Verbindungselement zwischen S4 und S5 und der Linkerregion bzw. der MHR im N-Terminus des TRPM-Kanals interagiert.^{111,112} Für TRPM- und TRPC-Kanäle wurde eine in der Membran liegende TRP-reentrant Helix, die auf die TRP-Box folgt, beschrieben.¹¹³ Aus der TMD heraus ragen in das Cytoplasma zwei Helices hinein (CH1 und CH2), die mit weiteren Strukturelementen versehen sind. Hierzu zählt die

Coiled-coil Domäne in TRPC, TRPM und TRPA, TRPP.¹¹⁴ Ihre Funktion ist im Rahmen der Tetramerisierung, in der es zu wichtigen Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen einzelnen TRP-Einheiten kommt, von Wichtigkeit.¹¹⁵ Während in TRPP-Kanälen durch das EF-Hand-Motiv ein Ca²⁺ abhängiges Bindungselement vorliegt, wird die Aktivität von TRPC, TRPM und TRPV-Kanälen durch eine Andockstelle für das Ca²⁺-bindende Protein Calmodulin (CaM) und IP₃ reguliert.^{116,117}

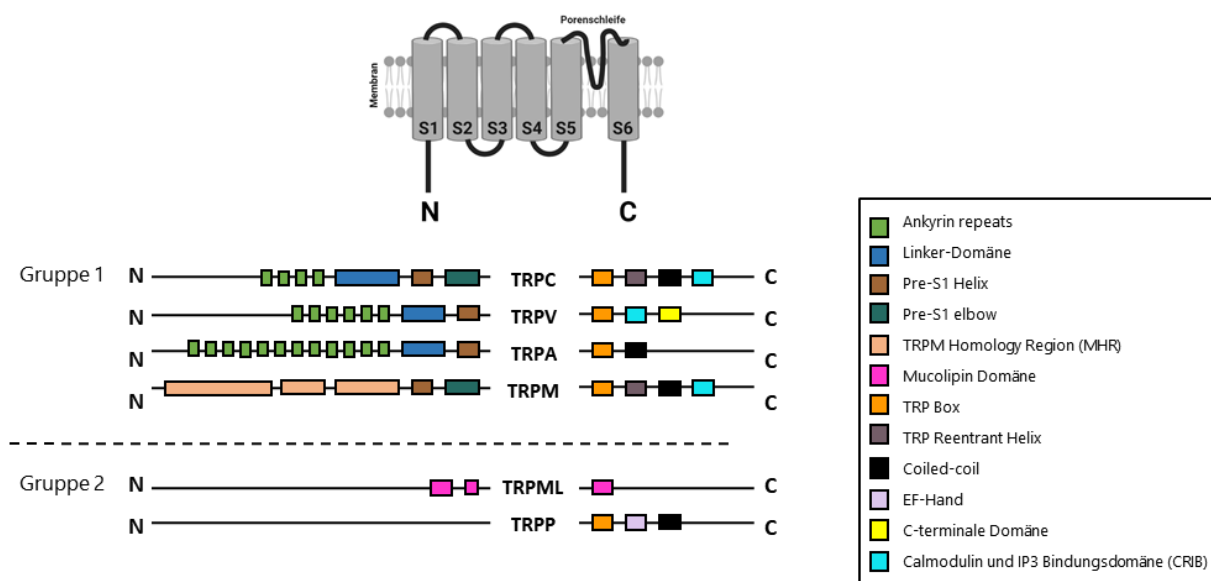


Abb. 9: Strukturtopologie der TRP-Kanal-Superfamilie. Darstellung der transmembranären Domäne eingeteilt in sechs Segmenten und intrazelluläre Strukturelemente im N- und C-Terminus. Zu der Gruppe 1 der TRP-Kanäle werden TRPC, TRPV, TRPA und TRPM gezählt und zur Gruppe 2 die beiden TRP-Familien TRPML und TRPP, die sich topologisch und sequentiell von den Mitgliedern der ersten Gruppe unterscheiden. (Abb. modifiziert nach Huffer KE et al., 2020)¹⁰⁴

Die Regulation der TRP-Kanäle erfolgt in einer sehr differenzierten Weise. Dabei spielen bei der Aktivität zahlreiche Stimulatoren in Form von Rezeptoren, endogenen oder exogenen Liganden eine wichtige Rolle. Des Weiteren tragen Stimulatoren wie der pH-Wert, Temperatur, osmotischer Druck, Membranspannung und mechanische Reize bei manchen TRP-Kanälen zur Modulation der Kanalöffnung bei.¹¹⁸ Unter den Angehörigen der TRPV-Familie ist TRPV1 das bekannteste Mitglied, dass durch seine Sensitivität gegenüber dem Naturstoff Capsaicin, einem Vanilloid-Alkaloid aus verschiedenen Paprikaarten, Berühmtheit erlangte. Dass Capsaicin sowie auch Temperaturen oberhalb von 42 °C die Nozizeption beeinflussen, war bereits vor der Entdeckung des TRPV1-Kanals bekannt. Der amerikanische Wissenschaftler David Julius lieferte erstmalig 1997 durch seine Forschungsarbeiten den Beleg, dass die sogenannten Schmerz-Stimulatoren ihre Wirkung über den

TRPV1-Kanal entfalten.¹¹⁹ Für diese herausragende Entdeckung, die heute außerdem für die nicht-Opioid basierte Schmerztherapie eine enorme Relevanz erreicht hat, wurde ihm gemeinsam mit dem Entdecker der mechanosensitiven Piezo1/2 Ionenkanäle Ardem Patapoutian 2021 der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen. Die meisten TRPV-Kanäle sind vordergründig für Ca^{2+} permeabel. Die TRPVs 5 und 6 zeichnen sich im Vergleich zu TRPV1-4 zusätzlich durch ihre höhere Leitfähigkeit gegenüber Ca^{2+} -Ionen aus und werden direkt von CaM moduliert.^{120,121} Zu der Gruppe der TRPM-Kanäle zählen acht Mitglieder, die sich untereinander durch ihre verschiedenartige Funktionalität hervorheben. Ein vielfach studierter TRPM-Kanal ist TRPM8. Er ist an der Thermoregulation beteiligt und wird durch Kälte und Stoffen wie Menthol und Eukalyptus aktiviert.¹²² Vor wenigen Jahren wurde ebenso zum ersten Mal vorgestellt, dass TRPM8 ein möglicher Rezeptor für das Steroidhormon Testosteron ist.¹²³ Eine Besonderheit unter den TRPM-Kanälen stellen TRPM6 und 7 dar, die im Gegensatz zu den weiteren Familienmitgliedern porenbildende Strukturen mit enzymatischen Domänen kombinieren.¹²⁴ Bezüglich der Ionenselektivität bilden die beiden Kanäle TRPM4 und TRPM5 unter den TRPs eine Ausnahme indem sie hauptsächlich für monovalente Kationen permeabel sind mit $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$. Der TRPA1-Kanal ist der einzige Vertreter der TRPA-Familie in Säugetieren. Stimuliert wird er durch kalte und heiße Temperaturen (unter 17 °C und über 45 °C) als auch durch exogene Substanzen, wie sie in Senf und Wasabi (Isothiocyanate), Zimtöl (Cinnamaldehyde) oder Marijuana (Tetrahydrocannabinol) vorkommen.^{125,126} Die in der TRP-Kanal Klassifikation zu der zweiten Gruppe zählenden Kanäle TRPP und TRPML stehen in Zusammenhang mit schwerwiegenden Erberkrankungen, die auf Mutationen im Gen dieser Ionenkanäle zurückzuführenden sind, sogenannte Kanalopathien. Physiologisch wird der TRPP-Kanal durch mechanische Reize oder über Wachstumsfaktoren initiierte Signaltransduktion aktiviert.¹¹¹ Bestimmte Mutationen im TRPP2-Gen hingegen tragen zur Bildung einer polyzystischen Nieren bei.¹²⁷ Obwohl die Regulation des TRPML-Kanals nicht hinreichend geklärt ist, wird angenommen, dass wie bei nahezu allen TRP-Kanälen Phosphatidylinositole ihren Anteil daran haben.¹²⁸ Für die Erbkrankheit Mucopolysaccharidose IV, eine neurodegenerative lysosomale Speicherkrankheit, werden Mutationen im TRPML1-Gen verantwortlich gemacht.¹²⁹ Zusammenfassend spielen TRP-Kanäle für eine Vielzahl verschiedener physiologischer Funktionen eine herausragende Rolle, indem sie die intrazelluläre Ionenkonzentration insbesondere die Ca^{2+} -Konzentration kontrolliert verändern. Ihre Aktivierung trägt somit zu essenziellen physiologischen Funktionen bei, zu denen die Thermo- und Mechanosensation, die Ionenhomöostase durch Calcium-, Magnesiumresorption und Osmoregulation sowie die Motilität durch Muskelkontraktion und vasomotorische Kontrolle zählen.¹⁰² Mit Fokus auf den für diese Arbeit bedeutenden Kanal TRPC6 werden in den folgenden

Kapiteln zunächst die TRPC-Familie und im Anschluss darauf aufbauend der TRPC6-Kanal näher beleuchtet.

1.2.1.3 Die TRPC-Familie

Die Mitglieder der TRPC-Familie besitzen unter allen TRP-Kanälen den höchsten Verwandtschaftsgrad mit den in der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* entdeckten TRP-Protein, woher sich schließlich der Name „classical“ oder „canonical“ herleitet. Während in anderen Spezies wie z.B. der Maus und der Ratte alle sieben bekannten TRPCs exprimiert werden, konnte im Menschen lediglich das Gen für TRPC2 ausfindig gemacht werden und nicht sein Proteinprodukt. Es existiert daher nur als Pseudogen.¹³⁰ Auf der Grundlage von Sequenzalignments und Funktionen werden die TRPC-Kanäle verschiedenen Gruppen zugeordnet: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5. Zwischen den Mitgliedern aus der TRPC3/6/7 Gruppe liegt mit 75 % die stärkste sequenzbasierte Ähnlichkeit vor.¹³¹

TRPC-Kanäle werden im Organismus ubiquitär exprimiert doch im Hinblick auf Spezies, Gewebespezifität und Entwicklungsstadium des Gewebes können sie sich voneinander unterscheiden. Bedingt durch die limitierte Qualität der auf dem Markt verfügbaren TRPC-Antikörper stützen sich die Ergebnisse vorwiegend auf die Bestimmung der genauer zu quantifizierbaren relativen mRNA-Level in den jeweiligen Geweben. Zusammenfassend werden im Nagetier und Menschen die TRPCs hauptsächlich im Gehirn exprimiert und deshalb im Folgenden auf die Verteilung der TRPCs in diesem Organ genauer eingegangen. Im Gehirn wird der TRPC1-Kanal in allen Hirnregionen produziert. Es wird angenommen, dass der TRPC1-Kanal selbst nicht in der homomeren Struktur vorliegt, sondern vielmehr mit TRPC4 und 5 heteromere Ionenkanäle bildet und dazu befähigt ist mit TRPP und TRPV-Kanälen zu fusionieren.^{132,133} TRPC1-Kanäle konnten vor allem im Hippokampus, Amygdala, Cerebellum und Kortex nachgewiesen werden.^{132,134} Die höchste Expression der TRPC4- und 5-Kanäle konnte im Hippokampus, Cerebellum, Kortex und Hypothalamus des Nagers festgestellt werden, wobei TRPC4 im Vergleich zu TRPC5 stärker in der Amygdala und TRPC5 häufiger im Hypothalamus exprimiert wird.¹³⁵ Im humanen zerebralen Gewebe hingegen scheint der Anteil der TRPC4-mRNA relativ gleich verteilt zu sein.¹³⁶ Der TRPC6-Kanal wird im murinen ZNS bevorzugt in den Hirnarealen Hippokampus, Kortex, Substantia nigra und Cerebellum gebildet.^{137,138} Das stärkste mRNA-Level von TRPC3 liegt vorwiegend im Cerebellum sowie Nucleus caudatus und das des TRPC7-Kanals überwiegend in der Hypophyse vor.¹³⁶ Die überwiegende Expression im Gehirn und Lokalisation der TRPC-Kanäle in bestimmten Hirnarealen

zeigt ihre Bedeutung für wesentliche Gehirnfunktionen, die nicht zuletzt in neurologischen Erkrankungen beeinträchtigt vorliegen können.

Die endogene Aktivierung der TRPC-Kanäle wird auf verschiedenen Wegen erreicht. So kann die Öffnung des Ionenkanals über intrazelluläre Mechanismen prinzipiell sowohl rezeptorvermittelt (receptor operated calcium entry, ROCE) als auch speicherreguliert (store operated calcium entry, SOCE) ablaufen. Bei der rezeptorvermittelten Aktivierung wird über die Stimulation von GPCRs wie z.B. vom Gq/11-Typ, dessen Stimulation zur Öffnung von TRPC1/4/5 Heteromeren beiträgt, oder auch durch die Stimulation von RTK-Rezeptoren (Rezeptor Tyrosine Kinase) wie z.B. der BDNF-Rezeptor TrkB, der den TRPC3-Kanal stimuliert, prinzipiell die Phospholipase C (PLC) aktiviert werden.^{134,139} Dieses Enzym katalysiert im weiteren Verlauf des Signalweges die Spaltung des membranständigen Moleküls Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die beiden Produkte Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) per Hydrolyse. Bei der Aktivierung der Mitglieder der TRPC3/6/7-Gruppe steht insbesondere der second messenger DAG durch seine direkte Bindung an den entsprechenden Ionenkanälen im Vordergrund. Zahlreiche Studien belegen, dass ebenfalls bei externer Zugabe von DAG-Analoga mit verbesserter Membranpermeabilität und Löslichkeit die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in TRPC3/6/7 exprimierenden Zellen und Geweben steigt. Interessanterweise aktiviert DAG die Kanäle TRPC1/4/5 nicht im vergleichbaren Maße. Eine Studie legt hingegen nahe, dass diese TRPC-Mitglieder unter bestimmten Voraussetzungen DAG-regulierbar sind. Die mangelnde Lipidsensitivität wird konkret damit begründet, dass das in den TRPC4/5-Kanälen C-terminal lokalisierte VTTRL-Motiv, durch seine Interaktion mit der in den Antipportern NHERF 1 und 2 (Na⁺/H⁺ exchange regulation factor) enthaltenen PDZ-Domäne die Interaktion mit DAG erschwert. Erst die PKC-Hemmung und damit einhergehende fehlende Phosphorylierung von T972 im VTTRL-Motiv oder der Austausch von Threonin gegen Alanin würden den Kanal für DAG sensibilisieren.¹⁴⁰ Neben DAG besitzt der Second Messenger IP₃ gleichwohl das Potential TRPC-Kanäle zu aktivieren und zusätzlich den SOCE-Signalweg einzuleiten. IP₃ bindet nach seiner Entstehung aus der hydrolytischen Spaltung von PIP₂ an den IP₃-Rezeptor im ER, dessen N-terminaler Abschnitt dann in der Lage ist mit der CIRB-Region der TRPCs zu interagieren. Für TRPC1, TRPC3 und TRPC4 konnte gezeigt werden, dass ihre Öffnungswahrscheinlichkeit durch den Konkurrenten um das CIRB-Motiv Calmodulin (CaM) minimiert wurde.¹⁴¹ Die Bindung von IP₃ an seinen Rezeptor im ER evoziert ebenfalls die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER in das Zytoplasma. Nach dem von Putney entwickelten Konzept des SOCE werden anschließend speicherregulierte Ca²⁺-Kanäle in der Plasmamembran getriggert, die nach ihrer Öffnung eine Ca²⁺-Influx herbeiführen. Ein vielfach auf biophysikalische Eigenschaften hin untersuchter speichervermittelte Ca²⁺-Einstrom ist der sog. I_{CRAC} (Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels current), der durch den CRAC-Kanal (Ca²⁺ release-

activated Ca^{2+} channels) vermittelt wird. Dieser nun über indirekten Wege erzeugte Ca^{2+} -Ioneneinstrom bezweckt, das entleerte Ca^{2+} -Reservoir im ER wieder aufzufüllen und damit die Ca^{2+} -Homöostase in der Zelle aufrechtzuerhalten.^{142,143} Zu den Schlüsselkomponenten des hoch Ca^{2+} -sensitiven CRAC-Kanals gehören das auf der ER-Membran sitzende stromale Interaktionsmolekül 1 (STIM1), das die Aufgabe des Ca^{2+} -Sensors erfüllt und der in der Plasmamembran lokalisierte Orai-Kanal.¹⁴⁴ Der erste TRPC-Kanal, dessen Aktivierungsmechanismus über den SOCE-Weg in Zusammenhang gebracht wurde, war der des TRPC1-Kanals.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Begründet wurde diese Annahme mit der Beobachtung, dass beispielsweise eine Überexpression von TRPC1 der SOCE-basierte Mechanismus in Gang gesetzt wird, sein Knock-down (KD) im Tiermodell diesen Mechanismus einschränkt und das Thapsigargin, ein Inhibitor der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die TRPC1 Funktion aktiviert.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Im Laufe der Zeit wurde auch bei weiteren TRPC-Kanälen wie TRPC4 und TRPC5 eine Beteiligung am I_{CRAC} festgestellt.¹⁵¹ In der Forschung wird die Regulation der genannten TRPCs über den SOCE-basierten Mechanismus anerkannt. Dennoch wird dieser komplex ablaufende Aktivierungsmechanismus aufgrund widersprüchlicher und teils nicht reproduzierbarer Ergebnisse kontrovers diskutiert und erfordert zunehmend die Klärung von Fragestellungen beispielsweise hinsichtlich der Wechselwirkungen einzelnen Akteure zueinander und die Funktion dieser Akteure unter bestimmten zellulären Bedingungen.

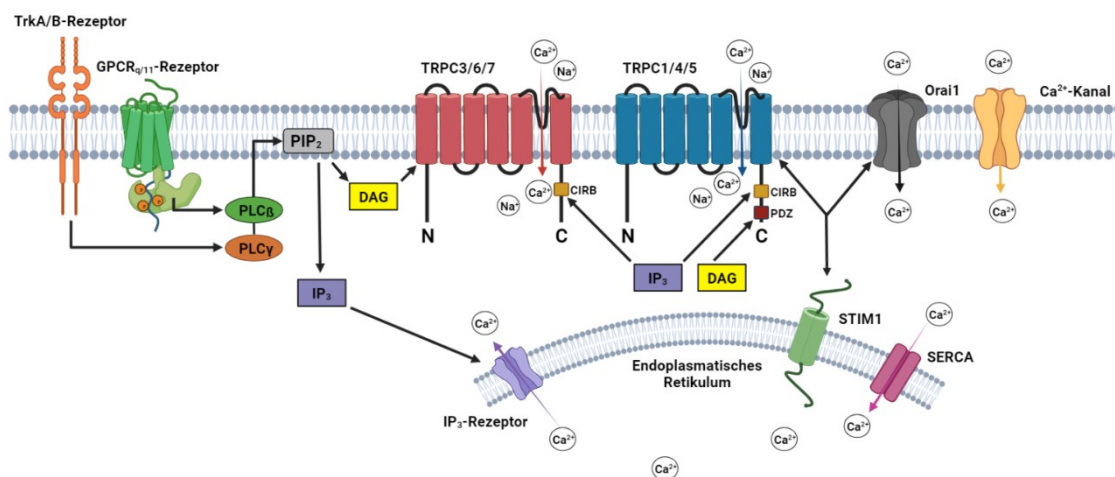


Abb. 10: Aktivierungsmechanismen der TRPC-Kanäle. Die Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) führt über die Aktivierung der Phospholipasen PLC β und PLC γ zur hydrolytischen Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) und 1,2-sn-Diacylglycerol (DAG). IP $_3$ bindet an den Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor (IP $_3$ -R) im Endoplasmatischen Retikulum (ER), woraufhin Ca $^{2+}$ aus dem Speicher entleert und in das Zytosol abgegeben wird. Das stromale Interaktionsmolekül 1 (STIM1) und der Ca $^{2+}$ -Kanal Orai1 bilden gemeinsam mit TRPC1/4/5 einen Komplex der als sog. I $_{CRAC}$ -Kanal fungiert. IP $_3$ wirkt auch durch eine direkte Wechselwirkung mit der CIRB-Domäne stimulierend auf die TRPC-Kanäle. DAG aktiviert prinzipiell die Ionenkanäle TRPC3/6/7. TRPC4/5 können unter bestimmten Bedingungen durch die Interaktion von DAG mit dem VTTRL-Motiv angeregt werden so bald die Antiporter NHERF1/2 mit ihrer PDZ-Domäne vom VTTRL-Motiv abdissoziieren. Sarkoplasmatisches/endoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase (SERCA).

Mit seinen strukturellen, funktionellen und pharmakologischen Besonderheiten kommt dem TRPC6-Kanal in dieser Arbeit eine zentrale Bedeutung zuteil, weshalb er im folgenden Unterkapitel nun im Detail vorgestellt wird.

1.2.2 TRPC6

1.2.2.1 Struktur

Der TRPC6-Kanal ist in der Plasmamembran lokalisiert. Der Weg von der Synthese bis zu einem funktionsfähigen Ionenkanal in der Plasmamembran setzt zu Beginn die Ablesung des entsprechenden TRPC6-Gens im Genom voraus. Das Humane TRPC6-Gen sitzt auf dem Chromosom 11q21-q22, beinhaltet 13 Exons und codiert für ein TRPC6 Protein, das aus 931 Aminosäuren besteht. Insgesamt konnten im Menschen innerhalb der TRPC-Familie mindestens 12 verschiedenartige und vollständige Varianten als Folge von alternativen Splicing Prozessen entdeckt werden.^{152,153} In den vergangenen Jahren wurden in der Strukturaufklärung verschiedener TRP-Kanäle und so auch einiger aus der TRPC-Familie beachtliche Fortschritte gemacht. Allen voran konnten Mithilfe des Kryo-EM-Verfahrens erstmals von Tang et al. unter Verwendung des Antagonisten BTDM und später von Bai et al. mit dem Agonisten AM-0883 eine hochaufgelöste Abbildung des humanen TRPC3- und TRPC6-Kanals mit einem niedrigen Signal-Rausch-Verhältnis im geschlossenen bzw. geöffneten Zustand produziert werden, das einen genaueren Einblick in den Aufbau und in Struktur-Wirkungsbeziehung erlaubt.¹¹³ Azumaya et al. gelang es die zytoplasmatische Domäne des murinen TRPC6-Kanals zu rekonstruieren.¹⁵⁴

Wie im Kapitel 1.2.1.2 beschrieben und in Abb. 11 dargestellt beinhaltet der TRPC6-Kanal eine transmembranäre Domäne (TMD) beginnend mit dem Pre-S1 elbow und daran angeschlossen sechs transmembranäre helikale Segmente mit einer porenbildenden „Loop“-Region zwischen den Segmenten 5 und 6 sowie eine kompakte intrazelluläre zytoplasmatischen Domäne (ICD) mit einem

Teil des N- und C-Terminus. Der N-Terminus beginnt mit vier ARs Einheiten (eine Einheit besteht aus zwei Helices) auf denen eine Linker-Domäne mit 9 Linker-Helices (LHs) und die Pre-S1 Helix folgt. Carboxyterminal folgt auf die im Zytoplasma liegende TRP-Box eine in der TMD liegende TRP-reentrant Helix, an der sich die beiden Helices CH1 und CH2 anschließen. Für die Funktionalität des Ionenkanals ist die Multimerisierung von vier Untereinheiten entscheidend. Dabei bildet der TRPC6-Kanal ausschließlich mit seines gleichen (Homotetramere) oder den phylogenetisch eng verwandten Kanälen TRPC3 und TRPC7 funktionsfähige Kanäle (Heterotetramere).¹⁵⁵ Erst in dieser Konstellation bilden vier übereinanderliegende Porenschleifen eine Pore die als Selektivitätsfilter fungiert und den Eintritt von überwiegend Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen (Selektivitätsverhältnis 5:1) in die Zelle kontrolliert. Die Tetramerisierung der einzelnen TRPC6-Untereinheiten erfordert sowohl die Beteiligung der TMD als auch der ICD, wodurch zwischen den benachbarten Untereinheiten Wechselwirkungen entstehen. Aminosäurenreste des N-terminus interagieren mit LH-Einheiten des benachbarten N-Terminus. Die CH1, die im Vergleich zur CH2 horizontal positioniert ist, verbindet zwei benachbarte Kanaluntereinheiten, während die vertikal stehenden CH2 Helices aller vier Untereinheiten ein tunnelförmiges Bündel für den Ionenfluss in die Zelle formen. Interessanterweise zeigten Tang et al. anhand elektrophysiologischer Funktionsanalysen, dass die ersten 71 Aminosäuren des N-Terminus sowie die letzten 53 Aminosäuren des C-Terminus keinen entscheidenden Einfluss auf die Assemblierung des TRPC6-Kanals haben und die durch OAG hervorgerufene Steigerung des Membranpotentials nicht beeinträchtigt wird. Eine weitere neue Erkenntnis, die die Kryo-EM-basierte Strukturaufklärung hervorbrachte, war die Lokalisierung scheinbar flexibler Strukturelemente, die in Kontrast zu den rigiden Strukturelemente methodisch bedingt keine Auflösung erfahren konnten.

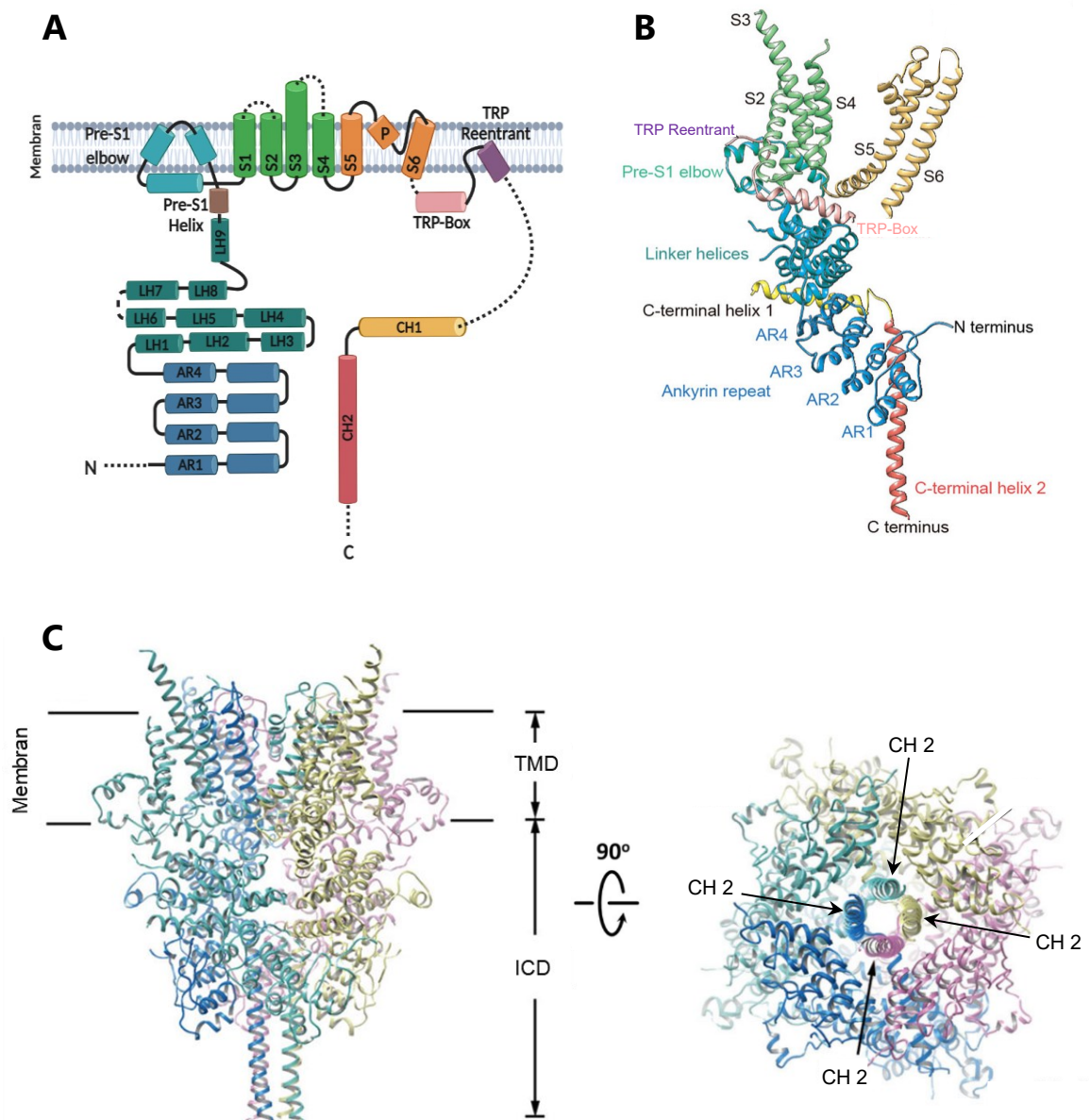


Abb. 11: Kryo-EM-Modell des menschlichen TRPC6-Kanals. (A) Topology und Anordnung der Domänen einer Untereinheit des TRPC6-Kanals. Helices sind als Zylinder dargestellt. Gestrichelten Linien deuten auf flexible und in den Kryo-EM-Studien nicht auflösbare Proteinregionen hin. (B) Ribbon Diagramm eines TRPC6-Monomeren farblich abgestimmt mit dem Topology Model in (A). (C) TRPC6-Kanal nach der Tetramerisierung in seiner funktionsfähigen Form. Eine Wende der Ribbon Struktur um 90° zeigt die Unteransicht des Ionenkanals mit den vier C-terminalen Helices CH2, die gemeinsam einen Tunnel für den Ionenfluss in den Intrazellularraum bilden.

1.2.2.2 Physiologische und pathophysiologische Relevanz

Der TRPC6-Kanal wird in menschlichen Organen und Geweben peripher hauptsächlich in der Niere, Herz, Lunge, Plazenta, vaskuläre Endothelzellen, glatten Muskulatur und zentral in Gehirn, allen voran im Hippokampus und Kortex exprimiert. Dort ist er an verschiedenen physiologischen Prozessen, die die Ca^{2+} -Homöostase und das Ca^{2+} -Signaling unterstützen, beteiligt. Obgleich seine Bedeutung im Detail nicht vollständig aufgeklärt ist, nahm im Rahmen der Erforschung von physischen als gleich psychiatrischen Erkrankungen, seine Bedeutung in den vergangenen Jahrzehnten zunehmend zu.

Ein prominentes pathologisches Beispiel, welches mit Mutationen im TRPC6-Gen in Verbindung gebracht wird, ist die aggressive autosomal-dominante Form der fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS). Dabei handelt es sich um eine schwerwiegende Nierenerkrankung die bereits im Kindesalter auftreten kann und zu starken renalen Eiweißverlust, Bluthochdruck, Niereninsuffizienz bis hin zu Nierenversagen führt.^{159–161} Intensive Forschungsarbeiten zu diesem nephrotischen Syndrom identifizierten eine Reihe von gain-of-function (GOF) und loss-of-function (LOF) Mutanten, deren Mutationen besonders häufig in den AR-Domänen (z.B. P112Q, M132T) oder in der Nähe des C-terminus (z.B. R895C, E897K) lokalisiert sind.^{162,163} Das sowohl GOF als auch LOF Mutationen im Krankheitsgeschehen der FSGS involviert sein können, zeigt, dass parallel zu einem durch GOF Mutanten vermittelten pathologisch erhöhten Ca^{2+} -Influx in den Podozyten eine basale TRPC6 Aktivität für die Funktionalität des glomerulären Filtersystems erforderlich bleibt.¹⁶⁴ Darin begründet, dass nicht alle zugrundeliegenden Pathomechanismen restlos aufgeklärt sind, stellt die Behandlung der FSGS weiterhin eine klinische Herausforderung dar.^{165,166} Zu berücksichtigen bleibt auch, dass eine Behandlung mit selektiven TRPC6-Inhibitoren, nicht in jedem Falle glomeruläre Schädigungen verhindern oder diese sogar verschlechtern können, wie die Deletion von TRPC6 in Akita-Mäusen in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt hat.¹⁶⁷ Im Herz-Kreislauf-System und Gefäßsystem reguliert Ca^{2+} zahlreiche physiologische lebenswichtige Funktion. In einigen Herz-, Lungen- und Gefäßerkrankungen konnten daher mitunter Verbindungen zum TRPC6-Kanal hergestellt werden. Anhaltend erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen, wie sie durch eine Hyperreagibilität der TRPC6-Kanäle induziert werden, führen zur Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin, die in der Entstehung von Herzhypertrophie sowie fortschreitende Herzinsuffizienz involviert ist. Calcineurin dephosphoryliert Transkriptionsfaktoren des nuklearen Faktors aktivierter T-Zellen (NFAT) und ermöglicht so die Translokation in den Zellkern und die daraus resultierende Transkription hypertroph agierender Gene.¹⁶⁸ Im Jahr 2019 publizierten Lin et al., dass die orale Applikation des selektiven TRPC6-Inhibitors BI 749327 eine mögliche therapeutische Intervention dagegen darstellt. BI 749327 zeigte in ihrer Studie, dass es die NFAT-

Aktivierung im Zellsystem mit TRPC6-GOF-Mutanten unterdrückt und eine Progredienz einer kardialen und renalen Fibrose im Tiermodell dosisabhängig unterdrückte.¹⁶⁹ Eine weitere wichtige Rolle scheint der TRPC6-Kanal bei der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion, einen homöostatischer Mechanismus im pulmonalen Gefäßsystem, der als Reaktion auf eine alveoläre Hypoxie auftritt, zu haben.¹⁷⁰ Durchaus konnte in Patienten, die unter einer idiopathischen pulmonalen arteriellen Hypertension litten eine signifikant erhöhte TRPC6-Expression ermittelt werden.¹⁷¹ Die erhöhte Expression von TRPC6 in der Plazenta ist ein starker Hinweis auf seine wichtige Rolle in der Entwicklung der Plazenta und den Verlauf der Schwangerschaft. So erbrachten Untersuchungen im Tiermodell, dass der Verlust von TRPC6 mit histologischen Modifikationen und reduzierter Wurfgröße assoziiert war.¹⁷² Auch in Prozessen innerhalb des neuronalen Gefüges, die insbesondere die neuronale Plastizität betreffen, nimmt der TRPC6-Kanal eine wichtige Funktion ein. In einer Vielzahl von Studien konnte seine modulierende Wirkung auf die Entwicklung, das Wachstum und die Differenzierung von Neuronen festgestellt werden, was im folgenden Kapitel insbesondere im Hinblick auf seine Bedeutung für die Depressionserkrankung eingehender betrachtet wird.

1.2.2.3 Die Rolle von TRPC6 in der Depressionserkrankung

In den letzten Jahren wurden in der Depressionsforschung intensive Untersuchungen in bestimmten Hirnarealen durchgeführt, von denen angenommen wird, dass sie bei einer Depression dysfunktional arbeiten. Dabei handelt es sich konkret um den Hippokampus und den präfrontalen Kortex. Der Hippokampus ist Teil des limbischen Systems und unterhält Verbindungen zum präfrontalen Kortex, dem Nucleus accumbens und der Amygdala, die in der Entstehung und Verarbeitung z.B. von Emotionen und Stimmungen involviert sind.

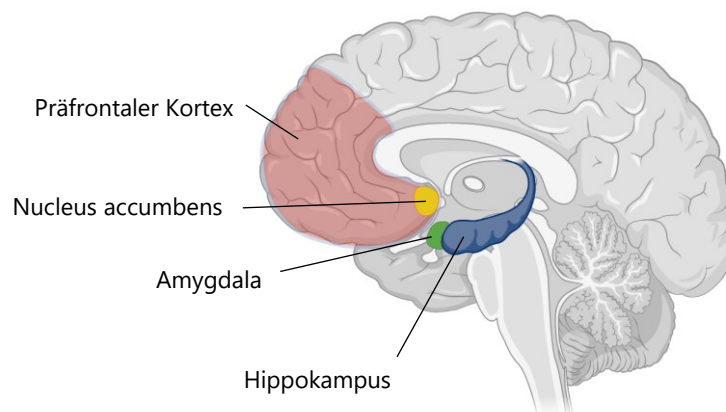


Abb. 12: Funktionell und strukturell beeinträchtigte Hirnareale bei depressiven Patienten.

Darüber hinaus enthält der Hippokampus große Mengen an Glukokortikoidrezeptoren, deren Aktivität von der HPA-Achse reguliert wird, was seine Anfälligkeit gegenüber dem depressionsauslösenden Faktor Stress mitunter erklärt. Nicht zuletzt konnte in Tierstudien bereits mehrfach bestätigt werden, dass verschiedene Stressstimuli die synaptische Plastizität im Hippokampus verstärkt in Richtung Langzeit-Depression (long-term depression, LTD) modulieren und damit die synaptische Signalübertragung abschwächen.^{173,174} Neurobiologische Veränderungen bei einer Depression betreffen nicht nur die Funktionalität des Hippokampus auf molekularer Ebene sondern reichen bis hin zu Veränderungen des Hippokampusvolumens, wie Untersuchungen an depressiven Patienten darlegen konnten.¹⁷⁵ Eine Reduktion der Neuronenzahl konnte ebenfalls im präfrontalen Kortex registriert werden, die mit der Krankheits- und Behandlungsdauer sowie mit der Schwere der Depression korreliert.¹⁰ Der präfrontale Kortex ist eine bedeutende zerebrale Region für die Regulation von Denken sowie Verhalten und wird u.a. deshalb mit der Depression in Verbindung gebracht, weil Aspekte wie Arbeitsgedächtnis, Entscheidungsfindung und zielgerichtetem Verhalten in dieser affektiven Störung beeinträchtigt vorliegen.¹⁷⁶ Studien zur Lokalisation der TRPC6-Kanalexpression zeigen, dass dieser Ionenkanal in bestimmten Strukturen des Hippokampus wie in den Granularzellen und Interneuronen des Gyrus dentatus und in den Pyramidenzellen der CA1-Region sowie im präfrontalen Kortex, in dem kortikale Neurone intensiv exprimiert werden. In diesem Zusammenhang konnte gleichfalls Forschungsgruppen eine Beteiligung von TRPC6 in der synaptischen Plastizität, die sich über das Wachstum und Differenzierung von exzitatorischen Synapsen und ihren Dendriten bis hin zu morphologischen Veränderungen der Dendriten-Dornfortsätze erstreckt, präsentieren.¹⁷⁷⁻¹⁸²

Die synaptische Plastizität stellt eine der fundamentalsten und wichtigsten Funktionen des Gehirns dar und beschreibt im Kern die Fähigkeit komplexe Informationen wahrzunehmen, zu bewerten und zu speichern und auf Reize adaptiv zu reagieren. Diese kritische Gehirnfunktion spielt eine Schlüsselrolle im Gedächtnis und neurobiologische Mechanismen, die diesen Veränderungen zugrunde liegen und ist in der Pathophysiologie der Depressionen verwickelt.¹⁰ Ein Wirkstoff, der den TRPC6-Kanal aktiviert und darüber die Steuerung des Ca^{2+} -Influges reguliert als auch damit verbundene Veränderungen zellulärer Signalwege moduliert, ist der aus Extrakten des Johanniskrautes isolierte bioaktive Hauptinhaltsstoff Hyperforin.⁸¹ Wie zuvor ausgeführt spielt der TRPC6-Kanal eine bedeutende Rolle für den Aufbau und die Beibehaltung der synaptischen Plastizität. In Studien konnte dargelegt werden, dass seine Aktivierung durch Hyperforin das Wachstum von Neuriten im vergleichbaren Maße zu steigern vermag, wie es durch die Zugabe des neuronalen Wachstumsfaktors NGF geschieht. Zusätzlich konnten neurotrophe Effekte in Pyramidalzellen der CA1- und CA3-Region des Hippokampus beobachtet werden, in denen Hyperforin TRPC6-vermittelt eine Veränderung der dendritischen Dornenfortsätze und ihrer Dichte induzierte.¹⁷⁸ Auffälligerweise erinnern diese positiven neuronalen Effekte in den genannten Wirkungsbereichen im Gehirn an diejenigen des Neurotrophins BDNF. Tatsächlich besteht sogar ein Zusammenhang zwischen den durch BDNF und TRPC6-induzierten Veränderungen in der neuronalen Netzstruktur. Beispielsweise konnten Experimente in Neurone aus dem Cerebellum von Ratten demonstrieren, dass die von BDNF gesteuerte Ausrichtung des Wachstumskegels gemeinsam mit der Beteiligung von TRPC3/6 reguliert wird.¹⁷⁹ Wie in Abb. 13 schematisch dargestellt, stoßt die Aktivierung des BDNF-Rezeptors TrkB multiple Signaltransduktionskaskade an, die nach der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor CREB in die Synthese von essenziellen Proteinen für das Wachstum und Überleben von Neuronen münden. Dabei spielt auch der Einstrom von Ca^{2+} eine Schlüsselfunktion inmitten der Neurotrophin-induzierten Inangangsetzung jener Signalkaskaden, die im Krankheitsgeschehen der Depression verstrickt sind.¹⁷⁴ Studienergebnisse von Jia et al. zeigen, dass TRPC3 und TRPC6 in Granularneuronen von Ratten entscheidend die BDNF-induzierte CREB-Phosphorylierung unterstützen, insofern eine per Serumentzug eingeleitete Apoptose durch eine TRPC3/6-Überexpression und damit verbundenen Steigerung der CREB-Aktivität abgefangen werden konnte.¹⁸³ Darauf folgende Studien präsentieren, dass eine Überexpression von TRPC6 in Hippokampuskulturen die Phosphorylierung von CREB und der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase IV (CaMKIV) erhöht und daraufhin das dendritische Wachstum fördern.¹⁸⁴ Die Arbeiten von Heiser et al. vertieften den Blick auf nachgeschaltete Signalwege im TRPC6-vermittelten Neuriten Wachstum und Synapsenverdichtung in PC12-Zellen und primären hippocampalen Neuronen. Demnach kam es in Abhängigkeit von Hyperforin zu einer Verstärkung signalregulierender Kinasen des Ras/MEK/ERK, PI3K/Akt, und CAMKIV Signalweges, die über die Phosphorylierung von CREB die beobachteten

neuronalen Effekte herbeiführten.¹⁸¹ Im Resümee deuten die Studiendaten auf die hohe Relevanz von TRPC6 für die synaptische Plastizität hin, jener wichtigen neuronalen Fähigkeit, die in der Depression gestört vorliegt. Sie zeigen auch, dass die Hyperforin-vermittelte Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionskaskaden ebenfalls von BDNF bedient werden, die das antidepressive Wirkprofil von Hyperforin weiter konturieren.

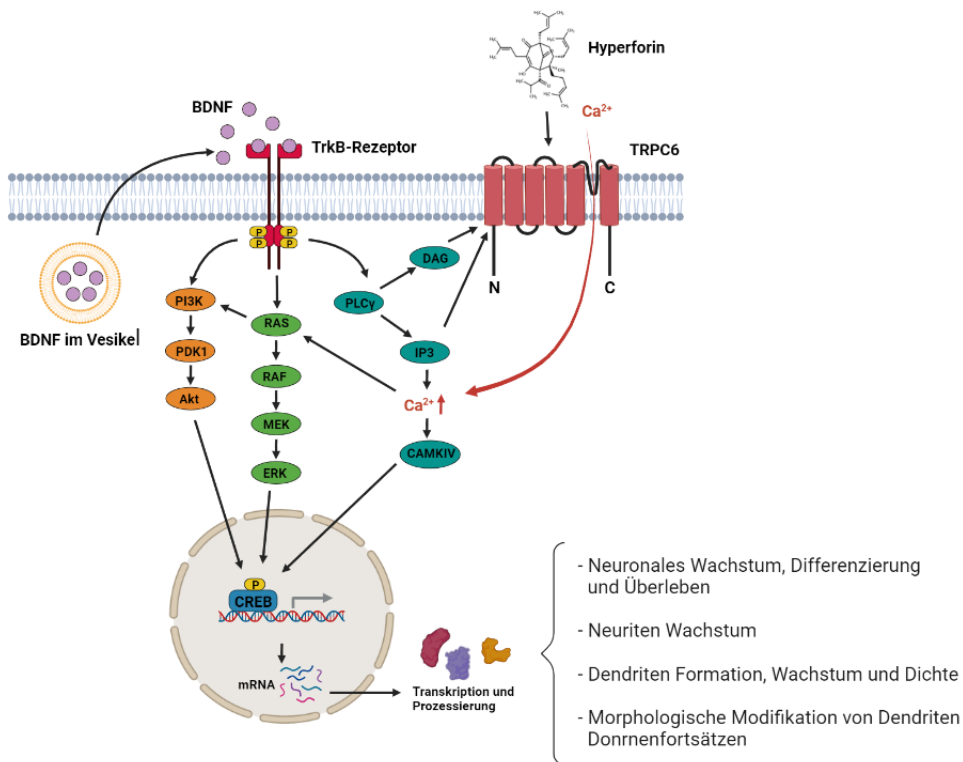


Abb. 13: BDNF und Hyperforin induzierte Effekte auf die synaptische Plastizität. Bindung von BDNF an TrkB und Hyperforin an den TRPC6-Kanal führt zur Aktivierung des Ras/MEK/ERK, PI3K/Akt, und CAMKIV Signalweges. Signaltransduktionskaskaden leiten anschließend die Phosphorylierung von CREB ein, wodurch die Gentranskription von Proteinen, die für den Aufbau und Beibehaltung der synaptischen Plastizität benötigt werden, in Gang gesetzt wird. (Abb. modifiziert nach Heiser et al., 2013)¹⁸¹

1.2.2.4 TRPC6-Kanal Modulatoren

Die Forschung im Bereich der TRP-Kanäle hat sich seit ihrer Entdeckung vor wenigen Jahrzehnten zunehmend intensiviert. Neue Erkenntnisse über Struktur und Funktion leisteten ihren Beitrag zum besseren Verständnis von physiologischen und pathologischen Prozessen, in denen sie involviert sind. Untersuchungen mit transgenen TRPC6-defizitären Nagern stellen eine Möglichkeit dar die Rolle von TRPC6 in einem kompletten Säugerorganismus besser nachzuvollziehen. Vor dem Hintergrund variierender Versuchsdesigns, schwieriger Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse, möglicher speziesspezifischer Reaktionen und nicht zuletzt dem Faktor Kosten können Tierexperimente nur einen Teil zum nötigen Erkenntnisgewinn über die Funktion des TRPC6-Kanals beisteuern. Durch die pharmakologische Modulation des TRPC6-Kanals kann seine Struktur und Funktion in Modellsystemen wie Zellen oder Geweben gleichwohl charakterisiert werden. Dabei stellt die Selektivität und Potenz einzelner Modulatoren eine besondere Herausforderung dar, nicht zuletzt wie im Falle des TRPC6-Kanals, wo eine ca. 70 % große Aminosäurenidentität und die Möglichkeit einer Tetramerisierung mit den strukturverwandten Kanälen TRPC3 und TRPC7 besteht. Eine strukturelle Basis für eine pharmakologische Modulation der TRPC6-Kanäle wurde jüngst durch die Ergebnisse der Kryo-EM-Methode geschaffen, die durch die Auflösung der Kanalstruktur sowohl im offenen als auch geschlossenen Zustand mehr Licht in die der TRPC6-Funktion zugrundeliegenden molekularen Mechanismen brachte.

1.2.2.4.1 TRPC6-Aktivatoren

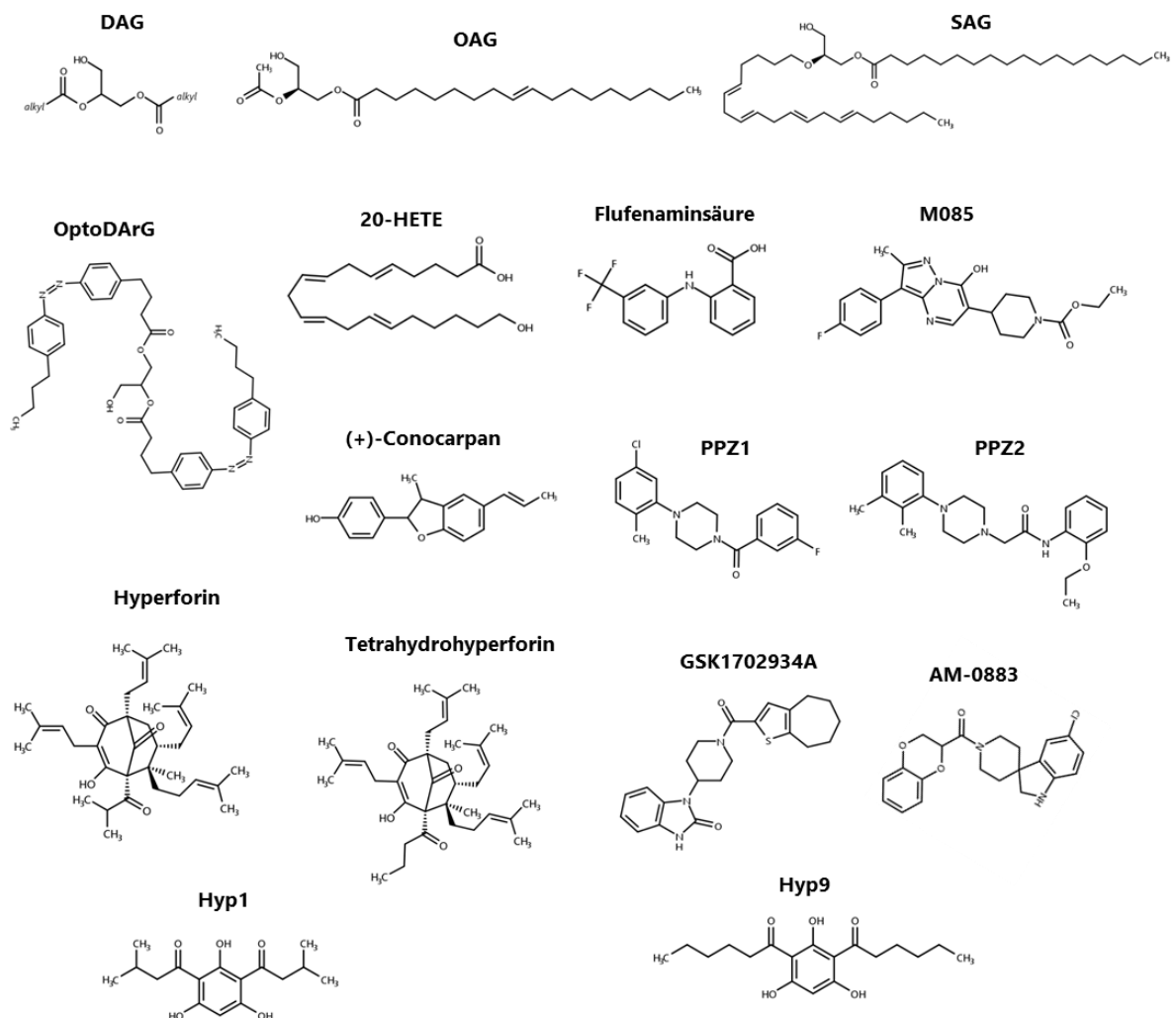


Abb. 14: Chemische Strukturen ausgewählter selektiver und unselektiver TRPC6-Aktivatoren.

Ein endogener Aktivator des TRPC6-Kanals ist DAG, ein Glycerinderivat, dass wie im Kapitel 1.2.1.3 dargelegt aus dem Molekül PIP_2 nach der Stimulation des Rezeptors GPCRq/11 oder den Rezeptor Tyrosinkinase und anschließender Aktivierung der PLC entsteht. Hoffmann et al. beschrieben als Erste die Aktivierung des TRPC6- und TRPC3-Kanals unabhängig von einer rezeptorvermittelten Signaltransduktion durch die direkte Zugabe der synthetischen DAG-Spezies DOG (1,2-dioctanoyl-sn-glycerol), OAG (1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol) und SAG (1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol) auf TRPC3/6 exprimierende CHO-Zellen, die sich im Vergleich zum reinen DAG durch ihre bessere Membrangängigkeit, Löslichkeit und Stabilität auszeichnen. Für den homologen Verwandten TRPC7 wurde ebenfalls eine Sensitivität gegenüber den DAG-Analoga nachgewiesen.^{185,186} Andererseits wird angenommen, dass die Kanäle TRPC1/4/5 nicht durch DAG aktiviert werden, obgleich eine DAG

induzierte Aktivierung von TRPC5 nicht strikt ausgeschlossen werden kann.^{140,187,188} Trotz der hohen Sequenzidentität variiert die Affinität der DAG-Analoga gegenüber den Kanälen der TRPC3/6/7-Gruppe. Beispielsweise wurde in Patch-Clamp-Messungen unter der inside-out und outside-out Konfiguration eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit der TRPC6-Kanäle nach der Applikation von SAG im Vergleich zu OAG beobachtet und im Cell-Attached-Modus konnte OAG sogar keine Aktivierung von TRPC7 erreichen. Diese Beispiele zeigen, dass synthetische DAG-Analoga in Abhängigkeit von der Art und Länge ihrer Fettsäureresten entscheidend die Aktivierung bestimmter TRPCs beeinflussen können.^{189,190} Versuchsergebnisse, die belegten, dass DAG auf direktem Wege den TRPC3/6-Kanal modulieren kann, warfen die Frage nach dem dahinterstehenden Mechanismus und Bindemotiv auf. Hierzu wurden von Frank et al. in einem Ansatz zu Photoschaltern modifizierte DAGs sog. OptoDARGs synthetisiert, die später von weiteren Arbeitsgruppen experimentell zur Untersuchung von TRP-Kanälen aufgegriffen wurden.¹⁹¹⁻¹⁹³ Kennzeichnend für diese photochromen DAG-Derivate sind inmitten der Fettsäureester integrierte Azobenzole, die abhängig von der Lichtbestrahlung in die effektive cis- und ineffektive trans-Konfiguration alternierend wechseln können. Für TRPC6 konnte eine Aktivierbarkeit durch das photosensitive DAG-Molekül PhoDAG-1 festgestellt werden. Bei der Untersuchung möglicher DAG-Bindestellen im TRPC3-Kanal führte die Interaktion von PhoDAG-1 und PhoDAG-3 mit TRPC3-Mutanten zum Ergebnis, dass DAG möglicherweise in der Nähe des TRPC3-Selektivitätsfilter der Kanalpore bindet. Interessanterweise beinhaltet diese Lipidbindedomäne Aminosäuren wie sie in der TRPC3/6/7-Gruppe konserviert vorzufinden sind.¹⁹² Eine weitere endogene Verbindung, die die Ionenleitfähigkeit des TRPC6-Kanals steigert, ist der aus der Arachidonsäure über das CYP P450 enzymatisch abgebaute Metabolit 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE). Es konnte gezeigt werden, dass die parallele exogene Zugabe von DAG eine synergistische Aktivierung des TRPC6-Kanals in vaskulären Muskelzellen bewirkt.¹⁹⁴ Jedoch wurde für 20-HETE gleichwohl eine indirekte Aktivierung von TRPC6 in kultivierten Podozyten beschrieben, die eine Generierung von ROS und die Stimulation von GTPasen voraussetzt.¹⁹⁵ Flufenaminsäure, eine Anthranilsäure mit antiphlogistischer und analgetischer Eigenschaft, gilt als Blocker zahlreicher unspezifischer Kationenkanäle. Allem Anschein nach inhibiert die Flufenaminsäure ebenso die Kanäle TRPC3 und TRPC7 während sie im Unterschied dazu den TRPC6-Kanal zur Öffnung mobilisiert.^{196,197} Überraschenderweise konnte ebenso ein anderer Effekt der Flufenaminsäure in Richtung TRPC6-Inhibition registriert werden, der möglicherweise auf unterschiedlich gewählte Flufenaminsäure Konzentrationen in vergleichbaren experimentellen Ansätzen zurückzuführen ist, wie das z.B. bei der Untersuchung des TRPM8-Kanals festgestellt werden konnte.^{198,199} Der aus der Wurzel der Pflanze *Krameria lappacea* isolierte Naturstoff (+)-Conocarpan wurde erstmalig 2019 mit einer Aktivierung des TRPC6-Kanals und fehlender Aktivierung der weiteren TRPC-Familienmitgliedern in Zusammenhang gebracht. Dabei demonstrierten Patch-Clamp-

Aufnahmen in HK-2 (human kidney-2), dass der EC_{50} -Wert von (+)-Conocarpan bei $6.01 \mu\text{M}$ liegt. Die bei der Zugabe von (+)-Conocarpan ausgelöste Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration konnte allerdings nicht ausschließlich auf einen TRPC6-vermittelten Ca^{2+} -Influx zurückgeführt werden, da (+)-Conocarpan ebenfalls zellinnere Ca^{2+} -Speicher zu entleeren vermag.²⁰⁰ Ein weiterer pflanzlicher Naturstoff der den TRPC6-Kanal in Neuronen selektiv aktiviert und von Leuner et al. zum ersten Mal 2007 beschrieben wurde, ist das aus dem Echten Johanniskraut gewonnene und für seine antidepressive Wirkung bekannte Hyperforin.⁸¹ Im Gegensatz zu den klassischen Antidepressiva, die ihre antidepressive Wirkung hauptsächlich über die Blockade von Neurotransmitter-Transporter entfalten, führt Hyperforin in Neuronen zu einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration, wodurch die Funktion von Neurotransmitter-Transporter durch eine Abflachung des elektrochemischen Gradienten entlang der Plasmamembran minimiert wird. Dieser von Hyperforin induzierte Effekt ist auf eine exklusive Aktivierung des TRPC6-Kanals zurückzuführen.^{81,201,202} Hyperforin ist ein bizyklisches, polyprenyliertes Acylphloroglucinol und beinhaltet das pharmakologisch relevante Strukturelement Phloroglucinol. Auf der Suche nach Phloroglucinol-Derivaten, die vergleichsweise zu Hyperforin durch eine stärkere Wirksamkeit, höhere chemische Stabilität, verbesserte Löslichkeit und reduzierte Interaktionsbereitschaft mit dem CYP-Enzymsystem gekennzeichnet sind sowie zusätzlich lipophile und weniger rigide Strukturelemente wie die in DAG-Derivaten vorliegenden Acetylresten enthalten, wurden von Leuner und Kollegen eine Reihe symmetrischer 2,4-Diacylphloroglucinol (Hyp-Derivate) synthetisiert. In verschiedenen Testsystemen wurden die Substanzen charakterisiert und zeigten mitunter im Ca^{2+} -Fluoreszenz-Imaging, dass Hyp1 (EC_{50} 2,71), Hyp5 (EC_{50} 1,66) und Hyp9 (EC_{50} 1,26) über ein vergleichbares Aktivitätsprofil zu Hyperforin (EC_{50} 1,51) sowohl in TRPC6 endogen als auch heterolog exprimierenden Zellen verfügen.⁸² Ein weiteres Beispiel für eine stabile und von Hyperforin abgeleitete Struktur mit Affinität für den TRPC6-Kanal ist Tetrahydrohyperforin. In verschiedenen Alzheimer-Mausmodellen konnte sich Tetrahydrohyperforin als neuroprotektiv erweisen, indem es z.B. $\text{A}\beta$ -Plaques minimierte, das reduzierte Exzitatorische postsynaptische Potential (EPSP) im Hippokampus anhob und die adulte Neurogenese im ZNS unterstützte. In silico Studien deuten auf starke pharmakophore Ähnlichkeiten zwischen Tetrahydrohyperforin und weiteren TRPC6-Aktivatoren wie Hyperforin, Hyp9 und OAG hin. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die festgestellten Tetrahydrohyperforin Effekte durch eine Aktivierung der TRPC3/6/7-Familie verursacht werden.²⁰³⁻²⁰⁶ Im Rahmen eines Wirkstoffscreenings wurden vor wenigen Jahren die Piperazin-Derivate PPZ1 und PPZ2 ebenfalls mit einer konzentrationsabhängigen Potenzierung der TRPC3/6/7-Aktivität in PC12-Zellen in Verbindung gebracht. Dabei zeigte sich anhand der EC_{50} -Werte, dass PPZ1 stärker effektiver war als PPZ2 mit $10.2 \mu\text{M}$ in TRPC3, $8.4 \mu\text{M}$ in TRPC6 und $2.9 \mu\text{M}$ in TRPC7. Bedingt durch eine unzureichende Wasserlöslichkeit der beiden Aktivatoren konnten allerdings keine vollumfängliche Struktur-

Wirkungsbeziehung erreicht werden.²⁰⁷ Mit M085 einem Pyrazolopyrimidin und GSK1702934A existieren weitere potente unselektive TRPC6-Aktivatoren (EC_{50} 4.66 μ M und EC_{50} 440 nM), die jedoch eine stärkere Bindungsaffinität für den TRPC3- als für den TRPC6-Kanal aufzeigten.^{208,209} Der TRPC6-Agonist AM-0883 trug in einer Kryo-EM-basierten Strukturuntersuchung dazu bei, dass vor einem Jahr erstmalig der TRPC6-Kanal in seinem geöffneten Zustand aufgelöst werden konnte, nachdem 2018 die TRPC6-Kanalstruktur von Tang et al. im geschlossenen Zustand durch die Komplexierung mit dem TRPC6-Inhibitor BTDM (IC_{50} 10 mM) publiziert wurde. In Kontrast zu OAG zeichnet sich AM-0883 durch eine etwa 70-fach höhere Effektivität (EC_{50} 45.5 nM) aus.²¹⁰

Aktivator	EC ₅₀ -Wert [μ M]					
	TRPC3		TRPC6		TRPC7	
20-HETE			0,8	II		
AM-0883			0,046	II		
GSK1702934A	0,08	II	0,44	II		
Hyp1			2,71	I		
Hyp5			1,66	I		
Hyp9			1,26	I		
Hyperforin			1,51	I		
M085	0,44	III	4,66	I	0,50	I
OAG			117	II		
PPZ1	57	I	67,3	I	45,6	I
PPZ2	10,2	I	8,4	I	2,9	I

Tab. 1: EC₅₀-Werte ausgewählter selektiver und unselektiver Aktivatoren von TRPC6. Angegeben sind publizierte EC₅₀-Werte in [μ M], die bei der Anwendung verschiedener Methoden (I = Calcium-Imaging, II = Patch-Clamp, III = Membranpotentialmessung) in HEK293-Zellen gewonnen wurden.

1.2.2.4.2 TRPC6-Inhibitoren

Lanthanoide wie La^{3+} wurden bevor die TRP-Kanäle als neue Klasse unspezifischer Ionenkanäle entdeckt wurden als Inhibitor eingesetzt, um z.B. die Drosophila TRP-Mutante in einer anderen Fliegenart zu untersuchen.²¹¹ Weitere Lanthanoide wie Gd^{3+} zählen zu den Breitspektrum Blockern von TRP-Kanälen und weisen je nach Kanalsubtyp unterschiedliche Selektivitäten auf. In mit TRPC6 transfizierten HEK293-Zellen wurde eine halbmaximale inhibitorische Konzentration von 4-6 μM für La^{3+} und 1,9 μM für Gd^{3+} beschrieben.^{196,212}

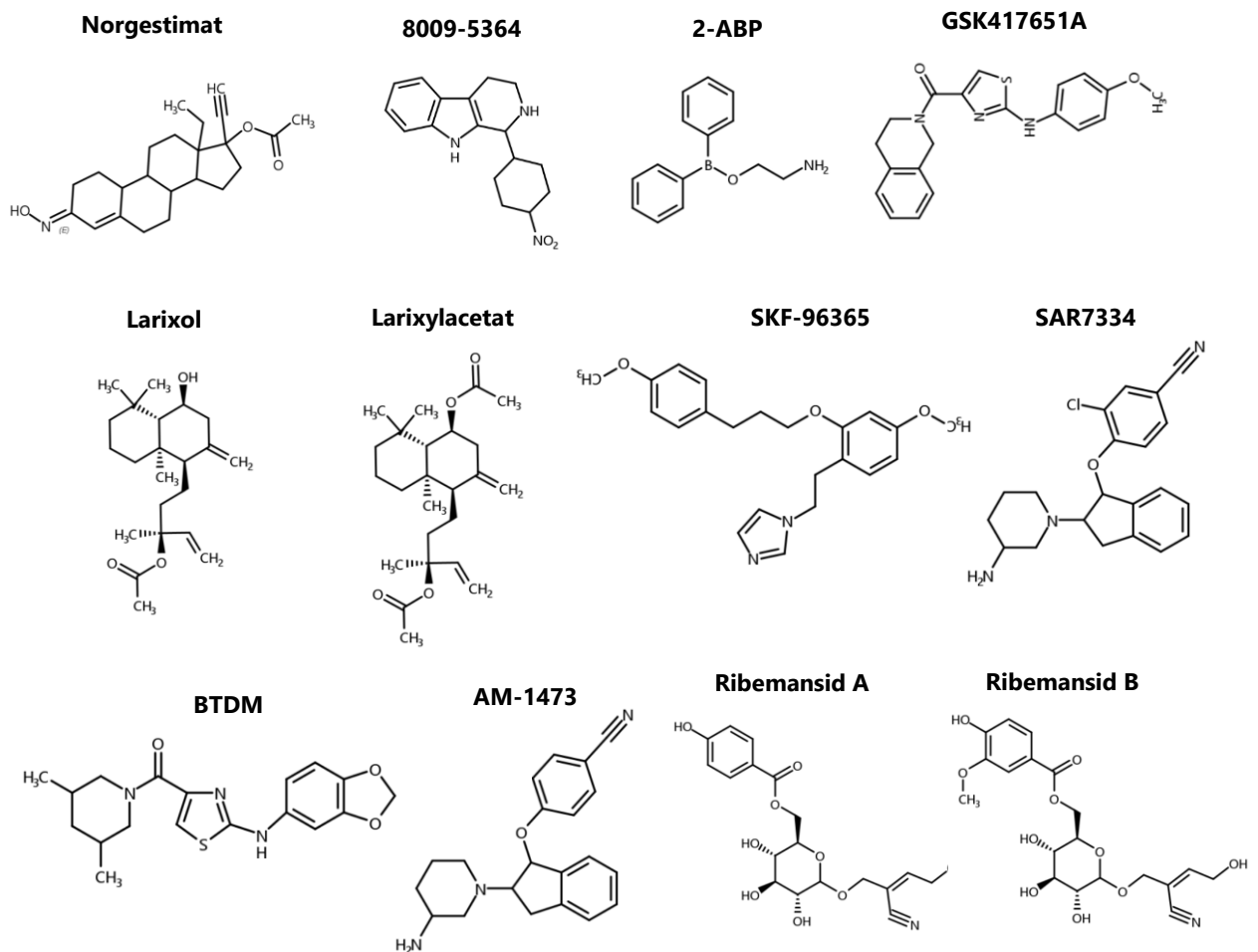


Abb. 15: Chemische Strukturen ausgewählter selektiver und unselektiver TRPC6-Inhibitoren.

Mit dem Imidazol-Derivat SKF-96365 liegt ein weiterer unselektiver TRPC6-Inhibitor vor, der ursprünglich zur Prüfung des SOCC und ROCC vermittelten Ca^{2+} -Influxes spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle verwendet wurde. Die halbmaximale Hemmkonzentration von SKF-96365 liegt für TRPC6 bei einem IC_{50} -Wert von 2 μM und bei weiteren TRP-Kanälen vergleichsweise höher.²¹³ Ein weiterer unselektiver TRPC6 Inhibitor der den Ionenkanal in mikromolaren Konzentration blockiert ist das synthetische Gestagen Norgestimat ($\text{IC}_{50} = 5,2 \mu\text{M}$), dessen Hemmeigenschaft allerdings geringfügig schwächer ausgeprägt bleibt als gegenüber TRPC3 ($\text{IC}_{50} = 3,0 \mu\text{M}$).²¹⁴ Anders als jene zuvor präsentierten unselektiven TRPC6 Antagonisten zeigten Washburn et al. eine Reihe neuer Anilinothiazol-basierter Verbindungen, die sich primär durch ihre Effektivität im nanomolaren Konzentrationsbereich auszeichnen. Als besonders wirksam konnten sich duale Blocker wie GSK2332255B mit $\text{IC}_{50} = 5$ und 4 nM gegen TRPC3 und TRPC6 sowie GSK2833503A mit $\text{IC}_{50} = 21$ und 3 nM gegen TRPC3 und TRPC6 präsentieren.^{215,216} Doch ihre Verwendung zur Behandlung von beispielsweise Herzerkrankungen, die mit einer erhöhten TRPC3- und TRPC6-Aktivität einhergehen, wurde durch eine schwache orale Bioverfügbarkeit sowie einer zu schnellen renalen Eliminierung begrenzt, was die Entwicklung weiteren Substanzen mit einem verbesserten pharmakokinetischen Profil erforderlich machte. Im Jahr 2015 stellten Maier und Kollegen mit der Substanz SAR-7334 einen Inhibitor vor, der sich neben seiner hohen Effektivität ($\text{IC}_{50} = 9,5 \text{ nM}$) vor allem durch seine nahezu selektive Blockade des TRPC6-Kanals hervorut. Demnach hemmt SAR-7334 in Kontrast zu TRPC6 die Aktivität der beiden homologen Ionenkanäle TRPC3 und TRPC7 erst in Konzentrationsbereichen oberhalb von 200 nM.²¹⁷ Mit den Inhaltsstoffen Larixol und Larixylacetat aus der Pflanze *Larix decidua* wurden ein Jahr darauf erstmalig Naturprodukte als potente TRPC6 Inhibitor beschrieben, deren halbmaximale Hemmkonzentration mit 2,04 μM bzw 0,58 μM im Vergleich zu SAR-7334 zwar moderat ausfallen aber bedingt durch ihre selektive Blockade des TRPC6-Kanals von pharmakologischen Interesse sind.²¹⁸ Obwohl SAR-7334 und Larixol(acetat) als selektive TRPC6-Antagonisten gelten, rufen Untersuchungsergebnisse einer kürzlich veröffentlichten Studie Zweifel an diese Annahme hervor. Infolgedessen wird die TRPC6-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 von beide Verbindungen erwartungsgemäß gehemmt, aber zugleich die Pregnenolonsulfat-vermittelte Signalübertragung über TRPM3-Kanäle.²¹⁹ Für zwei weitere natürliche TRPC6-Inhibitoren, die aus der Johannisbeerenart *Ribes manshuricum* extrahiert wurden, Ribemansid A und B, wurde ebenfalls ein hemmender wenngleich niederpotenter Effekt auf die TRPC6-Aktivität mit IC_{50} -Konzentration von 24.5 μM bzw 25.6 μM beschrieben. Daneben zeigten beide Stoffe, dass sie ähnlich wie SAR-7334 agieren, indem sie suppressiv auf die TGF- β 1-induzierte Fibrogenese in HK-2 Zellen wirkten.²²⁰ Jüngst wurde die Substanz BI 749327 publiziert, die mit einem IC_{50} -Wert von 13 nM den TRPC6-Kanal im Unterschied zu den homologen Verwandten TRPC3 ($\text{IC}_{50} = 1,1 \mu\text{M}$) und TRPC7 ($\text{IC}_{50} = 0,55 \mu\text{M}$) selektiv blockiert. Neben seinen inhibitorischen Charakter zeichnet sich

BI749327 insbesondere durch seine orale Bioverfügbarkeit aus und konnte im Rahmen der Behandlung von pathologischen Veränderungen der Myokardfunktion in einem Tiermodell protektive Effekte hervorrufen.¹⁶⁹ Tang et al. setzten für ihre Kryo-EM-Studie der Kanäle TRPC6 und TRPC3 den Stoff BTDM ein, bei dem es sich um einen potenten und direkt bindenden Inhibitor mit $IC_{50} = 10$ nM bzw. $IC_{50} = 11$ nM handelt und für ihn eine Blockade von GOF TRPC6-Mutanten aus der Nierenerkrankung FSGS beschrieben wurde.¹¹³

Inhibitor	IC ₅₀ -Wert [μM]		
	TRPC3	TRPC6	TRPC7
2-APB	.	10 - 13	
8009-5364	5,0	13	>50
BTDM	0,011	0,010	
BI 749327	1,100	0,013	0,550
Gd ³⁺	2,3	1,9	
GSK2332255B	0,005	0,004	
GSK2833503A	0,021	0,03	
GSK417651A	0,08	0,17	0,10
La ³⁺	4	4 -6	
Larixol	8,3	2	
Larixylacetat	6,38	0,58	
Norgestimat	3	5,2	
Ribemansid A		24,5	
Ribemansid b		25,6	
SAR-7334	0,282	0,008	0,226
SKF-96365		2	

Tab. 2: IC₅₀-Werte ausgewählter selektiver und unselektiver Inhibitoren von TRPC6. Angegeben sind ausgewählte publizierte IC₅₀-Werte in [μM], die nach einer Voraktivierung mit DAG-Analoga im Calcium-Imaging in HEK293-Zellen gemessen wurden.

1.3 Tierversuchsexperimente in der Depressionsforschung

1.3.1 Historische Entwicklung und rechtliche Grundlagen

Ein Großteil unserer anatomischen, physiologischen, biochemischen, pharmakologischen und psychologischen Kenntnisse über Menschen und Tiere stammen aus experimentellen Studien an Tieren. In Deutschland wurde das erste Tierschutzgesetz (damals noch Reichstierschutzgesetz) 1933 verabschiedet. Um dem Tierschutz einen höheren Stellenwert im deutschen Rechts- und Wertesystem einzuräumen, beschloss der Bundestag 2002 eine entsprechende Erweiterung des Grundgesetzes Artikel 20a. Im Zuge der Harmonisierung von Gesetzen und Regeln innerhalb der europäischen Union (EU) wurde 2010 vom Europäischen Parlament die Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere erlassen. Darin betont sie das ethische Prinzip der „3R“:

- **Vermeiden** (engl.: replace): Tierversuche dürfen nur dann durchgeführt werden, wenn sie durch keine Alternativmethoden (z.B. Zellkulturen, In-Silico-Verfahren) ersetzt werden können.
- **Verringern** (engl. reduce): Die Anzahl der Versuchstiere muss so gering wie möglich gehalten werden (z.B. durch ein kluges Versuchsdesign, optimierte Versuchsmethoden und Statistikberechnungen). Gleichzeitig muss die Versuchstieranzahl so hoch sein wie sie zur Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung nötig ist, um eine mangelhafte Aussagekraft der Versuchsergebnisse aufgrund einer zu kleinen Versuchstieranzahl zu verhindern.
- **Verbessern** (engl. refine): Die Belastung der Versuchstiere muss minimiert werden (z.B. durch artgerechte Haltung, schonende Versuchsmethoden, Betäubungsmittel).

Die Bestimmungen der Europäischen Richtlinie und damit auch das 3R Prinzip wurden 2013 mit dem novellierten Tierschutzgesetz und der daran angehängten Tierschutz-Versuchstierverordnung in deutsches Recht umgesetzt. Demnach müssen zukünftig sämtliche Tierversuchsvorhaben in deutschen wissenschaftlichen Einrichtungen bei der zuständigen Landesbehörde beantragt werden, wodurch im Anschluss eine Genehmigung erworben werden kann, sobald die Einhaltung des 3R Prinzips belegt wird.

1.3.2 Bedeutung von Tiermodellen in der Depressionsforschung

Die Depressionserkrankung zeichnet sich nach wie vor – trotz neuer wissenschaftlich relevanter Erkenntnisse aus der Grundlagen- und klinischen Forschung – durch ein hoch komplexes und demnach schwer therapierbares Krankheitsbild aus.²²¹ Der Erfolg in der Entdeckung innovativer und nebenwirkungsarmer Antidepressiva ist begrenzt und hängt mit einem noch unzureichenden Verständnis der zugrunde liegenden neurobiologischen und pathophysiologischen Mechanismen dieser affektiven Störung zusammen. Zudem spiegelt sich die heterogen ausgeprägte Symptomatik der Depression deutlich in der Schwierigkeit einer präzisen Diagnosefindung wider. Moderne diagnostische Methoden fokussieren sich zunehmend auf Biomarker, um eine rechtzeitige medizinische Intervention schon im Frühstadium dieser psychiatrischen Erkrankung einzuleiten.²²² Nach wie vor muss allerdings festgehalten werden, dass die Rolle einzelner Biomarker in der Pathogenese der Depression noch nicht hinreichend geklärt ist. Zudem können Biomarker keine zufriedenstellende Antwort auf die Ursachen der Erkrankung geben.²²³ Eine Möglichkeit die Komplexität der Depression auf molekularbiologischer und -genetischer Ebene besser zu verstehen, erlauben tierexperimentelle Studien, die im Gegensatz zu invasiven Versuchen am menschlichen Gehirn aus ethischen Gesichtspunkten vertretbar sind. Tiermodelle ermöglichen den Forschenden durch genetische Manipulation von biologischen Zielstrukturen oder kontrollierter Stressexposition im Tier depressive Symptome hervorzurufen und zu studieren. Daran angeschlossen kann der Einfluss exogener Faktoren auf das Verhalten, die Wirkung neuer Antidepressiva und pharmakogenetische Interaktionen ermittelt werden. Der klinisch definierte Krankheitsphänotyp der Depression kann in einem Tiermodell allerdings nicht vollständig rekonstruiert werden. Bestimmte Depressionssymptome wie z.B. gefühlte Traurigkeit, Schuldgefühle, negatives Selbstwertgefühl und immer wiederkehrende Suizidgedanken, werden von Betroffenen nicht nur individuell unterschiedlich stark bewertet, sondern können zudem bedingt durch die mangelnde Selbstreflexion, Antizipation, Konzeption und Kommunikation eines Tieres nicht ermittelt und interpretiert werden. Diese Gegebenheit sowie das komplexe Zusammenspiel zugrundeliegender biologischer Mechanismen einschließlich dem Einfluss von epigenetischen Faktoren erschweren die Entwicklung eines allgemein anwendbaren bzw. idealen Depressionsmodells. Dennoch können einzelne Aspekte der Erkrankung, die konsistent bei depressiven Patienten in Erscheinung treten, in einem Tiermodell pharmakologisch, molekularbiologisch oder genetisch modelliert werden, um ein sogenanntes depressions- und angstähnliches Verhalten zu untersuchen. Bei der Wahl eines geeigneten Tiermodells zur Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung ist die Definition und Beurteilung der Validität von besonderer Wichtigkeit. Im Jahre 1994 schlug Paul Willner drei Kriterien vor, die die Validität

eines Tiermodells weitestgehend sicherstellen sollen.²²⁴ Diese Kriterien werden von der heutigen Fachwelt auch einstimmig anerkannt und können in drei Kategorien eingeteilt werden:

- **Prädiktive Validität**

Kann die Arzneimittelwirkung im Tiermodell auch in der klinischen Anwendung beim Menschen beobachtet werden? Führt das Tiermodell in Vergleichsstudien mit einer Placebo-Intervention zu vergleichbaren Effekten bei depressiven Patienten?

- **Phänotypische Validität**

Besteht zwischen dem Tiermodell und dem Menschen eine phänomenologische Ähnlichkeit? Kann das Tiermodell eine Vielzahl depressiver Krankheitszeichen darstellen? Können diese Krankheitszeichen spezifisch der Depressionserkrankung zugeordnet werden oder überlappen sie mit einer anderen psychiatrischen Erkrankung?

- **Konstrukt-Validität**

Wie gut reflektiert die Modulation des Tiermodells, die in ihm einen depressiven Krankheitsphänotyp induziert, was derzeit als Ursache für Depression bei Patienten verstanden wird? Besteht eine Ähnlichkeit der neurobiologischen Funktionsstörung im Menschen und Tiermodell?

Ein Tier, das sich zum favorisierten Tiermodell in zahlreichen experimentellen Studien durchgesetzt hat, ist die Labormaus. Sie weist hinsichtlich Anatomie, Physiologie und Genom eine große Ähnlichkeit zum Menschen auf. Diese Vorteile ermöglichen die Funktion von neuronalen Systemen in einem Säugetier besser zu verstehen und sie bei einer vorliegenden Dysfunktion therapeutisch zu modulieren. Durch die Entwicklung neuer molekularbiologischer Technologien wie dem Gene-Targeting konnten in der Vergangenheit zahlreiche genetisch veränderte Mauslinien kreiert werden, die der neuropsychiatrischen Forschung den Weg ebneten, die Bedeutung einzelner Biomoleküle für das beobachtete Verhalten zu erkennen. Ein weiterer Pluspunkt der Maus als Tiermodell ist ihre kurze Reproduktionszeit bei einer Vielzahl an Nachkommen und die daran geknüpfte zeitnahe Generierung von Forschungsdaten. Auch aus ökonomischer Sicht werden Mäuse in Verhaltensexperimenten bevorzugt eingesetzt. Sie verursachen vergleichbar geringe Kosten in Haltung und Pflege und treten durch ihre weniger anspruchsvolle Handhabung im Vergleich zu Ratten hervor.

1.3.3 Mausmodelle zur Untersuchung von depressions- und angstähnlichen Verhalten

Die Untersuchung von depressions- und angstähnlichen Verhalten in Nagetieren basiert auf die Beobachtung häufig in Erscheinung tretender Symptome, die sich bei der Depressionserkrankung im Menschen abbilden. Hierzu können angst-, belohnungs-, sozial- und verzweiflungsbasiertes Verhalten sowie Veränderungen der allgemeinen Fortbewegung, des Schlafes, der Paarungsbereitschaft, der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme gezählt werden.²²⁵ Ein apathisches Verhalten wird als das Nichtvorhandensein von zielgerichteten Verhalten interpretiert und kann beispielsweise durch die Beobachtung des nachlassenden Nestbaus, gestörter Selbstpflege, verringerter mütterliche Fürsorge, mangelndes soziales Interesse und reduziertes Interesse an neuen Objekten identifiziert werden. Um depressions- und angstassoziierte Verhaltensmuster sowie die Folgen auf neurobiologischer Ebene in Tieren, z.B. nach der Konfrontation mit Stressoren, der Gabe von depressionsauslösenden Substanzen (z.B. Lipopolysaccharide) oder genetischer Manipulation analysieren zu können, haben Forscher in den letzten Jahrzehnten einen umfangreichen Satz an verschiedenen Tierversuchsmodellen zusammengestellt. So sind zur Untersuchung von Zuständen wie z.B. Verzweiflung in einer akuten Stresssituation oder Antriebslosigkeit wie der *Forced Swim Test* (FST) oder *Tail Suspension Test* (TST) weitverbreitet. Die Beobachtung von Angst kann durch Tests wie dem *Open Field Test* (OFT), *Ligth-Dark Box Test* (LDBT) und *Elevated Plus Maze Test* (EPMT) zugänglich gemacht werden. Für die Bestimmung von Anhedonie stehen belohnungsbasierte Tests wie der *Sucrose Preference Test* (SPT) zur Verfügung. Um kognitive Dysfunktionalität, die mit Lern-, Orientierungs- und Gedächtnisdefiziten einhergehen registrieren zu können, kann auf nicht-soziale und soziale Objekterkennungstests wie dem *Spatial Object Recognition Test* (SORT) und dem *Novel Object Recognition Test* (NORT) zurückgegriffen werden.²²⁶

Im Folgenden werden nun die im vorherigen Absatz genannten Verhaltenstests sowie zusätzlich verschiedene Mausmodelle, die ein hohes Maß an Validität aufweisen und zur Bestimmung von bestimmten depressions- und angstähnlichen Verhalten in Studien häufig herangezogen werden präsentiert. Verhaltensexperimente wie der OFT, SORT, NORT, LDBT, die im Rahmen dieser Arbeit eine tragende Rolle zu Teil kommt, werden im Kapitel 4.12 eingängig vorgestellt.

- **Learned Helplessness Model (LHM)**

Bei diesem Mausmodell werden unkontrollierbare und unvorhersehbare elektrische Fuß- oder Schwanz-Schocks unterschiedlicher Dauer und innerhalb variierender Intervalle von wenigen Sekunden über einen Zeitraum von wenige Tagen beigebracht.²²⁷ Auf diese Weise können depressionsähnliche Symptome evoziert werden wie reduziertes Fluchtverhalten, Verzweiflung und Angst. Ein im Anschluss stattfindender Verhaltenstest wie der FST oder der TST dienen zur Evaluierung der erlerten Hilflosigkeit im Tiermodell.^{228,229}

- **Chronic Mild Stress Model (CMSM)**

Dieses Tiermodell entsteht durch eine kontinuierliche und über mehrere Wochen hinweg erbrachte Konfrontation mit einem milden und unvorhersehbaren Stressor wie z.B. Futterentzug oder Austausch von Käfigkamaraden. Infolgedessen verringern die Tiere allmählich und letztlich langfristig ihren Verhaltensphänotyp, was sich z.B. im reduzierten Konsum einer Saccharoselösung im SPT zeigt. Während im LHM eine spezifische Trennung zwischen depressions- und angstassoziierten Verhalten sich nicht immer eindeutig definieren lässt, verhält sich das CMSM in zwei wichtigen Angstverhaltenstests, dem EPMT und dem sozialen Interaktionstest nicht anders als das Vergleichsmodell.²³⁰

- **Chronic Social Defeat Stress Model (CSDSM)**

Während in den beiden vorausgehenden Mausmodellen der Einfluss von Stress in sozialen Beziehungen nicht im Vordergrund steht, versucht dieses Tiermodell diesen Punkt stärker zu berücksichtigen. Bei diesem Modell wird ein männliches Testtier in den Heimkäfig eines älteren, aggressiven und dominanten männlichen Nagetieres eingeführt. Dabei wird das eingedrungene Männchen von dem anderen Männchen stark angegriffen und besiegt. Nach dieser aggressiven Attacke werden im weiteren Versuchsverlauf beide Männchen durch ein Gitter im Käfig voneinander separiert. Es folgen mehrmalige psychische Attacken durch das dominante Männchen, bis das Testtier nach einigen Versuchstagen so weit prepariert ist, dass es verschiedenen Verhaltenstest unterzogen werden kann. Mit diesem Modell können verschiedene depressionsartige Verhaltensmuster wie Ahedonie, Angst, reduziertes soziale Interaktionsvermögen, verminderte Paarungsbereitschaft oder minimierte Nahrungsmittelaufnahme gepaart mit entsprechenden neurologischen Folgen untersucht werden.^{231,232} Nachteilig bleibt, dass weibliche Versuchstiere nicht auf diese Weise getestet werden können.

- **Forced Swim Test (FST)**

Der Test beruht auf die Beobachtung, dass Nager in einem unentrinnbaren, mit Wasser gefüllten Zylinder so lange fluchtartig Bewegungen vollziehen bis sie in eine immobile und einer von Antriebslosigkeit beherrschten Phase übergehen, bei der sie aber nicht untergehen. Dabei zeigen in vielen Experimenten jene Tiere, die zuvor mit einem Antidepressivum behandelt wurden, eine längere Fluchtreaktion als solche die bspw. mit einem Vehikel behandelt wurden.²³³ Mit dem FST kann ein Screening von verschiedenen Antidepressiva schnell und kostengünstig vollzogen werden.^{234,235}

- **Tail suspension test (TST)**

Dieser Test ermöglicht es wie beim FST die Antriebslosigkeit bei Nagern zu bewerten. Hierzu wird die Maus an der Schwanzspitze mit Kopf in Abwärtshaltung so weit oben befestigt, dass sie sich nicht abstützen kann. Die Versuche, sich aktiv aus dieser Situation zu befreien, gehen mit fortschreitender Testdauer in immobiles Verhalten über. Letztlich wird die Immobilitätszeit gemessen, die bei Gabe von Antidepressiva sich verkürzt. Wie beim FST kann mit diesem Modell in einem zügigen und kostengünstigen Verfahren die Wirksamkeit von Antdepressiva unterschiedlicher Wirkmechanismen beurteilt werden.²³⁶

- **Elevated Plus Maze Test (EPMT)**

Nagetiere halten sich bevorzugt in geschützten, gedeckten und dunklen Bereichen auf und betreten durchaus aus Neugier kurzzeitig helle, offene und sich auf einer Höhe befindende Bereiche. Dieser Test macht sich diese Eigenart zu Nutze und versucht auf diese Weise ein Angsverhalten zu detektieren, dass sich durch eine signifikant verkürzte Aufenthaltszeit im hellen Bereich darstellt. Das Setting besteht aus vier Armen in Form eines Plus das ca. 45 cm über den Boden angeordnet ist. Zwei gegenüberliegende Arme werden durch Wände abgeschirmt. Die verminderte Bereitschaft der Tiere, die offenen Arme zu Betreten gilt als indirektes Maß für Ängstlichkeit. Vorteile bietet der Test in seiner einfachen Ausführung, die ohne unangenehme Stimuli wie z.B. Wasser oder Elektroschocks auskommt.²³⁷

- **Sucrose Preference Test (SPT)**

Für gewöhnlich bevorzugen Nagetiere den Konsum einer Saccharoselösung, mit der eine belohnende Wirkung einhergeht als eine neutrale Trinklösung wie Wasser. Anhand dieser Gegebenheit misst der der SPT Anhedonie bei den Testtieren. Hierzu werden den Tieren zwei Trinkflaschen angeboten, wovon die eine mit Wasser und die andere mit einer niedrig

konzentrierten Saccharoselösung befüllt ist. Der Grad der Bevorzugung des gesüßten Wassers dient als Messwert der Genussfähigkeit (Hedonie).²³⁸

- **Novelty Suppressed Feeding Test (NSFT)**

Dieser Versuch basiert darauf, dass Nager bevor sie beginnen Nahrung zu verzehren ihre Umgebung inspizieren. Dabei unterdrücken sie selbst ein großes Verlangen nach dem Futter bis sie ihre Umgebung frei von Gefahren sehen. Nach einem Futterentzug von einem Tag wird dem hungrigen Tier im NSFT das Angebot gemacht in einem hellen Kompartiment mit Futterstück zu laufen. Bei verstärkter Angst verlängert sich die Latenzzeit bis zum Verzehr des Futters.²³⁹

1.3.4 Die TRPC6 defizitären Mauslinie B6;129S-Trpc6^{tm1Lbi}/Mmjax

Neue technologische Errungenschaften auf dem Feld der Genetik erweiterten den Blick auf neuromolekulare Prozesse in der Pathogenese affektiver Störungen. Ein Meilenstein in der Etablierung von Mauslinien mit modifizierten Zielgenen wurde maßgeblich von den Genetikern Evans, Capecchi und Smithies erbracht. Basierend auf ihre Forschungsarbeiten gelang es ihnen Mitte des letzten Jahrhunderts erstmalig die „KO-Maus“ (Knock-out) mithilfe homologer Rekombination unter Verwendung embryonaler Stammzellen zu kreieren.²⁴⁰ Auf diese Weise konnten zahlreiche Untersuchungen an Target-Genen in vivo durchgeführt werden, deren Rolle im Krankheitsgeschehen der Depression als relevant eingestuft werden. Die Analyse des Verhaltens einer transgenen Maus ist von unerlässlicher Bedeutung und liefert neben wertvollen Informationen über ihren psychischen und physischen Gesundheitszustand gleichwohl Auskunft über die Reliabilität. Zur Identifizierung verschiedener Verhaltensdomänen, die das Gedächtnis und Sozialverhalten betreffen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Mauslinie B6;129S-Trpc6^{tm1Lbi}/Mmjax, bei der es sich um eine von Lutz Birnbaumer und Kollegen entwickelte TRPC6-KO Mauslinie handelt, verwendet.²⁴¹ Veröffentlichte Studienergebnisse mit dieser Mauslinie, die im Rahmen verhaltensexperimenteller Untersuchungen von depressions- und angstähnlichen Verhalten gewonnen wurden, werden im Kapitel 6.5 und 6.6 aufgegriffen.

2. ZIELSETZUNG

In vorausgegangenen Studien konnte demonstriert werden, dass Hyperforin und Hyp-Derivate das Potential besitzen den TRPC6-Kanal selektiv zu aktivieren und durch die Steuerung des Ca^{2+} -Influxes die Eigenschaft haben, antidepressive Effekte in Zellsystemen und Tiermodellen zu evozieren. Bisher konnten aber keine hinreichenden wissenschaftlichen Belege erbracht werden, die nahelegen, dass die Aktivierung des TRPC6-Kanals durch eine direkte Interaktion der genannten Aktivatoren mit bestimmten Aminosäuren oder Strukturelementen erfolgt. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit und aufbauend auf Primärdaten vergangener Arbeiten der Versuch gestartet das potenzielle Bindemotiv von Hyperforin und Hyp-Derivaten zu identifizieren, indem jene in der TRPC3/6/7-Gruppe nicht-konserviert vorliegenden Aminosäuren in der TRPC6- und TRPC3-DNA-Sequenz über eine zielgerichtete Mutagenese gegenseitig ausgetauscht werden. Die daraus entstehenden TRPC6- und TRPC3-Plasmidmutanten werden anschließend nach ihrer transienten Transfektion in HEK293-Zellen einer Expressionskontrolle unterzogen, in den Methoden wie das Fluoreszenzimaging und Western Blot angewendet werden. Für die funktionelle Charakterisierung werden Verfahren wie das Calcium-Imaging zur Bestimmung von Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und elektrophysiologische Messungen zur Dokumentation von Ionenströme nach der Zugabe von Hyperforin angewendet. Wie eingangs erwähnt kann TRPC6 ebenfalls selektiv durch Phloroglucinolderivate wie Hyp1 aktiviert werden. Mit Hyp13 ist eine neue von Hyp1 strukturell hergeleitete Verbindung mit einer zusätzlichen lipophilen Komponente synthetisiert worden, die hinsichtlich ihrer TRPC6-Selektivität und -Effektivität in PC12-Zellen und HEK293-Zellen noch zu charakterisieren gilt. Außerhalb der Untersuchung der Effektivität von Hyp13 in zwei verschiedenen Zellsystemen und des TRPC6-Bindemotives soll diese Arbeit ebenfalls einen Einblick in die Rolle des TRPC6-Kanals in vivo schaffen. In einer tierverhaltensexperimentellen Studie mit männlichen und weiblichen TRPC6-KO Mäusen der Mauslinie B6;129S-Trpc6^{tm1Lbj}/Mmjax soll unter dem Einsatz einer etablierten Verhaltenstestbatterie bestehend aus sieben verschiedenen Einzeltests der Verhaltensphänotyp beschrieben werden. Während für diese Mauslinie bereits ein depressions- und angstähnliches Verhalten gezeigt wurde, werden in der geplanten Testreihe weitere Parameter, die das Verhalten beeinflussen wie Kognition, lokomotorische Aktivität, Sozialverhalten und Geruchspräferenz untersucht.

3. MATERIALIEN UND GERÄTE

3.1 Geräte und Instrumente

Name	Hersteller und Standort
Autoklav: Technoclav 50 6.0	Fedegari Autoclav SPA, Albuzzo (Italien)
Coulter-Zähler: Coultercounter Z2	Beckmann Coulter, Brea (USA)
Elektrodenhalter: EPC10 USB	HEKA Electronics, Lambrecht (Deutschland)
Elektrophorese-Kamm: 10 Taschen	Bio-Rad, München (Deutschland)
Feinwaage: AG 245, max. 210 g	Mettler Toledo, Columbus (USA)
Fluoreszenzmikroskop: Nikon Eclipse A800	Nikon, Düsseldorf (Deutschland)
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat, Eberhardzell (Deutschland)
Gelelektrophorese-Apparatur	Bio-Rad, München (Deutschland)
Glaskapillarenziehgerät: P-1000	Sutter Instrument, Novato (USA)
Hauptverstärker: Amplifier EPC10 USB	HEKA Electronics, Lambrecht (Deutschland)
Heißluftsterilisator	Binder, Tuttlingen (Deutschland)
Inkubator: Hera Cell 150	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Kamera: Clara Interline CCD	Andora, Belfast (UK)
Kamera: Retiga electro CCD	Teledyne Imaging, Tucson (USA)
Kühlschrank	Privileg, Stuttgart (Deutschland)
Lichtmikroskop: Telaval 31	Zeiss, Oberkochen (Deutschland)
LötKolben	Basetech, Winnipeg (Canada)
Magnetrührer	IKA, Staufen im Breisgau (Deutschland)
Mikromanipulator: Remote Control SM7	Luigs & Neumann, Ratingen (Deutschland)
Mikroskop: Olympus BX51WI Fluid Immersion	Olympus, Hamburg (Deutschland)
Mikrovolumen-Spektralphotometer: Nanodrop	Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Mikrowelle: Micromat	AEG, Frankfurt am Main (Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim (Deutschland)
Osmometer	Advanced Instruments, Norwood (USA)
PCR-Thermocycler: Biometra T Gradient	Biometra, Göttingen (Deutschland)
PH-Meter: PHM 62	Radiometer, Kopenhagen (Dänemark)
Pipettierhilfe: Accu-jet pro	Brand, Wertheim (Deutschland)
Polychrom Lampe: Tilluxe PX45 Xenon Lampe	FEI, München (Deutschland)
Polychrom: Tillphotronics, Polychrom V	FEI, München (Deutschland)
Power Pac 300/ Power Pac BasicTM	Bio-Rad, München (Deutschland)
Schüttler: Max Q 4000	Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Schüttler: Rocking Platform	VWR, Radnor (USA)
Short Plates 1,0 mm	Bio-Rad, München (Deutschland)
Spacer Plates 1,0 mm	Bio-Rad, München (Deutschland)
Sterilarbeitsbank: Lamin Air HB 2448	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Tiefkühler (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen (Deutschland)
Tiefkühler (-80°C)	Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Tischzentrifuge: Galaxy Mini	VWR, Radnor (USA)
Transferkammer: Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München (Deutschland)
Ultraschalbad	VWR, Radnor (USA)

Vortexer: Vortex Genie 2TM	Bender & Hobein, Bruchsal (Deutschland)
Vorverstärker: Red Star Headstage EPC10 USB	HEKA Electronics, Lambrecht (Deutschland)
Waage: PB 3002, Delta Range, max. 3100 g	Mettler Toledo, Columbus (USA)
Wasserbad: Köttermann Typ 3042	Köttermann, Uetze-Hänigsen (Deutschland)
Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Zentrifuge: Labofuge 400R Zentrifuge	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Zentrifuge: Universal 320R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen (Deutschland)

Tab. 3: Geräte und Instrumente.

3.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller und Standort
Borosilikat Glas Kapillaren	GB150F-10P, Science Products, Hofheim (Deutschland)
Counter Döschen	Beckman Coulter, Brea (USA)
Deckgläschen Ø 24 mm	PK26.2, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Einmalspritze: 10, 50 mL	B. Braun, Melsungen (Deutschland)
Glasgeräte (Becher, Kolben, Messzylinder)	Schott, Mainz (Deutschland)
Kryoröhrchen: 2 mL	5000-0020, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Lötzinn	648102, Stanol, Wuppertal (Deutschland)
Mikrofilament	MF34G-5, WPI, Friedberg (Deutschland)
Mikroschraubenröhrchen: 1,5 mL	72.692.005, Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Objektträger	160005, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Parafilm	PM-996, Bemis, Neenah (USA)
PCR-Reaktionsgefäße; 200 µl	72.737.002, Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Pipettenspitzen: 10, 200 µl, 1, 5, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
PVDF-Membran	88520, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Reaktionsgefäße: 0,5, 1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Silberdraht	7440-22-4Goodfellow, Bonn (Deutschland)
Silikonschlauch	14204, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg (Deutschland)
Falcon-Röhrchen: 15 mL, 50 mL	227261, Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Zellkulturflaschen	156367, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Zellkulturplatten: 6-well	657160, Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Zellkulturschalen: 6, 10 bzw. 25 cm	639160, Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Zellschaber	541070, Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien.

3.3 Chemikalien, biologische Materialien und Kits

Name	Katalog-Nr., Hersteller und Standort
1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG)	O6754, Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol-d8 (SAG)	sc-220503, Santa Cruz Biotechnology (USA)
4 x SDS-Laemmli buffer	K929.1, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	17874, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Bacto Agar	214030, BD, Mississauga (Canada)
Bacto Tryptone	211705, BD, Mississauga (Canada)
Bisacrylamid	3029.1 Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Bovine serum albumin	T844.3, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Bradford Reagenz	5000006, Bio-Rad, München (Deutschland)
CaCl ₂	10043-52-4, Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Chemilumineszenz Reagenz	RPN2236, GE Healthcare, München (Deutschland)
CsCH ₃ O ₃ S	C1426, Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
CsCl	7647-17-8 Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
DH5α Escherichia coli	18265017, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Dimethylsulfoxid	A994.1, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Dpnl	R0176S, New England Biolabs, Frankfurt am Main (Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium	41965039, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
ECL-Reagenz	RPN2236, GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Effectene	301425, Qiagen, Hilden, (Deutschland)
Eindeckmittel	P36983, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Ethanol	K928.4, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure	CN06.3, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Fetal Bovine Serum	10500-064, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Fura-2AM	F1201, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Giemsa	T862.1, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Glucose-Monohydrat	6887.1, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Glycerol	G5516, Sigma Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Glycin	0079.3, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
H ₂ SO ₄	Chemikalienausgabe Pharmazie/Uni Mainz (Deutschland)
Hanks Balanced Salt	H4891, Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
HCl	Chemikalienausgabe Pharmazie/Uni Mainz (Deutschland)
Hefeextrakt	APPCA1552.1000, VWR, Radnor (USA)
HEPES	H3375, Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Hyp1	Dr. Kevin Schwickert, Uni Mainz (Deutschland)
Hyp13	Dr. Kevin Schwickert, Uni Mainz (Deutschland)
Hyperforin	Dr. Willmar Schwabe, Karlsruhe (Germany)
KCl	2675.291, VWR, Radnor (USA)
KH ₂ PO ₄	6878.1, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Methanol	P717.1, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
MgCl ₂ -Hexahydrat	2189.1, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
NaCl	27810.295, VWR, Radnor (USA)

NaCl-Lösung 0,9 %	8607.2, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
NaH ₂ PO ₄	K300.2, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
NaOH	Chemikalienausgabe Pharmazie/Uni Mainz (Deutschland)
Opti-MEM	51985034, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
PageRuler Plus Prestained Marker	26619, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Penicillin/Streptomycin	15140122, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Phenylmethylsulfonylfluoride	10837091001, Sigma Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Plasmid Maxipräp Kit	D4202, Zymo Research, Freiburg im Breisgau, (Deutschland)
Plasmid Minipräp Kit	D4209, Zymo Research, Freiburg im Breisgau, (Deutschland)
Pluronic-F127	P6866, Thermo Fischer Scientific, Waltham (USA)
Poly-L-lysine	P2636, Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Polymerase	KK2101, Roche, Mannheim (Deutschland)
Protease inhibitor	04693159001, Roche, Mannheim (Deutschland)
Sodium dodecyl sulphate	CN30.2, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
TEMED	2367, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Tris	5429.3, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Tris-HCl	9090.3, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Triton X-100	3051.4, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Tween 20	9127.2, Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Venor GeM Classic	11.1025, Minerva Biolabs, Berlin (Deutschland)

Tab. 5: Chemikalien, biologische Materialien und Kits

3.4 Testsubstanzen

Testsubstanz	Lösungsmittel	Stock-Konzentration
Hyperforin	DMSO	50 mM
Hyp1	DMSO	50 mM
Hyp13	DMSO	50 mM
OAG	DMSO	100 mM
SAG	DMSO	100 mM

Tab. 6: Testsubstanzen.

3.5 Antikörper

Name	Hersteller und Standort
Anti-mouse	A1978, Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Anti-rabbit	7074P2, Cell Signaling, Frankfurt am Main (Deutschland)
β-actin	A197, Sigma Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
TRPC3	D4P5S, Cell Signaling, Frankfurt am Main (Deutschland)
TRPC6	ACC-017, Alomone Labs, Jerusalem (Israel)

Tab. 7: Antikörper.

3.6 Plasmide

Vektor	Insert	Ursprung
pcDNA3.1 (+)	DN-hTRPC6-eYFP	Laborbestand AK Friedland
pcDNA3.1 (+)	eYFP	Laborbestand AK Friedland
pcDNA3.1 (+)	hTRPC3-eYFP	Laborbestand AK Friedland
pcDNA3.1 (+)	hTRPC3LLKL-eYFP	Laborbestand AK Friedland
pcDNA3.1 (+)	hTRPC6-eYFP	Laborbestand AK Friedland
pcDNA3.1 (+)	hTRPC6IMRI-eYFP	Laborbestand AK Friedland

Tab. 8: Plasmide.

3.7 Zellen

Linie	Spezies	Ursprung
HEK293	Homo sapiens	Universitätsklinikum Tübingen
PC12	Rattus norvegicus	Laborbestand AK Friedland

Tab. 9: Zellen.

3.8 Tiere

Linie	Spezies	Ursprung
B6;129S-Trpc6 ^{tm1Lbi} /Mmjax	Mus musculus	Jackson Laboratory
B6;129S	Mus musculus	Jackson Laboratory
C57BL/6JRj (BL6)	Mus musculus	Janvier-labs

Tab. 10: Tiere.

3.9 Puffer und Lösungen

SOC-Medium	
Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	10 mM
Aqua bidest. H ₂ O ad	100 mL

LB-Medium, pH=7,00	
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Aqua bidest. H ₂ O ad	1 L

LB-Medium mit Agar, pH=7,00	
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Bactoagar	15 g
Aqua bidest. H ₂ O ad	1 L

RIPA-Puffer	
1 M Tris-HCl, pH 7,4	1,25 mL
1 M NaCl-Lösung	3,75 mL
Triton-X100	250 µL
Na-Deoxycholat	0,125 g
20 % SDS	0,125 g
0,5 M EDTA	0,25 mL
Aqua bidest. H ₂ O ad	25 mL

Trenngel 8 %	
H ₂ O	2,025 mL
30 % Bisacrylamid	1,3 mL
1,5 M Tris pH 8,8	1,3 mL
20 % SDS	0,025 mL
10 % APS	0,05 mL
TEMED	0,003 mL

Sammelgel	
H ₂ O	0,685 mL
30 % Bisacrylamid	0,17 mL
1,5 M Tris pH 8,8	0,13 mL
20 % SDS	0,005 mL
10 % APS	0,01 mL
TEMED	0,001 mL

Proteinproben für Western Blot	
Protein	20 µg
4 x SDS-Laemmli buffer	6 µL
Aqua bidest. H ₂ O ad	25 µL

Laufpuffer	
Tris	3,03 g
Glycin	14,4 g
SDS	1 g
Aqua bidest. H ₂ O ad	1 L

Transferpuffer mit SDS	
Tris	3,03 g
Glycin	14,4 g
SDS	1 g
Methanol	200 mL
Aqua bidest. H ₂ O ad	1 L

BSA-Lösung (5 %)	
BSA	0,5 g
TBST (0,1 %) ad	10 mL

TBST-Puffer 0,1 %	
Tris	2,42 g
NaCl	8,78 g
Aqua bidest. H ₂ O ad	700 mL
> pH 7,5 mit konzentrierter HCL	
Tween 20	1 mL
Aqua bidest. H ₂ O ad	1 L

TBST-Puffer 0,5 %	
Tris	2,42 g
NaCl	8,78 g
Aqua bidest. H ₂ O ad	700 mL
> pH 7,5 mit konzentrierter HCL	
Tween 20	5 mL
Aqua bidest. H ₂ O ad	1 L

Membran Stripping-Lösung	
100 mM 2-mercaptoethanol	0,8 mL
20 % SDS	10 mL
62,5 mM Tris-HCL	6,25 mL
Aqua bidest. H ₂ O ad	100 mL

Extrazellulärlösung; pH=7,4; 310 – 320 mOsm	
135 mM NaCl	3,944 g
2 mM CaCl ₂	110,9 mg
5 mM KCl	186,4 mg
2,14 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	217,5 mg
11 mM Glucose x 1 H ₂ O	1,090 g
10 mM HEPES	1,192 g
Aqua bidest. H ₂ O ad	500 mL

Intrazellulärlösung; pH=7,4; 300 – 310 mOsm	
130 mM CsCH ₃ O ₃ S	2,964 g
10 mM CsCl	168,4 mg
4,27 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	86,81 mg
10 mM HEPES	238,3 mg
Aqua bidest. H ₂ O ad	100 mL

HBSS-Puffer, pH=7,4	
HEPES	2,38 g
CaCl ₂	111 mg
MgSO ₄	120,4mg
Hanks Balanced Salt solution	1 Pkt.
Aqua bidest H ₂ O ad	1L

PBS-Puffer, pH=7,4	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
NaH ₂ PO ₄	1,78 g
KH ₂ PO ₄	0,23 g
Aqua bidest H ₂ O ad	1L

Tab. 11: Puffer und Lösungen.

3.10 Software

Name	Hersteller und Standort
Biorender	https://biorender.com
Fiji ImageJ 1.52i	National Institutes of Health, MD (USA)
GraphPad PRISM 9.0	GraphPad Software, San Diego (USA)
Heka Fitmaster	HEKA Electronics, Lambrecht (Deutschland)
Heka Patchmaster	HEKA Electronics, Lambrecht (Deutschland)
Igor Pro	Wavemetrics, Tigard, USA
Live Aquisition 2.0	FEI Munich
Microsoft Office Power Point 2016	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft Office Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
NIS Elements	Nikon, Tokio (Japan)
Observer XT 13	Noldus, Wageningen (Niederlande)
Ocular 2.0	Teledyne Photometrics, Tucson (USA)
Snapgene	GSL Biotech LLC, San Diego (USA)

Tab. 12. Software.

4. METHODEN

4.1 Zellen

4.1.1 PC12-Zellen

PC12-Zellen wurden ursprünglich aus dem Phäochromozytom, einem Tumor im Nebennierenmark, von Ratten isoliert, von Greene und Tischler 1976 weiter kultiviert und als neue Zelllinie, die auf den Nervenwachstumsfaktor NGF (nerve growth factor) reagiert, etabliert.²⁴² Phänotypisch sind diese Zellen gekennzeichnet durch ihr adhärentes Wachstum auf beschichteten Oberflächen, die Neigung zu aggregieren und eine polygonale Morphologie einzunehmen. Obwohl PC12-Zellen aus dem Phäochromozytom stammen, wurden sie in der Vergangenheit umfassend auf ihr Neuronen-ähnliches Verhalten untersucht. So stimuliert die Zugabe von NGF ihre Ausdifferenzierung mit Bildung von funktionalen Synapsen, die dazu befähigt sind untereinander und selbst mit anderen Neuronen sich zu verknüpfen und zu kommunizieren.²⁴³ Zudem evoziert NGF die Produktion von Synapsin 1, ein Protein, das in der Synaptogenese und synaptischen Plastizität involviert ist.²⁴⁴ Bedingt durch die endogene Produktion von Rezeptoren und Ionenkanälen werden PC12-Zellen zusätzlich zur Prüfung der Sekretion von Neurotransmittern und zur Messung von intrazellulären Ionenkonzentrationen angewendet.

4.1.2 HEK293-Zellen

HEK293-Zellen (human embryonic kidney 293 cells) bilden eine Zelllinie, die ihren Ursprung in menschlichen embryonalen Nierenzellen hat. Sie wurden im Jahr 1973 von Frank Graham im Labor von Alex Van der Eb in Leiden (Holland) durch die Transformation von HEK-Zellen mit DNA-Bruchstücken des Adenovirus 5 erzeugt. Dabei sind 4,3 Kilobasen des viralen Genoms in das humane Chromosom 19 der Nierenzellen eingebaut worden.²⁴⁵ Die Zahl 293 führt auf den 293igsten Transformationsversuch von Frank Graham zurück. HEK293-Zellen sind vergleichsweise zu PC12-Zellen weniger zirkulär geformt, wachsen semi-adhärent auf beschichteten Oberflächen und zeichnen sich durch eine relativ hohe Teilungsrate (Verdopplung der Zellzahl nach 36 Stunden) aus. Neben CHO-Zellen (Zellen aus Ovarien des chinesischen Hamsters), HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen des Zervixkarzinoms) sind sie in der Biotechnologie ein häufig eingesetztes Zellmodell und eignen sich besonders aufgrund ihres guten Transformationsvermögens als heterologes Expressionssystem für verschiedene Gen- und Proteinprodukte. Modifizierte HEK293-Zellen Varianten wie beispielsweise

die HEK293-T Zelllinie (exprimiert das Simian Virus 40 (SV40) large T Antigen) eignen sich beispielsweise zur Produktion hoher Titer viraler Genvektoren, die in der Gentherapie zum Einsatz kommen.²⁴⁶ In der Erforschung von strukturellen und funktionellen Eigenschaften exogener Rezeptoren und Ionenkanälen erweisen sich HEK293-Zellen ebenfalls aufgrund ihrer hohen Transfektionseffizienz und damit verbundenen Überexpression des gewünschten Zielproteins als nützliches zelluläres System. Obgleich es sich bei HEK293-Zellen um Nierenzellen handelt, spiegeln sie durch die Synthese von Neurofilamenten typischen Proteinen und 61 mRNAs neuronaler Proteine die Facette eines neuronalen Phänotyps wieder, der vermutlich durch die Aktivität viraler Onkogene und anschließender Expression neurogener Transkriptionsfaktoren hervorgerufen wurde.²⁴⁷

4.2 Zellkultur

4.2.1 Kultivierung

Die PC12-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Medium (DMEM) auf Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Dem Medium wurden 10 % hitzeinaktiviertes Kälberserum (fetal calf serum, FCS), 5 % Pferdeserum (horse serum, HS), 50 µg/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Penstrep) zugesetzt. HEK293-Zellen wurden in DMEM auf Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Das Medium beinhaltet zusätzlich 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 50 µg/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin. Nach allen drei bis vier Tagen wurden die Zellen passagiert. Hierbei wurde nach Abnahme des Mediums die Zellen mit frischem und temperiertem Medium von der Zellkulturschale abgelöst, mit einer serologischen Pipette separiert, die entstandene Zellsuspension in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt und bei -4 °C und 1000 rpm fünf Minuten (Min.) lang zu einem Zellpellet herunterzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in frisches und temperiertes Medium durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und die Zellen abschließend in eine neue Zellkulturschale nach Bestimmung der erforderlichen Zellzahl überführt.

4.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) ermittelt. Hierzu wurden während des Passagierens das Zellpellet in 1 mL DMEM-Medium resuspendiert und aus der Zellsuspension 10 µl entnommen und mit 90 µl 0,5%ige Trypanblaulösung versetzt sowie vermengt. Für die anschließende Zellenzählung unter dem Lichtmikroskop wurde diese Mischung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die durch das Trypanblau dunkel gefärbten Zellen wurden bei der

Zählung zwecks geschädigter Permeabilitätsfunktion der Plasmamembran nicht berücksichtigt. Hingegen wurden die ungefärbten Zellen, durch die das Trypanblau nicht in das Zellinnere diffundiert war, aus allen vier großen Quadranten gezählt und der Mittelwert gebildet. Die genaue Zellzahl ergab sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \text{Mittelwert Quadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10 \times \text{Kammerkonstante} \times 10^4$$

4.2.3 Kryokonservierung

Eine langfristige Lagerung wurde wie folgt erzielt. Das überschüssige Medium aus einer ca. 80 - 90 % konfluent bewachsenen Zellkulturplatten in der Passage drei oder vier wurde abgenommen und die Zellen wie unter dem Punkt 4.2.1 bis zum Schritt des Herunterzentrifugieren der Zellsuspension behandelt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (90 % FCS und 10 % DMSO in Raumtemperatur) resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl von zwei Millionen Zellen pro Kryoröhrchen (Auffangvolumen 2 mL) wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren und nach drei Tagen im flüssigen Stickstoff konserviert.

4.2.4 Auftauen der Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem Stickstofftank eine Min. im Wasserbad (37 °C) und unter Schwenken aufgetaut. Daraufhin wurde die Zellen mit einer serologischen Pipette aufgenommen und vorsichtig in ein mit 10 mL Medium (RT) gefülltes Flacon-Röhrchen geträufelt. Diese Zellsuspension wurde bei -4 °C und 1000 x rpm 5 Min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert.

Die gebildete Zellsuspension wurde in eine Zellkulturschule pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 Stunden inkubiert bis am nächsten Tag die Zellen gesplittet und in die Passage 1 überbracht wurden.

4.2.5 Mykoplasmen-Test

Um eine Beeinträchtigung der Zellvitalität hinsichtlich des Wachstums, des Metabolismus und der Lebensdauer durch Mykoplasmen (parasitierende Bakterien der Klasse Mollicutes) zu vermeiden, wurden die Zellen einem Mykoplasmen-Test unterzogen. Hierzu wurde der 100 µL Überstand der Zellkultur 10 Min. lang bei 100 °C inkubiert (Inaktivierung) und für die Extraktion der DNA

weiterverwendet. Mittels PCR und das Mitführen einer intern Positiv- und Negativkontrolle aus dem Mykoplasmen-Kit wurden die PCR-Fragmente elektrophoretisch getrennt und qualitativ auf das Vorhandensein von Mykoplasmen untersucht.

4.3 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese (Site Directed Mutagenesis, SDM) ist eine spezielle PCR-basierte Methode, die angewendet wird, um eine oder mehrere Basen in der DNA auszutauschen (Substitution), einzubringen (Insertion) oder zu entfernen (Deletion) mit dem Ziel eine strukturelle oder funktionelle Manipulation des Genproduktes herbeizuführen. Für die Konstruktion der hTRPC6-Mutante 777IMRI780 und der hTRPC3-Mutante 708LLKL711 wurde eine Substitution von vier benachbarten Aminosäuren im C-terminalen Teil beider Ionenkanalsequenzen vorgesehen. Jedes Insert war in einem pcDNA3.1(+) Plasmidvektor eingebaut und am C-Terminus mit dem Fluoreszenzmarker eYFP (enhanced yellow fluorescent protein) getaggt. Für das Design von sense und antisense Oligonukleotide (Primer) wurden zunächst die Nukleotidsequenzen von hTRPC6 und hTRPC3 auf den Internetseiten der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information of the Institute of Health, USA) recherchiert und im Programm Snapgene aufgerufen. Damit eine hinreichende Ausbeute des PCR-Produkts erreicht werden konnte wurden beim Primerdesign folgende Kriterien berücksichtigt: ein G/C-Gehalt (Guanin/Cytosin-Gehalt) von 40 - 60 %, eine Mindestbasenlänge von 18 Basenpaaren (basepair, bp), eine Schmelztemperatur (melting temperatur, T_m) unterhalb der Denaturierungstemperatur und die Lokalisation der ausgetauschten Basen nahe des 5'-Endes. Zur Reduktion von möglichen Fehlpaarungen und geringer PCR-Produktausbeute wie sie z.B. durch eine Hybridisierung der Primer untereinander auftreten können, wurde beim Primerdesign zusätzlich auf eine nicht vollständig überlappende Anordnung der Primer geachtet.

Primer für hTRPC6-Mutante 777IMRI780 (5' → 3')	
Vorwärts	TCTGGTGCCGAGTCCAAAGTCCCTGTTTTATCTCATAATGCGCATTAAAAAATGG ATTCTGAGCTGTTCCAGGGCC
Rückwärts	GCTCAGAAATCCATTTTTTAATGCGCATTATGAGATAAAACAGGGACTTTGGACT CGGCACCAGATTGAAGGGTACAGG
Primer für hTRPC3-Mutante 708LLKL711 (5' → 3')	
Vorwärts	GTTTATTTCTCCTGAAACTTGTTAACTTTCCCAAATGCAGAAGGAGAAG
Rückwärts	TGGAAAGTTAACAAGTTTCAGGAGGAAATAAACAAATGATTTTGGACTAGG

Tab. 13: Primer für die Mutanten hTRPC6IMRI-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP.

4.4 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur exponentiellen Vervielfältigung (Amplifikation) minimaler Mengen an Nukleinsäure. Prinzipiell werden in einer Amplifikation (= Zyklus) drei Schritten durchlaufen, wobei unterschiedliche Temperaturen die entsprechenden Schritte einleiten. Anfänglich findet eine Denaturierung bei hohen Temperaturen (98 °C) statt bei der die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge durch das Brechen von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basen separiert wird. Daraufhin kann am 5'- oder 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs der DNA ein kommerziell erhältliches oder für z.B. Mutationen ein eigen konzipiertes mindestens 18 bp langer Primer binden (Annealing). Bei diesem Schritt ist die Temperatur abhängig von der Schmelztemperatur T_m , die zur Hybridisierung des Primers an die DNA erforderlich ist. In der Elongationsphase bindet eine Taq-DNA-Polymerase (aus dem thermostabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus*) bei ihrem Temperaturoptimum von 72 °C an den Primer und startet von dort aus die Verlängerung eines neuen DNA-Stranges (500-1000 bp) entlang des DNA-Leitstranges durch die Katalyse von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs) in die 3' Richtung. Die Wiederholung dieses Vorgangs erfolgt in 25 bis 30 Zyklen bis sich im Anschluss ein finaler Extensionsschritt anreicht in dem noch partiell verlängerte DNA-Produkte vervollständigt werden, um die durch die zunehmende Zyklenzahl abnehmende Aktivität der Taq-DNA-Polymerase zu regulieren.

4.4.1 Herstellung eines PCR-Reaktionsansatzes und Ablauf der PCR

Die Herstellung des PCR-Reaktionsansatzes erfolgte auf Eis. In einem PCR-Tube wurde zunächst die Plasmid-DNA von hTRPC6 bzw. hTRPC3 und aqua bidest. H₂O vorgelegt bis danach mit Ausnahme der Polymerase alle weiteren Komponenten hinzu pipettiert wurden. Die für die Synthese der hTRPC6 und hTRPC3-Mutanten eingesetzten Primer sind in der Tabelle 13 gelistet. Nachdem der vorläufige Ansatz zwei Sekunden lang gevortext und herunterzentrifugiert wurde kam zum Schluss die Polymerase hinzu, um durch mechanische Kräfte sie in ihrer enzymatischen Aktivität nicht zu schädigen. Für die Negativkontrolle wurde anstatt Plasmid-DNA aqua bidest. H₂O dem PCR-Mix zugefügt. Die fertigen Ansätze wurden in den Thermocycler verbracht. Damit die PCR starten konnte wurde ein Programm mit bestimmten Temperatur- und Zeitangaben im Thermocycler eingestellt.

Komponenten im PCR-Reaktionsmix	
- Plasmid-DNA (20 ng// μL)	1 μL
- Sense Primer (10 pmol/ μL)	1 μL
- Antisense Primer (10 pmol/ μL)	1 μL
- KAPA HiFi Fidelity Buffer (5X)	5 μL
- KAPA HiFi GC Buffer (5X)	1 μL
- MgCl_2 (25 mM)	1 μL
- KAPA dNTP Mix (10 mM pro dNTP)	0,75 μL
- KAPA HiFi DNA Polymerase (1 U/ μL)	1 μL
- Aqua bidest. H_2O ad	25 μL

Tab. 14: Konzentrations- und Volumenangaben der Reagenzien für einen PCR-Reaktionsansatz.

Reaktionsschritt		Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	105 °C	2 Min.
2	Denaturierung	98 °C	15 Sek.
3	Annealing	65 °C	30 Sek.
4	Elongation (90 Sek. / kbp)	72 °C	8 Min.
5	Wiederholung des Zyklus (Reaktionsschritt 2 bis 4)		30 x
6	Finale Extention	72 °C	10 Min.
7	Pause	-4 °C	∞

Tab. 15: PCR-Protokoll mit Reaktionsschritten sowie zugehörigen Temperatur- und Zeitangaben.

4.4.2 DpnI Restriktionsverdau des PCR-Produktes

Das gewonnene PCR-Produkt beinhaltet die Plasmid-DNA von hTRPC6 bzw. hTRPC3 sowie die neu synthetisierte Plasmid-DNA der Mutante hTRPC6IMRI bzw. hTRPC3LLKL. Um die Plasmid-DNA der jeweiligen Mutante weiterverwenden zu können, musste diese zuvor von der elterlichen Plasmid-DNA getrennt werden. Die elterliche Plasmid-DNA besitzt bedingt durch ihre Isolation aus DH5 α -Bakterien ein spezifisches Methylierungsmuster. An dieser Stelle kommt das Restriktionsenzym DpnI, zum Einsatz, das methylierte Adenin Basen in der Sequenz: 5'-GATC-3' erkennt und diese DNA spaltet. Der Mix für den Restriktionsverdau wurde nach dem Protokoll des Anbieters NEB (New England Biolabs, USA) zusammengestellt, eine Stunde lang bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und im Anschluss im Kühlschrank bis zur Retransformation aufbewahrt.

4.5 Transformation und Plasmid Präparation

Damit die einzelnen Plasmid-DNA-Fragmente im PCR-Produkt zu zirkulären Plasmiden legiert und vervielfacht werden konnten, wurde auf ein effizientes heterologes Expressionssystem aus kompetenten DH5 α -Bakterien aus dem Stamm *Escherichia coli* (*E. coli*) zurückgegriffen. Anfänglich wurden die Bakterien 30 Min. lang auf Eis inkubiert. Entsprechend dem Heat-Shock-Verfahrens wurden 50 μ L kompetente DH5 α -Bakterien mit 10 μ L PCR-Produkt vermischt und für 20 Sek. bei 42 °C in einen Heizblock gestellt, um durch das kurzzeitige Aufbrechen der Bakterienzellwand eine Transformation des PCR-Produktes in das Bakterium zu erzwingen. Anschließend wurde die mit 950 μ L SOC-Medium, einem Nährmedium zur Steigerung der Transformationseffizienz, versetzt. Die Mischung wurde für eine Stunde bei 37 °C auf den Schüttler (250 rpm) gestellt, damit die Bakterien beim Ablesen der Plasmid Sequenz eine Resistenz gegenüber Ampicillin (Selektionsmarker) erwerben konnten. Von diesem Ansatz wurde 150 μ L auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 35 °C in den Inkubator gestellt. Am nächsten Tag wurden Klone erfolgreich transfizierter Bakterien gepickt und 20 Stunden lang in jeweils 100 mL LB-Medium, das kurz zuvor mit Ampicillin (100 mg/mL) versetzt wurde, zur Erhöhung der Bakteriendichte bei 37 °C geschüttelt. Vor der Isolation der Plasmide aus der Übernachtskultur stand noch ihre Kryokonservierung bevor. Es wurden Glycerin-Stocks angelegt und im Tiefkühlschrank bei -80 °C gelagert. Dazu wurden 750 μ L der frischen Flüssigkultur mit 250 μ L Glycerinlösung homogenisiert und zügig eingefroren. Nach der Kryokonservierung wurde die verbliebene Übernachtskultur 10 Min. lang bei -4 °C und 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Bakterienzellextrakt mit Reagenzien aus einem kommerziell erhältlichen Minipräpkit behandelt und insgesamt nach den Vorgaben im Herstellerprotokoll verfahren bis die Plasmid-DNA rein und von jeglichen Bakterienzellresten befreit vorlag. Die Konzentration der extrahierten Plasmid-DNA wurde photometrisch am Spektralphotometer durch die Messung der Absorption im UV-Bereich bei 260 nm und 280 nm nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ermittelt. Zusätzlich wurde die Reinheit bestimmt und als Quotient A260/A280 dargestellt. Ein Quotient von 1,8 – 2,0 entsprach dabei einer reinen, extrahierten DNA während Werte < 1,8 als ein Hinweis auf Verunreinigungen gewertet wurden. Abschließend erfolgte eine Aliquotierung der Plasmid-DNA und Lagerung bei -20 °C.

4.6 Sequenzierung der TRPC3/6-Mutanten

Um zu gewährleisten, dass nach der zielgerichteten Mutagenese es zu keinen weiteren unerwünschten Mutationen in der Basenabfolge kommt, wurden die Protein-codierenden DNA-Abschnitte der Plasmide sequenziert. Die Ablesung der Nukleotidsequenz erfolgte nach der von Sanger 1977 entwickelten Methode mittels eines automatisierten Sequenzierers.²⁴⁸ Die Sequenzierung begann mit einer Amplifikation der DNA unter Verwendung von individuell designten Primern (Tab. 16) einer DNA-Polymerase und fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotiden. Die Leseweite einer einzelnen Sequenzierung lag bei maximal 200 bp was bei einem Insert mit fast 1000 bp wie im Falle von TRPC3/6 mehrere Sequenzierungen erforderlich machte. Nach der Amplifikation wurden die Proben auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt, während die Fluorophore der Nukleotide per Laser angeregt und ihre Fluoreszenz-Signale detektiert wurden. Das Ergebnis der Sequenzierung lag im Anschluss in Form eines vierfarbigen Elektropherogramms vor und wurde für ein Alignment mit der hTRPC6 oder hTRPC3 Basissequenz herangezogen. Folgende Tabelle listet alle verwendeten Sequenzierungsprimer in der 5' → 3' Laufrichtung auf:

hTRPC6			
Vorwärts Primer (5' → 3')		Rückwärts Primer (5' → 3')	
V1	GGGAGAAGGTTAGCTAATCGAGG	R1	GAGTCCATGAGCAGATAGTCCTG
V2	GAAATTGTGCATACCCTCCTGC	R2	TCATCTTGCTGGAGTTCAGACTG
V3	GGTCAAGTTCCTTGTGGTCCTTG		
V4	TGTGAAATACTACAATTTGGCCAGG		
V5	GGAAATTGAGGATGACGCTGATG		
V6	TCTCAGAATACAGAAGACCTAGCAG		

hTRPC3			
Vorwärts Primer (5' → 3')		Rückwärts Primer (5' → 3')	
V1	CATCCCTGAGACGCATGACAG	R1	GTTCTGGCCCATGTAGTCCAC
V2	TACGTGCGCATCGTAGAGG		
V3	TCTCTGCCGAGACTCAGAAGAG		
V4	GGGTTCTTGAATGATGTGGTC		
V5	TGCTGCTTTTACCACTGTAGAAG		
V6	CAGCCAACACGTTATCAGCAG		

Tab. 16: Sequenzierungsprimer für hTRPC3/6 Plasmid-DNA.

4.7 Transiente Transfektion

Für eine zeitlich begrenzte Expression der (un-)modifizierten Kanalproteine und des Fluoreszenzproteins eYFP (Kontrolle, ctl) in PC12-Zellen oder HEK293-Zellen wurde eine transiente Transfektion durchgeführt. Hierbei kommt es im Vergleich zu einer stabilen Transfektion nicht zu einem Einbau der Fremd-DNA in das Wirtsgenom. Zunächst wurden Deckgläschen (\varnothing 24mm) in jedes Well einer 6-Well-Platte eingesetzt und mit einer 0,01 % Polylysin-Lösung beschichtet. Nach 20 Min. wurde die überschüssige Polylysin-Lösung entfernt, jedes Deckgläschen drei Mal hintereinander mit 2 mL autoklavierten aqua bidest. H₂O gewaschen und luftgetrocknet. Danach wurden pro Well 200 000 PC12-Zellen oder 100 000 HEK293-Zellen in 2 mL Vollmedium ausgesät. Zwischen 20 bis 24 Stunden vor der Zugabe der Plasmid-DNA wurde das Medium durch frisches Medium ausgetauscht und anschließend ein Transfektion-Mix hergestellt, der pro Well aus 1 μ g Plasmid-DNA, 100 μ L Opti-MEM® und 2 μ L Effectene® bestand. Nach einer 10-minütigen Inkubation des Transfektion-Mixes im Brutschrank bei 37 °C wurde dieser vorsichtig auf die Zellen getropft. PC12-Zellen wurden 48 Stunden und HEK293-Zellen 24 Stunden nach der transienten Transfektion experimentell weiterverwendet.

4.8 Calcium-Imaging

4.8.1 Fluorometrische Messung der intrazellulärer Ca²⁺ -Konzentration

Um die Funktionalität und Aktivität der zu charakterisierenden Ionenkanäle zu prüfen, wurde die Calcium-Imaging Methode angewendet. Hierbei können mithilfe eines ionensensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Veränderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration hinsichtlich Intensität und Eintrittszeitpunkt detektiert werden. Als Fluoreszenzindikator mit vorteilhaften Eigenschaften in puncto Fluoreszenzstabilität, Bindungsaffinität gegenüber Ca²⁺-Ionen und Membranpermeabilität hat sich in zahlreichen zellbiologischen Anwendungen der Stoff Fura-2AM erwiesen. Fura-2AM ist an fünf Acetoxymethylester (AM) gebunden und kann in dieser lipophilen Strukturform durch die Membran passiv in den intrazellulären Raum diffundieren. Dort angekommen werden die Acetoxymethylester durch unspezifische Esterasen abgespalten und geladene Carboxylgruppen freigelegt, die Ca²⁺ in einem Chelat-Komplex binden. Der Übergang von Fura-2AM zu Fura-2 führt zusätzlich durch die strukturbedingte Zunahme der Polarität zum Verbleiben des Fluoreszenzfarbstoffes innerhalb der Zelle. Über eine alternierende Bestrahlung der Zelle mit UV-Licht der Wellenlänge 340 nm (Absorptionsmaximum Ca²⁺-freies Fura-2) und 380 nm (Absorptionsmaximum Ca²⁺-gebundenes Fura-2) kann das reflektierende Licht durch einen

Emissionsfilter (510 nm) geleitet und über eine CCD-Kamera detektiert werden. Das Messergebnis wird als Verhältnis der resultierenden Fluoreszenzintensitäten (F340/F380) dargestellt und verhält sich proportional zur vorliegenden intrazellulären der Ca^{2+} -Konzentration.

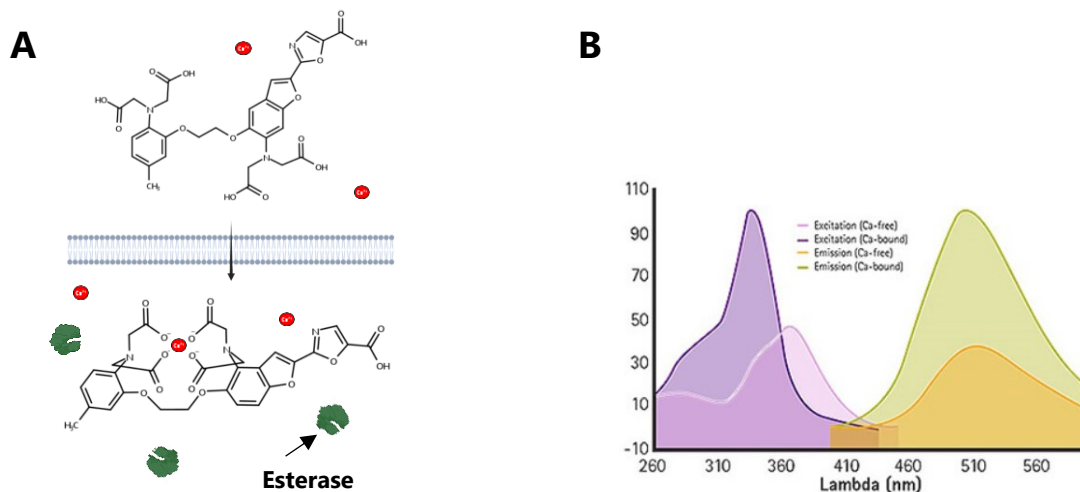


Abb. 16: Der Fluoreszenzindikator Fura-2AM. (A) Fura-2AM Struktur oben im freien Zustand und unten nach der hydrolytischen Abspaltung der Acetoxymethylester-Gruppen durch unspezifische Esterasen im Zytosol und Komplexierung mit Ca^{2+} im gebundenen Zustand. (B) Absorptions-/Emissionsspektrum von Fura-2 im Ca^{2+} freien und Ca^{2+} gebundenen Zustand.

4.8.2 Beladung und Messung von PC12- und HEK293-Zellen mit Fluoreszenzindikator Fura-2AM

Das Vollmedium wurde aus den Wells (Vertiefungen) abgesaugt und die Zellen mit 1 mL/Well HBSS-Puffer versetzt. Hinzu kamen 25 μL einer Mixtur bestehend aus 2 μM Fura-2AM, 10 μL Pluronic und 160 μL FBS. Nach einer 40 Min. langen Inkubation bei Dunkelheit wurde die überschüssige Lösung abpipettiert und es folgte ein dreifacher Waschschriff mit 2 mL HBSS bis die Zellen für 30 Min. in 2 mL/Well HBSS inkubiert wurden, wo sich ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulären Fura-2AM einstellen konnte. Anschließend wurden die präparierten Deckgläschen in eine Messkammer eingespannt und 450 μL HBSS hinein pipettiert. Die fluorometrische Messung der Ca^{2+} -Ionenkonzentration erfolgte in einer Calcium-Imaging Apparatur, die sich aus einem Olympus BX51WI Immersions-Mikroskop mit Probenkammer, Polychromator mit Kontrolleinheit, CCD-Kamera und einem Computer zusammensetzt.

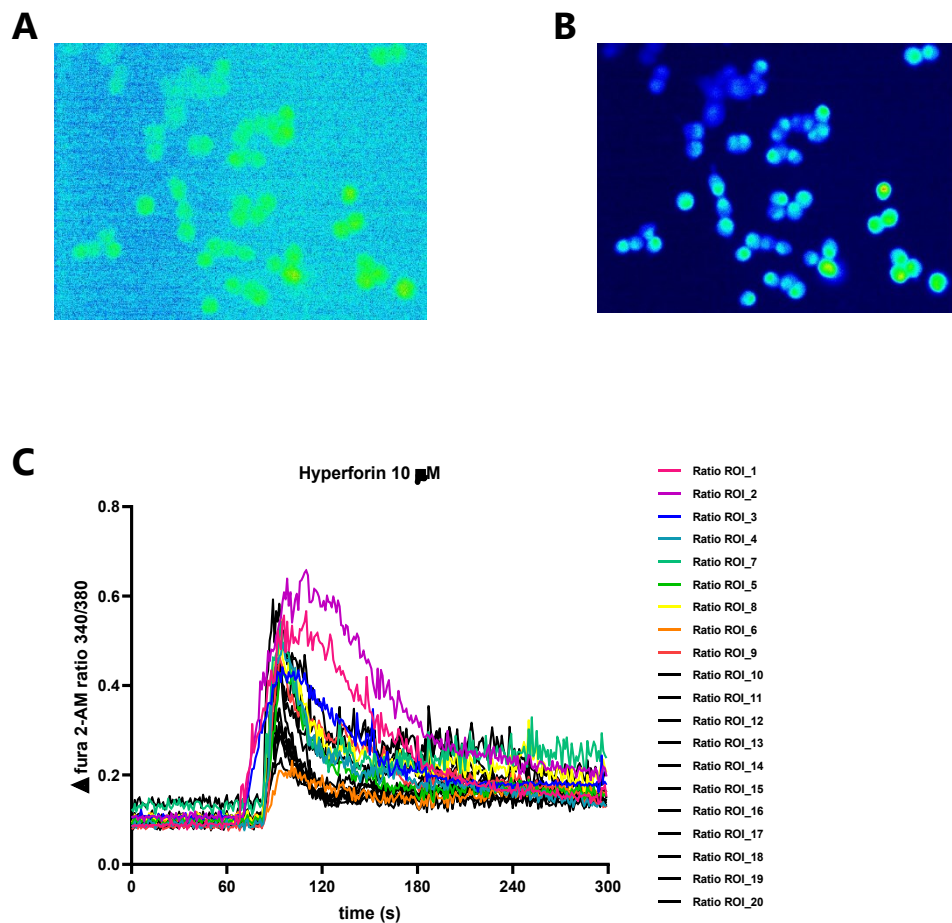


Abb. 17: Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit der Calcium-Imaging-Apparatur am Beispiel von PC12-Zellen. (A) Videoausschnitt der Fura-2 beladenen Zellen bei 340 nm (B) und bei 380 nm. (C) Signalkurven des Fura-2-AM Verhältnisses 340/380 einzelner Zellen innerhalb von 300 Sek.. 60 Sek. nach der Zugabe des Aktivators Hyperforin ($10 \mu\text{M}$) erfolgte eine Signalzunahme, die nach dem Erreichen des Signalmaximums allmählich abflachte.

Die Messung der Exzitation und Emission erfolgte nach dem im Unterpunkt 4.8.1 beschriebenen Prinzip der Fluoreszenzmessung. Vor dem Start der Messung wurde das zu messende Areal jeder einzelnen fluoreszierenden Zelle durch ein ROI (Region of Interest) abgegrenzt und zur Minimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses mit einem Background-ROI in Bezug gesetzt. Bevor die Zugabe der Testsubstanz erfolgte, wurden in den ersten 60 Sek. die intrazellulären basalen Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen aufgenommen. Zellen, die mit eYFP getaggten Plasmiden erfolgreich transfiziert waren, wurden durch eine Exzitation bei 513 nm identifiziert und für die Auswertung berücksichtigt.

4.9 Western Blot

4.9.1 Prinzip

Die Western Blot-Analyse ist eine molekularbiologische Methode, die das gewünschte Protein aus einem Proteingemisch nach einer elektrophoretischen Trennung dauerhaft auf eine Trägermembran fixiert und nach einer antikörperbasierten Behandlung identifizierbar und quantifizierbar macht. Die Entwicklung dieses auch als „Immunoblotting“ bezeichneten Verfahrens nahm seinen Anfang in den späten 1970er Jahren in den Laboratorien von Robert Nowinski und George R. Stark.²⁴⁹ Heute zählt der Western Blot zu den meistverwendeten proteinanalytischen Methoden und sticht vordergründig durch seine schnelle und einfache Umsetzbarkeit hervor. Die Trennung der einzelnen Proteine aus einem Proteinlysate orientiert sich nach ihrem Molekulargewicht und ihrer Ladung. Diese beiden Parameter sowie der Acrylamid-Prozentsatz, der die Gelstruktur maßgeblich beeinflusst, entscheiden über die elektrophoretische Mobilität der Proteine im elektrischen Feld. Dabei erlaubt die bei der Probenvorbereitung stattfindende Denaturierung und Beladung der Proteine mit dem anionischen Tensid Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) eine Wanderung der Proteine von der Kathode (Minuspole) in Richtung Anode (Pluspol). Der darauffolgende Proteintransfer wird durch das Blotting des proteinbeladenen Gels auf eine Trägermembran ermöglicht. In Abhängigkeit von der Proteingröße und dem lipophilen/hydrophilen Proteincharakter wird hierbei bevorzugt auf Trägermaterialien wie Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) zurückgegriffen. Nach einer kontinuierlichen Inkubations- und Waschprozedur mit spezifischen Primär- und Sekundärantikörpern können im letzten Reaktionsschritt über verschiedene Wege die Proteinbanden detektiert werden. Chemolumineszenz-Substrate wie ECL (enhanced chemiluminescence) reagieren mit HRP (horseradish peroxidase) konjugierten Sekundärantikörpern. Das Enzym HRP katalysiert unter der Einwirkung von H_2O_2 die Oxidation von Luminol und ruft bei Bestrahlung mit UV-Licht eine Lumineszenzreaktion hervor, die von einer CCD-Kamera aufgenommen wird.

4.9.2 Herstellung von Proteinlysate und Proteinkonzentrationsbestimmung

Die verwendeten Proteinlysate wurden aus (un-)transfizierten HEK293-Zellen gewonnen. Nach Abzug des Vollmediums wurden die Zellen drei Mal hintereinander mit gekühltem PBS-Puffer gewaschen und auf Eis gestellt. Mit einem Schaber wurden die Zellen vom Plattenboden abgelöst und es folgte eine 30-minütige Inkubation im Lysepuffer RIPA (50 μ L/Well) dem zuvor noch 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) frisch zugesetzt wurde. Anschließend wurde das Zellgemisch bei 10 000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der proteinreiche Überstand in ein 1,5 mL Tube überführt. Daraus

wurden 10 μL für die Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen und der verbleibende Ansatz von 40 μL mit 4 μL Protease Inhibitor (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) aliquotiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die quantitative Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mit dem Bradford-Test. Bei dieser photometrischen Methode kommt es zwischen dem Protein und dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau zu einer Komplexbildung, die zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (ungebundene Form) zu 595 nm (gebundene Form) führt. Über die ermittelte Extinktion bei 595 nm kann schließlich im Spektralphotometer die Proteinkonzentration im Extrakt ermittelt werden.

4.9.3 Gießen der Polyacrylamid-Gele

Das Polyacrylamid-Gel wurde in eine aus Spacer- und Shortplate (Deckplatte) zusammengesetzten Einheit, die in eine Multi Casting Chamber des Mini PROTEANTM Tetra Cell Systems eingespannt war, gegossen. Die erste Gelschicht bildete das feinporige Trenngel. Dabei wurden der Mischung der Radikalstarter APS (Ammoniumpersulfat) und der Katalysator TEMED (Tetramethylethylendiamin) zum Ende hinzugegeben, um eine vorzeitige Polymerbildung des Trenngels zu verhindern. Nachdem das Gemisch zwischen die Glasplatten pipettiert wurde, wurden noch über das noch flüssige Trenngel 200 μL Isopropanol geschichtet, sodass die Oberfläche geglättet und von Luftblasen befreit war. Eine Stunde später war das Trenngel auspolymerisiert und es folgte die Herstellung des grobporigen Sammelgels, das danach über das Trenngel gegossen wurde. Zusätzlich wurde ein Trennkamm (10 Taschen; 1,0 mm Dicke) eingesetzt. Nach einer Wartezeit von ca. 30 Min. war das diskontinuierliche Gel vollständig ausgehärtet und wurde abschließend in feuchtes Zellulosepapier eingewickelt und maximal für 2 Wochen im Kühlschrank bei $2 - 8\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

4.9.4 Versuchsdurchführung

Die Proteinlyseextrakte wurden aus dem $-80\text{ }^\circ\text{C}$ Gefrierschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurde ein Proben-Mix bestehend aus 20 μg Proteinmenge, 6 μL 4 x SDS-Laemmli Puffer und Aqua bidest H_2O mit einem Endvolumen von 25 μL hergestellt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben 10 Min. im brodelnden Wasser ($100\text{ }^\circ\text{C}$) erhitzt und kurz herunterzentrifugiert. Das Gel wurde in eine Mini PROTEAN Tetra Cell Electrophoresis Module Kammer eingespannt, die wiederum mit einem Laufpuffer aufgefüllt wurde. Anschließend folgte die Befüllung der Geltaschen, die ein Fassungsvermögen von 30 μL besaßen, mit den entsprechenden Proben. Um die Proteinbanden bei der Analyse einer bestimmten Größe zuordnen zu können, wurden eine Geltasche noch mit 6 μL PageRuler Plus Prestained Größenmarker beladen. Die Elektrophorese wurde bei -80 Volt gestartet

und alsbald die Proben an der Trennlinie zwischen Sammelgel und Trenngel angelangt waren, wurde die elektrophoretische Spannung auf 120 Volt erhöht. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden diese auf eine mit Methanol konditionierte PVDF-Membran in einer Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell mit Transferpuffer übertragen. Im nächsten Schritt wurde zur Sättigung unspezifischen Proteinbindungsstellen die Trägermembran mit BSA-Lösung (5 %) 1 Stunde lang bei Raumtemperatur behandelt. Danach wurde die Trägermembran drei Mal hintereinander mit TBST-Puffer (0,5 %) gewaschen und über Nacht eine Hälfte der Trägermembran (mit Proteinen größer als 75 kDa) mit dem primären monoklonalen Anti-TRPC6 Antikörper (ca. 130 kDa) in der Verdünnung von 1:1000 und der zweite Teil der Trägermembran (mit Proteinen kleiner als 75 kDa) mit Anti- β -Actin Antikörper in der Verdünnung von 1:2000 bei 4 °C inkubiert. Am Tag darauf wurde der primäre monoklonale Anti-TRPC6 Antikörper und der Anti- β -Actin Antikörper abgenommen und die Trägermembrane drei Mal mit TBST-Puffer (0,5 %) gewaschen und mit dem HRP gekoppeltem Sekundärenantikörpern (Anti-rabbit bei TRPC6 und Anti-mouse bei β -Actin) für eine Stunde bei Raumtemperatur konjugiert. Im Anschluss erfolgte ein weiterer 3-schrittiger Waschgang bei dem danach die Trägermembran in TBST-Puffer (0,1 %) gelagert wurde. Für die Detektion der Proteinbanden wurde die Trägermembran mit der Western Blot ECL Detektion Reagenz 4 Min. lang unter leichtem Schwenken inkubiert und danach am Gel Dokument Imager aufgenommen. Die densitometrische Analyse der Proteinbanden wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ durchgeführt. Dabei erfolgte eine Normierung der Proteinbanden auf das Housekeeping-Protein β -Actin (ca. 42 kDa). Um weitere relevante Proteine auf der gleichen Trägermembran zu detektieren, wurde diese dann 30 Min. mit Stripping-Puffer bei 50 °C inkubiert. Nach drei Waschgängen mit TBST-Puffer (0,5 %) wurde die Trägermembran mit dem monoklonalen Anti-TRPC3 Antikörper (ca. 130 kDa) in der Verdünnung von 1:1000 über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer (0,5 %) für eine Stunde bei Raumtemperatur in eine Lösung mit dem HRP gekoppelten sekundären Anti-rabbit Antikörper in der Verdünnung 1:10.000 inkubiert. Schließlich wurde die Trägermembran erneut gewaschen und nach einer Behandlung mit ECL Detektion Reagenz die Proteinbanden am Gel-Dokumentationssystem detektiert.

4.10 Elektrophysiologie

Die Patch-Clamp-Technik wurde erstmals 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann in einer Arbeit über die Aktivität einzelner Ionenkanäle im Froschmuskel beschrieben und revolutionierte durch die Echtzeitmessung von Ionenströme an der Zellmembran die Forschung auf dem Gebiet der Elektrophysiologie.²⁵⁰ Auf diese Weise wurde es möglich minimale Ströme von etwa 1 pA durch

einzelne Ionenkanäle darzustellen sowie ihre funktionellen und strukturellen Eigenschaften näher zu untersuchen.

4.10.1 Messkonfigurationen

Im Prinzip wird bei diesem Messverfahren zunächst eine Mikropipette genauer eine Glaskapillare aus Borsilikat, die mit einer Ag^+/AgCl -Elektrode versehen ist und eine Spitzenöffnung von ca. 1-2 μm Durchmesser aufweist, mit einer Elektrolytlösung der sog. Intrazellulärlösung aufgefüllt. Unter Verwendung eines Mikromanipulators wird die Mikropipette mit der Zelloberfläche in Kontakt gebracht bis die Glasöffnung einen Membranfleck (Patch) dicht (Seal) umschließt. Dieser Vorgang ist durch eine Zunahme des elektrischen Widerstandes um mehrere Gigaohm ($\text{G}\Omega$) gekennzeichnet und soll eine rauscharme Aufnahme des Ionenkanalstroms durch die Minimierung von Leckströmen sicherstellen. Mit dem Aufbau des sogenannten „Gigaseals“ durch eine elektrische Isolation eines Membranbezirkes (ca. 1-2 μm^2) von der verbleibenden Membranfläche ist die sogenannte Cell-Attached-Konfiguration erreicht. Dabei handelt es sich um eine Messanordnung, bei der die Komposition des Zytosols weitestgehend unverändert bleibt. Sie eignet sich vordergründig für Fragestellungen, die sich auf die Effekte intrazellulärer Botenstoffe oder Komponenten, die die elektrische Aktivität von Ionenkanälen beeinflussen können, fokussieren. Um alternativ zur Einzelkanalstrommessungen bei intakten Zellen den Ionenstrom durch die gesamte Zellmembran (Ganzzellstrom) registrieren zu können, kann die Whole-Cell Konfiguration angewendet werden. Hierbei wird durch ein kurzes stoßartiges Ansaugen des Membranflecks unterhalb der Mikropipettenspitze die Zelle aufgebrochen. Folglich fließen die in der Mikropipette vorliegende Intrazellulärlösung und das Cytoplasma der Zelle ineinander, bis sich zwischen beiden Lösungen ein Elektrolytgleichgewicht eingestellt hat. Gleichzeitig fällt durch den Wegfall des Membranwiderstandes der Mikropipettenwiderstand auf Werte unter dem Gigaseal ab. Sämtliche elektrophysiologischen Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, fanden im Whole-Cell Modus statt. In der Inside-out Konfiguration, können Einzelkanalstrommessungen umgesetzt werden, bei der die intrazelluläre Domäne eines Ionenkanals in einer Elektrolytlösung mit definierter Zusammensetzung außerhalb der Zelle untersucht wird. Hierbei wird die Mikropipette nach dem Erreichen des Cell-Attached-Modus ruckartig von der Zelle entfernt, wodurch der Membranpatch an der Mikropipettenöffnung haften bleibt. Bei der Outside-out Konfiguration rückt die extrazelluläre Seite des Ionenkanals in den Mittelpunkt. Anders als bei der Inside-out Anordnung erfolgt das Herbeiführen der Outside-out Konfiguration erst nachdem die Zelle wie in der Whole-Cell Konfiguration durch einen Unterdruck rupturiert wurde. Das augenblickliche Entfernen der Mikropipette bewirkt, dass Teilstücke der Membran an der Spitze haften bleiben und sich dann

verbinden, sodass letztlich durch die Membrnumkehr die extrazelluläre Domäne des Ionenkanals in direkter Verbindung mit der Elektrolytlösung in der Messkammer steht. Somit ergibt sich über die Outside-out Konfiguration eine weitere Möglichkeit Einzelkanalstrommessungen vorzunehmen.

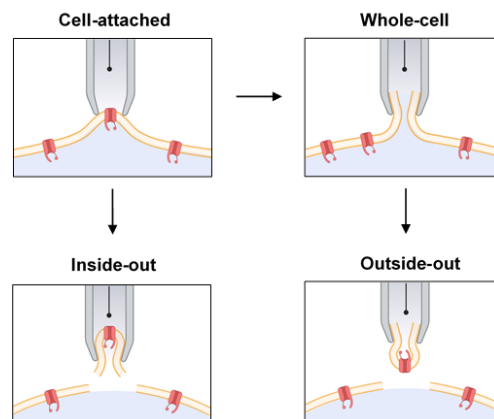


Abb. 18: Patch-Clamp-Messkonfigurationen.

4.10.2 Messverfahren in der Whole-Cell-Konfiguration

Auf einem Glasplättchen kultivierte PC12-Zellen, transfizierte PC12-Zellen oder transfizierte HEK293-Zellen wurden in eine mit 800 μL Extrazellulärlösung gefüllte Badkammer eingespannt, die daraufhin in den Strahlengang des Mikroskops platziert wurde. Die Patch-Clamp-Apparatur stand auf einer unter Druckluft betriebener schwingungsdämpfenden Tischplatte zwecks Vermeidung der durch Vibrationen auslösenden Störsignale. Des Weiteren war der Messplatz von einem Faraday'schen Käfig umschlossen, um ihn vor elektrostatischen Kräften abzuschirmen. Im Falle von transfizierten Zellen wurden ausschließlich solche gewählt, die durch das monochromatische Licht des Polychromators im Wellenlängenbereich für YFP angeregt wurden und separat von den benachbarten Zellen vorlagen. Die Visualisierung der anvisierten Zelle erfolgte mittels einer an das Mikroskop angeschlossene CCD-Kamera und das Programm Ocular. Bevor die Messung beginnen konnte, wurde eine Glaskapillare für die Mikropipette, die unmittelbar vor dem Versuch am Glaskapillarenziehgerät (Mikropipetten-Puller) hergestellt wurde, mit der Intrazellulärlösung befüllt und an den Elektrodenhalter befestigt. Durch das Erzeugen eines Überdrucks wurden vermeintliche Luftblasen und Mikropartikel aus der Mikropipettenspitze herausgelöst, die sonst den Aufbau eines hochohmigen Seals verhindert hätten. Die Mikropipette wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators vorsichtig auf die Zelloberfläche gesetzt bis der Widerstand zwischen Zellmembran und Mikropipette (Zugangswiderstand, R_s) auf Gigaseal Werte gestiegen ist. Daraufhin wurde nach der Whole-Cell Konfiguration die Zellmembran geöffnet,

wodurch der Zugangswiderstand zurück auf Werte im $M\Omega$ -Bereich fiel. Nachdem sich der Zugangswiderstand eingependelt hat, wurde die Membrankapazität (C_m) der Zelle überprüft um in der Datenauswertung lediglich intakte Zellen, bei denen eine Membrankapazität zwischen 5 und 12 pF lag, zu berücksichtigen. Die Membrankapazität verhält sich proportional zur Membranfläche und bestimmt gemeinsam mit dem Membranwiderstand die Membranzeitkonstante, die darauf hinweist, wie schnell das Membranpotential auf einen Ionenfluss reagiert.²⁵¹ Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der durch die Zugabe der Agonisten resultierende Veränderung des Ionenstroms, wurden die Versuche im Voltage-Clamp Modus durchgeführt. Hierbei resultierten sog. Strom-Spannungskurven (I/V-Kurven), die sowohl vor dem Messstart zur Aufzeichnung der basalen Ionenströme als auch nach der Applikation von 200 μ L eines Agonisten protokolliert wurden. Um den Ionenstromfluss abzubilden wurden mehrere Spannungsrampen von +100 mV bis -100 mV ausgehend von einem Haltepotential bei 0 Volt hintereinander induziert. Durch die Spannungsklemmtechnik wurde über die Badelektrode die Membranspannung registriert und mit der durch die Spannungsrampe vorgegebenen Spannung verglichen während mittels der Messelektrode Abweichungen der Membranspannung durch kompensierende Ströme, die in die Zelle eingespeist wurden, ausgeglichen wurden. Für die Aufzeichnung, Darstellung und Speicherung der Strom-Spannungsbeziehung bedurfte es die zwei elektronischen Komponenten Vorverstärker (Headstage) und Hauptverstärker (Amplifier), die gemeinsam über das Programm Patchmaster kontrolliert wurden.

4.10.3 Prinzip des Verstärkers

Die Aufgabe des Verstärkers im Voltage-Clamp Modus beruht auf die Abgleichung der Membranspannung mit dem Haltepotential bzw. Kommandopotential (U_K). Weicht diese z.B. durch die Aktivierung von Ionenkanälen und die damit verbundene Veränderung der Membranleitfähigkeit ab, so wird die Differenz durch eine Injektion einer definierten Stromdosis (Kompensationsstrom) über die Messelektrode neutralisiert, damit das Kommandopotential eingehalten wird. Dieser aus einem Schaltkreis resultierende Rückkopplungsmechanismus kann anhand eines Schaubildes wie folgt illustriert werden:

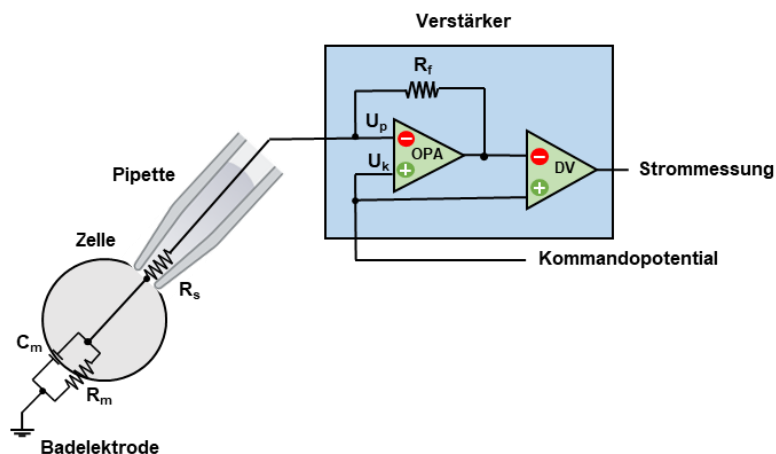


Abb. 19: Schematische Darstellung eines Patch-Clamp-Verstärkers und Schaltkreises. C_m = Membrankapazität, R_m = Membranwiderstand, R_s = Zugangswiderstand, R_f = Rückkopplungswiderstand, OPA, = Operationsverstärker, DV = Differentialverstärker. (Abb. modifiziert nach Yobas et al., 2013)²⁵²

Wesentlich Komponenten des Vorverstärkers bilden die beiden parallelgeschalteten Elemente Operationsverstärker (OPV) und Rückkopplungswiderstand (R_f). Der OPV ist ein elektronisches Bauteil mit einem Eingang für das Pipettenpotential (U_p) und einem weiteren für das Kommandopotential (U_k). Im Falle einer Differenz zwischen beiden Potentialen entsteht am Ende des OPV über den Rückkopplungswiderstand ein Kompensationsstrom, der in die Messelektrode weitergeleitet wird. Dabei wird so lange ein Stromfluss generiert, bis das Pipettenpotential und das Kommandopotential gleich groß sind. Die Potentialdifferenz zwischen Pipettenpotential und Kommandopotential wird zusätzlich dem Differentialverstärker (DV) des Hauptverstärkers zugeführt, woraus durch eine Differenz zum Kommandopotential eine Strom-Spannungsbeziehung abgeleitet wird, die am Bildschirm des Oszilloskops sichtbar gemacht werden kann.

4.11 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mäuse, die im Rahmen der Verhaltensexperimente verwendet wurden, erfolgt mit der PCR-Methode, die von einer Labormitarbeiterin ausgeführt wurde. Hierbei wurde aus Ohrstanzen zunächst die DNA lysiert. Die PCR wurde danach in einem Thermocycler durchgeführt. Für jede Gewebeprobe wurden zwei PCR-Reaktionen gefahren mit einem Primerpaar für TRPC6-WT-spezifische Fragmente der DNA und mit einem Primerpaar für TRPC6-KO-spezifische Fragmente der DNA. Wurde die DNA von beiden Primerpaaren amplifiziert, so lag eine heterozygote Maus vor. Auf

dem Agarosegel wurde die Qualität des PCR-Ergebnisses zusätzlich mittels einer positiven Kontrolle und einer Leerprobe (PCR-Probe ohne DNA, Negativkontrolle) überprüft. Die verwendeten Primer wurden aus der Website des Jackson Labors für die Genotypisierung des TRPC6-WT Maus-Stammes B6;129 und des TRPC6-KO Maus-Stammes B6;129S-Trpc6tm1Lbi/Mmjax entnommen (Tab. 17) und vor ihrer Verwendung im Programm Snappgene mit der murinen TRPC6 DNA-Sequenz und der Phosphoglyceratkinase (PGK) Promoter-Sequenz aligned (Abb. 20). Die von Dietrich et al. 2017 gezüchtete Mauslinie B6;129S-Trpc6tm1Lbi/Mmjax weist im Vergleich zur WT-Maus eine lückenhafte Phosphoglyceratkinase (PGK)-Neokassette auf, wodurch das Ablesen der TRPC6-Nukleotidsequenz während der Proteinbiosynthese unterbrochen wird.

mTRPC6-WT und -KO Primer			
WT Primer 5' → 3'		KO Primer 5' → 3'	
Vorwärts	TCT TTA TGC AAT CGC TGT GG	Vorwärts	TCT ATT AAC ACT CAA CTG GCA CCT
Rückwärts	GCT AGT CTT CCT GCA ATC CA	Rückwärts	GCC AGA GGC CAC TTG TGT AG

Tab. 17: Primer Paare für die Genotyp Bestimmung von TRPC6-WT und -KO Mäusen.



Abb. 20: Alignment von TRPC6-WT und TRPC6-KO Primer Paaren mit der DNA-Sequenz von mTRPC6 und der PGK-Promotor-Sequenz. Primer sind als Pfeile dargestellt. (A) Vorwärts und Rückwärts Primer binden an einen Abschnitt der mTRPC6-KO DNA-Sequenz. (B) Vorwärts Primer bindet an einen mTRPC6-WT DNA-Sequenzabschnitt im Exon 7 und Rückwärts Primer an die modifizierte PGK-Promotorsequenz.

4.12 Tierverhaltensexperimente

Um den Verhaltensphänotyp der TRPC6-KO Maus zu charakterisieren, wurden basierend auf der Veröffentlichung von Jene et al. eine Verhaltenstestbatterie durchgeführt.²⁵³ Innerhalb drei bis vier Stunden wurden von den Tieren multiple Verhaltensexperimente stets in der gleichen Reihenfolge und getrennt von 15-minütigen Intervallphasen durchlaufen. Die Wahl dieser Verhaltenstestbatterie soll eine möglichst stressarme und konzentrierte Untersuchung verschiedener verhaltensrelevanter Domänen, wie die Erinnerung an und das Erkennen von Objekten und Räumen, angstassoziiertes Verhalten, Geselligkeit und Geruchspräferenz innerhalb eines kurzen Zeitraumes gewährleisten. Die Apparaturen und Objekte wurden regelmäßig mit 5%iger EtOH-Lösung gereinigt, um zu verhindern, dass die Tiere Markierungen hinterlassen, an denen sie sich naturgemäß nach Ablauf der Prätestphase und Intervallphase orientieren, was zu falschen Messergebnissen führen würde. Folgendes Schaubild fasst die angewendeten Verhaltensexperimente (detaillierte Beschreibung siehe hierzu Abschnitt 4.12.5 ff.) und ihre Abfolge zusammen:

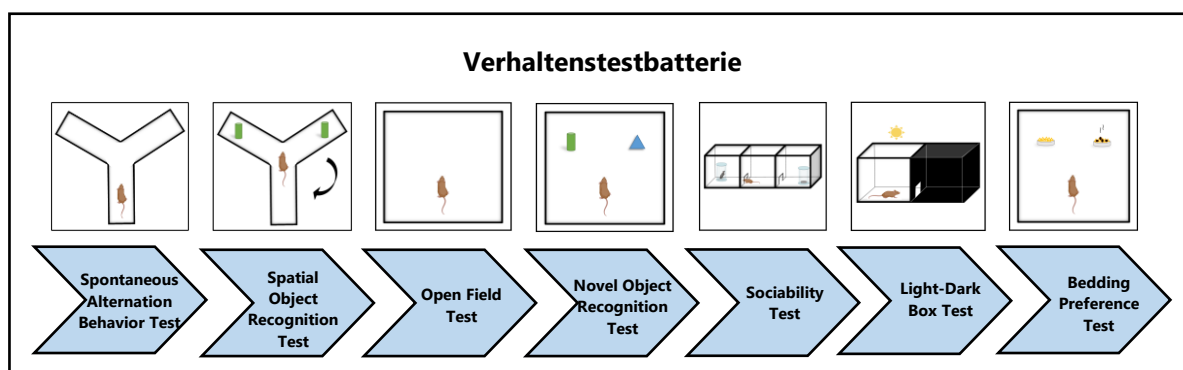


Abb. 21: Schematische Abbildung der Verhaltenstestbatterie nach Jene et al. Schaubild mit den genannten Verhaltensexperimenten und chronologischer Ablauf.

4.12.1 Die Zucht der B6;129S-Trpc6^{tm1Lbi}/Mmjax Mauslinie

Inzucht-Mauslinien nehmen einen festen Platz in der Tierforschung ein. Durch die Kreuzung von zwei unterschiedlichen Mauslinien mit manipuliertem Genom und anschließender Verpaarung von i.d.R. mindestens 20 Geschwistergenerationen können Züchter einen stabilen Verhaltensphänotyp etablieren, der als Modell für die Erforschung von verschiedensten Erkrankungen dienlich sein kann. Ein erfolgreich etablierter Inzuchtstamm zeichnet sich durch keine auffälligen Veränderungen im Wachstum, Konstitution, Fertilisation und Lebensdauer im Vergleich zur ursprünglichen Maus aus. Dietrich et al. etablierten im Jahr 2005 erstmals eine transgene TRPC6-KO Mauslinie genauer die

B6;129S-Trpc6tm1Lbi/Mmjax Mauslinie. Hierzu wurde ein Klonierungsvektor mit einer Neomycin-Resistenzkassette designt, der an das Exon 7 des TRPC6-Gens bindet. An dieser Position löst der Klonierungsvektor einen vorzeitigen Leserastersprung mit einem Abbruch der Translation aus, so dass durch den Verlust der Transmembransegmenten 4 und 5 und ein Teil der Porenregion kein funktionsfähiges TRPC6 Protein mehr gebildet werden konnte. Dieses Konstrukt wurde in 129Sv/SvEv abgeleiteten embryonalen EK.CCE-Stammzellen (ES) per Elektroporationsverfahren eingeschleust und transfizierte ES in Blastozysten einer weiblichen C57BL/6J Maus injiziert. Die chimären Nachkommen wurden über eine Generation mit C57BL/6J Mäusen gekreuzt. Die daraus entstandenen Nachkommen mit 129Sv:C57BL/6J genetischen Hintergrund konnten in der Folgezeit nach mehrfacher Verpaarung erfolgreich reinerbige und mischerbige Individuen mit dem entsprechenden Genotyp TRPC6 +/+, TRPC6 -/- und TRPC6 +/- hervorbringen. Einen eindeutigen phänotypischen Unterschied zwischen der TRPC6-KO und TRPC6-WT Maus, was vordergründig die Fertilisation und Wurfgröße betrifft, konnten A. Dietrich et al. für die TRPC6-KO Maus nicht feststellen.

4.12.2 Versuchstiere und Haltung

Die Verhaltensversuche fanden in den Mouse Behaviour Unit (MBU)-Räumlichkeiten des Translational Animal Research Centers (TARC) der Universitätsmedizin Mainz über einen Zeitraum von 8 Monaten statt. Es wurden männliche und weibliche Mäuse der Stämme B6;129S-Trpc6tm1Lbi/Mmjax (TRPC6-KO) und B6;129S (TRPC6-Wildtyp) im Alter von 9 bis 13 Wochen aus der Zucht im TARC für die Verhaltensexperimente verwendet. Zuvor wurden die Tiere ab der 4. Woche nach der Geburt genotypisiert. Dabei wurden Tiere mit einem heterogenen Genotyp für die künftige Züchtung der nachkommenden Generation miteinander verpaart und darauf geachtet, dass sie von unterschiedlichen Elternpaaren stammen. Alle im Experiment verwendeten Mäuse, wurden nach dem Transport aus der spezifiziert Pathogen-freien (SPF) Haltung zwei Wochen lang einzeln in der MBU akklimatisiert und gleichzeitig nach Geschlechtern räumlich separiert. Die männlichen Tiere wurden direkt in den Versuchsraum transportiert, während die Weibchen bis zum Versuchsbeginn in einem Haltungsraum verweilten und eine Stunde vor Versuchsbeginn zur Akklimatisierung an die neue Umgebung in den Versuchsraum gebracht wurden. Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Tiere ein letztes Mal in einen anderen Käfig mit frischer Einstreu, Nestmaterial, Futter und Wasser umgesetzt, damit eine hinreichende Eingewöhnung an die Ausstattung im Heimkäfig gewährleistet war. Der Versuchsraum befand sich in der MBU. Alle Tiere wurden einzeln in Plexigalkäfigen (30 x 20 x 14 cm) unter Standardbedingungen gehalten (12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus, Beleuchtungsstärke ca. 50 Lux, 22 ± 2 °C Raumtemperatur, 55 ± 10 % Luftfeuchtigkeit, Wasser und Futterpellets ad libitum). In allen Versuchen und Videoanalysen war der Experimentator gegenüber dem Genotyp der

Tiere verblindet. An jedem Versuchstag wurden parallel vier Tiere getestet. Die Zuteilung der Tiere in jeweils eine Kabine erfolgte randomisiert. Es wurde zusätzlich darauf geachtet, dass die Anzahl zwischen Test- und Kontrolltieren ausgeglichen war. Die Testboxen befanden sich in einer Kabine, die von außen durch einen schwarzen Vorhang blickdicht abgeschirmt werden konnte, damit während des Versuchs keine Störfaktoren von außen (Experimentator, benachbarte Testbox und weitere visuelle Reize im Raum) auftraten. Die gesamte Ausstattung wurde gründlich und vor jeder Nutzung mit einer 5%igen EtOH-Lösung gereinigt. Die Haltung, Pflege und Handling erfolgten gemäß der Guideline Directive 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und Europarats zum Schutze von Tieren für Forschungszwecke. Das Versuchsvorhaben wurde im Vorfeld beim Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz beantragt und genehmigt.

4.12.3 Cupping, Überprüfung der Vitalität und neurologischer Reflexe

Vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere an drei aufeinanderfolgenden Tagen im Rahmen des Handlings an die Zusammenarbeit mit dem Experimentator gewöhnt, indem sie täglich für 2 Min. von der Hand locker umschlossen wurden (cupping). Des Weiteren wurde innerhalb dieses Zeitraumes der Allgemeinzustand der Versuchstiere untersucht. Hintergrund ist, dass körperliche Anomalien oder Krankheiten die Performance des Versuchstiers fälschlicherweise beeinflussen können, die es im Vorfeld zu erkennen und zu vermeiden galt. Es existieren eine Reihe verschiedener Vorgehensweisen neurologische Reflexe zu beobachten wie z.B. Augenblinzeln, Zucken der Ohren und der Tasthaare bei Berührung oder das Ausstrecken der Vorderpfoten, sobald die Maus von einer Höhe der Tischplatte genähert wird. Letzteres wurde in dieser Arbeit einmal täglich durchgeführt, um die visuelle Funktion und Beweglichkeit sicherzustellen. Gesunde Tiere können die Tischplatte rechtzeitig sehen und beginnen dann ihre Vorderpfoten auszustrecken, um sicher darauf zu landen. Die Vitalität der Mäuse wurde durch die tägliche Messung ihres Körpergewichts beurteilt. Eine signifikante Abnahme des Körpergewichts kann ein Hinweis auf eine mögliche Erkrankung oder erhöhtes Stressempfinden sein. Zudem wurde dadurch kontrolliert, ob zwischen TRPC6-WT und TRPC6-KO Mäusen der gleichen Alterswoche und Geschlechtsdifferenzen vorlagen, die ebenfalls die Messergebnisse verzerren hätten können.

4.12.4 Bestimmung des Östruszyklus weiblicher Versuchstiere

Um einen möglichen Einfluss des weiblichen Hormonstatus auf den Ausgang der Verhaltenstests in Betracht zu ziehen, wurde bei den Mäusen unmittelbar nach dem Beenden der Testreihe ein Vaginalabstrich durchgeführt. Prinzipiell wird bei Nagetieren der ca. fünf Tage andauernde Östruszyklus in vier Phasen eingeteilt, die wiederum anhand bestimmter dominierender Zellarten in der Uterusschleimhaut definiert werden. Im Proöstrus liegen vermehrt kernhaltige Endothelzellen vor und nur vereinzelt Keratinozyten, im Östrus sind lediglich Keratinozyten vorhanden, im Metöstrus erscheinen vorrangig Keratinozyten und Leukozyten neben wenigen kernhaltigen Endothelzellen und im Diöstrus treten mehrheitlich Leukozyten und kernhaltige Endothelzellen auf.²⁵⁴ Bei der Präparation des Vaginalabstriches wurde zunächst mit einem handelsüblichen Wattestäbchen, das zuvor in eine 0,9%igen isotonischen NaCl-Lösung eingetaucht wurde, die Vaginalschleimhaut entnommen, auf ein Glasplättchen übertragen und etwa ein Tag lang getrocknet. Am folgenden Tag wurde über den Vaginalabstrich eine 5%ige Giemsea-Lösung getropft, 20 Min. lang gewartet, die überschüssige Färbelösung abgezogen und die verbleibende Färbelösung mit Aqua bidest H₂O vorsichtig heruntergewaschen. Nach dem Trocknen wurden vom Präparat unter einem Lichtmikroskop Bilder angefertigt und der Status des Östruszyklus bestimmt.

4.12.5 Tierversuchsexperimente

4.12.5.1 Spontaneous Alternation Behavior Test (SABT)

Der Test zur spontanen Verhaltensänderung (Spontaneous Alternation Behavior Test, SABT) ist eine weitverbreitete Methode zur Beurteilung der Gedächtnisfunktion.²⁵⁵ Hierzu wird das Versuchstier in eine Y- oder T-geformte Box (Y-maze, T-maze) platziert und sein Verhalten, dass bei einer normalen Gehirnfunktion von einem abwechselnden Eintreten in alle drei Arme bzw. Zonen des Y- oder T-mazes geprägt ist, beobachtet. Es scheint evident zu sein, dass das Versuchstier nach dem Erkunden einer bestimmten Zone sich ein räumliches Abbild im Gehirn konstruiert und geleitet von seiner Motivation und Neugier nach einer anderen Umgebung diese Zone nicht darauffolgend ein wiederholtes Mal besucht.²⁵⁶ Der Versuch wurde in einem Y-Maze (30 cm x 10 cm x 15 cm) aus Holz durchgeführt. Die Wände des Y-Mazes waren schwarz und der Boden grau koloriert. Zu Beginn der Testphase wurde die Maus in den dem Experimentator zugewandten Arm (Zone C) platziert. Die Maus konnte sich daraufhin 5 Min. lang spontan in alle drei Arme (Zone A, B und C) bewegen und diese auskundschaften. Während der 5-minütigen Exploration beider Objekte wurde das Verhalten der Maus videotechnisch dokumentiert. Anschließend wurde die Maus in ihren Käfig zurückgesetzt, bevor sie nach einer 15 Min. langen Intervallphase den nächsten Verhaltensversuch durchlief.

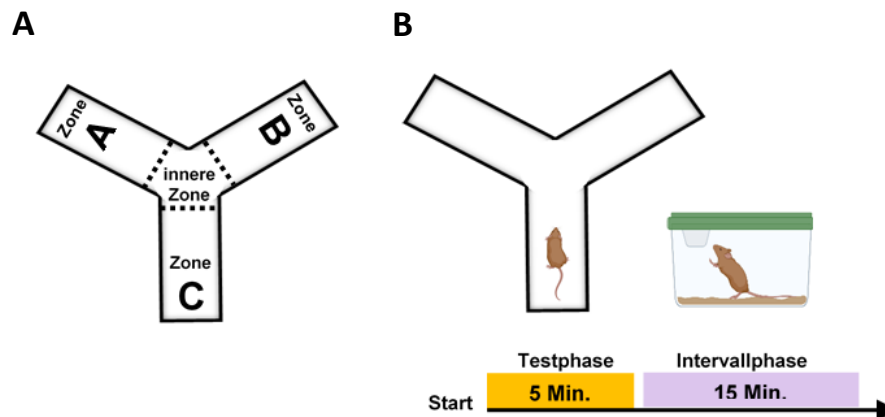


Abb. 22: Schematische Darstellung des Spontaneous Alternation Behavior Tests (SABT). (A) Illustration eines Y-Mazes. Gestrichelte Linien definieren die imaginäre Grenze der Zonen A, B, C. (B) Maus erkundete (5 Min.) im Y-Maze die drei Zonen A, B und C einschließlich der inneren Zone. Nach Ablauf der Testphase begann die Intervallphase (15 Min.) in der sich die Maus wieder in ihrem Heimkäfig befand.

In der Analyse des SABT wurden drei Explorationsverhaltensmuster berücksichtigt. Dabei wurde erst die Passage der vorderen Maus Körperhälfte aus der inneren Zone heraus in einen Arm des Y-Mazes als Eintritt in die Zone A, B oder C gewertet. Die Tabelle 18 fasst die Explorationsverhaltensmuster mit den entsprechenden Konstellationen von zwei bzw. drei aufeinanderfolgenden Zonen zusammen. Der prozentuale Anteil jedes Explorationsverhaltensmusters wurde folgendermaßen berechnet:

$$SAP [\%] = (\text{Anzahl spezifischer Verhaltensänderungen} / \text{Anzahl aller betretenen Zonen}) \times 100$$

$$AAR [\%] = (\text{Anzahl spezifischer Verhaltensänderungen} / \text{Anzahl aller betretenen Zonen}) \times 100$$

$$SAR [\%] = (\text{Anzahl spezifischer Verhaltensänderungen} / \text{Anzahl aller betretenen Zonen}) \times 100$$

Explorationsverhaltensmuster	Beschreibung	Konstellationen
Spontaneous Alternation Performance (SAP)	Maus besucht alle drei Zonen nacheinander	A-B-C A-C-B B-A-C B-C-A C-A-B C-B-A
Alternate Arm Returns (AAR)	Erste und dritte Zone, die von der Maus betreten werden, sind identisch	A-B-A A-C-A B-A-B B-C-B C-A-C C-B-C
Same Arm Returns (SAR)	Maus kehrt wieder in der zuvor betretenen Zone zurück	A-A B-B C-C

Tab. 18: Explorationsverhaltensmuster im Spontaneous Alternation Behavior Versuch.

4.12.5.2 Spatial Object Recognition Test (SORT)

Der Test zur Wiedererkennung eines Objektes im Raum (Spatial Object Recognition Test, SORT) ist ein Experiment zur Bestimmung des räumlichen Lern- und Erinnerungsvermögens des Versuchstieres und dessen Explorationsverhaltens. Eine Wiedererkennung liegt dann vor, wenn der Nager weniger Zeit mit einem Objekt in einem bekannten Raum verbringt als mit einem Objekt, das räumlich umpositioniert wurde.²⁵⁷ Während beim SORT die Wiedererkennung eines Objektes im Raum im Vordergrund steht, kann in einem anderen Versuchsaufbau, das sich ebenfalls auf das Prinzip der Wiedererkennung beruft, ein neues Objekt (Novel Object Recognition) oder ein Artgenosse (Social Object Recognition) von Interesse sein.²⁵⁸ In einem Y-Maze (Material, Aussehen und Größe siehe SABT Versuch) wurden zwei identische Objekte aus Kunststoff am Ende der Zone A und B fixiert. Nach dem Platzieren der Maus in das Zentrum des Y-Mazes besaß das Tier 15 Min. lang Zeit (Habituationsphase) beide Objekte zu inspizieren. Während der Prätestphase befand sich die Maus außerhalb des Y-Mazes für 15 Min. in ihrem Heimkäfig. Es erfolgte eine Verschiebung des Objektes von der Zone B in C einschließlich einer Reinigung des Y-Mazes plus Objekten mit 5%iger EtOH-Lösung. In der Testphase wurde die Maus anfänglich wieder in die Mitte des Y-Mazes abgelegt. Während der 5-minütigen Exploration beider Objekte wurde das Verhalten der Maus videotechnisch

dokumentiert. Letztlich wurde die Maus zurück in ihren Heimkäfig transportiert in dem sie 15 Min. lang (Intervallphase) bis zum nächsten Verhaltensexperiment verweilte. Die Bewertung einer Exploration orientierte sich nach der Art der Interaktion mit dem Objekt. Erfasst wurden: schnüffeln, berühren mit beiden Vorderpfoten, berühren mit der Nase oder Schnurrbart. Klettern auf dem Objekt wurde nicht als Exploration gewertet. Tiere, die sich weniger als 5 Sek. mit einem Objekt austauschten wurden exkludiert. Der prozentuale Anteil der Objekt Wiedererkennung wurde wie folgt berechnet:

$$SORT [\%] = (Umpositioniertes\ Objekt\ Interaktion / Totale\ Objekt\ Interaktion) \times 100$$

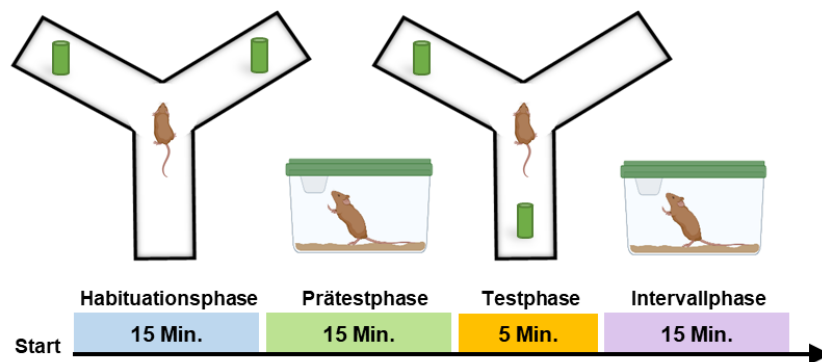


Abb. 23: Schematischer Ablauf des Spatial Object Recognition Tests (SORT). In der Habituationsphase (15 Min.) wird die Maus mit zwei identischen Objekten konfrontiert, die sich am Ende der Zone A und B des Y-Mazes befinden. In der Prätestphase (15 Min.) sitzt die Maus in ihrem Heimkäfig. In der anschließenden Testphase (5 Min.) ist die Maus wieder im Y-Maze und im Vergleich zur Objektanordnung in der Habituationsphase steht nun das Objekt aus der Zone B in der Zone C. Nach der Testphase folgt die Intervallphase (15 Min.) in der die Maus bis zum Beginn des nächsten Versuchs verweilt.

4.12.5.3 Open Field Test (OFT)

Der Open Field Test (Open Field Test, OFT) ist eine vielfach angewendete Methode, die 1934 zum ersten Mal von Calvin Hall mit Ratten in einer quadratischen Arena durchgeführt wurde.²⁵⁹ In heutigen Verhaltensstudien findet der OFT vordergründig seine Anwendung in der Erfassung von angstassoziierten als auch explorativen Verhaltens und in der Überprüfung der lokomotorischen Aktivität des Nagetieres. Die Maus tendiert von Natur aus sich in einer unbekanntem Umgebung am Rand der Arena aufzuhalten, um eine geringe Rückzugsdistanz zu wahren, bevor sie darauffolgend beschließt in das Zentrum zu laufen, um diesen Bereich des Raumes zu erkunden. Eine erhöhte

Defäkationsfrequenz gemessen an der Anzahl der Boli (Kothäufchen) kann auf Angst und Stress zurückgeführt werden.²⁶⁰ Der Versuch fand in einer quadratischen Testbox (50 x 50 x 50 cm) aus Holz statt. Die Wände der Testbox waren schwarz und der Boden grau koloriert. In der 10 Min. langen Testphase wurde die Maus zu Beginn am Rand abgesetzt und konnte von diesem Punkt aus die Arena frei erkunden. Die Auswertung der Parameter: zurückgelegte Wegstrecke, Latenz und Frequenz in das Zentrum einzutreten, Zeit im Zentrum und am Rand wurden videotechnisch aufgenommen und über die Software Observer XT digital berechnet. Nach dem Versuch wurde die Maus in ihren Heimkäfig zurückgebracht.

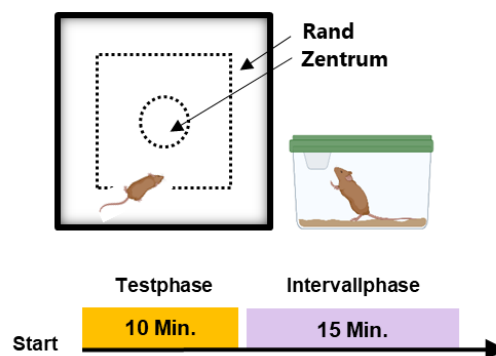


Abb. 24: Schematische Illustration des Open Field Tests (OFT). In der Testphase (10 Min.) erkundet die Maus die Umgebung innerhalb einer quadratischen offenen Arena. Gestrichelte Linien markieren die drei imaginären Zonen Rand, Mitte und Zentrum. Nach Ablauf der Testphase folgt die Intervallphase (15 Min.) in der sich die Maus in ihrem Heimkäfig aufhielt.

4.12.5.4 Novel Object Recognition Test (NORT)

Der Test zur Wiedererkennung eines neuartigen Objektes (Novel Object Recognition Test, NORT) ist wie der SORT ein weiterer anerkannter Versuch zur Untersuchung kognitiver Fähigkeiten und liefert wertvolle Rückschlüsse auf das Lern- und Erinnerungsvermögen des Tiermodells. Erstmals wurde dieser Test 1988 von den beiden Wissenschaftlern Ennaceur und Delacour bei Ratten durchgeführt. Sie präsentierten den Ratten zunächst zwei identische Objekte und tauschten nach einer kurzzeitigen Prätestphase eines dieser Objekte gegen ein erkennbar anderes Objekt aus. Beide stellten im Anschluss fest, dass die Tiere motivierter waren das ihnen neu vorgestellte Objekt zu erkunden als das ihnen bereits bekannte Objekt. Auch Mäusen liegt dieses neugierige Verhalten zugrunde, weshalb der NORT ebenso erfolgreich bei ihnen eingesetzt wird.^{261,262} In der Eingewöhnungsphase wurde die Maus zunächst in der Testbox mit zwei identischen Objekten 15 Min. lang konfrontiert,

bevor sie in ihren Käfig zurück platziert wurde. Nach einer 15-minütigen Prätestphase startete die Testphase in derselben zuvor gründlich mit 5%iger EtOH-Lösung gereinigten Testbox in der nun eines der Objekte gegen ein anderes ausgetauscht war. Die verwendeten Objekte variierten in Form, Größe und Farbe und bestanden aus Kunststoff. Größentechnisch übertrafen die Objekte eine Maus im Wesentlichen nicht. Der prozentuale Anteil der Interaktion mit dem neuen Objekt wurde wie folgt berechnet:

$$\text{NORT [\%]} = (\text{Unbekanntes Objekt Interaktion} / \text{Totale Objekt Interaktion}) \times 100$$

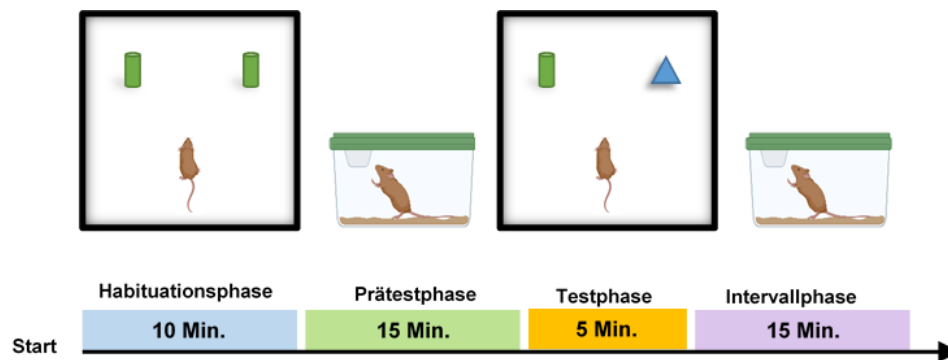


Abb. 25: Schematische Darstellung des Novel Object Recognition Tests (NORT). In einer offenen Arena wird die Maus während der Habitutionsphase (15 Min.) mit zwei identischen Objekten konfrontiert. Danach wird die Maus zurück in ihren Heimkäfig transportiert. Nach Ablauf der Prätestphase (15 Min.) beginnt die Testphase (5 Min.). In dieser Phase ist eines der Objekte gegen ein unbekanntes Objekt, das sich optisch deutlich vom bekannten Objekt unterscheidet, ersetzt worden. Die Maus bekommt nun die Möglichkeit sich mit dem bekannten und unbekanntem Objekt auseinanderzusetzen. Danach beginnt die Intervallphase (15 Min.) in der sich die Maus wieder in ihrem Heimkäfig befindet.

4.12.5.5 Sociability Test (ST)

Um die Fähigkeit zu Geselligkeit bzw. sozialen Verhalten bei Mäusen im Labor zu beobachten, hat sich eine Methode etabliert, die einst von Crawley und Kollegen designt wurde, in der die Maus in Kontakt mit einer ihr unbekanntem Maus tritt.²⁶³ Für Gewöhnlich präferieren Nagetiere den Kontakt mit einem unbekanntem Artgenossen als mit bereits bekannten Artgenossen, was auf ein ausgeprägtes und komplexes Sozialverhalten basiert, das nicht zuletzt eine wichtige Rolle in der Entwicklung sozialer Hierarchien und der Partnerwahl spielt. Der Test erfolgte in einer dreigliedrigen Kammer (Maße je einzelne Kammer 18.5 x 38.5 x 22 cm). Alle Wände bestanden aus Plexiglas. Die Trennwände zwischen den Kammern hatten eine Öffnung, die durch eine Schiebetüre verschlossen werden konnte. Zu Beginn des Versuchs standen leere Gitterboxen in den beiden äußeren Kammern

und die Öffnungen in den Trennwänden waren verschlossen. Die Maus wurde in die mittlere Kammer transportiert in der sie sich in der Habituationsphase (5 Min.) an die Umgebung gewöhnen konnte und freie Sicht auf die anderen beiden Kammern mit den leeren Gitterboxen hatte. Unmittelbar nach der Habituationsphase wurden in eine Gitterbox ein Metallring und in die andere Gitterbox eine 3 - 4 Wochen alte BL6 Maus gesteckt, die Schiebetüren herausgenommen und die Maus in die mittlere Kammer platziert. Während der 6-minütigen Testphase konnte die Maus sich zwischen alle drei Kammern frei bewegen. Der prozentuale Anteil der Interaktion mit dem sozialen Objekt wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Sociability [\%]} = (\text{Soziales Objekt Interaktion} / \text{Totale Objekt Interaktion}) \times 100$$

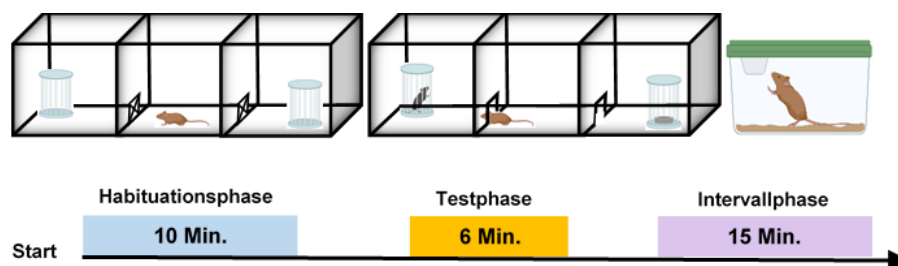


Abb. 26: Schematische Präsentation des Sociability Tests (ST). In einer dreigliedrigen Kammer mit verschlossenen Zugängen und leeren Gitterboxen im ersten und dritten Kompartiment wird die Maus in das zweite Kompartiment platziert. Nach Ablauf der Habituationsphase (10 Min.) schließt sich unmittelbar danach die Testphase (6 Min.) an. In einer Gitterbox befindet sich nun ein Metallring und in der anderen eine junge männliche BL6 Maus. Durch die geöffneten Zugänge kann die Maus sich zwischen den Kompartimenten bewegen und mit dem Metallring oder der BL6 Maus interagieren. In der darauffolgenden Intervallphase (15 Min.) befindet sich die Maus wieder in ihrem Heimkäfig.

4.12.5.6 Light-Dark Box Test (LDBT)

Der Light-Dark Box Versuch basiert auf das natürliche aversive Verhalten von Nagern gegenüber stark beleuchtete Areale und ihrem explorativen Verhalten unbekannte Räume zu entdecken. Für das Experiment wurde in einer Zweikammer-Box aus PVC (Maße je einzelne Kammer 19.5 x 19 x 25 cm) vorbereitet. Diese Apparatur bestand aus einem weißen Kompartiment, das nach oben geöffnet war und mit Licht der Stärke 600 lux beleuchtet wurde. Das Zweite Kompartiment war schwarz und wurde zur Verdunkelung des inneren Bereiches mit einem Deckel versehen. Zwischen beiden Kompartimenten lag eine Trennwand, die für die Maus einen Durchgang besaß. Mehrmalige Transitionen und eine längere Verweildauer im hellen Kompartiment können als ein geringeres angstassoziiertes Verhalten interpretiert werden.²⁶⁴ Zu Beginn der 5-minütigen Testphase wurde die

Maus in das helle Kompartiment abgelegt und gefilmt. Als der Versuch beendet war, wurde die Maus zurück in ihren Heimkäfig transportiert und verblieb dort 15 Min. bis der nächste Versuch gestartet wurde. Die Zeit im beleuchteten Areal in Prozent sowie die Anzahl der Transitionen wurden folgendermaßen berechnet:

$$\text{Zeit im Licht [\%]} = ((\text{totale Zeit im beleuchteten Kompartiment}) / (\text{Explorationszeit-Latenz im dunklen Kompartiment})) \times 100$$

$$\text{Transitionen} = \text{Totale Anzahl der Übertritte ins beleuchtete Kompartiment} - 1$$

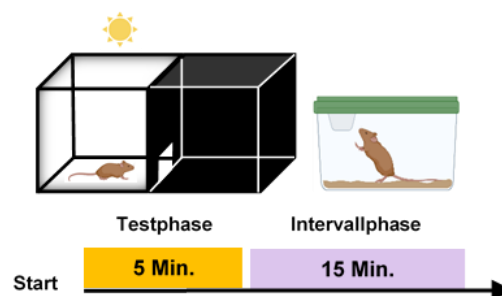


Abb. 27: Schematische Darstellung des Light-Dark Box Tests (LDBT). In einer zweigliedrigen Kammer wird ein Kompartiment mit der Lichtstärke 600 Lux beleuchtet und die zweite abgedunkelt. Während der Testphase (5 Min.) kann die Maus durch eine Öffnung zwischen beiden Kompartimenten wandeln. Im Anschluss beginnt die Intervallphase (15 Min.) in der die Maus wieder in ihrem Heimkäfig sitzt.

4.12.5.7 Bedding Preference Test (BPT)

Der Einstreu Präferenztest (Bedding Preference Test) ist eine experimentelle Herangehensweise, um die Präferenz der Maus für verschiedene Einstreu-Gerüche zu bewerten. In einer wie im NORT und OFT verwendeten quadratischen Testbox wurde der Maus ein Glasschälchen mit sauberer Einstreu und eins mit verschmutzter Einstreu präsentiert. Die verschmutzte Einstreu stammt aus dem Heimkäfig einer stammfremden männlichen erwachsenen Maus. Das erhöhte Interesse für den Einstreu-Geruch einer fremden Maus kann ein Hinweis auf die Bereitschaft sein in sozialer Interaktion mit einer fremden Maus einzutreten. Der Versuch fand 5 Min. lang statt. Dokumentiert wurden die Zeit, in der das Tier mit den Vorderpfoten und der Schnauze die Einstreu berührte. Der prozentuale Anteil der Interaktion mit der verschmutzten Einstreu wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Einstreu Präferenz [\%]} = (\text{Verschmutzte Einstreu Interaktion} / (\text{Totale Interaktion})) \times 100$$

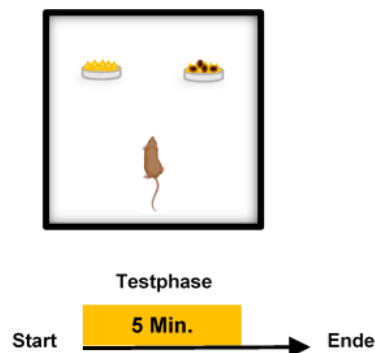


Abb. 28: Schematische Abbildung des Bedding Preference Tests (BPT). In einem Offenfeld werden ein Schälchen mit sauberer Einstreu und eines mit benutzter Einstreu einer erwachsenen männlichen Maus fixiert und anschließend das Verhalten der Maus beobachtet (5 Min.).

4.12.5.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der aus den Verhaltensexperimenten gewonnenen Daten erfolgte mit dem Statistik Programm Prism Version 9. Um die Rolle des Geschlechts und Genotyps auf das Messergebnis bewerten zu können, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two way measure analysis of variance bzw. 2-Way ANOVA) angewendet. Bei bestimmten Verhaltensexperimenten wie SORT, NORT, ST und BPT wurde berücksichtigt, dass die Kontrolltiere mit einer mindestens 50%igen Wahrscheinlichkeit in Interaktion mit dem unbekanntem Objekt oder Tier eintraten, damit die Verwertbarkeit des Verhaltensexperiments durch eine hinreichende Verhaltensaktivität sichergestellt werden konnte. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes in den Faktoren Interaktion, Geschlecht und Genotyp wurde eine Post-Hoc-Analyse mit einer Tukey Korrektur angeschlossen, um herauszufinden welcher Genotyp und welches Geschlecht für die Signifikanz im Ergebnis hauptsächlich verantwortlich sind. Das Körpergewicht wurde mit dem ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test überprüft, weil lediglich ein Vergleich zwischen TRPC6-KO und -WT Tieren eines Geschlechts in einer bestimmten Alterswoche aufgestellt werden musste. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt und über den p-Wert gekennzeichnet. Eine statistische Signifikanz lag bei einem p-Wert von $< 0,05$ vor und wurde mit einem Sternchensymbol (*) markiert. Die p-Werte $< 0,01$, $< 0,001$ und $< 0,0001$ wurden entsprechend mit einem zusätzlichen Sternchensymbol hervorgehoben. Lag der p-Wert zwischen $0,05$ und $0,1$ wurde dieser als Trend oder marginal signifikant bezeichnet. Die Angaben der Daten erfolgten als Mittelwerte \pm Standardfehler. Ausreißer wurden mittels dem Dixon's Q Test identifiziert und exkludiert, sobald der Ausreißer unter einem Q-Wert von 1 % lag. Tiere, die in einem Experiment eine totale Interaktionszeit (bekanntes und

unbekanntes Tier oder Objekt) von unter 5 % hatten wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die statistische Analyse der aus dem Calcium-Imaging, Whole-Cell-Aufnahme und Western Blot Methode erhaltenen Daten, wurde ebenfalls mit dem Statistik Programm Prism Version 9 durchgeführt. Um die Effektivität der getesteten Aktivatoren im Zellsystem bewerten zu können wurde der ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test angewendet und für einen statistisch relevanten Unterschied zwischen zwei Mittelwerten galt $p < 0,05$.

5. ERGEBNISSE

5.1 Hyperforin Derivat Hyp13 induziert einen TRPC6-vermittelten Ca^{2+} -Influx und evoziert einen Ionenstrom in verschiedenen Zellsystemen

5.1.1 Hyp13 führt zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Calcium-Imaging

Vorausgegangene Publikationen zeigen, dass Hyperforin in verschiedenen Zellsystemen in denen der TRPC6-Kanal endogen wie z.B. in PC12-Zellen oder nach einer transienten Transfektion wie z.B. in HEK293-Zellen exprimiert wird, die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration) erhöht und zur Erzeugung von Ionenströmen führt. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass Hyperforin ein selektiver Aktivator des TRPC6 Kanals ist, der nicht die Aktivierung der struktur- und funktionsverwandten Kanälen TRPC3 und TRPC7 befördert.⁸¹ Leuner et al. präsentierten im Jahr 2010 erstmalig 2,4-Diacylphloroglucinol Derivate (Hyp-Derivate) bei denen es sich um niedermolekulare Strukturen handelt, die sich gemeinsam mit Hyperforin das Pharmakophor Phloroglucinol teilen und zusätzlich Strukturelemente von DAG beinhalten. Unter den potenten 2,4-Diacylphloroglucinol Derivate befand sich auch die Substanz Hyp1. Für Hyp1 wurde in Ca^{2+} -Imaging und elektrophysiologischen Messungen ein zu Hyperforin vergleichbares Wirkprofil festgestellt, dass allerdings anders als Hyperforin durch die strukturelle Modifikation nicht mehr die Eigenschaft besaß anfällig gegenüber degradierenden Einflussfaktoren zu sein als auch an den PXR zu binden.^{82,89} Bisher wurde auf molekularer Ebene der Einfluss einer zusätzlichen lipophilen Komponente am freien C-Atom des Phloroglucinolrings von Hyp13 nicht untersucht. Mit der Substanz Hyp13 lag nun ein weiteres 2,4-Diacylphloroglucinol Derivat vor, das sich strukturell von Hyp1 durch einen Butylrest in der Meta-Stellung zu den beiden Acylketten im Phloroglucinolring hervorhebt.

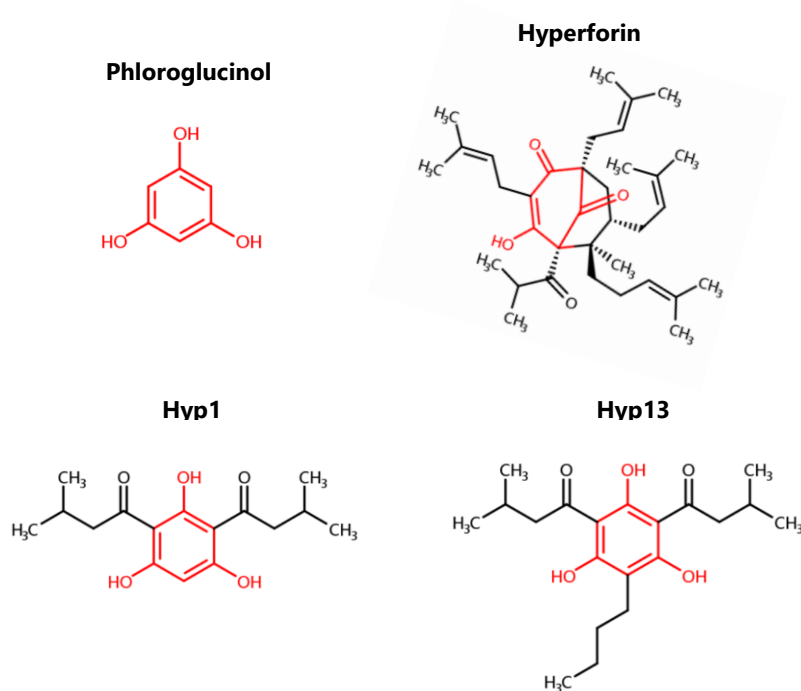


Abb. 29: Strukturformeln von Phloroglucinol, Hyperforin, Hyp1 und Hyp13. Phloroglucinol Kernstruktur ist rot markiert.

Um die Aktivität von Hyp13 in PC12-Zellen zu untersuchen, wurde mittels des Calcium-Imaging Verfahrens Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration durch eine Verschiebung des Fura-2AM 340/380 Verhältnisses gemessen. Parallel wurde in PC12-Zellen die Aktivität der beiden Kontrollsubstanzen Hyperforin und Hyp1 getestet, um an ihnen mögliche Effektunterschiede zu dokumentieren. Nachdem die PC12-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2AM inkubiert und in das Fluoreszenzmikroskop platziert wurden, erfolgte eine Lösungsmittelkontrolle durch die Zugabe von 0,02 % DMSO. Anschließend wurde ermittelt, ob die Aktivierung des TRPC6-Kanals durch Hyp13 konzentrationsabhängig verläuft. Im Calcium-Imaging führte die Zugabe von 0,02 % DMSO erwartungsgemäß zu keiner Beeinflussung der $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration im Zellplasma. Nach der Messung der Substanzkonzentrationen 1 μ M, 3 μ M, und 10 μ M der drei genannten Aktivatoren wurde ein signifikanter sowie konzentrationsabhängiger Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration beobachtet, der sich in der Fura-2AM 340/380 Beziehung widerspiegelte. Für die Berechnung des relativen Fura-2AM 340/380 Verhältnisses wurde der Basalwert vor der Aktivator Zugabe vom Signalmaximum abgezogen. Hyp13 führte wie Hyperforin und Hyp1 direkt nach der Applikation zu einem Anstieg der Signalkurve, die wenige Sek. später durch das Abdissoziieren des Aktivators des TRPC6-Kanals und möglichen zellulären Regulationsprozessen, die die Öffnungswahrscheinlichkeit der TRPC6-Kanäle minimierten, abflachte.

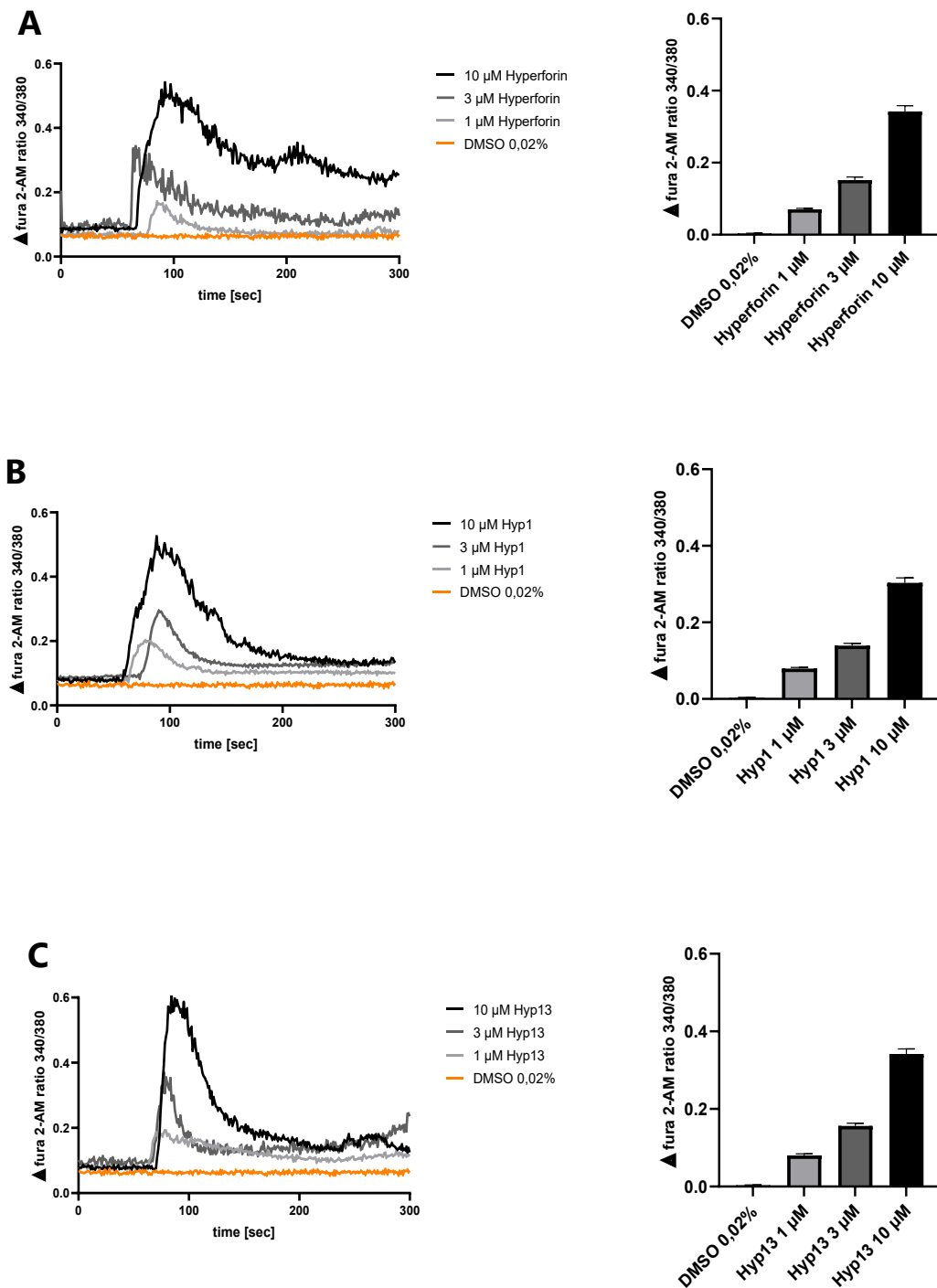


Abb. 30: Hyp13 führt zu einem konzentrationsabhängigen Ca²⁺-Influx in PC12-Zellen. Hyperforin (A), Hyp1 (B) und Hyp13 (C) aktivieren in den Konzentrationen 1 μM, 3 μM, und 10 μM im Calcium-Imaging Fura-2AM beladene PC12-Zellen. Dargestellt sind Ca²⁺-Influx Signalkurven der getesteten Aktivatoren. Lösungsmittelkontrolle erfolgte mit 0,02 % DMSO. Bardiagramme fassen die Differenz zwischen den Basalen und denen im Signalmaximum erzielten Fura-2AM 340/380 Werten der Aktivatoren zusammen. Bei allen drei getesteten Substanzen führt die Steigerung der Aktivatorkonzentration zu einer signifikanten Zunahme des Ca²⁺-Influxes. Angaben in Mittelwert ± SEM und n/Anzahl der Messungen ≥ 3.

5.1.2 Hyp13 vermittelt über hTRPC6 in HEK293-Zellen eine konzentrationsabhängige Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Calcium-Imaging

Um nachträglich festzustellen, dass die gezeigten Hyp13 Effekte in PC12-Zellen auch in einem andersartigen Zellsystem, wie in hTRPC6-eYFP exprimierenden HEK293-Zellen, in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration eintreten und somit auf eine Bindung des Aktivators an den Ionenkanal zurückzuführen sind, wurde der Ca^{2+} -Influx bei 1 μM , 3 μM und 10 μM Hyperforin und Hyp13 gemessen. Damit die Verwertbarkeit der mit eYFP (Kontrolle, ctrl) oder hTRPC6-eYFP transient transfizierten HEK293-Zellen vor der Zugabe von Hyperforin und Hyp13 sichergestellt werden konnte, wurde noch vor jeder Messung zum einen die Fluoreszenz bei der Anregungswellenlänge für YFP (513 nm) getestet und darauffolgend die Aktivierbarkeit erfolgreich transfizierter HEK293-Zellen mit OAG überwacht. Dabei wurde 60 Sek. nach der Aufnahme des basalen Fura-2AM 340/380 Verhältnisses OAG (100 μM) auf die Fura-2AM beladenen HEK293-Zellen pipettiert und 4 Min. später der Effekt von Hyperforin bzw. Hyp13 getestet. Während erwartungsgemäß die eYFP exprimierenden HEK293-Zellen nicht auf OAG und den beiden Aktivatoren reagierten stieg in hTRPC6-eYFP transfizierten HEK293-Zellen mit zunehmender Hyperforin und Hyp13 Konzentration die intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration an. Damit kann bestätigt werden, dass auf der einen Seite eine stärkere Bindung an den Ionenkanal mit einer höheren Aktivatorkonzentration einhergeht und andererseits, dass Hyp13 nicht nur in einem homologen, sondern gleichwertig in einem heterologen Expressionssystem TRPC6-Kanäle aktiviert und sein zügig eintretender Effekt, wie das von Hyperforin, auf eine höchstwahrscheinlich direkte Interaktion mit dem TRPC6-Kanal beruht.

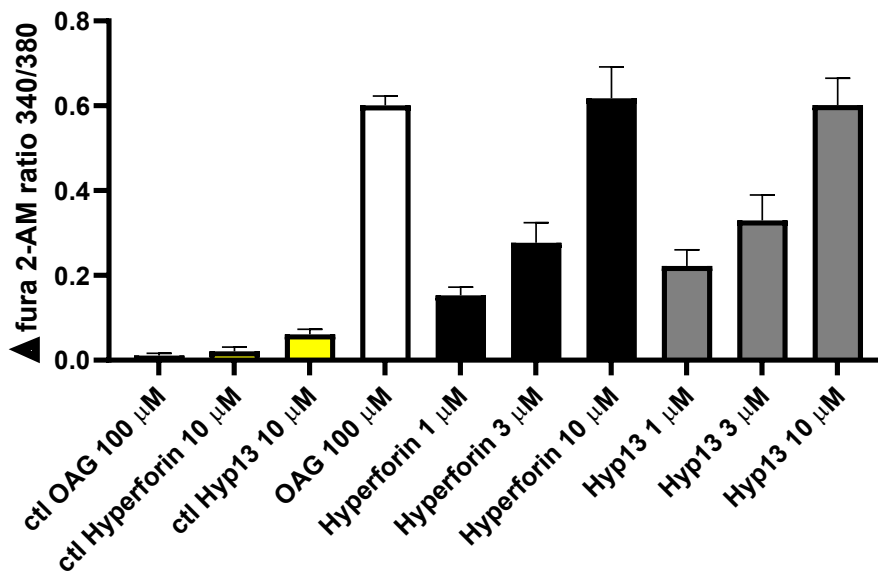
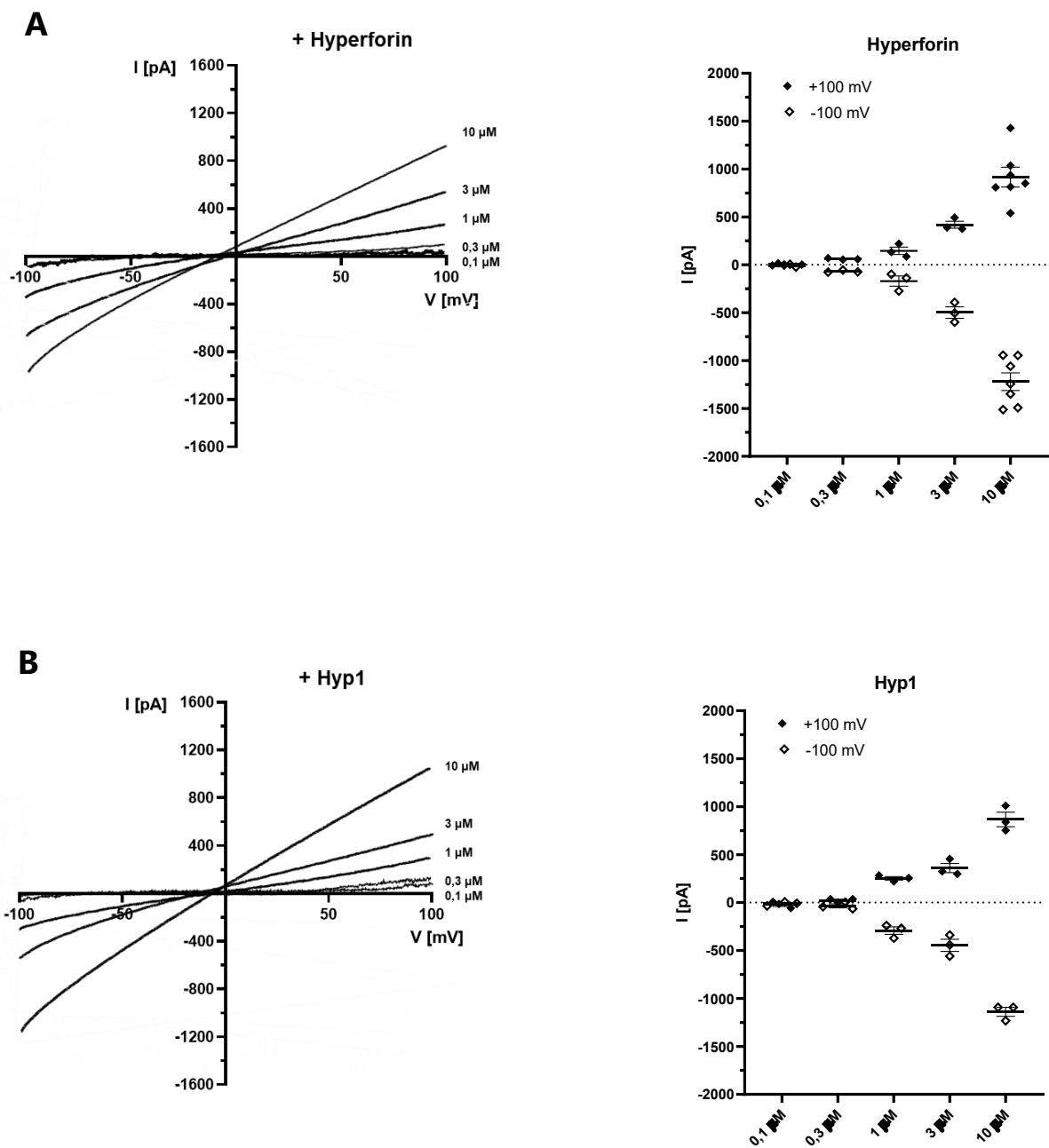


Abb. 31: Hyp13 induziert konzentrationsabhängig einen Ca^{2+} -Influx in hTRPC6-eYFP exprimierenden HEK293-Zellen. Das Barogramm zeigt den durch Hyperforin und Hyp13 hervorgerufenen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen in hTRPC6-eYFP exprimierenden und mit Fura-2AM beladenen HEK293-Zellen nach einer Voraktivierung mit OAG (100 μM). Die Stimulation der Ca^{2+} -Aufnahme in das Zytosol nahm durch die Zugabe von Hyperforin und Hyp13 in den Konzentrationen 1 μM , 3 μM und 10 μM aufsteigend zu. Als Kontrolle dienten mit eYFP-DNA transfizierte HEK293-Zellen (ctl). Angaben in Mittelwert \pm SEM und n/unabhängige Messung \geq 3.

5.1.3 Hyp13 ruft eine konzentrationsabhängige Zunahme des Ionenstromes in der Whole-Cell-Aufnahme hervor

Um die im Calcium-Imaging durch Hyp13 ausgelösten Effekte in PC12-Zellen elektrophysiologisch zu untersuchen, wurde mittels der Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell Konfiguration der Ionenstrom nach der Applikation von Hyp13 in die Messkammer gemessen und eine Dosis-Wirkungsbeziehung einschließlich der Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) erstellt. Die Ca^{2+} -Konzentration in der Badlösung lag bei 2 mM. Wie im vorherigen Calcium-Imaging Versuch wurden die beiden Kontrollsubstanzen Hyperforin und Hyp1 ebenfalls parallel getestet. Des Weiteren wurde die Vitalität der PC12-Zellen durch die Verwendung von 100 μM SAG kontrolliert. In den Konzentrationen 0,1 μM , 0,3 μM , 1 μM , 3 μM und 10 μM evozierte Hyp13 vergleichbar zu Hyperforin und Hyp1 über einem Spannungsbereich von + 100 mV bis – 100 mV einen auswärts- und einwärtsgerichteten Strom, dessen Stärke abhängig von der eingesetzten Aktivator-Konzentration war. Die aus der Messung resultierende Strom-Spannungskurven zeigten für Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 in den eingesetzten Konzentrationen vergleichbare Stromstärken bei -

100 mV und +100 mV, die nach wenigen Min. wieder abnehmen. Die Stimulation der PC12-Zellen mit 100 μM SAG führte überdies zu einer signifikanten Steigerung des auswärts- und einwärtsgerichteten Stroms im Spannungsbereich von +100 mV bis -100 mV und gleicht in seiner Stärke und in der Verlaufsform der Signalkurve den durch Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 bei einer Konzentration von 10 μM ausgelösten Strömen.



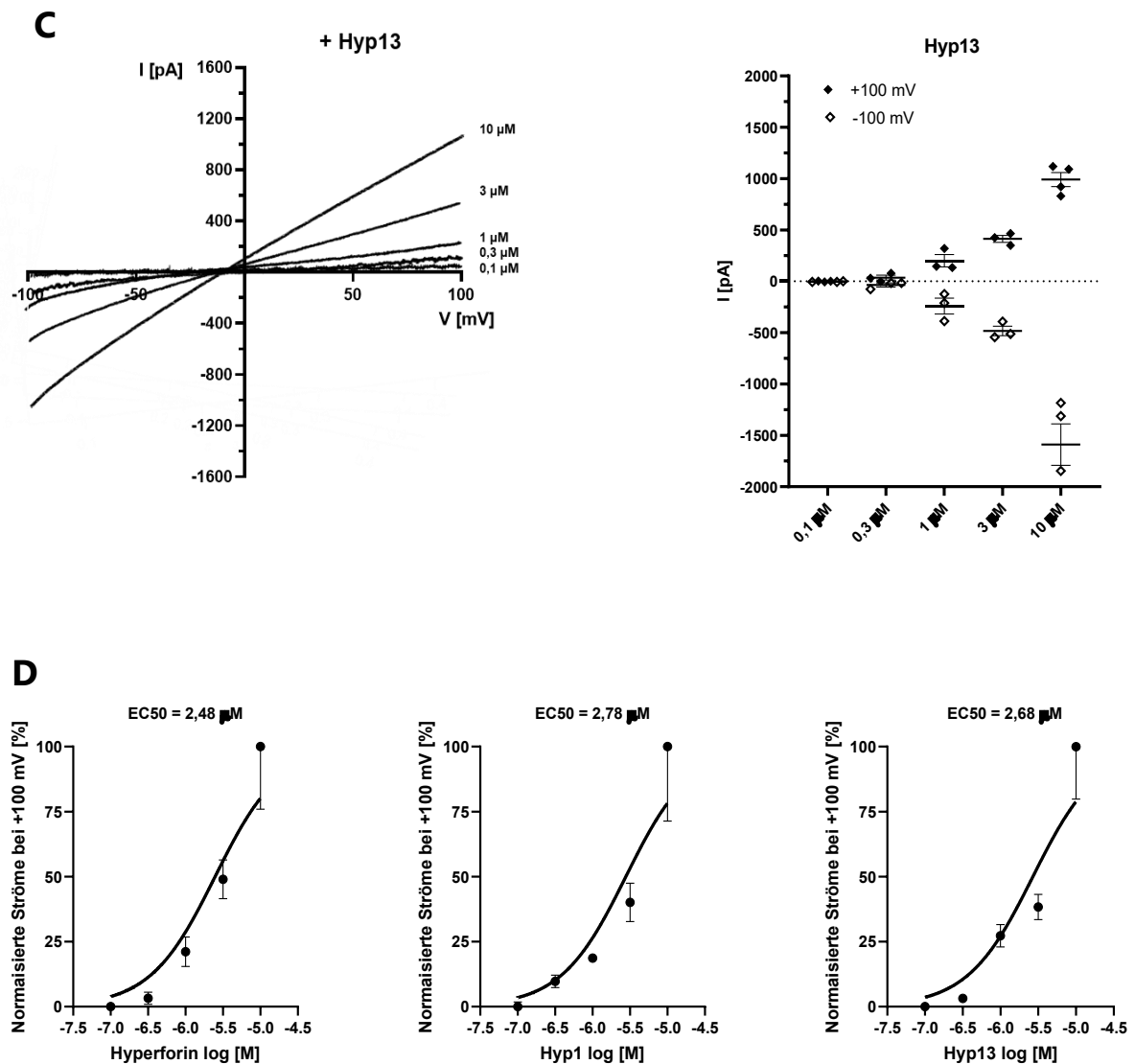


Abb. 32: Hyp13 führt zu einer konzentrationsabhängigen Veränderung des Ionenstroms in PC12-Zellen. Die PC12-Zellen Aktivierung nach der Applikation von 100 μM SAG (A) sowie nach der Zugabe der Substanzen Hyperforin (B), Hyp1 (C) und Hyp13 (D) in den Konzentrationen 0,1 μM , 0,3 μM , 1 μM , 3 μM , und 10 μM in der Patch-Clamp Whole-Cell-Aufnahme resultiert in einen signifikanten Anstieg auswärts- und einwärtsgerichteter Ströme innerhalb einer Spannungsrampe von +100 mV bis -100 mV. Gezeigt sind für jeden Aktivator Strom-Spannungskurven, die nach der Zugabe der genannten Konzentrationen entstanden sind und zusätzlich ein Diagramm, das die positiven und negativen Ströme bei +100 mV (◆) und -100 (◇) nach Abzug der basalen Ionenströme zusammenfasst. (D) Präsentiert die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen logarithmierten Aktivator Konzentrationen und normalisierten aufwärtsgerichtete Ströme bei +100 mV. EC₅₀-Werte von Hyperforin (2,48 μM), Hyp1 (2,78 μM) und Hyp13 (2,68 μM) wurden durch eine nichtlineare Regressionsanalyse analysiert. Angaben in Mittelwert \pm SEM und n/Anzahl der Zellen \geq 3.

5.1.4 Sequenzalignment und Expression der dominant negativen Mutante hTRPC6AAA

Die bisherigen Ergebnisse aus dem Calcium-Imaging und die elektrophysiologische Charakterisierung der Hyp13 Aktivität in PC12-Zellen zeigen, dass Hyp13 das Potential hat in PC12-Zellen aktivatorische Effekte hervorzurufen, deren Stärke vergleichbar mit jenen sind, die durch Hyperforin oder Hyp1 in der jeweiligen Konzentration hervorgerufen werden. Um zu belegen, dass diese Ergebnisse auf die selektive Aktivierung der endogenen TRPC6-Kanäle beruht, wurden die PC12-Zellen mit einer dominant negativen (dn) TRPC6-Plasmid-DNA transfiziert. Aus Studien ist bekannt, dass der TRPC6-Kanal seine Ca^{2+} -Ionenleitfähigkeit durch die Tetramersisierung von homomeren oder heteromeren TRPC-Proteineinheiten einen stabilen und funktionellen Ionenkanal bildet, der durch das Übereinanderlegen von vier Porenschleifen eine Pore in die Plasmamembran konstruiert.²⁶⁵ Im Falle von heteromer zusammengesetzten TRPC-Kanälen bilden TRPC6-Proteineinheiten vorzugsweise mit Mitgliedern der gleichen Subfamilie dementsprechend mit TRPC3 und TRPC7 funktionierende Proteinkomplexe. Welche Mechanismen die Tetramersisierung des TRPC6-Kanals steuern und über die stöchiometrische Zusammensetzung der porenbildenden Heteromere bestimmen, konnte bisher noch nicht hinreichend geklärt werden. Leuner et al. belegten durch die transiente Transfektion einer dn-TRPC6-Mutante in PC12-Zellen, dass der Hyperforin induzierte Ca^{2+} -Influx gehemmt ist. Die hierbei eingesetzte Mutante zeichnet sich durch einen Alanin-basierten Austausch der drei in TRPC3/6/7 sowohl in der Humanen als auch Murinen Spezies vorliegenden konserviert Aminosäuren LWF in der Porenregion aus und hebt die Funktion des TRPC6 Ionenkanals auf, obwohl ihre Lokalisierung in die Plasmamembran ungestört bleibt.^{155,266} Der Austausch von Aminosäuren gegen Alanin ist eine gängige Methode um Funktionsverluste in Proteinen zu erzeugen, weil Alanin im Vergleich zu seitenkettenarmen Aminosäuren wie Glycin die Sekundärstruktur-Präferenzen der Mehrzahl proteinogener Aminosäuren nicht stört.²⁶⁷ Bevor die dn-TRPC6-Mutante in PC12-Zellen transfiziert wurde, erfolgte ihre Sequenzierung und das Alignment zur Überprüfung der Mutationsstelle 678-680 in der humanen TRPC6-Sequenz. Als Kontrolle dienten für die Messungen mit eYFP-Plasmid-DNA transfizierte PC12-Zellen. 48 Stunden nach der Transfektion im Vollmedium wurden die auf dem Coverslip haftenden PC12-Zellen auf einen Objektträger mit Eindeckmedium fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Licht der Anregungswellenlänge für YFP ($\lambda = 513 \text{ nm}$) angeregt, das emittierende Licht ($\lambda = 527 \text{ nm}$) detektiert und vom Bildgebungsprogramm Nis-Elements Br bearbeitet. Erwartungsgemäß lokalisierte sich die dn-TRPC6-Mutante nach der Proteinbiosynthese in die Plasmamembran, was durch fluoreszierende Punkte abgebildet wurde. Die Expression des eYFP-Proteins konnte durch seine diffuse Verteilung über die gesamte Zelle bestätigt werden.

A

Human TRPC3	560	RTVKDIFKFMVLFIMVFFAFMIGMFI	LYSYLGA	VNAFFTVEESFKL	FW	IFGLSEVTSVVLKYD	HKFIENIGVLYGI	YNV	TMVV	649
Human TRPC6	629	RTVKDIFKFMVIFIMVFAFMIGMFN	LYSYIGAKQNEA	FTVEESFKL	FW	IFGLSEVKS	VVINYNHKFIENIGVLYGV	YNV	TMVIV	718
Human TRPC7	574	RTVKDIFKFMVIFIMVFAFMIGMFN	LYSYRGA	KYNAFFTVEESFKL	FW	IFGLSEVISVVLKYD	HKFIENIGVLYGV	YNV	TMVV	663
Ratte TRPC6	628	RTVKDIFKFMVIFIMVFAFMIGMFN	LYSYIGAKQNEA	FTVEESFKL	FW	IFGLSEVKS	VVINYNHKFIENIGVLYGV	YNV	TMVIV	717

B

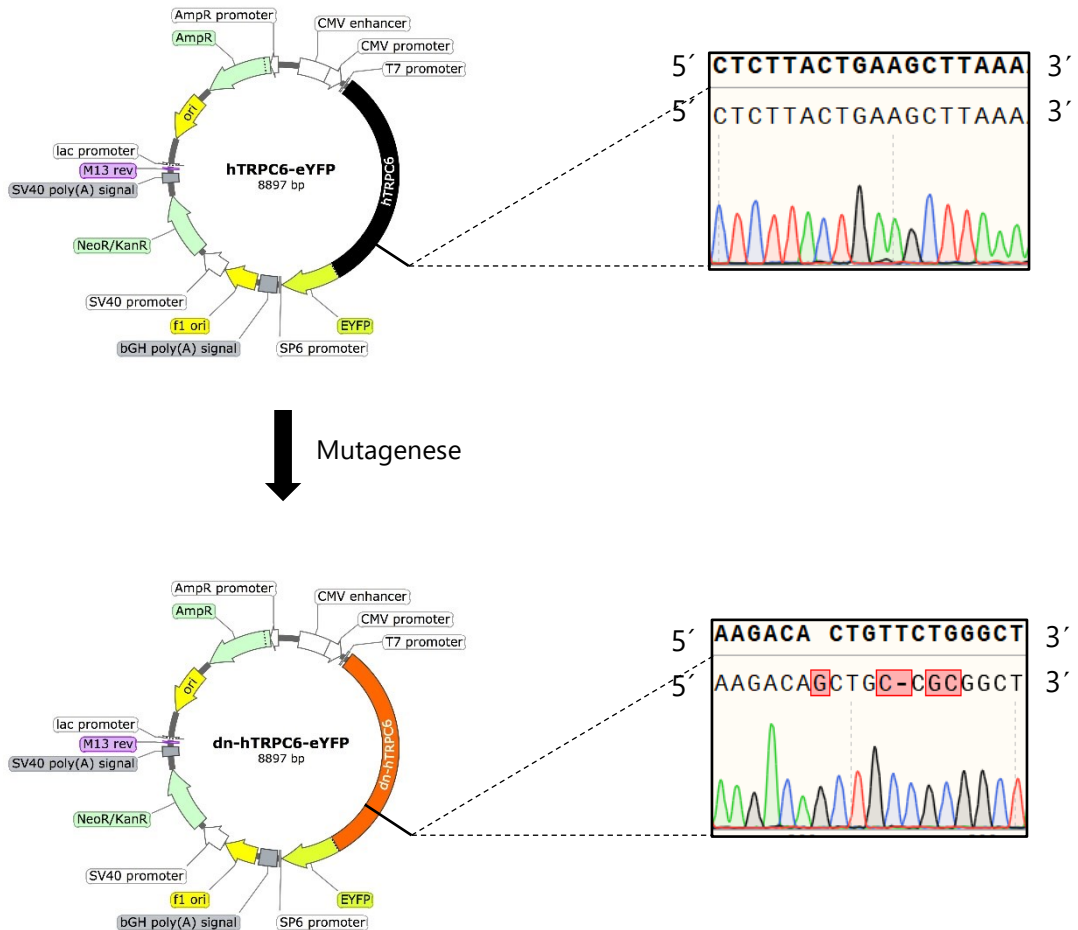


Abb. 33: Sequenzalignment der dominant negativen Mutante hTRPC6AAA. (A) Sequenzalignment wurde mit dem Snapgene Programm und den Proteinsequenzen von hTRPC3/6/7 und rTRPC6 erstellt. (B) Ausschnitt des Sequenzalignments von hTRPC6 mit hTRPC3, hTRPC7 und rTRPC6 verweist auf die konservierte Aminosäuresequenz LFW (schwarze Box), die innerhalb der extrazellulären Region zwischen den transmembranären Domänen fünf und sechs lokalisiert ist. Grau markierte Aminosäuren liegen in den dargestellten Sequenzen nicht konserviert vor. (B) Plasmidkarte mit pcDNA3.1 Vektor und Insert (Abb. modifiziert nach Kwon et al., 2007)²⁶⁸ und Elektropherogramm-Ausschnitt der Mutationsstellen nach der Sequenzierung. Einzelne Fluoreszenz-Signale der Nucleotide sind in den Farben Grün (Adenin), Schwarz (Guanin), Blau (Cytosin) und Rot (Thymin) markiert. Obere Nucleotidsequenz zeigt die hTRPC6-Nucleotidsequenz und darunter die der dn-TRPC6-Mutante. Ausgetauschte Basen sind rot markiert und bilden Basentripletten für die zu codierenden Aminosäuren AAA.

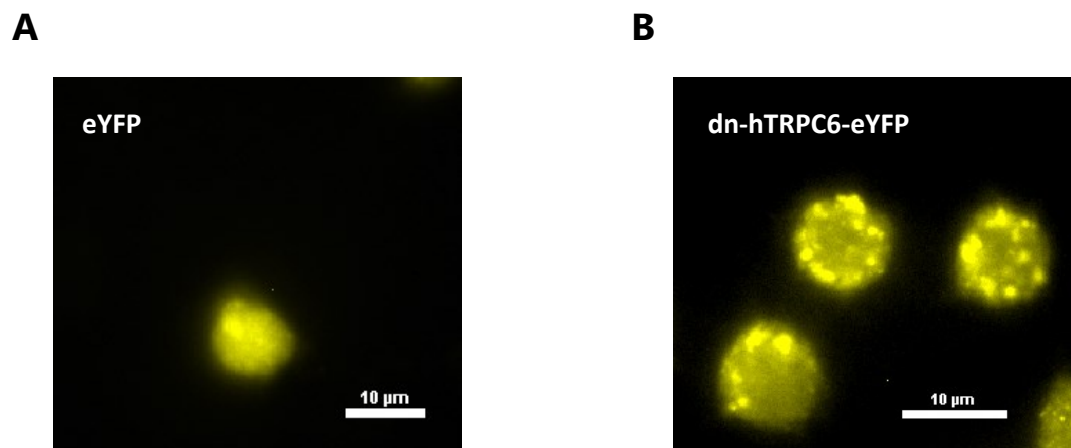


Abb. 34: Fluoreszenzmikroskopie mit hTRPC6AAA-eYFP transfizierten PC12-Zellen. Visualisierung mit dem Fluoreszenzmikroskop und entsprechenden Emissionsfilter für den YFP relevanten Wellenlängenbereich. (A) PC12-Zellen wurden mit eYFP-Plasmid-DNA oder wie in (B) mit dn-TRPC6-eYFP Plasmid-DNA 48 Stunden vor der mikroskopischen Aufnahme transfiziert. Expression des dn-TRPC6-Proteins führte zu seiner Einlagerung in die Plasmamembran, erkennbar durch fluoreszierende Punkte. PC12-Zelle mit eYFP-Plasmid-DNA zeigt homogene Verteilung des Proteins. Scale bar = 10 µM, n/transient transfizierte Zellprobe = 3.

5.1.5 Hyp13 Effektivität auf den Ca²⁺Influx ist in PC12-Zellen mit dominant negativer TRPC6-Mutante gehemmt

Nachdem die Mutationsstelle und die Transfektion der dn-TRPC6-Plasmid-DNA sowie die Lokalisation des Proteinproduktes in die Plasmamembran kontrolliert wurden, erfolgte im nächsten Schritt die Überprüfung der Aktivität von Hyp13 im Calcium-Imaging Verfahren. Wie bereits im vorausgegangenen Experiment mit untransfizierten PC12-Zellen wurden die beiden Substanzen Hyperforin und Hyp1 daneben mituntersucht. Bei der Messung des Ca²⁺-Influxes nach der Applikation von Hyp13 10 µM, die 60 Sek. nach der Aufnahme des basalen Fura-2AM 340/380 Verhältnisses erfolgte, konnte festgestellt werden, dass dieser signifikant reduziert war. Demgegenüber konnte in mit eYFP transfizierten PC12-Zellen sowie in untransfizierten PC12-Zellen eine signifikante Zunahme des Ca²⁺-Einstroms beobachtet werden. Die dn-TRPC6-Mutante führte nach der Zugabe von Hyperforin und Hyp1 in der Konzentration von 10 µM wie bei Hyp13 ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der [Ca²⁺]_i-Konzentration. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Hyp13 ein neues Mitglied innerhalb der 2,4-Diacylphloroglucinol-Gruppe ist, wie Hyperforin durch die selektive Aktivierung des TRPC6-Kanals einen zellulären Ca²⁺-Influx auslöst und damit das Ca²⁺-Signaling in PC12-Zellen steuert.

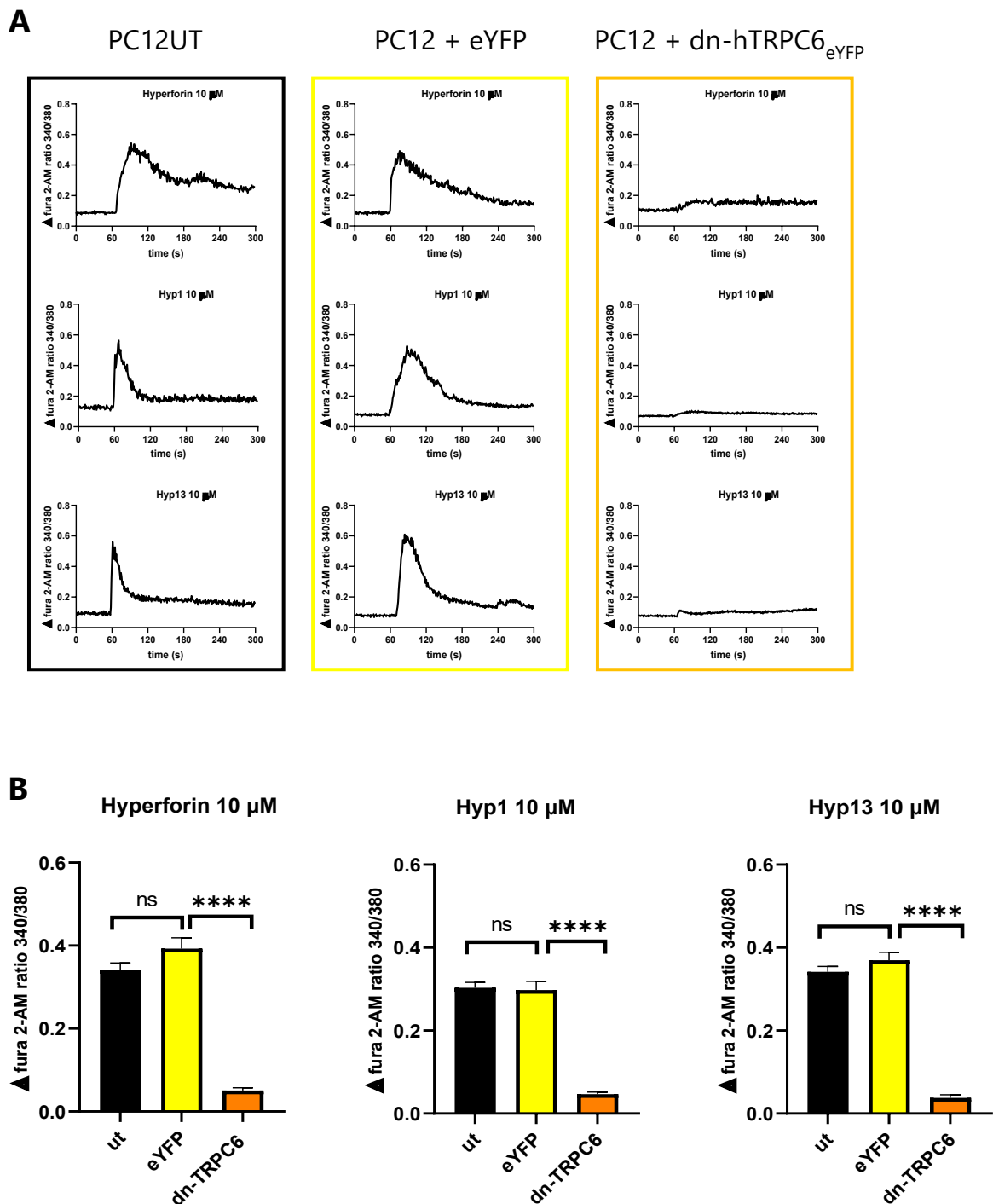
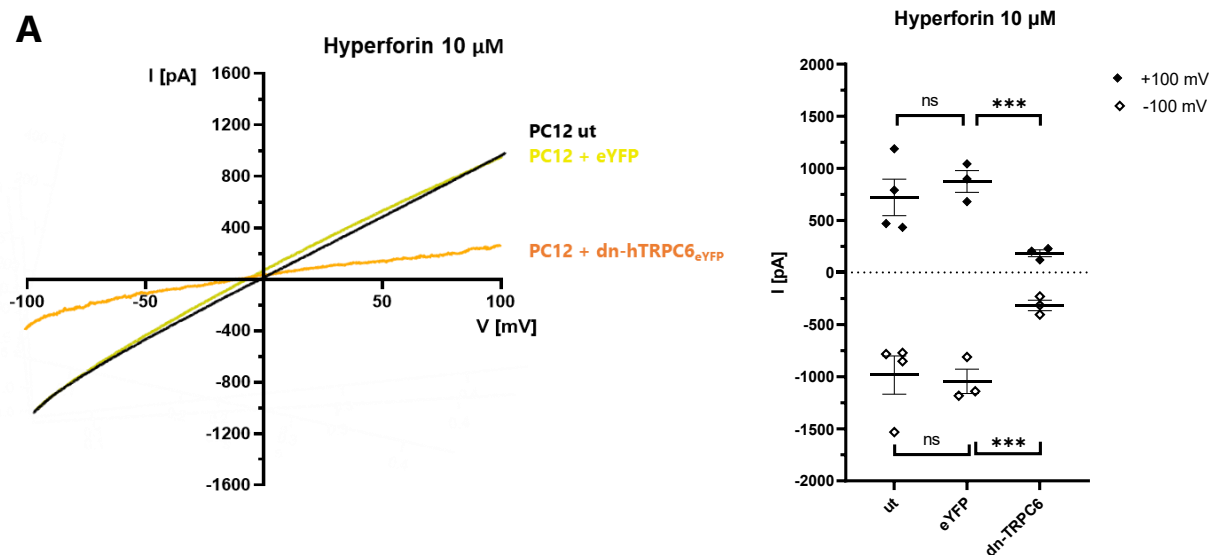


Abb. 35: Intrazelluläre Ca²⁺-Messung transfizierter PC12-Zellen mit der dominant negativen TRPC6-Mutante hTRPC6^{AAA}-eYFP. Die Zugabe der Aktivatoren Hyperforin (10 μM), Hyp1 (10 μM) und Hyp13 (10 μM) auf die mit Fura-2AM beladenen PC12-Zellen erfolgte nach einer einmütigen Aufnahme der basalen Ca²⁺-Werte. (A) präsentiert den Effekt in PC12-Zellen und (B) zeigt die Aktivität in eYFP exprimierenden PC12-Zellen. Wie in (C) dargestellt konnte in dn-hTRPC6_{eYFP} transfizierten PC12-Zellen kein Ca²⁺-Influx registriert werden. (D) Bardigramm präsentiert die durch den Ca²⁺-Influx ausgelösten Effekt auf das Fura-2AM Ratio. Angaben in Mittelwert ± SEM und n/unabhängige Messung ≥ 3. Datenauswertung mit dem ungepaarten zweiseitigen Student's t-test und ns ≥ 0,05; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

5.1.6 Hyp13 Effekt auf den Ionenstrom ist in PC12-Zellen mit dominant negativer TRPC6-Mutante reduziert

Wie im Punkt 5.1.3 beschrieben, führt die Zugabe von Hyp13 in PC12-Zellen auf konzentrationsabhängiger Weise zur Öffnung des TRPC6-Kanals und damit einhergehend durch den Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} -Ionen zur Veränderung des Ionenstromes im Whole-Cell Modus. Hingegen führte die Applikation von Hyp13 in der höchsten getesteten Konzentration von $10 \mu\text{M}$ in den mit dn-TRPC6-eYFP transfizierten PC12-Zellen im Calcium-Imaging zu einem signifikant minimierten Effekt. Durch die Blockade der Ionenleitfähigkeit des TRPC6-Kanals konnten bei der Interaktion mit Hyp13 über einer Spannungsrampe von -100 mV bis $+100 \text{ mV}$ lediglich ein minimal erhöhter Ioneneinstrom und Ionenausstrom während der Strom-Spannungsmessung registriert werden, der im Vergleich zu dem in eYFP transfizierten PC12-Zellen gemessenen Ionenstrom signifikant reduziert war. Darüber hinaus unterschieden sich die Ionenströme bei -100 mV und $+100 \text{ mV}$ in den eYFP transfizierten PC12-Zellen nicht signifikant von jenen, die in den untransfizierten PC12-Zellen beobachtet wurden. Bei der Überprüfung der Aktivität von $10 \mu\text{M}$ Hyperforin und Hyp1 konnten vergleichbare Ergebnisse wie bei Hyp13 festgestellt werden.



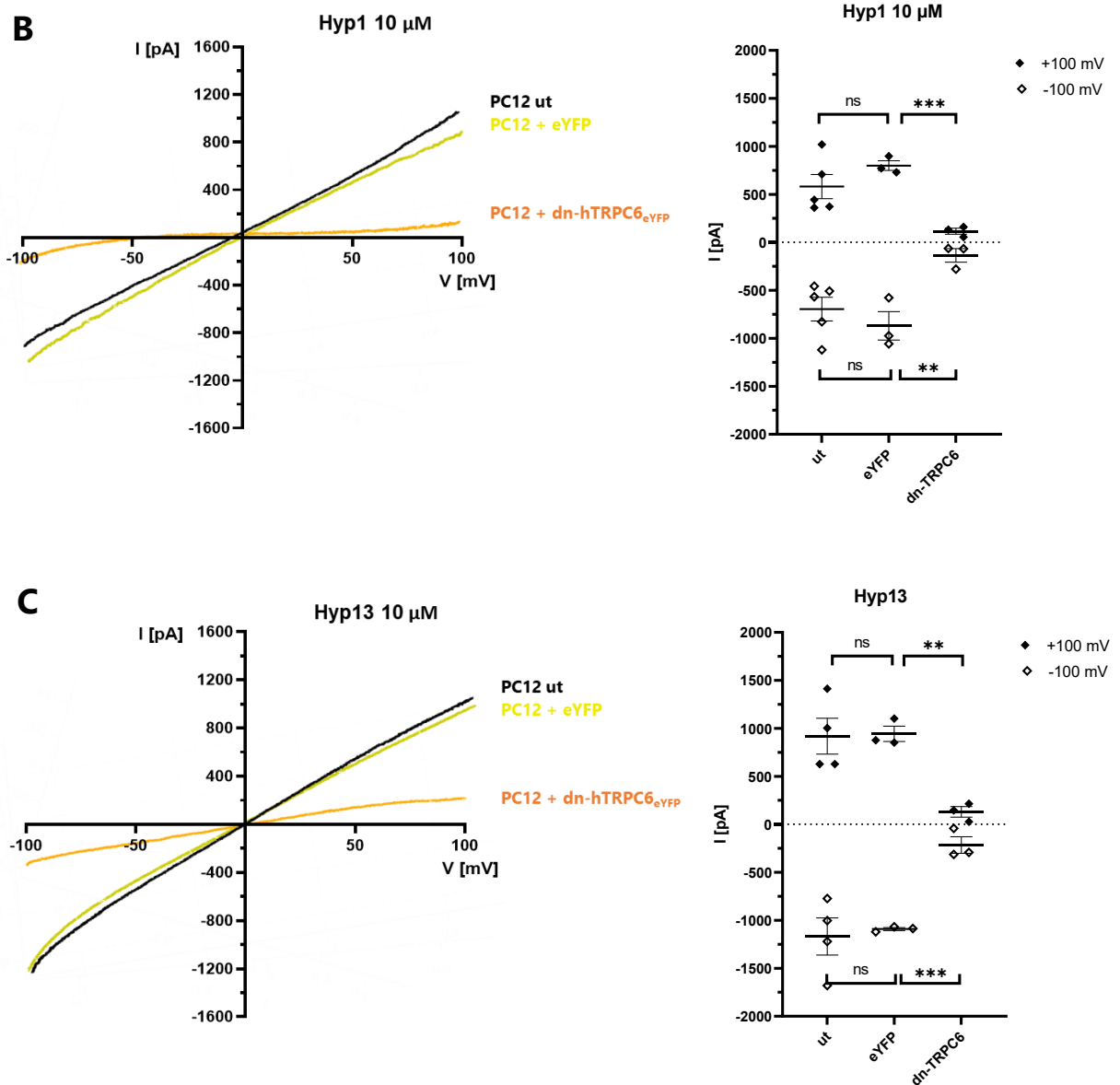


Abb. 36: Hyp13 Effekt ist in transfizierten PC12-Zellen mit hTRPC6AAA-eYFP in der Whole-Cell-Aufzeichnung reduziert. (A) präsentieren Strom-Spannungskurven (I/V-Kurven) nach der Zugabe von Hyperforin (10 μM) und Hyp13 (10 μM). Innerhalb von Spannungsrampen zwischen -100 und +100 mV bei einem Haltepotential von 0 mV wurden ein- und auswärts gerichtete Whole-Cell Ströme gemessen. (C) Angezeigt sind die durch die Zugabe von Hyperforin ausgelösten Netto-Ströme (gemessener Strom abzüglich basaler Strom) bei -100 mV (◇) und +100 mV (♦). Mittelwerte ± S.E.M und n/Zelle ≥ 3. Statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten zweiseitigen Student's t-test ermittelt und ns ≥ 0,05; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Im Ergebnis der bisherigen Versuche konnte gezeigt werden, dass Hyp13 wie auch das Hyp-Derivat Hyp1 und Hyperforin über die Aktivierung des TRPC6-Kanals zu einem signifikant gesteigerten Ca^{2+} -Influx im Calcium-Imaging und zu einem signifikant veränderten Ionenstrom in der Whole-Cell-Aufnahme in PC12-Zellen beiträgt. Die Öffnung des TRPC6-Kanals erfolgte in Abhängigkeit der eingesetzten Aktivator Konzentrationen. Dass Hyperforin in konzentrationsabhängiger Weise die Leitfähigkeit des TRPC6-Kanals und infolgedessen neuronale Prozesse beeinflusst, wurde in der Vergangenheit bereits untersucht.²⁶⁶ Im Calcium-Imaging konnten erst bei einer Aktivator Konzentration von 1 μM Effekte beobachtet werden. Im Patch-Clamp-Experiment konnten anders als im Calcium Imaging sogar Effekte bei 0,3 μM registriert werden, was auf die höhere Empfindlichkeit der elektrophysiologischen Methode zurückzuführen ist. Auf Grund von zunehmend zytotoxischen Effekten bei Hyp-Konzentrationen oberhalb von 10 μM , die zum Absterben der Zellen und zu einem beeinträchtigten Regualtionsmechanismus der TRPC-Kanäle führen würden, wurde die maximale Aktivator Konzentration auf 10 μM festgelegt. Um die gemessenen Aktivitätseffekte von Hyp13 ausschließlich auf den TRPC6-vermittelten Ca^{2+} -Influx zu rekurrieren, wurden die endogen exprimierenden TRPC6-Kanäle in den PC12-Zellen durch eine dn-TRPC6-Mutante in ihrer Funktion eingeschränkt. Dieses Vorgehen resultierte in einer signifikant reduzierten Abnahme der Aktivierung von PC12-Zellen bei der höchsten getesteten Konzentration von 10 μM sowohl im Calcium-Imaging als auch in der Whole-Cell-Aufzeichnung. Gleiches konnte auch für die weiteren Aktivatoren Hyp1 und Hyperforin bestätigt werden. Mit diesem Ergebnis, dass Hyp13 ein selektiver TRPC6-Aktivator ist, der in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Öffnung des TRPC6-Kanals führt, wurde in PC12-Zellen ein neues Hyp-Derivat mit chemisch stabiler Eigenschaft im Vergleich zu Hyperforin charakterisiert.

5.2. Das Bindemotiv LLKL interagiert mit Hyperforin und potenten Hyp-Derivaten und beeinflusst die Aktivierung des TRPC6-Kanals in HEK293-Zellen

5.2.1 Zielgerichtete Mutagenese der hTRPC6 und hTRPC3 Plasmid-DNA führt zur Bildung neuer Mutanten mit veränderten funktionellen Eigenschaften

Wie in früheren Studien gezeigt werden konnte, führt Hyperforin TRPC6-vermittelt zu einer Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und zu einer Depolarisation der Plasmamembran in unterschiedlichen neuronalen Zellsystemen.²⁶⁶ Um nachzuweisen, dass die beobachteten Aktivitätseffekte auf eine direkte Interaktion von Hyperforin mit dem TRPC6-Kanal zurückzuführen sind, wurde im Rahmen eines Screenings mit unterschiedlichen TRPC6-Mutanten die Aktivität von Hyperforin primär im Calcium-Imaging untersucht. Der TRPC6-Kanal ist strukturell befähigt mit den homologen strukturverwandten TRPC3 und TRPC7 funktionierende Ionenkanäle zu formen. Zusätzlich teilen sich die Mitglieder der TRPC3/6/7-Gruppe im Vergleich zu den weiteren TRPCs TRPC1/4/5 die Eigenschaft durch DAG aktiviert zu werden.²⁶⁹ Während DAG als ein unselektiver Aktivator der TRPC3/6/7-Gruppe gilt, besitzt Hyperforin lediglich eine Affinität für den TRPC6-Kanal. Basierend auf diesem Erkenntnis wurden nach einem Sequenzalignment der humanen TRPC3/6/7 Sequenzen jene Aminosäuren in der TRPC6-Sequenz identifiziert, die in der entsprechenden Position innerhalb der humanen TRPC3 und TRPC7 Sequenz verschieden waren. Anschließend erfolgte im Rahmen einer zielgerichteten Mutagenese der hTRPC6-Plasmid-DNA der Austausch der betreffenden Aminosäuren durch jene wie sie in der TRPC3 und TRPC7 Sequenz vorzufinden sind. Dieser Vorgang resultierte in einer Reihe neu geschaffener TRPC6-Mutanten, deren Funktionalität und Reaktion auf Hyperforin und DAG-Analoga im Calcium-Imaging von dem damaligen Doktoranten [REDACTED] aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Friedland in Kooperation mit [REDACTED] [REDACTED] getestet wurden. Die Messung des Ca^{2+} -Influsses erfolgte nach einer Inkubation der HEK293-Zellen mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2AM. Die zuvor mit den hTRPC6-Mutanten transfizierten HEK293-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit zunächst mit OAG (100 μM) voraktiviert und 4 Min. später auf Hyperforin (10 μM) getestet. Unter allen studierten hTRPC6-Mutanten fiel besonders eine durch ihre OAG Aktivierbarkeit aber ihre fehlende Hyperforin Aktivierbarkeit auf. Dabei handelte es sich um die hTRPC6-Mutante IMRI. Die Peptidsequenz IMRI (Ile-Met-Arg-Ile) taucht im hTRPC3- und im hTRPC7-Kanal zu Beginn des C-Terminus in der Nähe der TMD auf und ist in der Position 708-711 bzw. 722-725 lokalisiert. Die korrespondierenden Aminosäuren in hTRPC6 hingegen sind LLKL (Leu-Leu-Lys-Leu) und liegen in der Position 777-780 vor. Im Zuge dieser vorliegenden Arbeit wurde auf Basis dieser TRPC6-Mutante eine nähere Charakterisierung der potenziellen Bindestelle von Hyperforin im TRPC6-Kanal vorgenommen. In der

Konsequenz, dass die Mutante hTRPC6IMRI nicht mit Hyperforin interagiert und es somit zu keiner Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in den Vorversuchen gekommen ist, wurde im nächsten Schritt die Konstruktion einer hTRPC3-Mutante angestrebt, die für die potenzielle Bindung von Hyperforin an TRPC6 die relevante Peptidsequenz LLKL anstelle der Peptidsequenz IMRI in der Position 708-711 beinhaltet. Nachdem die hTRPC6-eYFP und hTRPC3-eYFP Plasmid-DNA sequenziert und aligned wurde, erfolgte das Design von spezifischen Primer-Paaren, die in der PCR-basierten zielgerichteten Mutagenese eingesetzt wurden. Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurde das PCR-Produkt mit DpnI Enzymen verdaut, in kompetente DH5 α E. coli Bakterien transformiert und auf Agarplatten mit Ampicillinresistenz ausplattiert bis am folgenden Tag Kolonien gepickt und in eine Übernachtskultur in LB-Medium hochgezogen wurden. Im Anschluss wurden die transformierten Bakterien mittels eines Minipräp-Kits lysiert und die Plasmid-DNA der Mutanten hTRPC6IMRI-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP aufgereinigt. Um zu kontrollieren, ob die Sequenzen der Mutanten an der richtigen Stelle mutiert waren, in ihrer Länge vollständig waren und keine weiteren unerwünschten Mutationen hatten, wurden die Plasmide beider Mutanten sequenziert und mit den Basissequenzen für hTRPC6 und hTRPC3 im Programm SnapGene verglichen. Das Ergebnis der zielgerichteten Mutagenese zeigte, dass die Mutanten die vorausgesetzten Qualitätsbedingungen erfüllten und für die darauffolgenden Versuchsvorhaben eingesetzt werden konnten.

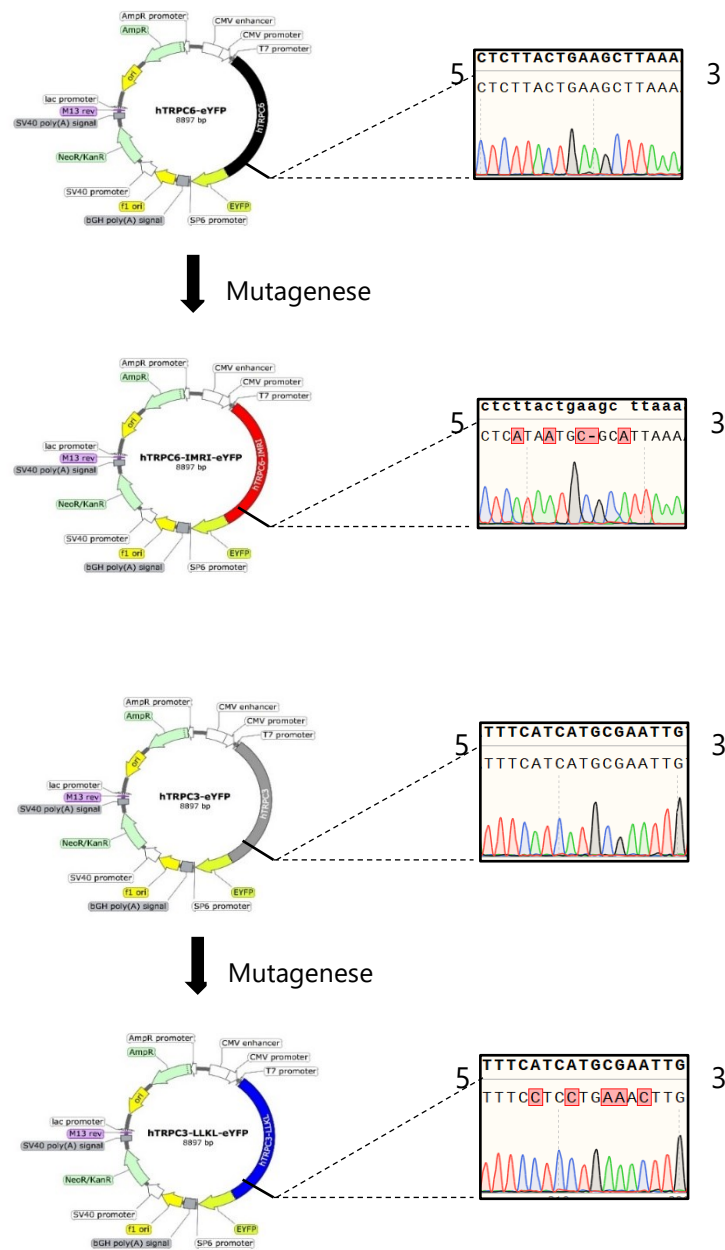


Abb. 37: Alignment der hTRPC6IMRI-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP DNA-Sequenz mit der hTRPC6- und hTRPC3-DNA-Sequenz bestätigt den Austausch der Aminosäuren an der richtigen Position. Plasmidkarte mit pcDNA3.1 Vektor und Insert (Abb. modifiziert nach Kwon et al. 2007)²⁶⁸ sowie Elektropherogramm-Ausschnitte nach der Sequenzierung präsentieren einzelne Fluoreszenz-Signale der Nucleotide in den Farben Grün (Adenin), Schwarz (Guanin), Blau (Cytosin) und Rot (Thymin). Obere Nucleotidsequenz zeigt einen Teil der Basissequenz von hTRPC6 um die Position 777-780 und von hTRPC3 um die Position 708-711 an und darunter die sequenzierte Basenabfolge. Ausgetauschte Basen in der Mutanten-Sequenz sind rot gefärbt.

5.2.2 Verifikation der zellulären Lokalisation und der Proteinexpressionsintensität der Mutanten hTRPC6IMRI und hTRPC3LLKL in HEK293-Zellen

Eine wichtige Ausgangsvoraussetzung für die Charakterisierung der Funktionalität der Mutanten hTRPC6IMRI und hTRPC3LLKL in HEK293-Zellen, ist eine vorausgehende Analyse ihrer Lokalisation in der Plasmamembran und ihrer Expressionsdichte im Vergleich zu den nicht mutierten Kanalproteinen hTRPC6 und hTRPC3. Aus früheren Studien ist bekannt, dass Mutationen im TRPC6- oder TRPC3-Kanal nicht nur die Ionenleitfähigkeit und Bindungsaffinität von Liganden verändern können, sondern entsprechend der Art und Lokalisation der Mutation Einfluss auf die posttranslationale Modifikation nehmen können.²⁷⁰ Für TRPC3 beispielsweise wurden in direkter Nachbarschaft zur Mutationsstelle IMRI für die hochkonservierte Aminosäure Serin 712 beschrieben, dass diese durch die Proteinkinase C (PKC) in HEK293-Zellen phosphoryliert wird, was die Öffnungswahrscheinlichkeit nach einer Stimulation des TRPC3-Kanals mit dem DAG-Analogon OAG reduziert. Weil DAG auch die PKC aktivieren kann, wurde für OAG eine duale Funktion angenommen, die in eine positive und negative Regulation des TRPC3-Kanals mündet.²⁷¹ Nachdem die HEK293-Zellen im Vollmedium transfiziert wurden, fand etwa 24 Stunden später ihre Übertragung auf einen Objektträger statt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen mit Licht der Anregungswellenlänge für YFP ($\lambda = 513$ nm) angeregt, das emittierende Licht ($\lambda = 527$ nm) detektiert und vom Bildgebungsprogramm Nis-Elements Br bearbeitet. Auf den Fluoreszenzbildern konnte bei hTRPC6-eYFP und hTRPC3-eYFP und ebenso bei hTRPC6IMRI-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP, transfizierten HEK293-Zellen anhand gleichmäßig verteilter fluoreszierender Punkte in der Plasmamembran die korrekte Lokalisation der Kanalproteine bestimmt werden. Im Vergleich dazu war die Expression von eYFP in transfizierten HEK293-Zellen von einer diffusen Verteilung im Zytosol gekennzeichnet. Die Fluoreszenzbilder geben im Ergebnis die Expression und Integration der beiden Mutanten hTRPC6IMRI und hTRPC3LLKL in die Plasmamembran an der richtigen Position in der Zelle an.

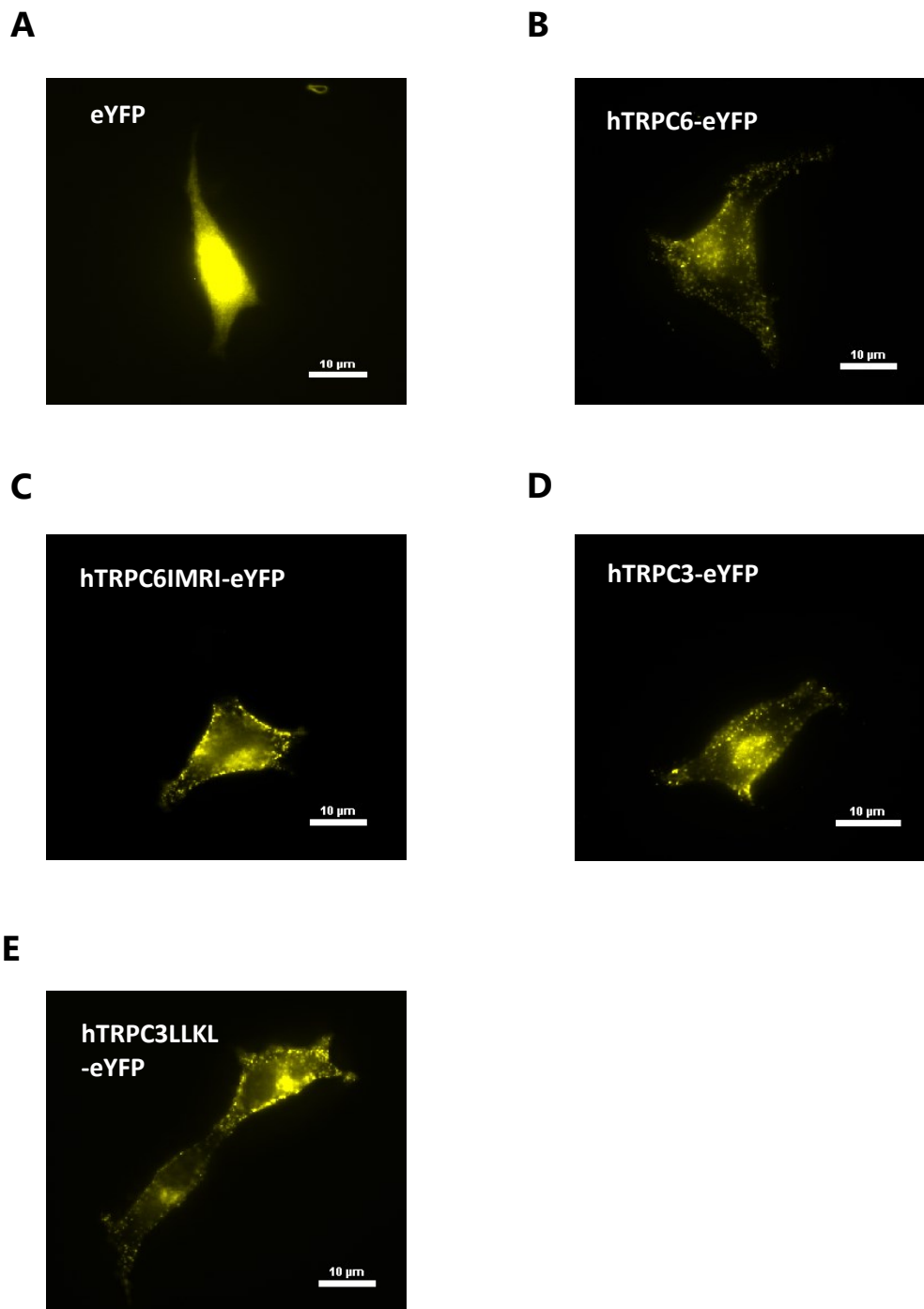
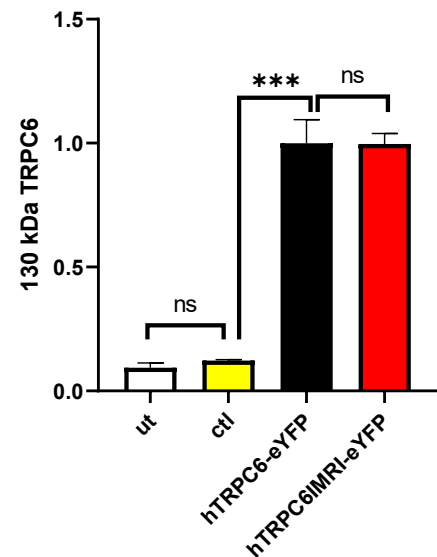
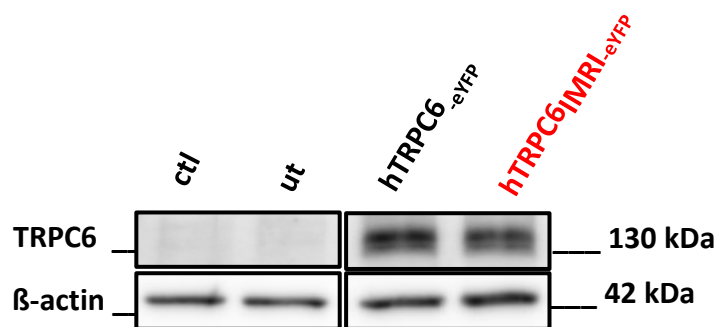


Abb. 38: Fluoreszenzimagining transfizierter HEK293-Zellen bestätigt die korrekte Lokalisation der hTRPC3/6-Mutanten in der Plasmamembran. Visualisierung mit dem Fluoreszenzmikroskop und entsprechenden Emissionsfilter für YFP bei einer Wellenlänge von 527 nm. Fluoreszenzbilder präsentieren HEK293-Zellen, die 24 Stunden vor der mikroskopischen Aufnahme transfiziert wurden mit (A) eYFP (Kontrolle, ctI), (B) hTRPC6-eYFP, (C) hTRPC6IMRI-eYFP, (D) hTRPC3-eYFP und (E) hTRPC3LLK-eYFP. Native und mutierte hTRPC3/6-Proteine sind in der Plasmamembran lokalisiert und als fluoreszierende Punkte erkennbar. eYFP ist im Zytosol homogen verteilt. Skalierungsbalken = 10 µm. n/ transfizierte Zellprobe = 3.

Um zu bestätigen, dass die zu untersuchenden mutierten und nicht modifizierten TRPC3/6-Kanäle hinsichtlich ihrer Expressionsintensität vergleichbar sind, wurden aus den mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfizierten HEK293-Zellen Proteinlysate angefertigt und diese im Western Blot mit für TRPC3 und TRPC6 spezifische monoklonalen Antikörper überprüft. Wie zu erwarten, evozierte eYFP die Expression von TRPC3/6 in HEK293-Zellen nicht und es konnte kein signifikanter Unterschied zu untransfizierten (ut) HEK293-Zellen verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu, zeigte der Immunoblot der weiteren Proteinlysate, dass im Falle der Mutanten die Expression nicht beeinträchtigt oder verstärkter vorlag als bei hTRPC6 und hTRPC3.

A



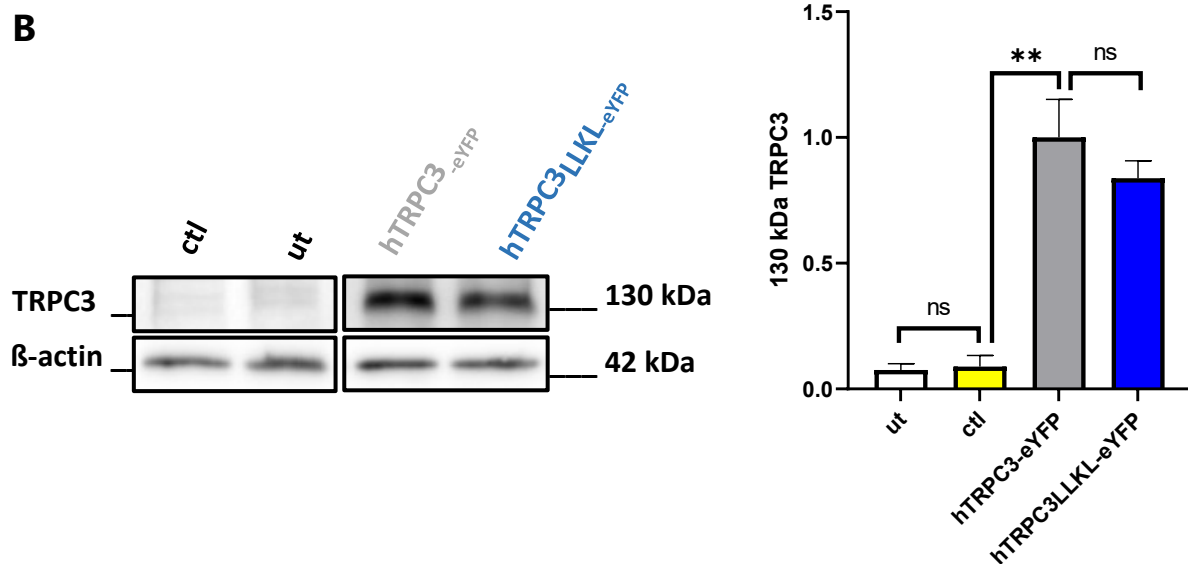
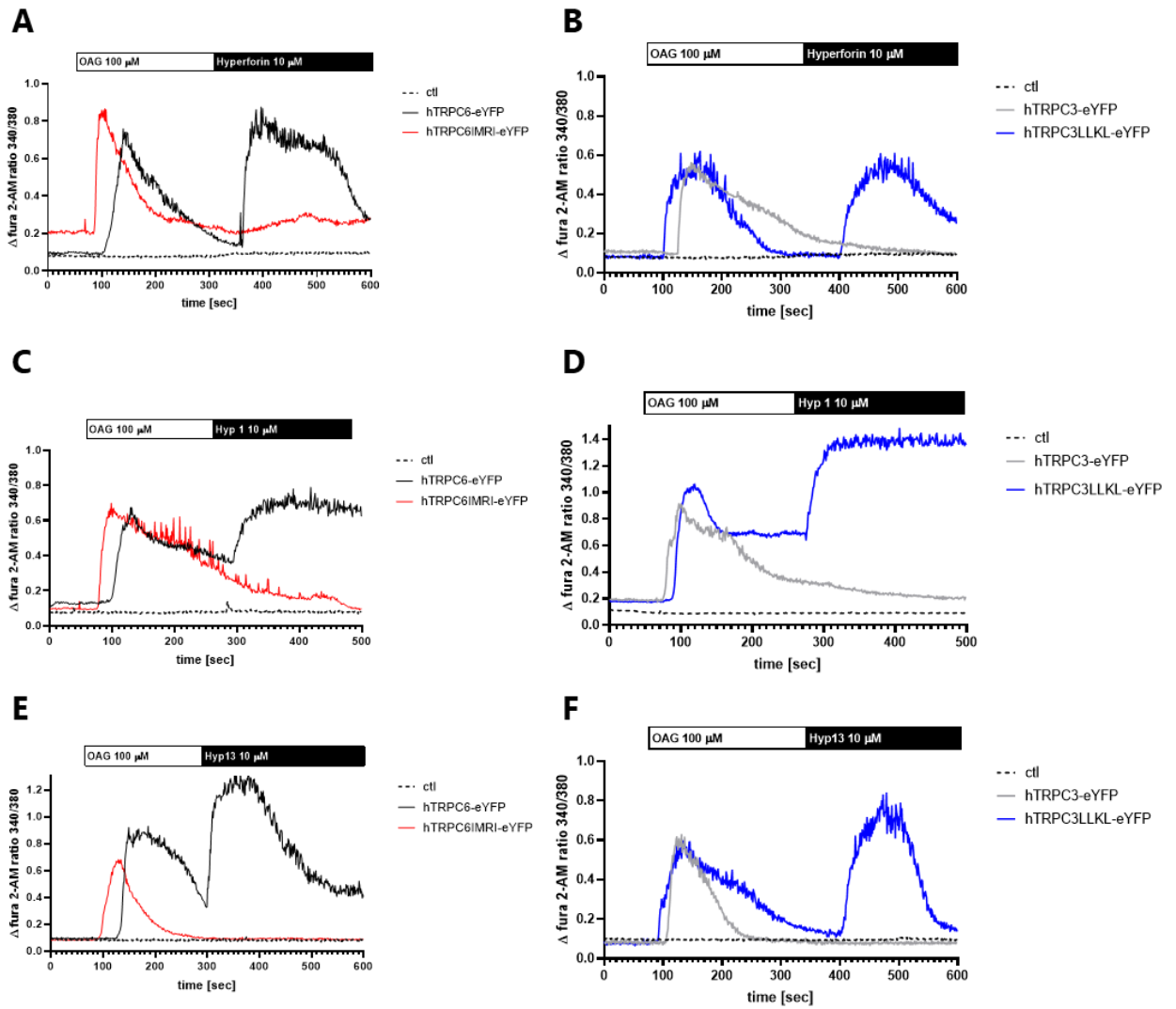


Abb. 39: Western Blot transifizierter HEK293-Zellen präsentiert vergleichbare Proteinexpressionsintensitäten zwischen hTRPC6, hTRPC3 und Mutanten. Western Blot mit 20 µg Proteinextrakt aus untransfiziert (= ut) und 24 Stunden zuvor mit eYFP, hTRPC6-eYFP, hTRPC6IMRI-eYFP, hTRPC3-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP transfizierten HEK293-Zellen. (A) Verwendeter Anti-TRPC6-Antikörper detektiert das hTRPC6-eYFP und hTRPC6IMRI-eYFP Protein bei 130 kDa. (B) Analyse der Expressionsintensität von hTRPC6-eYFP und hTRPC6IMRI-eYFP in HEK293-Zellen. Die Normierung der einzelnen Proben erfolgte auf β-Actin. (C) Eingesetzter Anti-TRPC3-Antikörper signalisiert das hTRPC3-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP Protein bei 130 kDa. (D) Analyse der Expressionsintensität von hTRPC3-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP in HEK293-Zellen. Die Normierung der einzelnen Proben erfolgte auf β-Actin. Die Daten in (C) und (D) wurden mit dem ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test berechnet und ns ≥ 0,05; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ****p < 0,0001. Dargestellt wurden sie als Mittelwerte ±SEM, n/Proteinextrakt = 3.

5.2.3 Die Mutanten hTRPC6IMRI und hTRPC3LLKL beeinflussen die Effekte selektiver TRPC6-Aktivatoren auf den Ca²⁺-Influx im Calcium-Imaging

Nach erfolgreicher Validierung der Mutanten hTRPC6IMRI und hTRPC3LLKL im Fluoreszenzimaging und Western Blot erfolgte die Kontrolle der Funktionalität der Mutanten im Calcium-Imaging. Die mit hTRPC6-eYFP, hTRPC6IMRI-eYFP, hTRPC3-eYFP, hTRPC3LLKL-eYFP und eYFP-Plasmid-DNA transfizierten HEK293-Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmarker Fura-2AM inkubiert und anschließend in einer mit HBSS-Pufferlösung gefüllten Badkammer fixiert und unter das Fluoreszenzmikroskop platziert. Damit die Aktivierbarkeit der Plasmid-DNA beladenen HEK293-Zellen vor der Zugabe eines selektiven TRPC6-Aktivatoren sichergestellt werden konnte, wurde vor jeder Messung die Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration überwacht. Hierzu wurde OAG (100 µM) 60 Sek. nach der Aufnahme des basalen Fura-2AM 340/380 Verhältnisses auf die HEK293-Zellen pipettiert und 4 Min.

später der Effekt von Hyperforin (10 μM), Hyp1 (10 μM) oder Hyp13 (10 μM) getestet. Es wurden lediglich die Signalkurven ausgewertet, die vor Messstart auf das Fluoreszenzlicht für YFP reagierten und nach der Zugabe von OAG aktivierbar waren. Die Analyse der Fura-2AM 340/380 Beziehung zeigte erwartungsgemäß, dass in HEK293-Zellen mit eYFP-Plasmid-DNA eine Zugabe der Aktivatoren keine Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration herbeiführt. Die Zugabe von Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 (jeweils 10 μM) zeigte eine hTRPC6-eYFP vermittelte signifikante Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die in hTRPC3-eYFP exprimierenden HEK293-Zellen ausgeblieben ist. Die Applikation des Voraktivators OAG konnte hingegen sowohl hTRPC3/6 als auch die Mutanten vollends aktivieren und evozierte einen signifikanten Ca^{2+} -Einstrom, was verdeutlicht, dass OAG anders als zu Hyperforin und seinen Analoga über ein multimodales Aktivitätsprofil verfügt. Wie eingangs beschrieben konnten Vorversuche Hinweise auf die besondere Rolle der Mutante hTRPC6IMRI im Aktivierungsmechanismus von Hyperforin geben. Die fehlende Aktivierbarkeit von hTRPC6IMRI durch Hyperforin bei gleichzeitig existierender Aktivität durch den unselektiven Aktivator OAG (100 μM) wurde im Calcium-Imaging ein weiteres Mal bestätigt. Um herauszufinden, ob das Peptid LLKL in TRPC6 tatsächlich mit Hyperforin in Wechselwirkung tritt und eine Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit nach sich zieht, wurde die Mutante hTRPC3LLKL gemessen. Im Vergleich zu hTRPC3 konnte Hyperforin die entsprechende Mutante stimulieren und eine signifikante Steigerung des Ca^{2+} -Influxes in HEK293-Zellen auslösen, der nicht minder die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration erhöhte wie für hTRPC6 beobachtet wurde. Nach der Überprüfung der Hyperforin induzierten Wirkung auf das intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationslevel stellte sich die nächste Frage, ob die beiden Phloroglucionol-Derivate Hyp1 und Hyp13 das gleiche Aktivitätsprofil aufweisen wie Hyperforin. Hyp1 (10 μM) und Hyp13 (10 μM) vermochten hTRPC6 im gleichen Maße zu aktivieren wie hTRPC3LLKL während hTRPC3 und hTRPC6IMRI nicht zu einem signifikanten Ca^{2+} -Influx führten.



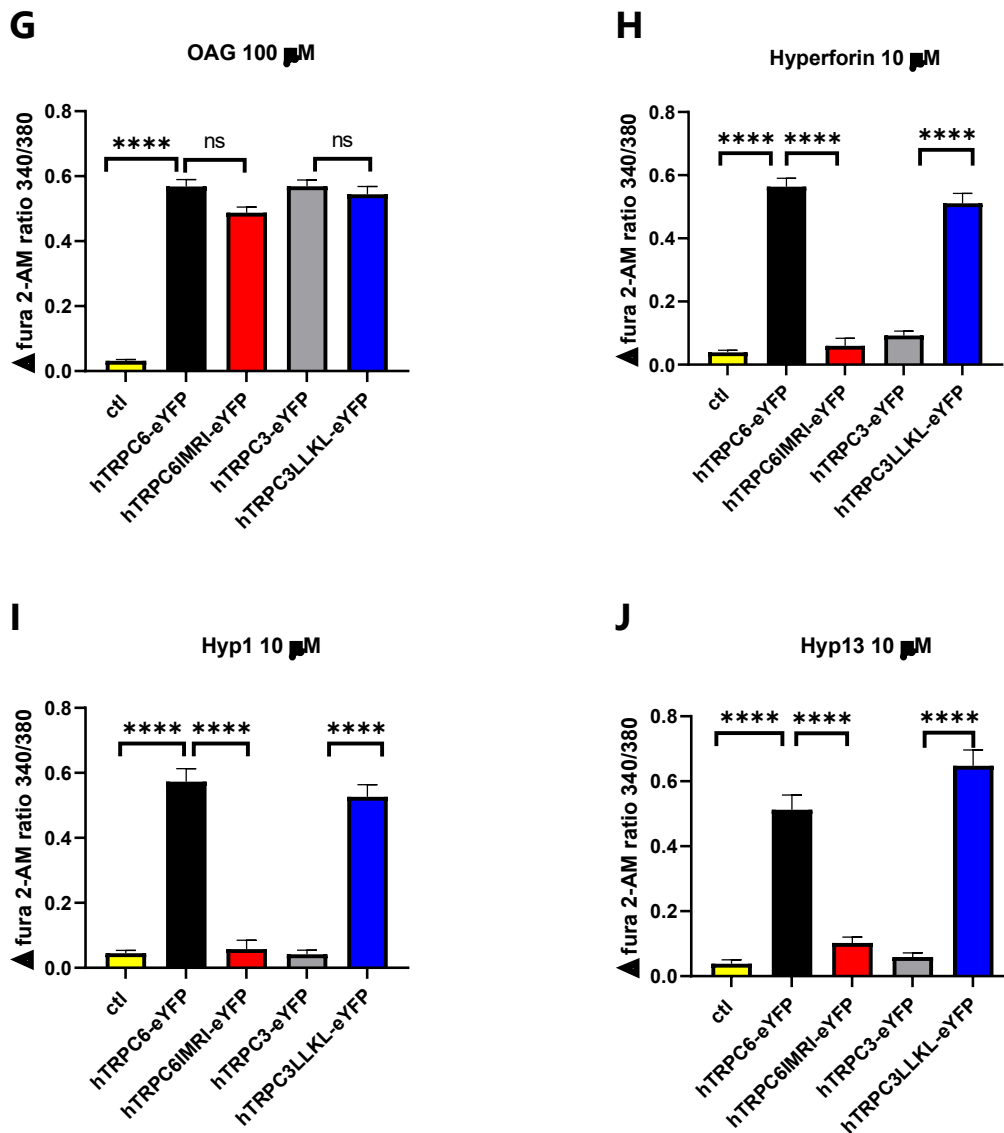


Abb. 40: Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 führen zu einem signifikanten Ca^{2+} -Influx in hTRPC6-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP transfizierten HEK293-Zellen. Dargestellt sind Zeitverläufe von eYFP (ctl), hTRPC6-eYFP, hTRPC3-eYFP, hTRPC6IMRI-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP gegen das Fura-2AM Ratio 340/380. Die Zugabe des unselektiven Aktivators OAG (100 μ M) erfolgte nach einer einmütigen Aufnahme der basalen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen. 4 Min. später erfolgte die Zugabe der selektiven Aktivatoren Hyperforin (10 μ M) (A + B), Hyp1 (10 μ M) (C + D) und Hyp13 (10 μ M) (E + F). Wie in den Bardiagrammen (H) bis (J) gezeigt, führte die Stimulation mit Hyperforin, Hyp1, Hyp13 in HEK293-Zellen mit hTRPC6 und hTRPC3LLKL Überexpression zu einer signifikanten Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was sich in einer Zunahme des Fura-2AM 340/380 Verhältnisses widerspiegelte. Hingegen konnten die drei selektiven Aktivatoren anders als OAG (G) keine Steigerung der Ca^{2+} -Influxes in hTRPC3-eYFP und hTRPC6IMRI-eYFP transfizierten HEK293-Zellen auslösen. Alle eingesetzten Aktivatoren blieben in HEK293-Zellen mit eYFP wirkungslos. Angaben in Mittelwert \pm SEM und n/unabhängige Messung \geq 6. Datenauswertung erfolgte mit dem ungepaarten zweiseitigen Student's t-test und ns \geq 0,05; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

5.2.4 Die Mutanten hTRPC6IMRI und hTRPC3LLKL beeinflussen die Effekte selektiver TRPC6-Aktivatoren auf den Ionenstrom in der Whole-Cell Aufnahme

Im Calcium-Imaging konnte nachgewiesen werden, dass die Aminosäure Sequenz LLKL im C-terminus des TRPC6-Kanals relevant für die Ionenleitfähigkeit ist, sobald Hyperforin und potente Hyp-Derivate wie Hyp1 und Hyp13 mit ihr interagieren. Um dieses Bindemotiv weiter elektrophysiologisch zu charakterisieren, wurde im nächsten Schritt die Funktion von hTRPC3/6 und Mutanten in HEK293-Zellen im Whole-Cell Modus untersucht. Zu Beginn wurde die Aktivierbarkeit der transfizierten HEK293-Zellen durch die Messung des Ionenstroms bei ± 100 mV nach der Zugabe des unselektiven Aktivators SAG (100 μ M) überprüft. Mit Ausnahme von eYFP, konnten alle getesteten Ionenkanäle von SAG signifikant stimuliert werden, was sich in einer signifikanten Veränderung der Strom-Spannungs-Beziehung äußerte.

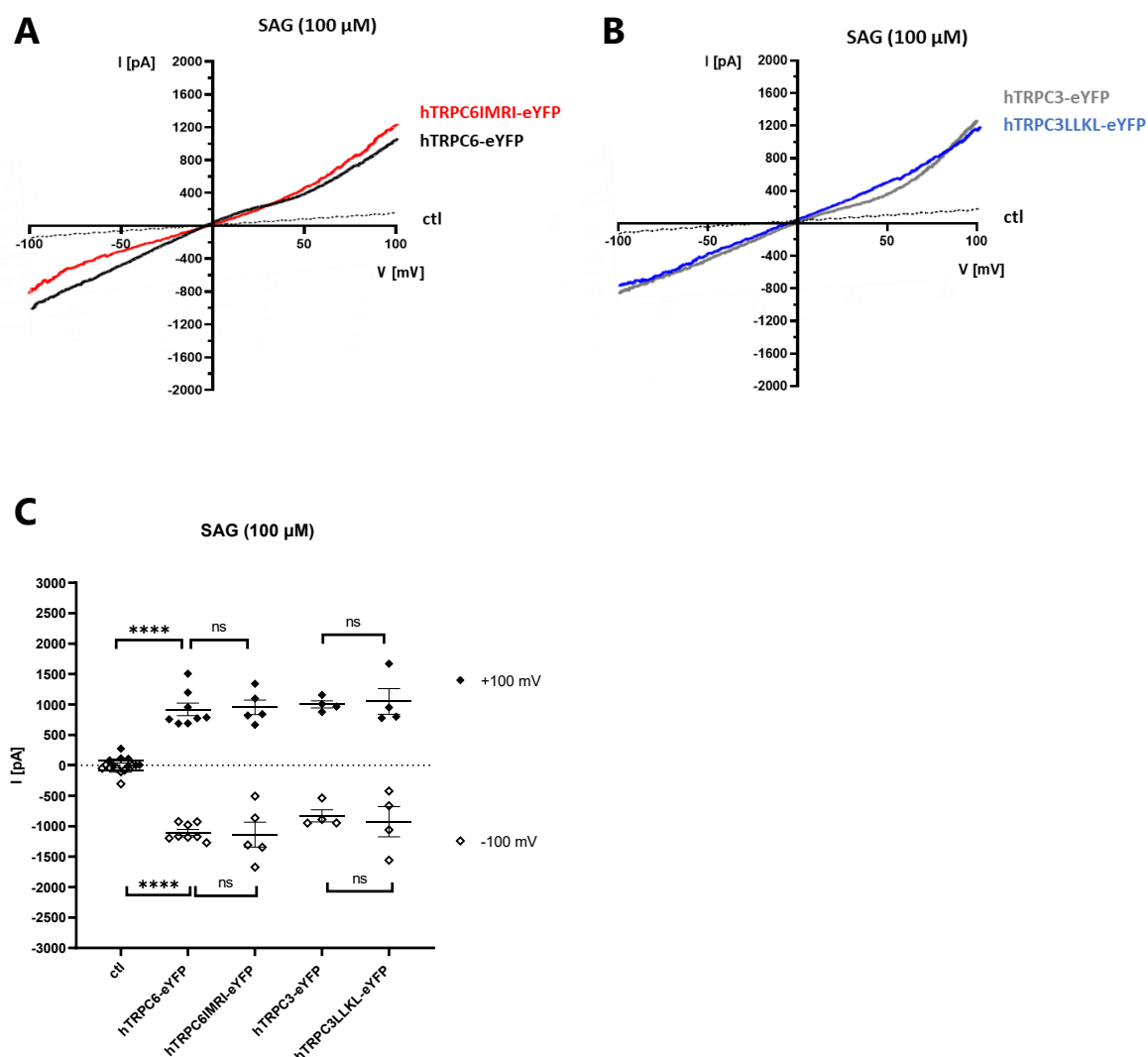
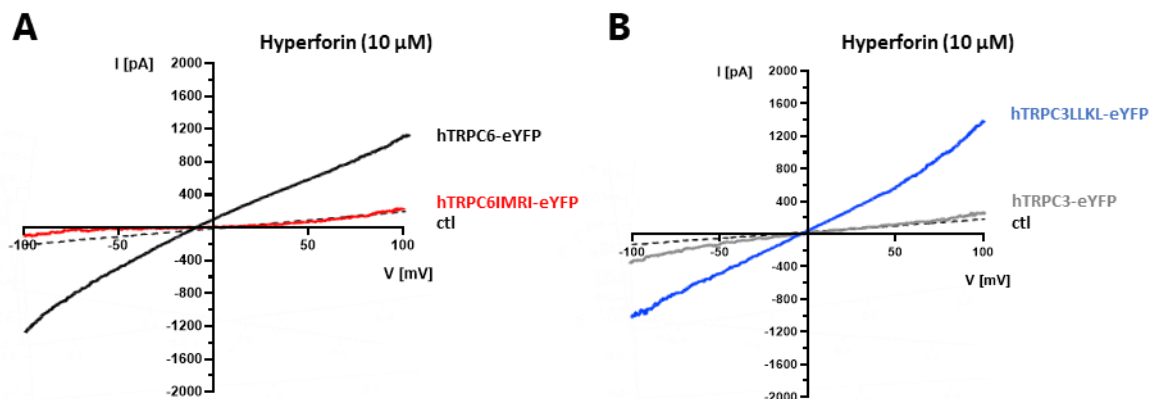
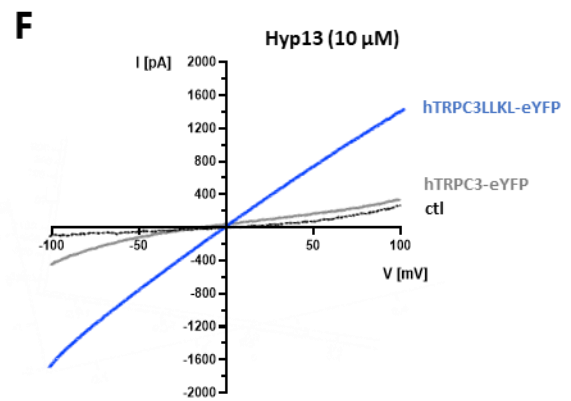
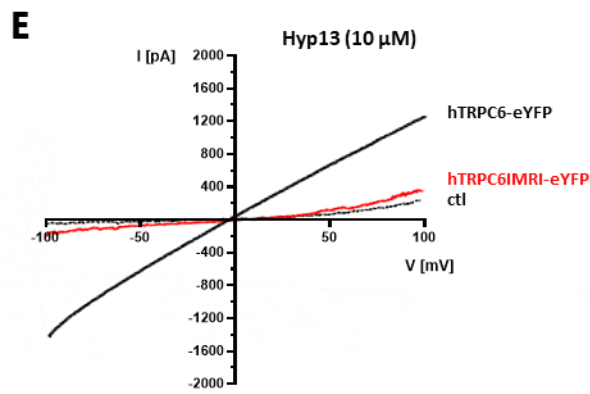
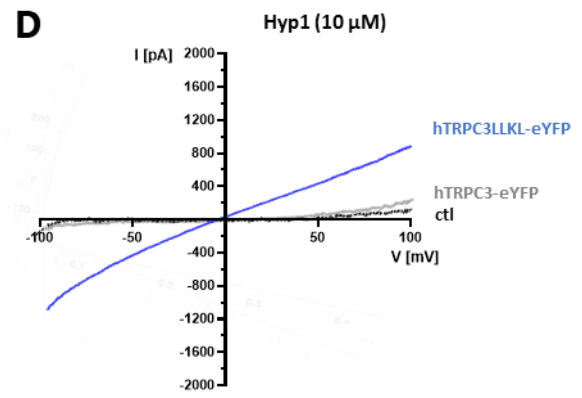
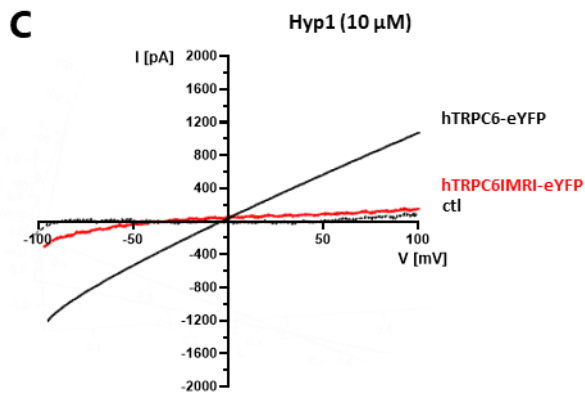


Abb. 41: SAG induziert eine Steigerung des Ionenstroms in mit hTRPC3-eYFP, hTRPC6-eYFP, hTRPC3LLKL-eYFP und hTRPC6IMRI-eYFP transfizierten HEK293-Zellen. (A) + (B) präsentieren Strom-Spannungskurven (I/V-Kurven) nach der Zugabe des unselektiven Aktivators SAG (100 μ M). SAG induziert ein- und auswärts gerichtete Ströme entlang der Membran nach der Aktivierung von hTRPC6, hTRPC3, hTRPC6IMRI, und hTRPC3LLKL aber nicht von eYFP. Whole-Cell Ströme stiegen innerhalb von Spannungsrampen zwischen -100 und +100 mV bei einem Haltepotential von 0 mV an. (C) Angezeigt sind die durch die Zugabe von SAG ausgelösten Netto-Ströme (gemessener Strom abzüglich basalen Stroms) bei -100 mV (\diamond) und +100 mV (\blacklozenge), Mittelwerte \pm S.E.M und n/Zelle \geq 3. Statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten zweiseitigen Student's t-test ermittelt und ns \geq 0,05; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Nachdem eine Aktivierbarkeit der zu untersuchenden Ionenkanäle durch SAG demonstriert werden konnte, wurde der Effekt der selektiven TRPC6 Aktivatoren Hyperforin, Hyp1, und Hyp13 in der Konzentration von 10 μ M getestet. Das Ergebnis des elektrophysiologischen Messverfahrens bestätigt die im Calcium-Imaging beobachteten Effekte. HEK293-Zellen, die hTRPC6-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP Ionenkanäle exprimierten, bildeten nach ihrer Stimulation mit Hyperforin (10 μ M) und Hyp 13 (10 μ M) eine signifikante Zunahme des Ionenstroms, während die erwartungsgemäß ausbleibende Steigerung des Ionenstroms in hTRPC3-eYFP ebenfalls in hTRPC6IMRI-eYFP beobachtet werden konnte. Die Veränderung des Ionenstroms zeigte sich in der Strom-Spannungsbeziehung in Form eines aus- und einwärts gerichteten Stromes innerhalb einer Spannungsrampe zwischen +100 mV und -100 mV.





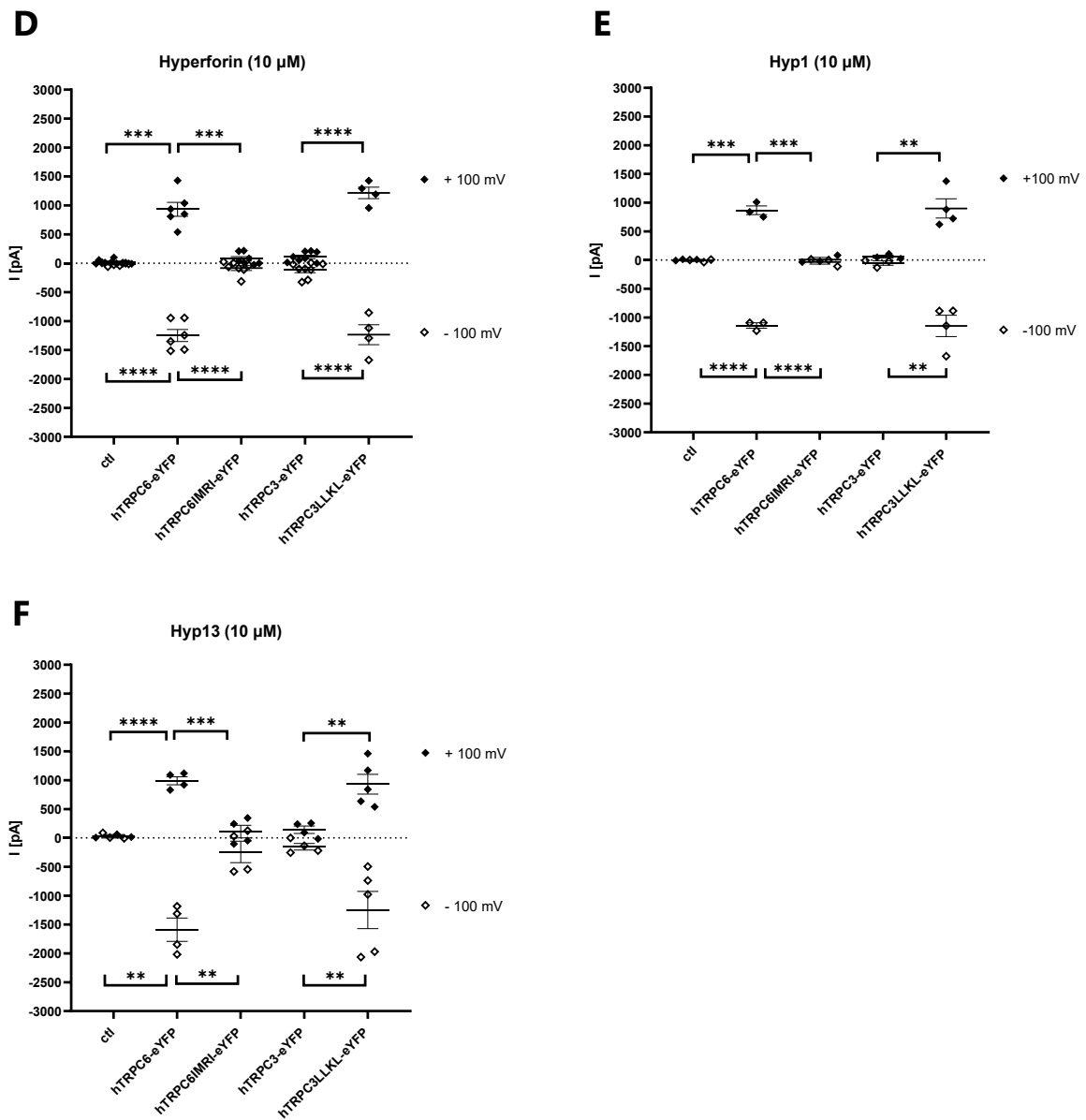
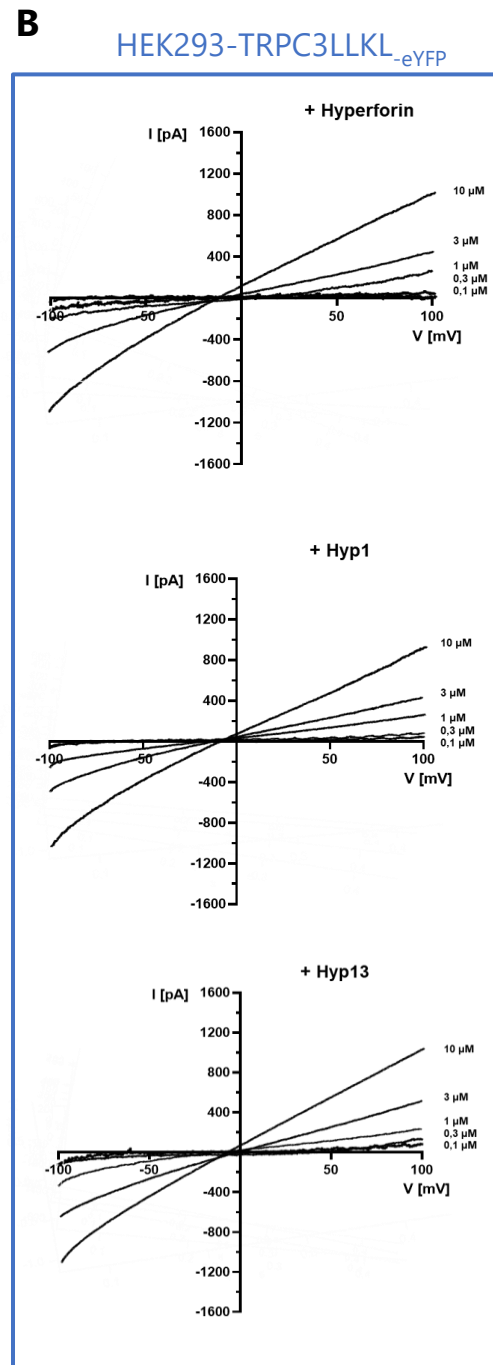
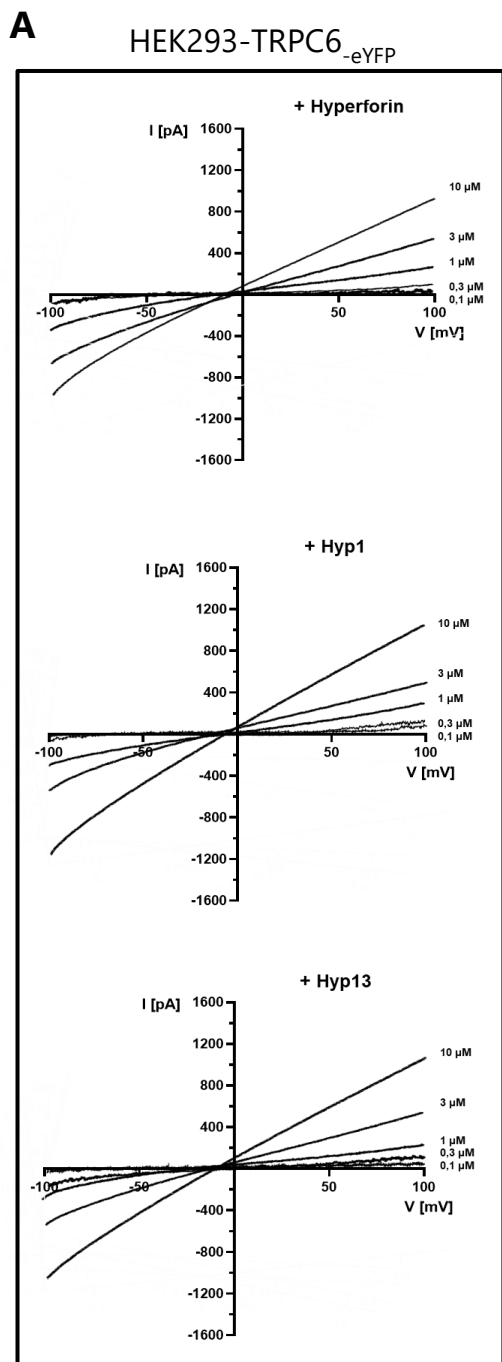
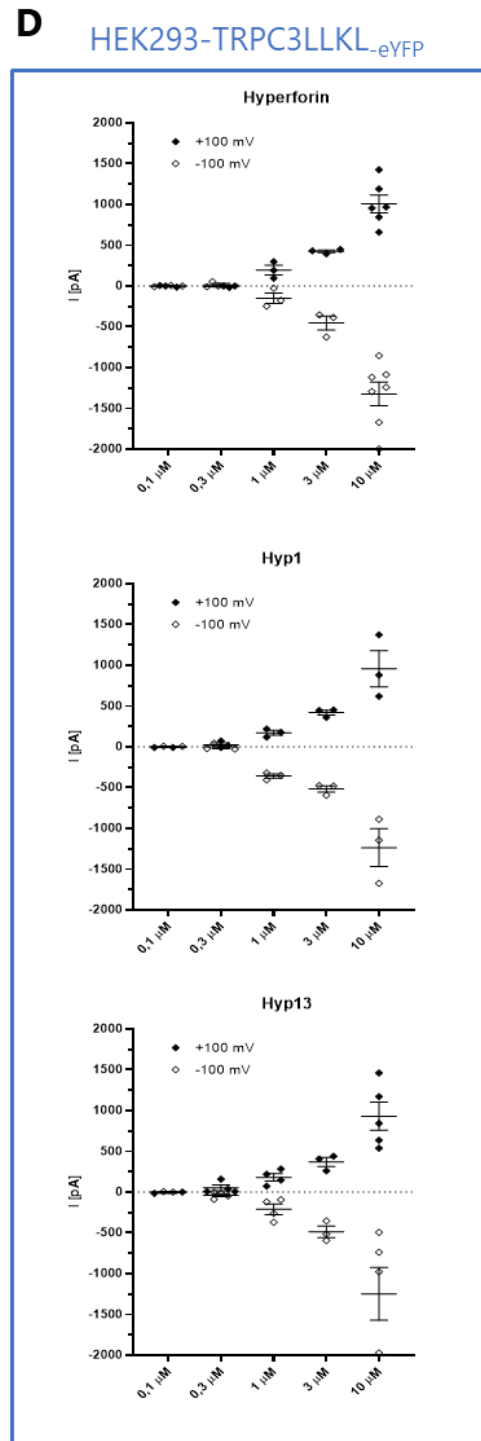
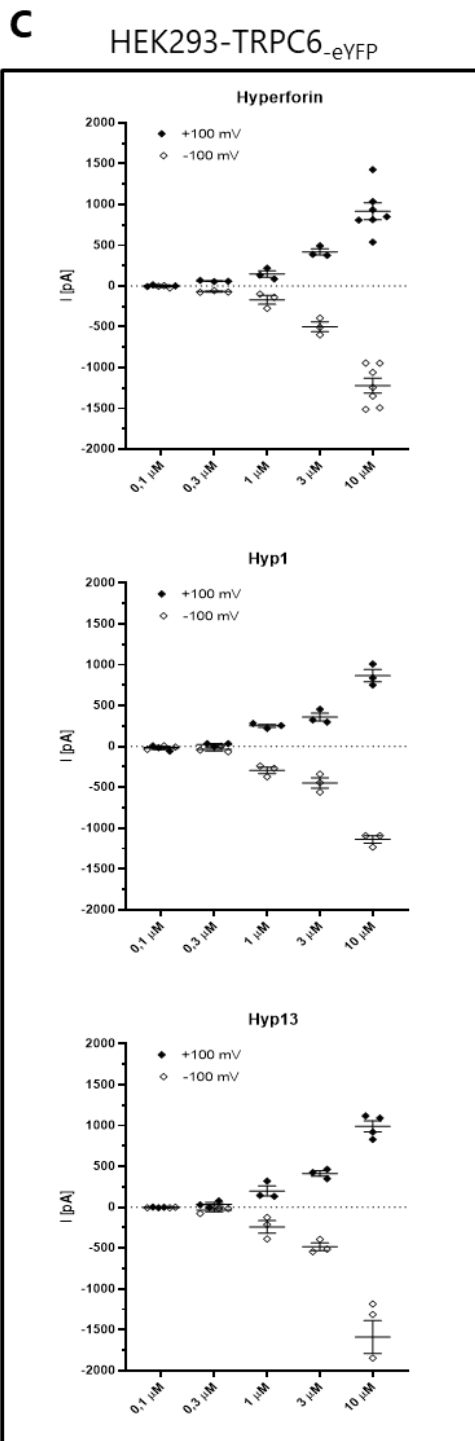


Abb. 42: Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 induzieren eine Steigerung des Ionenstroms in mit hTRPC6-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP transfizierten HEK293-Zellen. (A) bis (F) präsentieren Strom-Spannungskurven (I/V-Kurven) nach der Zugabe von Hyperforin (10 μ M) auf hTRPC6-eYFP, hTRPC3-eYFP, hTRPC6IMRI-eYFP, hTRPC3LLKL-eYFP und eYFP exprimierenden HEK293-Zellen. Innerhalb von Spannungsrampen zwischen -100 und +100 mV bei einem Haltepotential von 0 mV wurden ein- und auswärts gerichtete Whole-Cell Ströme gemessen. (D) bis (F) zeigen die durch die Zugabe der selektiven TRPC6-Aktivatoren ausgelösten Netto-Ströme (gemessener Strom abzüglich basalen Strom) bei -100 mV (\diamond) und +100 mV (\blacklozenge), Mittelwerte \pm S.E.M und n/Zelle \geq 3. Statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten zweiseitigen Student's t-test ermittelt und ermittelt und ns \geq 0,05; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

5.2.5 Die Ionenkanäle hTRPC6 und hTRPC3LLKL werden durch selektive TRPC6-Aktivatoren konzentrationsabhängig in der Whole-Cell Aufnahme stimuliert

In 5.1.3 konnte dargestellt werden, dass Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 mit steigender Konzentration den elektrochemischen Gradienten entlang der Plasmamembran in PC12-Zellen verschieben, was sich in einer stetigen Zunahme des Strom-Spannungsverhältnisses zeigte. Um zu belegen, dass das Bindemotiv LLKL nicht nur bei einer potenten Aktivator-Konzentration von 10 μM zu einer Kanalöffnung führt, vielmehr die Bindungsaffinität von Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 konzentrationsabhängig ist, wurden die Effekte bei 0,1 μM , 0,3 μM , 1 μM , 3 μM und 10 μM auf das Membranpotential gemessen und anschließend die EC_{50} -Werte berechnet. Mit steigender Aktivator-Konzentration veränderte sich stufenweise der Ionenstrom in hTRPC6-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP exprimierenden HEK293-Zellen und am stärksten bei der höchsten Aktivator-Konzentration (10 μM). Erste Veränderungen des Ionenstroms konnten bei der Zugabe aller selektiven TRPC6-Aktivatoren ab einer Konzentration von 0,3 μM registriert werden, was schon bei der Testung der Aktivitäten von Hyperforin, Hyp1, und Hyp13 in PC12-Zellen beobachtet werden konnte. Zusätzlich lag bei allen untersuchten Aktivator-Konzentrationen das Umkehrpotential der Strom-Spannungskennlinie um den Nullpunkt, was darauf hindeutet, dass erst beim Vorliegen eines positiven oder negativen Membranpotentials ein Stromfluss vermittelt wird. In mit hTRPC6-eYFP transfizierten HEK293-Zellen wurden für Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 halbmaximale Effektkonzentrationen bei 2,33 μM , 2,55 μM , 2,75 μM erreicht und in mit der Mutante hTRPC3LLKL-eYFP behandelten HEK293-Zellen entsprechend 2,43 μM , 2,91 μM , 2,71 μM .





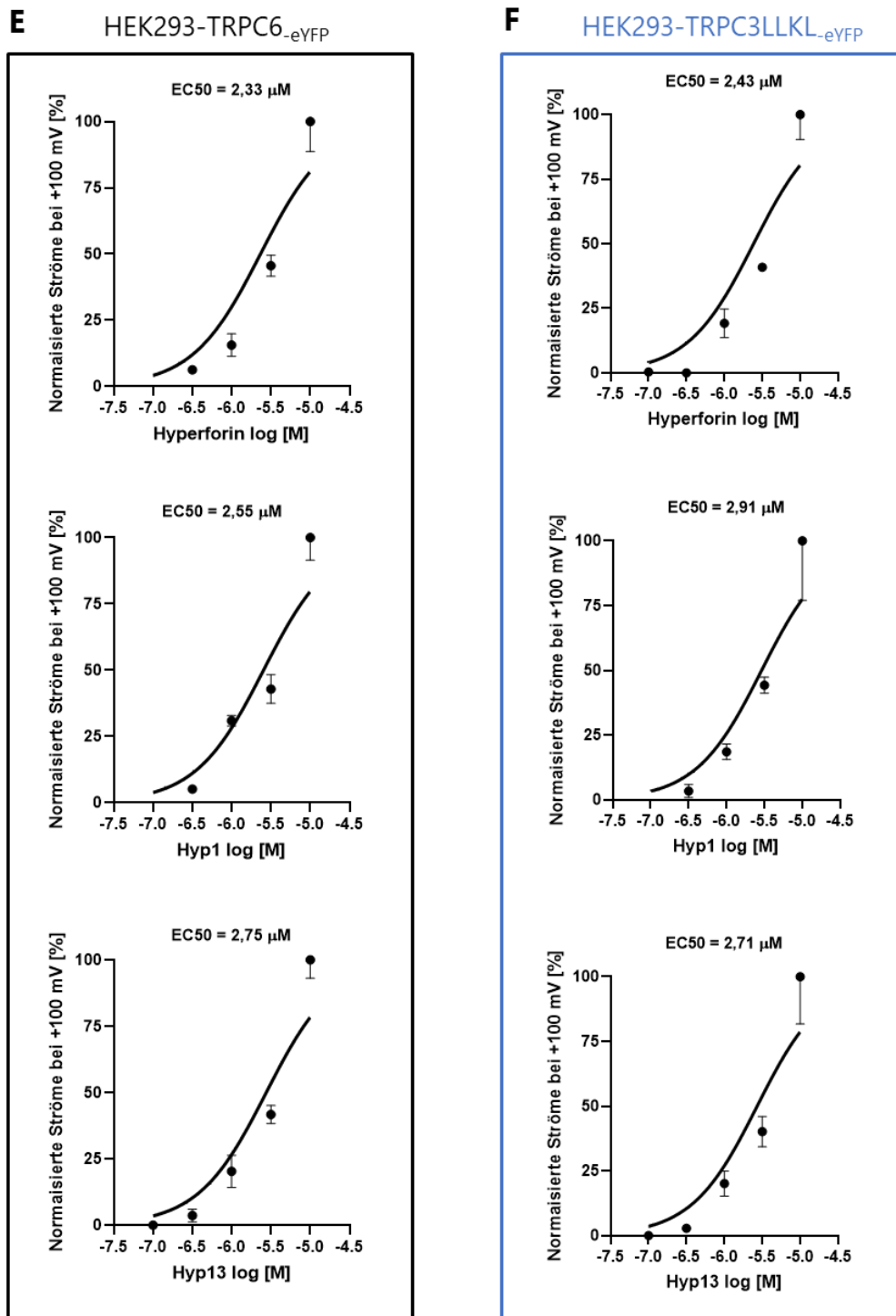


Abb. 43: Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 führen zu einer konzentrationsabhängigen Veränderung des Ionenstroms in mit hTRPC6_{eYFP} und hTRPC3LLKL_{eYFP} transfizierten HEK293-Zellen. Strom-Spannungsbeziehung von (A) hTRPC6_{eYFP} und (B) hTRPC3LLKL_{eYFP} transfizierten HEK293-Zellen nach der Applikation der Aktivoren Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 in den Konzentrationen 0,1 μM, 0,3 μM, 1 μM, 3 μM, und 10 μM in der Whole-Cell-Aufzeichnung resultieren in einer stetigen Zunahme aus- und einwärtsgerichteter Ströme innerhalb einer Spannungsrampe von +100 mV bis 100 mV mit zunehmender Substanzkonzentration. (C + D) zeigen zu den Signalkurven jedes Aktivators und den angegebenen Konzentrationen das entsprechende Diagramm, das die positiven und negativen Ströme bei +100 mV (♦) und -100 mV (◇) nach Abzug der basalen Ionenströme zusammenfasst. (E + F) präsentieren die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der logarithmierten

Aktivator Konzentrationen und normalisierten aufwärtsgerichteten Strömen bei +100 mV. EC₅₀-Werte wurden durch eine nichtlineare Regressionsanalyse analysiert. EC₅₀-Werte in hTRPC6-eYFP exprimierenden HEK93-Zellen für Hyperforin (2,33 µM), Hyp1 (2,55 µM) und Hyp13 (2,75 µM) und EC₅₀-Werte in hTRPC3LLKL-eYFP exprimierenden HEK93-Zellen für Hyperforin (2,43 µM), Hyp1 (2,91 µM) und Hyp13 (2,71 µM). Angaben in Mittelwert ± SEM und n/Anzahl der Zellen ≥ 3.

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der verhaltensexperimentellen Untersuchung der TRPC6-KO Maus vorgestellt. Die angewendete Verhaltenstestbatterie umfasste Tests für das Arbeitsgedächtnis, räumliche Gedächtnis, lokomotorische Aktivität, Geselligkeit und Geruchspräferenz und ist an die von Jene et al. etablierte Verhaltenstestbatterie angelehnt.

5.3 Verhaltensexperimente

5.3.1 Spontaneous Alternation Behavior Test (SABT)

In diesem Versuch, bei dem drei Explorationsmuster (SAP, AAR, SAR) zur Beurteilung des SABT im Y-Maze durchlaufen wurden, zeigten alle vier Gruppen (TRPC6-KO und TRPC6-WT, Männchen und Weibchen) keine signifikanten Unterschiede. Wie erwartet nahm das Explorationsverhalten in der Reihenfolge SAP > AAR > SAR ab. Über die Hälfte aller Tiere folgte dem SAP-Verhaltensmuster, was ein normales exploratives Verhalten in diesem Test widerspiegelt.

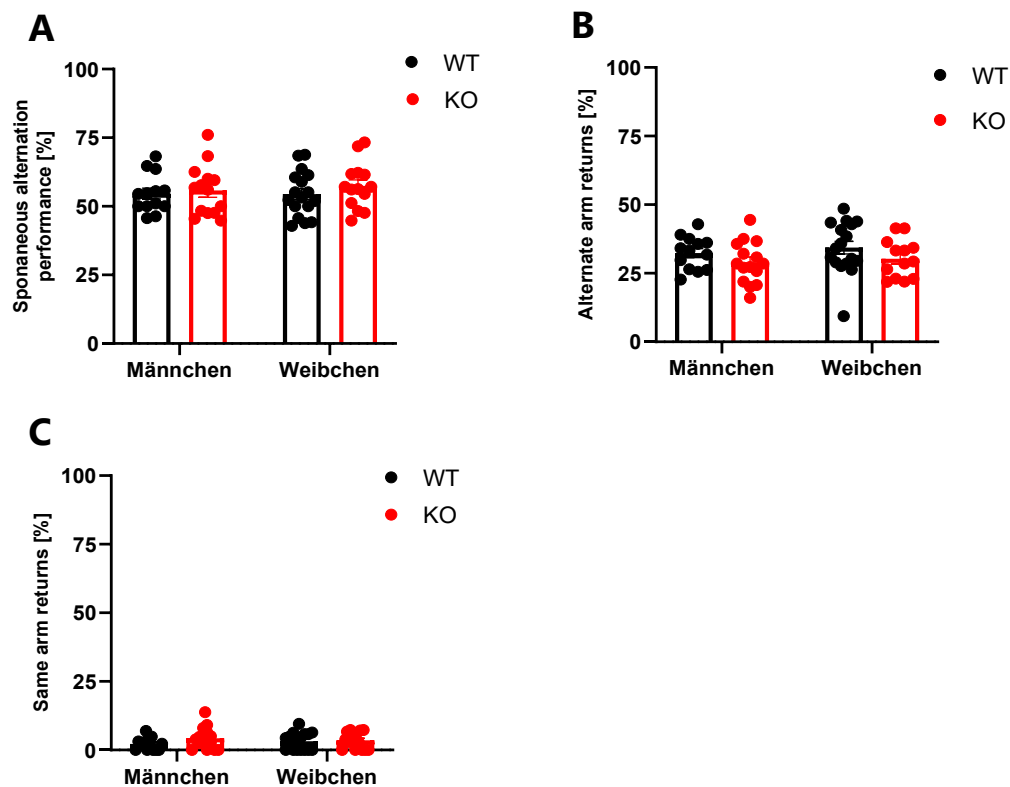


Abb. 44: Spontaneous Alternation Behavior Test (SABT): Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil der männlichen und weiblichen TRPC6-WT Mäuse (Kontrolle, schwarz) und TRPC6-KO Mäuse (rot) am SAP-, AAR- und SAR-Explorationsverhalten im Y-Maze (Abkürzungen siehe Tab. 18 Kapitel 4.12.5.1). (A) Über 50 % aller Gruppen betraten die drei Arme des Y-Mazes alternierend und entsprachen damit dem SAP-Verhaltensmuster. Dabei zeigte keine Gruppe einen signifikanten Unterschied. Im (B) AAR- und (C) SAR-Explorationsverhaltensmuster lagen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede vor. Angaben in Mittelwert \pm SEM. $N \geq 13$ Mäuse pro Gruppe. Die Daten wurden mit 2-Way ANOVA ausgewertet und ns $\geq 0,05$; * $p < 0,05$.

5.3.2 Spatial Object Recognition Test (SORT)

In diesem Experiment, bei dem die Maus nach einer kurzen Prätestphase im Y-Maze mit einem umpositionierten und ihr bekannten Objekt konfrontiert wurde, konnten im Anschluss signifikante Unterschiede in den Faktoren Interaktion (**p = 0,0021) und Genotyp (****p < 0,0001) ermittelt werden. Auch innerhalb der Geschlechter konnte sich eine Tendenz abzeichnen wonach der p-Wert bei 0,0998 lag. Es zeigte sich im Ergebnis deutlich, dass die TRPC6-KO Gruppen gehemmter waren mit einem bekannten Objekt in einem anderen Arm des Y-Mazes zu interagieren als die TRPC6-WT Gruppen. Die darauffolgende Tukey-Korrektur ergab zusätzlich, dass die signifikante Differenz, insbesondere zwischen weiblichen TRPC6-KO und weiblichen Kontrolltieren auftritt (****p < 0,0001). Darüber hinaus verweist das Ergebnis des Post-Hoc-Tests, dass unter den TRPC6-KO Tieren ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen Männchen und Weibchen vorliegt (**p = 0,004). Dieses Ergebnis deutet auf eine klare Reduktion der kognitiven Leistungen im TRPC6-Tiermodell hin. Allen voran scheinen im Experiment die weiblichen TRPC6-KO Tiere von dieser Beeinträchtigung betroffen zu sein. Beachtlicher Weise liegt der mittlere Anteil der TRPC6-KO Weibchen sogar unterhalb der 50 % Grenze, sodass angenommen werden kann, dass diese Gruppe eine ausgeprägte Präferenz hat, vordergründig mit einem bekannten Objekt in einer bekannten Position zu interagieren.

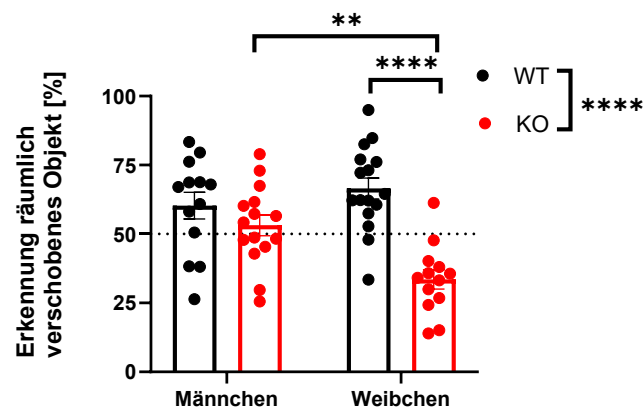


Abb. 45: Spatial Object Recognition Test (SORT): Das Diagramm zeigt die prozentuale Interaktionszeit von männlichen und weiblichen TRPC6-WT Mäusen (Kontrolle, schwarz) und TRPC6-KO Mäusen (rot) mit einem umpositionierten bekannten Objekt im Verhältnis zur gesamten Interaktionszeit (Objekt in gewohnter Position + Objekt in neuer Position). Signifikante Unterschiede wurden in den Faktoren Interaktion (**p = 0,0021) und Genotyp (****p < 0,0001) verzeichnet. Insbesondere lag bei den weiblichen TRPC6-KO Tieren eine gehemmte Auseinandersetzung mit einem bekannten Objekt in einer neuen Position vor. Gestrichelte Linie zeigt die 50 % Grenze der maximalen Verhaltensaktivität an. Angaben in Mittelwert ± SEM. N ≥ 13 Mäuse pro Gruppe. Die Daten wurden mit 2-Way ANOVA und anschließender Tukey-Korrektur ausgewertet und ns ≥ 0,05; *p < 0,05; **p = 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

5.3.3 Open Field Test (OFT)

Bei diesem Test zur Beschreibung eines angstähnlichen Verhaltens im offenen Feld wurden diverse Verhaltensparameter registriert. Hinsichtlich der abgelegten Wegstrecke konnten zwischen allen Gruppen kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Gleiches konnte auch für die Geschwindigkeit festgestellt werden. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass zwischen TRPC6-KO und -WT Tieren keine Unterschiede im Bewegungsapparat vorliegen, die den Ausgang aller weiteren Versuche verzerrt hätte. Die Häufigkeit (Frequenz) und die Zeit bis zum Eintreten des Tieres in das Zentrum der Arena (Latenz) sowie die Aufenthaltszeit am Rande der Arena ergaben ebenfalls keine signifikanten Effekte. Der Faktor Interaktion mit $*p = 0,0311$ präsentierte ein signifikantes Ergebnis. Die Tukey-Korrektur zur genaueren Verortung des gezeigten Effekts erzeugte eine marginale Signifikanz innerhalb der TRPC6-WT Gruppe, wonach der Unterschied zwischen Männchen und Weibchen bei $p = 0,1150$ lag. Im OFT konnte in Summe mit Ausnahme der Aufenthaltszeit im Zentrum keine signifikanten Differenzen im Genotyp oder im Geschlecht dargestellt werden.

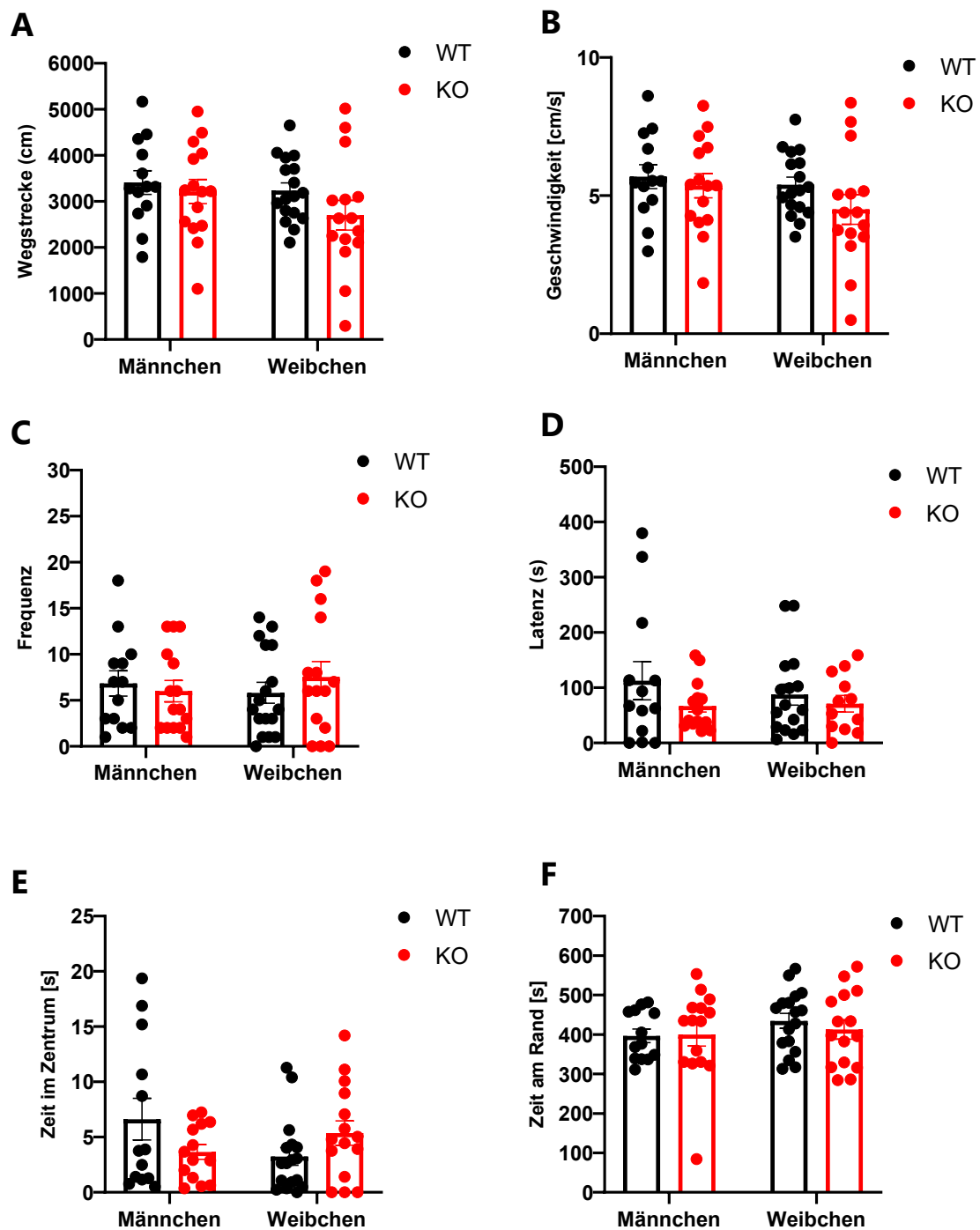


Abb. 46: Open Field Test (OFT): Die Diagramme präsentieren, die von männlichen und weiblichen TRPC6-WT Mäusen (Kontrolle, schwarz) und TRPC6-KO Mäusen (rot) abgelegte Fortbewegungsstrecke, -geschwindigkeit, -richtung und -häufigkeit in der offenen Arena. Bei der Betrachtung der zurückgelegten Wegstrecke (A), der Laufgeschwindigkeit (B), der Frequenz (C) und Latenz (D) in das Zentrum einzutreten sowie der Aufenthaltszeit am Rand der Arena (F) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bewertet werden. In (E) liegt ein signifikanter Effekt im Faktor Interaktion vor (* $p = 0,0311$) der nach der Tukey-Korrektur hauptsächlich durch die TRPC6-WT Gruppe ausgelöst wird bei der zwischen Männchen und Weibchen eine annähernde signifikante Differenz mit $p = 0,1150$ vorlag. Angaben in Mittelwert \pm SEM. $N \geq 13$ Mäuse pro Gruppe. Die Daten wurden mit 2-Way ANOVA und anschließender Tukey-Korrektur ausgewertet und $ns \geq 0,05$; * $p < 0,05$.

5.3.4 Novel Object Recognition Test (NORT)

In diesem Versuch wurde nach einer kurzen Prätestphase die Maus mit einem neuen Objekt, das gegen ein ihr bekanntes Objekt ersetzt wurde, konfrontiert und später die relative Interaktionszeit mit dem neuen Objekt analysiert. Das Ergebnis lieferte einen signifikanteren Unterschied im Faktor Genotyp. Die darauffolgende Tukey-Korrektur signalisierte einen merklichen Effekt zwischen weiblichen TRPC6-KO und -WT Tieren (* $p = 0,043$) und zeigt, dass der beobachtete Effekt im Genotyp primär auf entsprechend diesen unter den beiden weiblichen Gruppen zu rekurrieren ist. Wie im vorausgegangenen SORT-Experiment wird die 50 % Marke im Mittel von den TRPC6-KO Weibchen nicht überschritten und verweist auf eine favorisierte Interaktion mit dem bekannten Objekt als mit dem neuen Objekt dieser Gruppe hin. Das Ergebnis führt in Analogie zum Ergebnis im SORT zur Annahme, dass insbesondere bei den weiblichen TRPC6-KO Mäusen ein Defizit in der Kognition vorliegt.

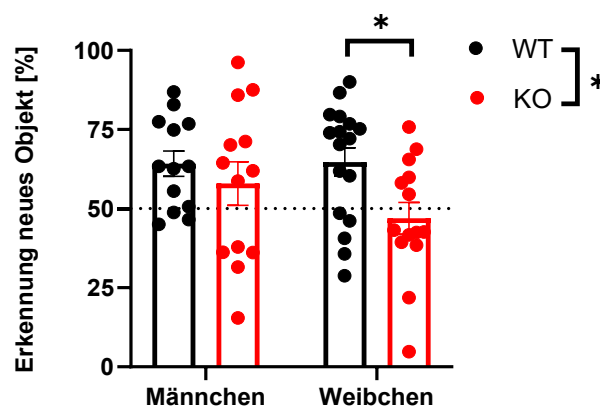


Abb. 47: Novel Object Recognition Test (NORT): Dargestellt sind die prozentualen Interaktionszeiten von männlichen und weiblichen TRPC6-WT Mäusen (Kontrolle, schwarz) und TRPC6-KO Mäusen (rot) mit einem unbekanntes Objekt im Verhältnis zur gesamten Interaktionszeit (bekanntes Objekt + unbekanntes Objekt). Signifikante Effekte wurden in den Faktoren Genotyp (* $p = 0,0238$) und nach der darauffolgenden Tukey-Korrektur zwischen weiblichen TRPC6-KO und -WT Tieren verzeichnet (* $p = 0,0433$). Insbesondere lagen in diesen beiden Gruppen bei den TRPC6-KO Mäusen eine gehemmte Auseinandersetzung mit dem neuen Objekt vor. Gestrichelte Linie zeigt die 50 % Grenze der maximalen Verhaltensaktivität an. Angaben in Mittelwert \pm SEM. $N \geq 13$ Mäuse pro Gruppe. Die Daten wurden mit 2-Way ANOVA und anschließender Tukey-Korrektur ausgewertet und ns $\geq 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.3.5 Sociability Test (ST)

Bei diesem Test stand die Interaktion mit einem sozialen Objekt (vier Wochen junge BL/6 Maus) in Relation zu einem nicht-sozialen Objekt (Metallring) im Mittelpunkt der Erkennung von Geselligkeit bzw. sozialen Verhaltens. Im Ergebnis lag kein signifikanter Unterschied zwischen allen Gruppen vor. Zudem überschritten alle Gruppen die 50 % Grenze der maximalen Verhaltensaktivität und zeigten damit, dass eine höhere Bereitschaft mit einem sozialen Objekt zu interagieren vorliegt als mit einem nicht-sozialen Objekt. In einer weiteren Analyse wurden die absoluten Interaktionszeiten jeder Gruppe mit dem Jungtier und dem sozialen Objekt verglichen. Das Ergebnis dieser Analyse zeigte für die bewerteten Faktoren Interaktion und Gruppe (Genotyp + Geschlecht) keinen statistischen Unterschied aber erwartungsgemäß im Faktor Objekt (soziales und nicht-soziales) mit **** $p < 0,0001$. Die genauere Betrachtung dieses Effekts mittels der Tukey-Korrektur legt offen, dass in der männlichen TRPC6-KO und -WT Gruppe sowie in der weiblichen WT-Gruppe die Interaktionsdauer mit dem Jungtier zwar signifikant länger war als mit dem Metallring (**** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$; ** $p = 0,0012$), aber diese Beobachtung in der weiblichen TRPC6-KO Gruppe nicht bestätigt werden konnte (ns = 0,1390). Damit legen diese Resultate nahe, dass eine fehlende TRPC6-Expression in den Weibchen die Dauer der sozialen Interaktion signifikant verkürzt, obwohl eine intakte Bereitschaft zu Geselligkeit besteht, was durch das weniger ausgeprägte Interesse für das nicht-soziale Objekt in Relation zur totalen Interaktion gezeigt wurde.

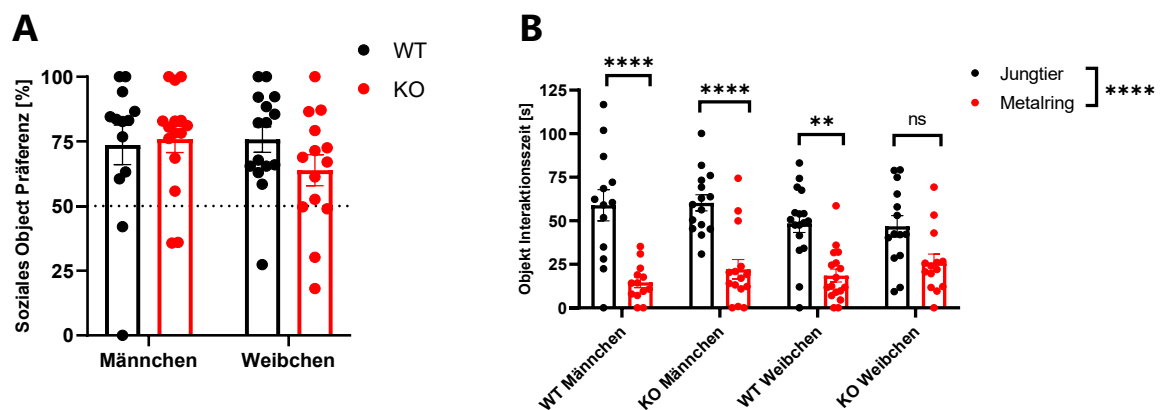


Abb. 48: Sociability Test (ST): (A) Dargestellt sind die prozentualen Interaktionszeiten von männlichen und weiblichen TRPC6-WT Mäusen (Kontrolle, schwarz) und TRPC6-KO Mäusen (rot) mit einem sozialen Objekt (männliches BL/6 Jungtier) in Relation zur gesamten Interaktionszeit (soziales Objekt + nicht-soziales Objekt (Metallring)). Ergebnisanalyse führte zu keinem statistischen Unterschied in allen Gruppen. Gestrichelte Linie zeigt die 50 % Grenze der maximalen Verhaltensaktivität an, die im Mittel von allen Gruppen erreicht wurde. (B) Präsentiert die absoluten Interaktionszeiten jeder Gruppe mit dem sozialen Objekt (schwarz) und dem nicht sozialen Objekt (rot). In der männlichen TRPC6-KO und -WT Gruppe und in der weiblichen TRPC6-WT Gruppe lag eine signifikante zeitliche Präferenz für das soziale Objekt vor (**** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$; ** $p = 0,0012$). Hingegen konnte in der weiblichen TRPC6-KO Gruppe kein signifikanter Unterschied bezüglich der Interaktionsdauer dem sozialen Objekt und dem nicht-sozialen Objekt gegenüber beobachtet werden (ns = 0,1390). Angaben in Mittelwert \pm SEM. $N \geq 13$ Mäuse pro Gruppe. Die Daten wurden mit 2-Way ANOVA und anschließender Tukey-Korrektur ausgewertet und ns $\geq 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.3.6 Light-Dark Box Test (LDBT)

In diesem Experiment, das zur Erfassung von angstassoziierten Verhalten in einem hell beleuchteten offenen Kompartiment stattgefunden hat, wurden zum einem die relative Aufenthaltszeit im Licht und die Übergänge ins Licht gemessen. Das Resultat dieses Versuches zeigte keinen signifikanten Unterschied in allen drei bewerteten Faktoren (Interaktion, Genotyp, Geschlecht) an. Demnach liegt gegenüber dem Stressor Licht bei allen Gruppen kein klar erkennbares angsthähnliches Verhalten als auch keine eindeutigen Differenzen im explorativen Verhalten, was mittels der gemessenen Transitionen zum Ausdruck gebracht worden wäre, vor.

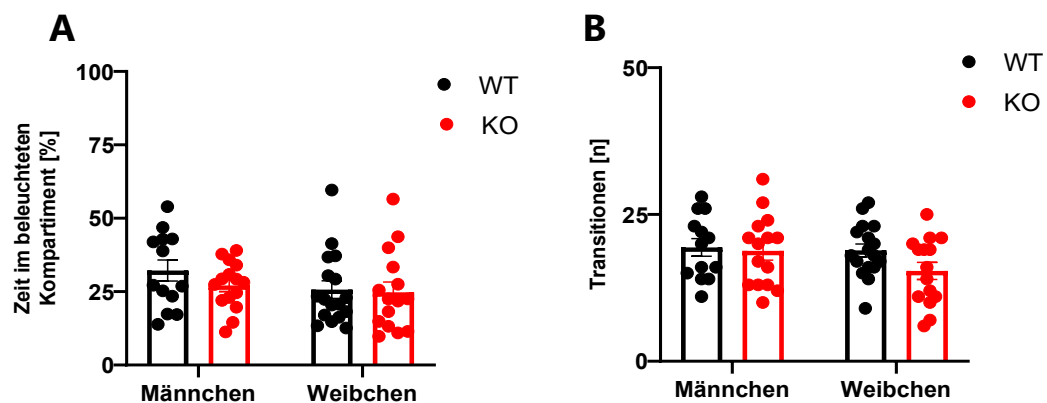


Abb. 49: Light-Dark Box Test (LDBT): Das Diagramm (A) präsentiert die prozentuale Verweildauer im beleuchteten Kompartiment und das Diagramm (B) die Anzahl registrierter Übergänge in das beleuchtete Kompartiment für männliche und weibliche TRPC6-WT Mäusen (Kontrolle, schwarz) und TRPC6-KO Mäusen (rot). In (A) und (B) konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich Interaktion, Genotyp und Geschlecht gemessen werden. Angaben in Mittelwert \pm SEM. $N \geq 13$ Mäuse pro Gruppe. Die Daten wurden mit 2-Way ANOVA ausgewertet und $ns \geq 0,05$.

5.3.7 Bedding Preference Test (BPT)

In diesem Test wurde die Geruchspräferenz der Tiere bewertet. Hierzu hatten alle Gruppen die freie Wahl eine saubere oder eine mit Urin kontaminierte Einstreu zu erkunden. Das Ergebnis lieferte einen signifikanten Unterschied im Faktor Genotyp ($*p = 0,0390$). Die darauffolgende Tukey-Korrektur verwies darauf, dass diese Signifikanz in erster Linie der weiblichen Gruppe zuzuordnen ist, die einen tendenziell statistischen Unterschied zwischen TRPC6-KO und -WT Mäusen vorzeigte ($p = 0,0993$). Die 50 % Grenze wurde von allen Gruppen überschritten, was für eine hinreichende Verhaltensaktivität der Kontrollgruppen und für eine Favorisierung der benutzten Einstreu in allen

Gruppen spricht. Das Testergebnis ist ein Hinweis auf ein vordergründig in den weiblichen TRPC6-KO Tieren vorzufindende minder ausgeprägte Geruchspräferenz für einer von einem Artgenossen benutzen Einstreu im Vergleich zu den Kontrolltieren.

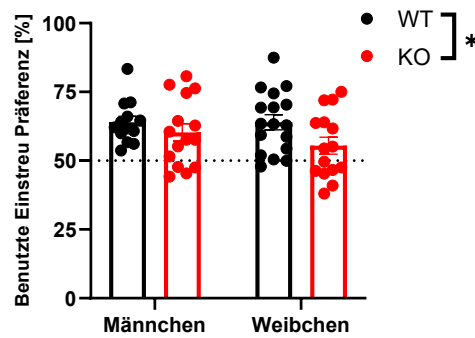


Abb. 50: Bedding Preference Test (BPT): Dargestellt sind die prozentualen Interaktionszeiten von männlichen und weiblichen TRPC6-WT Mäusen (Kontrolle, schwarz) und TRPC6-KO Mäusen (rot) mit benutzter Einstreu im Verhältnis zur gesamten Interaktionszeit (unbenutzte Einstreu + benutzte Einstreu). Im Faktor Genotyp lag ein signifikanter Unterschied vor (* $p = 0,0390$), der in der anschließenden Post-Hoc-Analyse einen annähernd signifikanten Unterschied zwischen weiblichen TRPC6-KO und -WT Tieren signalisierte ($p = 0,0993$). Gestrichelte Linie zeigt die 50 % Marke der maximalen Verhaltensaktivität an, die von allen Gruppen im Mittel überschritten wurde. Angaben in Mittelwert \pm SEM. $N \geq 13$ Mäuse pro Gruppe. Die Daten wurden mit 2-Way ANOVA und anschließender Tukey-Korrektur ausgewertet und $ns \geq 0,05$; * $p < 0,05$.

5.3.8 Zusammenfassung statistisch erhobener Werte

Verhaltenstest		Effekt	p-Wert	S	p-Wert nach Post-Hoc-Test (Tukey)			
					♂ WT vs. ♂ KO	♂ WT vs. ♀ WT	♂ KO vs. ♀ KO	♀ WT vs. ♀ KO
SABT	SAP	Interaktion	0,6748	ns				
		Genotyp	0,3545	ns				
		Geschlecht	0,7328	ns				
	AAR	Interaktion	0,9066	ns				
		Genotyp	0,0728	ns				
		Geschlecht	0,4151	ns				
	SAR	Interaktion	0,2702	ns				
		Genotyp	0,1474	ns				
		Geschlecht	0,9258	ns				
SORT		Interaktion	0,0021	**	0,3984	0,4575	0,004	<0,0001
		Genotyp	<0,0001	***				
		Geschlecht	0,0998	ns				
OFT	Wegstrecke	Interaktion	0,5085	ns				
		Genotyp	0,1586	ns				
		Geschlecht	0,1811	ns				
	Geschwindigkeit	Interaktion	0,5090	ns				
		Genotyp	0,1587	ns				
		Geschlecht	0,1810	ns				
	Frequenz	Interaktion	0,3458	ns				
		Genotyp	0,7492	ns				
		Geschlecht	0,8500	ns				
	Latenz	Interaktion	0,4950	ns				
		Genotyp	0,1520	ns				
		Geschlecht	0,6259	ns				
	Zeit im Zentrum	Interaktion	0,0311	*	0,2043	0,1150	0,4794	0,3527
		Genotyp	0,7129	ns				
		Geschlecht	0,4769	ns				
Zeit am Rand	Interaktion	0,5856	ns					
	Genotyp	0,6967	ns					
	Geschlecht	0,2823	ns					
NORT		Interaktion	0,2703	ns	0,5616	0,6666	0,3070	0,0433
		Genotyp	0,0238	*				
		Geschlecht	0,3145	ns				
ST		Interaktion	0,2383	ns				
		Genotyp	0,4168	ns				
		Geschlecht	0,4078	ns				
LDBT		Interaktion	0,5036	ns				
		Genotyp	0,3359	ns				
		Geschlecht	0,1571	ns				
	Transitionen	Interaktion	0,3080	ns				
		Genotyp	0,1543	ns				
		Geschlecht	0,1714	ns				
BPT		Interaktion	0,4109	ns	0,5435	>0,9999	0,4286	0,0993
		Genotyp	0,0390	*				
		Geschlecht	0,4098	ns				

Tab. 19: Datenergebnisse aus den Verhaltensexperimenten mit Signifikanzen zwischen den Faktoren Interaktion, Genotyp und Geschlecht. 2-Way ANOVA Analyse zeigt signifikante Unterschiede im SORT, NORT, OF (Zeit im Zentrum) und im BPT. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes wurde noch zusätzlich ein Post-Hoc-Test mit Tukey's Korrektur durchgeführt. SABT = Spontaneous Alternations Behavior, SAP = Spontaneous Alternations Performance, AAR = Alternate Arm Returns, SAR = Same Arm Returns, SORT = Spatial Object Recognition Test, OFT = Open Field Test, NORT = Novel Object Recognition Test, ST = Sociability Test, LDBT = Light-Dark Box Test, Bedding Preference Test (BPT), S = Signifikanz und ns $\geq 0,05$; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

5.4 Verhaltensexperimente begleitende Untersuchungen

Die Testbatterie wurde noch von weiteren Untersuchungen begleitet. Hierzu zählen die Messung des Körpergewichts über drei Tage unmittelbar vor dem Start der Verhaltenstestbatterie, die Ermittlung der Defäkationshäufigkeit nach dem Open Field Experiment und die Bestimmung des Östruszyklus nach Beendigung der Verhaltenstestbatterie.

5.4.1 Körpergewicht

Bezüglich des Körpergewichts zeichnete sich kein merklicher Unterschied zwischen TRPC6-KO und –WT Tieren beiderlei Geschlechts ab. Auch wurde keine Abnahme des Körpergewichts mit dem zunehmenden Alter in Wochen verzeichnet. Das Ergebnis des Körpergewichts ist ein wichtiger Hinweis auf die Vitalität der Tiere und würde bei klaren Differenzen zwischen den Genotyp-Gruppen sowie bei zu niedrigen Werten außerhalb des Normgewichtes zu einer Verzerrung der gewonnenen Daten führen.

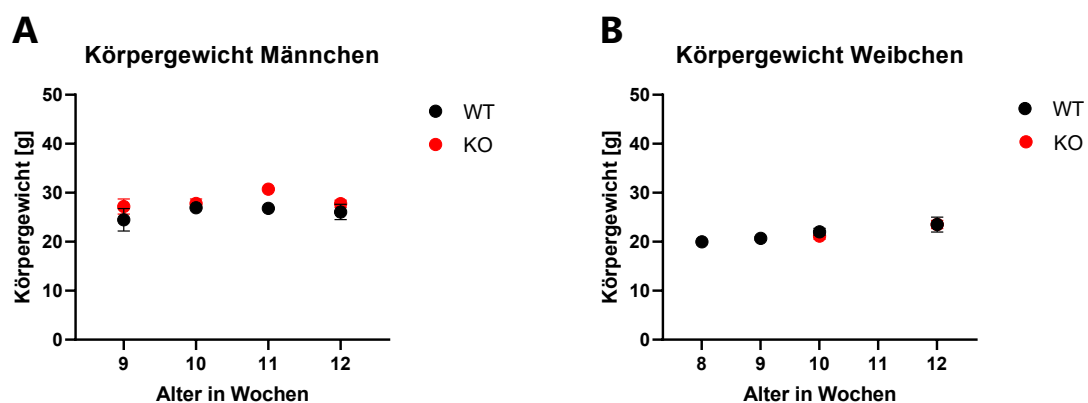


Abb. 51: Körpergewicht: (A) bildet das über drei Tage gemessene mittlere Körpergewicht der männlichen und (B) der weiblichen TRPC6-KO (rot) und –WT (Kontrolltiere, schwarz) ab. In der entsprechenden Alterswoche zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen TRPC6-KO und –WT Genotyp ab. Angaben in Mittelwert \pm SEM. $N \geq 13$ Mäuse pro Gruppe. Datenauswertung erfolgte mit ungepaarten zweiseitigen Student's t-test und $ns \geq 0,05$.

5.4.2 Defäkationsfrequenz

Der Open Field Test gilt als standardisierter Test zur Identifizierung von angstähnlichen Verhalten im Nagetier. Um Hinweise auf eine mögliche Stressreaktion während des Versuches zu finden, wurde die Defäkationsfrequenz anhand der Zählung der Boli bestimmt. Das Ergebnis zeigt, dass zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede bestehen und somit das gezeigte Verhalten der Tiere in Open Field nicht unter der Einflussgröße Stress stand.

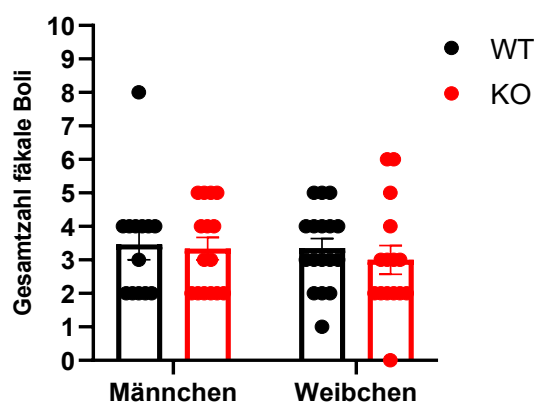


Abb. 52: Defäkationsfrequenz: Gezeigt ist die Anzahl der Boli von männlichen und weiblichen TRPC6-KO Mäusen (rot) und TRPC6-WT Mäusen (Kontrolle, schwarz). Die Datenanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den überprüften Faktoren Interaktion, Genotyp und Geschlecht. Angaben in Mittelwert \pm SEM. $N \geq 13$ Mäuse pro Gruppe. Die Daten wurden mit 2-Way ANOVA und anschließender Tukey-Korrektur ausgewertet.

5.4.3 Östruszyklusphasen

Die dargelegten Ergebnisse aus der Verhaltenstestbatterie präsentieren in den Tests SORT, NORT und BPT statistisch relevante Unterschiede zwischen TRPC6-KO und-WT Mäusen, die bei der Charakterisierung des Verhaltenphänotyps der TRPC6-KO Tiere eine bedeutende Rolle spielen. Dabei fällt auf, dass diese Differenzen primär unter weiblichen Tieren auftreten. Um den Einfluss des Östruszyklus auf das Verhalten der Tiere zu kontrollieren, wurden nach der Testreihe von den Weibchen ein vaginaler Abstrich präpariert und mit Giemsea-Färbelösung auf einen Objektträger fixiert. Das Ergebnis zeigt, dass die Verteilung der unterschiedlichen Östruszyklusphasen sowohl in TRPC6-KO als auch -WT-Mäusen relativ ausgeglichen war. Daraus kann entnommen werden, dass im Verhaltensexperiment aufgetretene Unterschiede innerhalb der beiden weiblichen Gruppen nicht auf den hormonellen Status, der die Einleitung bestimmter Östruszyklusphasen bestimmt, zurückzuführen sind.

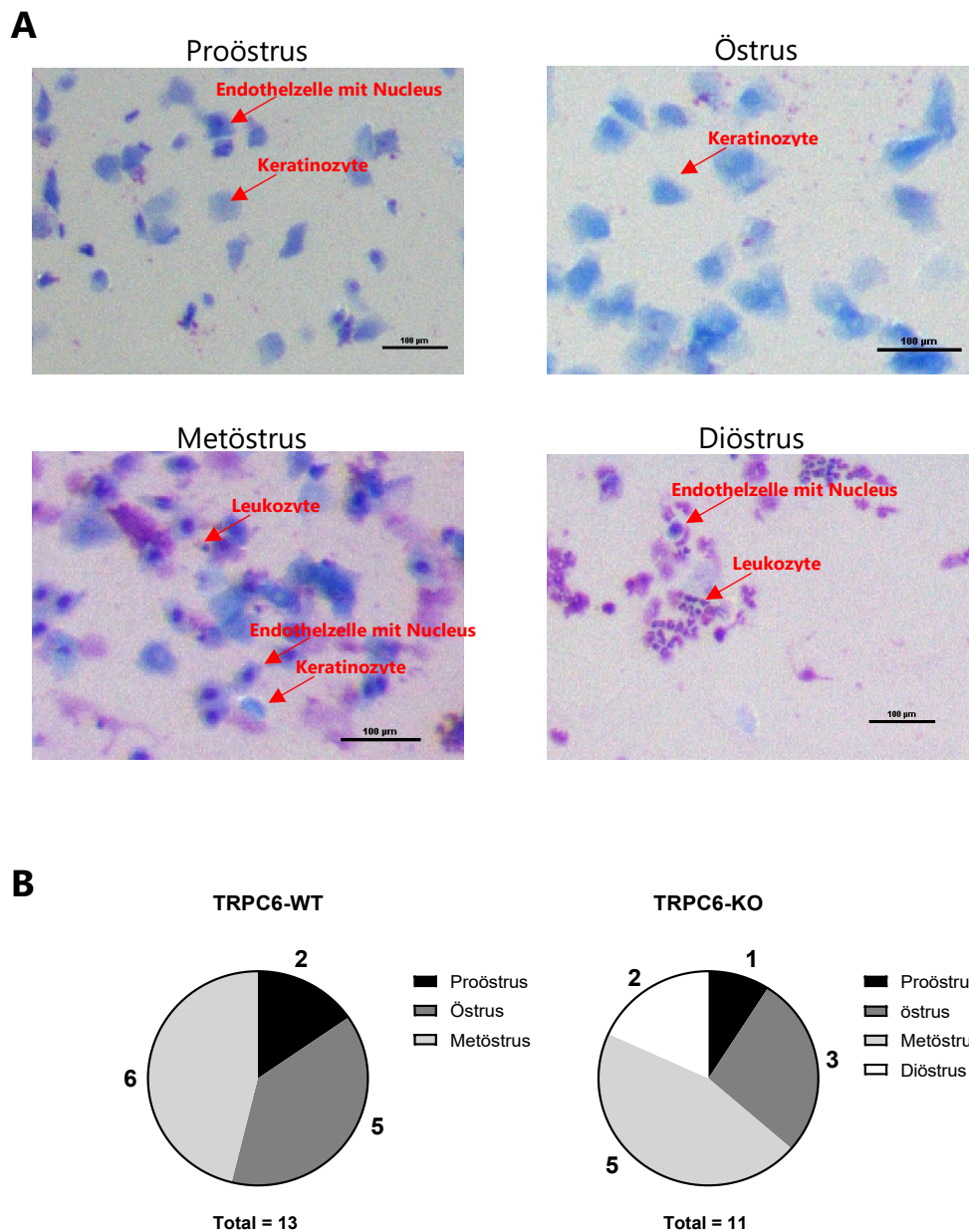


Abb. 53: Bestimmung der Östruszyklusphasen. (A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von kolorierten Vaginalabstrichen aus den vier Phasen des Östruszyklus. Rote Pfeile markieren beispielhaft eine Zelle des dominierenden Zelltyps. Skalierungsbalken = 100 µm. (B) Tortendiagramm zeigt eine annähernd übereinstimmende Verteilung der vier Östruszyklusphasen in TRPC6-KO und in TRPC6-WT.

6. DISKUSSION

6.1 Die Aktivierbarkeit von TRPC3/6 durch DAG-Analoga

Die Ergebnisse aus dem Calcium-Imaging und der Whole-Cell-Aufnahmen zeigen, dass sowohl die nativen Kanäle hTRPC3/6 als auch die Mutanten hTRPC6IMRI und hTRPC3LLKL eine vergleichbare Affinität für die beiden DAG-Analoga OAG und SAG aufbringen und dass sie nicht über das Bindemotiv LLKL in TRPC6 ihre aktivierende Wirkung entfalten. Die Mitglieder der TRPC3/6/7-Gruppe können durch lipidähnliche Second Messenger aktiviert werden. Hierzu zählt die vielfach methodisch in modifizierter Form eingesetzte Verbindung DAG, die neben IP₃ das Spaltprodukt aus der enzymatischen Hydrolyse des Phospholipids PIP₂ ist. Hoffmann et al. stellten als Erste fest, dass die Applikation von DAG und Analoga wie OAG und SAG die Ionenleitfähigkeit von TRPC3/6/7-Kanälen steigern und im Gegensatz dazu die TRPC Mitglieder TRPC1/4/5 nicht in den geöffneten Zustand überführen. Eine weitere bedeutende Erkenntnis, die mit der ersten Untersuchung der Kanal-Aktivierbarkeit durch DAG einherging, war die Beobachtung, dass die Öffnung der TRPC3/6/7-Gruppe selbst in Ca²⁺-Speicher und PKC-unabhängiger Weise erfolgen kann. Obgleich anfänglich die beiden Kanäle TRPC4/5 der DAG-nichtsensitiven Gruppe zugerechnet wurden, konnten jüngere Studien ebenfalls für diese TRPC-Mitglieder eine Affinität zu DAG unter bestimmten Voraussetzungen identifizieren. Hierbei stehen die Antiporter NHERF1/2 (Na⁺/H⁺-Austauscher-Regulationsfaktor 1/2) im Fokus, die ihre kanalmodulierende Funktion durch die Bindung an das VTTRL-Motiv (Val-Thr-Thr-Arg-Leu) im C-Terminus erreichen.^{272,273} Storch und Kollegen untersuchten die Bedeutung von NHERF1/2 im Zusammenhang mit einer DAG-basierten Stimulation der Kanäle TRPC4/5. Sie fanden heraus, dass bei einer fehlenden Phosphorylierung der Aminosäure Threonin T972 durch die PKC oder bei ihrem Austausch gegen die Aminosäure Alanin innerhalb des VTTRL-Motivs die NHERF1/2 Bindung über die PDZ-Domäne wegfällt und infolgedessen eine erhöhte DAG-Sensitivität eintritt. Eine Dissoziation von NHERF1/2 vom TRPC4/5-Kanal konnte methodisch durch eine PKC-Hemmung und PIP₂-Depletion erreicht werden. Die Verwendung einer NHERF1-Mutante (NHERF1-E68A), wie sie in Patienten mit unzureichender renaler Phosphatresorption identifiziert werden konnte, untermauerte nachträglich die regulatorische Funktion von NHERF1/2 in einer DAG-vermittelten Aktivierung von TRPC4/5.¹⁴⁰ Trotz dieses Befundes bleibt die physiologische Relevanz und Gewichtung der Aktivierung von TRPC4/5 durch DAG unter der Kontrolle der Regulationsfaktoren NHERF1/2 genauer zu überprüfen. Schließlich zeigen mehrere etablierte Studien, dass DAG TRPC4/5-Ströme nicht stimulieren kann.^{187,274} Bisherige Untersuchungen legen nahe, dass hydrophobe Liganden über direkte Ligand-Protein-Interaktionen oder über ihre Einbettung in hydrophoben

Spalten der Kanäle TRPC3/6 zu einer Zunahme der Öffnungswahrscheinlichkeit beitragen. Der TRPC3-Kanal besitzt durch eine Vertiefung in seiner Pore die Fähigkeit, die für das Gating des Ionenkanals entscheidend ist, DAG und Analoga direkt zu binden. Durch die Anwendung von photosensiblen DAG-Konstrukten, sog. OptoDARGs, konnte die Arbeitsgruppe um Lichtenegger in transfizierten HEK293-Zellen feststellen, dass insbesondere die Aminosäure Glycin G640 hinter dem Selektivitätsfilter der Pore in der S6-Helix eine wesentliche Bedeutung für die Aktivierung des TRPC3-Kanals durch DAG trägt. Der Austausch von Glycin gegen längere Reste wie Alanin und Lysin hatten bei elektrophysiologischen Messungen eine signifikante Reduktion des DAG-Effekts zufolge, was möglicherweise von einer Abnahme der strukturellen Flexibilität herrührt. Bei G640 handelt es sich um eine konservierte Aminosäure innerhalb der TRPC-Familie. Selbst eine Mutation der korrespondierenden Aminosäure in TRPC6 (G709A) konnte eine deutliche Abnahme der Aktivierbarkeit durch SAG (100 μM) präsentieren.¹⁹² In einem mittels der Kryo-EM-Methode durchgeführten Experiment konnten Fan et al. später zeigen, dass diese Ergebnisse durch die Entdeckung von Lipid-Bindungsstellen im Bereich dieser Position im TRPC3-Kanal konsistent sind.¹⁰⁹

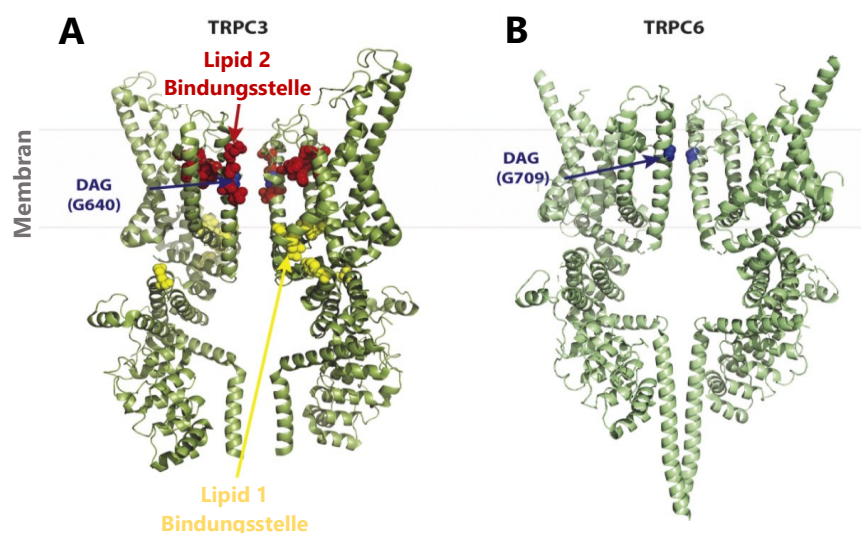


Abb 54: Kryo-EM-Struktur des humanen TRPC3- und TRPC6-Kanals mit Bindestellen für lipidähnliche Verbindungen. (A) TRPC3 mit zwei lipiddichten Regionen: Lipid 1 gelb und Lipid 2 rot dargestellt (Fan et al., 2018). (B) Struktur des TRPC6-Kanals (Tang et al., 2018) mit der blau markierten Aminosäure G709 (Lichtenegger et al., 2018), die äquivalent zu G640 in TRPC3 ist. (Abb. modifiziert nach Curcic et al., 2019)²⁷⁵

In der Nähe dieser Aminosäure liegt ebenfalls innerhalb der Kanalpore aller TRPC-Kanäle das Motiv LFW (609 – 611 in TRPC3, 678 – 680 in TRPC6). Der Austausch dieses Triplets gegen Alanin geht wie bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde mit einem Funktionsverlust einher, der nicht mit einer reduzierten Plasmamembran Expression oder Tetramerisierung der Mutanten in Wechselbeziehung steht.^{155,266,276} Bai et al. nahmen diese Beobachtung zum Anlass bei der Auflösung der TRPC6-Kanalstruktur mittels der Kryo-EM-Methode die Rolle der umliegenden Aminosäuren des Kanals näher zu überprüfen. Hierzu wurden die Mutanten E672A, F675A, W680A, N702A, Y705A und V706A auf ihre Affinität zu OAG (100 μ M) und den Aktivator AM-0883 getestet. Während bei der Applikation von OAG in allen TRPC6-Mutanten kein Effekt im Calcium-Imaging induziert werden konnte, erzeugte der Aktivator AM-0883 konzentrationsabhängig einen Ca^{2+} -Influx in V706A und E672A exprimierenden HEK293-Zellen, wenn auch in schwächerer Intensität als im TRPC6-WT. Die Ca^{2+} -Influx Messung der Mutante V710A mit OAG erzielte wiederum einen Effekt, der im Vergleich zum nativen Kanalprotein TRPC6 um ca. 80 % schwächer war und dem durch AM-0883 evozierten Effekt in seiner Stärke gleich. Somit stellen für die Interaktionsbereitschaft von DAG mit dem TRPC6-Kanal weitere Aminosäuren um G709 in der S5-Helix und Porenhelix kritische Positionen dar. Im Vergleich zu AM-8003 führt der Austausch der Aminosäuren Glu672 und Val706 gegen Alanin zusätzlich zu einer stärkeren Ca^{2+} -Influxhemmung.²¹⁰

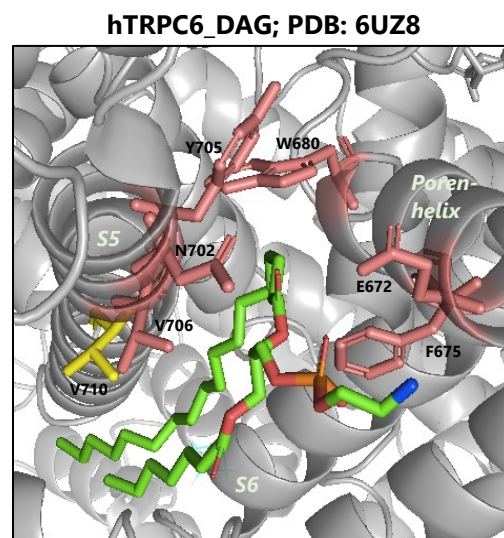


Abb. 55: Präsentation der Reste in TRPC6 die mit DAG interagieren. DAG-Molekül grün dargestellt. Alanin-Austausch der farblich markierten Reste in der S5-Helix und Poren-Helix führt zu keiner Aktivierbarkeit von TRPC6 bei Zugabe des Aktivators OAG (100 μ M) im Calcium-Imaging. Alanin Mutation von V710 (gelb) führt ähnlich wie bei den rot markierten Resten zu einer Hemmung der Aktivität lediglich mit geschwächerer Ausprägung (ca. 80 %).

Mit der Kryo-EM-Strukturanalyse gelang es im Jahr 2018 der Gruppe Tang et al. als Erstes die TRPC6-Struktur im atomaren Maßstab zu entschlüsseln. Wenn auch nicht alle Regionen, wie der erste Abschnitt des N-Terminus aufgelöst werden konnten, ergab eine Deletion der betreffenden Aminosäuren 1-71, dass weder die Tetramerisierung noch die DAG-Sensitivität des Kanals dadurch eingeschränkt wurden. Doch bleibt der N-Terminus um das Gebiet der Linker-Helices für die Wechselwirkung von DAG mit TRPC3/6/7-Kanälen nicht unerheblich. Auf Grundlage einer computergestützten Analyse (GDDA-BLAST) von Aminosäuresequenzen und Mutagenesestudien wurde festgestellt, dass die TRPC3 Doppeltmutante Ser197Arg/Ser201Phe anders als der TRPC3-WT reduzierte OAG-Effekte im Ca^{2+} -Imaging und in Patch-Clamp-Aufnahmen sowie Defizite bei der DAG-vermittelten Vesikelfusion und -insertion des Kanals in die Plasmamembran auslöst. Beide Serin Aminosäuren liegen in der TRPC3/6/7-Gruppe konserviert vor (S266/S270 in TRPC6). Die korrespondierenden Aminosäuren für Ser197 sind in TRPC4/5 Arginin und für Ser201 in TRPC1 Phenylalanin, woraus die Bildung der besagten TRPC3-Doppeltmutante hergeleitet wurde. Obwohl keine entsprechenden Daten für TRPC6 vorliegen, kann angenommen werden, dass die beiden Serin Aminosäuren in der Linker-Helix 2 (LH-2) im N-Terminus zumindest für die DAG-regulierte Fusionierung TRPC3/6/7 beinhaltender Vesikel eine zu berücksichtigende Lipid-Bindestelle ist.²⁷⁷ Dass DAG einerseits durch seine Bindung an den TRPC6-Kanal die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht und andererseits über eine Stimulation der Vesikelfusion mit der Plasmamembran agiert, konnte in bisherigen Untersuchungen demonstriert werden, obgleich der genaue Ablauf der Vesikelwanderung und -bindung an die Plasmamembran noch nicht vollends aufgeklärt ist.^{278,279} Im Einklang mit den bisherigen publizierten DAG-Interaktionsstellen in TRPC3/6 und den Ergebnissen aus der Ca^{2+} -Influx- und Whole-Cell-Messung von hTRPC6IMRI und hTRPC3LLKL mit den beiden DAG-Analoga OAG und SAG kann geschlossen werden, dass DAG und Hyperforin nicht um das gleiche Bindemotiv in TRPC6 konkurrieren. Vielmehr konnten in diesem Kapitel zitierte Arbeiten, die sich auf DAG-Bindestellen in TRPC3/6 konzentrierten relevante Aminosäuren aufdecken, die in der TRPC3/6/7-Gruppe zwischen der Poren-Helix (PH) und S6-Helix konserviert vorliegen, was die unselektive Affinität von DAG und Analoga den Mitgliedern dieser TRPC-Subfamilie gegenüber erklärt.

6.2 Die Bindestellen von TRPC6-Modulatoren

Während DAG als endogener und unselektiver TRPC3/6/7-Aktivator in zahlreichen Veröffentlichungen in Form seiner Abkömmlingen OAG und SAG Anwendung findet, wurde in den letzten Jahrzehnten nach weiteren TRPC6-Aktivatoren geforscht und anhand der Bestimmung ihrer Bindestellen wichtige Informationen über relevante Aminosäuren gesammelt, die für die Transformation der Kanalstruktur in den geöffneten Zustand als kritisch einzustufen sind. Dabei erwecken nicht nur Agonisten wie DAG, die erst nach einer Membranpassage ihre Wirkung entfalten, sondern sogleich Aktivatoren mit Bindestellen auf der extrazellulären Seite des TRPC6-Kanals das Interesse der Wirkstoffentwickler. In der Kryo-EM-Studie von Bai et al. konnte nach der Komplexierung von TRPC6 mit dem unselektiven Agonisten AM-0883 die Bindungsstellen F675 und W680 in der PH sowie N702 und Y705 in der S6-Helix identifiziert werden (vergl. Abb. 53). Yang et al. gingen im Anschluss der Frage nach, ob die beiden unselektiven TRPC6-Agonisten GSK1702934A und M085 gleichermaßen die Eigenschaft besitzen über extrazelluläre Bindungen die TRPC6-Funktion zu modulieren. Über ein In-Silico-Docking-Scanning des TRPC6-Kanals wurden zwischen PH und S6-Helix Reste entdeckt, deren darauffolgende Mutation die TRPC6-Affinität von M085 und GSK1702934A signifikant abschwächten. Hierbei fielen besonders die Aminosäuren W679, E671, E672 und K675 in der PH sowie N701 und Y704 in der S6-Helix auf, die orthosterische Stellen für die Erkennung dieser beiden Agonisten bilden und die innerhalb der TRPC3/6/7-Subfamilie absolut und innerhalb der TRPC-Familie partiell konserviert vorliegen. Da sich die drei unspezifischen Aktivatoren M085, GSK1702934A und AM-0883 strukturell unterscheiden, ist davon auszugehen, dass die Position zwischen der PH und der S6-Helix allgemein eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kanalfunktion von TRPC6 durch niedrig molekulare Aktivatoren spielt und für das Gating von Bedeutung ist.²⁸⁰ Für eine spezifische Steuerung der TRPC6-Funktion hingegen ist eine Wechselwirkung mit Resten in der Kanalstruktur entscheidend, die sich in erster Linie von jenen in den homologen Verwandten TRPC3 und TRPC7 unterscheiden, was durch die eindeutigen Daten zur Charakterisierung der Hyperforin-Bindestelle LLKL im C-terminalen Abschnitt von TRPC6 in dieser Arbeit präsentiert wird.

Doch nicht einzig die Darstellung der Bindungsstellen von TRPC6-Aktivatoren liefern wertvolle Erkenntnisse über das Steuerungsverhalten des TRPC6-Kanals, sondern auch jene, die aus Studien mit TRPC6-Inhibitoren stammen. Tang et al. gelang es den TRPC6-Kanal mit der TRPC3/6 inhibierenden Substanz BTDM im geschlossenen Zustand räumlich abzubilden und Interaktionspartner zu detektieren. Demnach sind an der BTDM-Bindung in TRPC6 die Aminosäuren W526 (S3-Helix) und I640 (S5-Helix) beteiligt, die eine moderate Affinität zu BTDM haben sowie T714 (zwischen TRP-Helix und CH1) und Q624 (zwischen S4- und S5-Helix), die durch eine stärkere

Interaktion mit BTDM gekennzeichnet sind.¹¹³ Bei der Untersuchung von Bindungsstellen des TRPC6-Inhibitors AM-1473, ein niedermolekularer Antagonist und strukturelles Analogon des Antagonisten SAR-7334, wurden Interaktionen mit den Resten H446 in der S1-Helix, E509 in der S2-Helix, D530 in der S3-Helix, Y612 in der S4-Helix, R758 im TRP-Reentrant-Motiv und Y753 in der TRP-Helix registriert (vergl. Abb. 56). Insgesamt verknüpfen die drei Ringgruppen des Antagonisten die intrazellulären Enden der Helices S1-S4, die TRP-Helix und das TRP-Reentrant-Motiv miteinander. Bemerkenswerterweise wirkt AM-1473 in TRPC6 gegenüber seinem eng verwandten Homolog TRPC3 36-mal stärker inhibierend. Während zusätzlich bei den bisher beschriebenen TRPC6-Antagonisten Ligand-Target-Interaktionen zwischen Aminosäuren stattfinden, die in TRPC3 und 6 konserviert vorliegen, ist R758 in TRPC6 durch ein Lysin in TRPC3 ersetzt. Der Austausch dieser Aminosäure zwischen TRPC6 und TRPC3 resultierte in einer Veränderung der Wirkung von AM-1473. In der TRPC6-Mutante R758K wurde AM-1473 letztlich 5-mal und in der TRPC3-Mutante K689R 3,5-mal weniger wirksam.²¹⁰ Bedingt dadurch, dass die TRPC6-Funktion der genannten Mutanten eine Aktivierungskontrolle mit OAG erfolgreich durchliefen, markieren sie Positionen, die für die Bindungsaffinität von DAG-Analoga wahrscheinlich nicht als kritisch einzuordnen sind. Bindestellen von Inhibitoren mit unspezifischer TRPC6 Hemmeigenschaft wie 2-APB wurden in Kryo-EM-Experimenten bisher lediglich im humanen und murinen TRPV6-Kanal aufgelöst.²⁸¹ Interessanterweise bindet hierbei 2-APB an die VSLD-Bindetasche (voltage sensing-like domain) eine durch hydrophobe Reste geformte Domäne auf der intrazellulären Seite des S1-S4-Helixbündels und teilt sich dadurch mit dem Inhibitor AM-1473 die korrespondierende Bindestelle in TRPC6. Vor kurzem gelang es Guo et al. die TRPC6-Struktur in Verbindung mit dem Inhibitor SAR-7334 aufzulösen. Ihrer Strukturanalyse nach interagiert SAR-7334 ebenfalls wie AM-1473 aber anders als BTDM mit der VSLD-Bindetasche in der TMD (vergl. Abb. 56). Während bei der Bindung von BTDM die Aminosäuren I724, N728 und Q732 zu einer Verengung der Porenregion führten und sie auf diese Weise den Ca^{2+} -Einstrom reduzierten, bewirkte die TRPC6-Komplexierung mit SAR-7334, dass die Aminosäuren L723, I727 und F731 näher zusammenrückten und so die Passage von Ca^{2+} blockierten. Diese Entdeckung verdeutlicht, dass die Besetzung unterschiedlicher Ligand-Bindetaschen die Konformation Ca^{2+} -leitender Strukturelemente innerhalb der Pore individuell stabilisieren können.²⁸² Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse zu den Bindestellen der genannten TRPC6-Modulatoren auf der einen Seite, dass strukturell verschiedenartige Substanzen die gleiche Bindetasche adressieren können und auf der anderen Seite das TRPC6-Modulatoren wie z.B. BTDM ($\text{EC}_{50} = 10 \text{ nM}$) und SAR-7334 ($\text{EC}_{50} = 8 \text{ nM}$) trotz vergleichbarer Wirkstärke über verschiedene Positionen im Ionenkanal ihre Wirkung entfalten und dabei individuell den Grad der Porenöffnung bestimmen können.

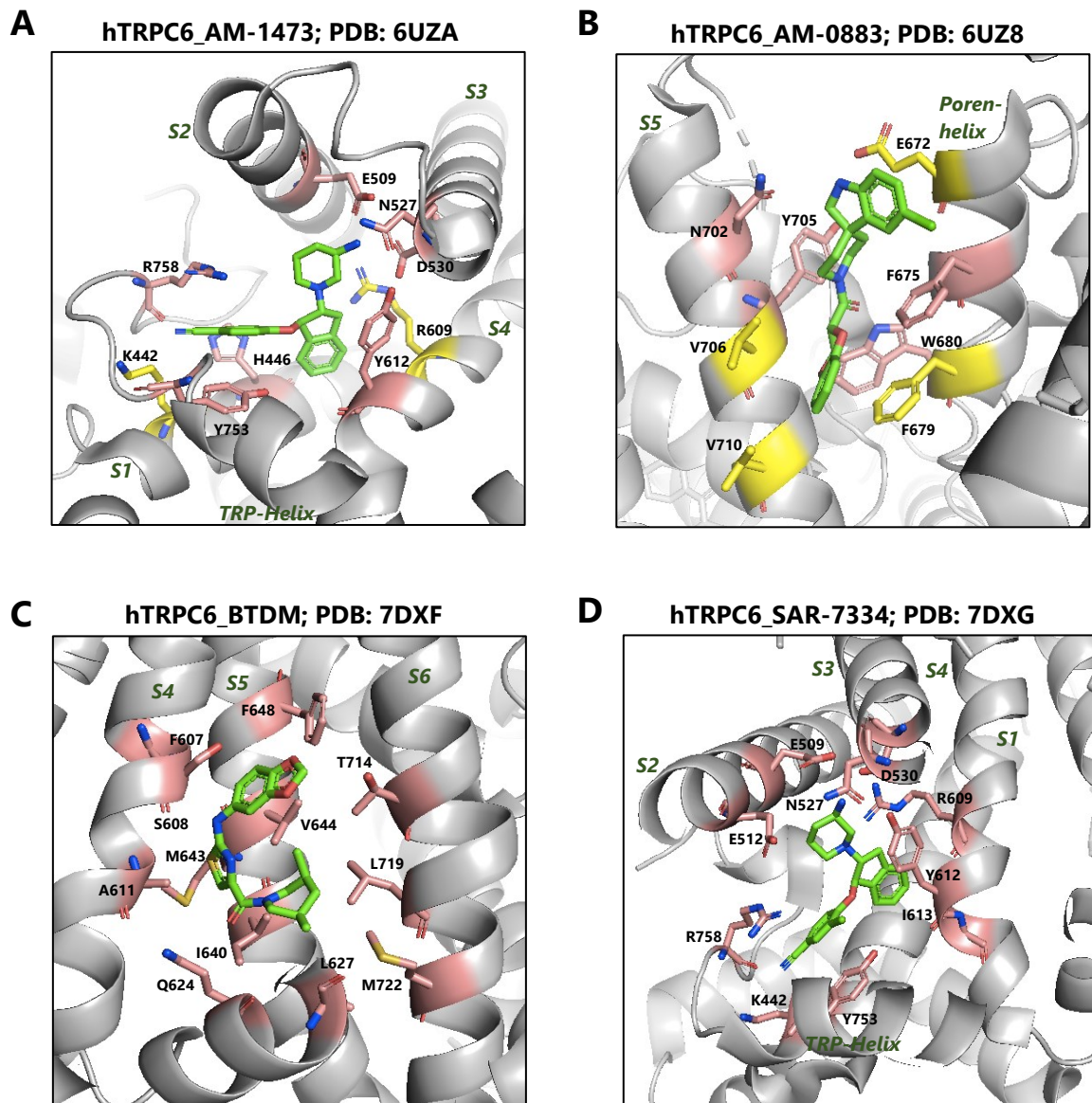


Abb. 56: Präsentation von ausgewählten TRPC6-Modulatoren Bindestellen. Liganden sind als grüne Sticks dargestellt. Reste, die mit dem Liganden gemäß der Kryo-EM-Strukturanalyse interagieren sind farbig (rot und gelb) koloriert und stechen aus der Ribbon-Struktur des TRPC6-Kanals hervor. Rot markierte Reste in (A) und (B) interagieren laut der Analyse der entsprechenden Alanin-Mutanten im Ca^{2+} -Imaging besonders intensiv und gelb markierte Reste weniger stark mit AM-1473 bzw. AM-0883.

6.3 Das Hyperforin Bindemotiv LLKL im TRPC6-Kanal

Die Identifizierung von Bindestellen einiger TRPC6-Aktivatoren und -Inhibitoren konnte in den letzten Jahren mit Hilfe der sensitiven Strukturaufklärungsmethode Kryo-EM deutlich erweitert werden. Je nachdem wie effizient Modulatoren den Zustand des Ionenkanals stabilisierten, konnten sie zu einem größeren Verständnis über intermolekulare Wechselbeziehungen und konformative Strukturveränderungen beitragen, obgleich die Forschung an dieser Stelle noch am Anfang steht. So zeigen Ergebnisse zahlreicher Kryo-EM-Studien und auch von TRPC3/6 methodische Grenzen auf, die sich darin äußern, dass die Struktur der Ionenkanäle nicht als Ganzes aufgelöst werden konnte, was auf die komplizierte Erfassung bestimmter ungeordneter Strukturabschnitte zurückzuführen ist. Die 3D-Struktur des TRPC6-Kanals sowie die der weiteren TRPC-Mitglieder weist daher an einigen Stellen Lücken auf, die zum einem durch fehlende oder schwache Wechselwirkungen mit den verwendeten Modulatoren zustande kommen und zum anderen durch flexible Proteinstrukturen, wie sie durch langkettige Peptide gebildet werden, entstehen. So konnten Tang et al. bedingt durch eine wahrscheinlich zu niedrige Bindungsaffinität von OAG die Struktur des TRPC3-Kanals nicht stabilisieren und in der erforderlichen Qualität darstellen.¹¹³ Unaufgelöste Positionen im TRPC6-Kanal finden sich im N-Terminus (Reste 1 – 84), zwischen den Ankyrin-Repeats AR3 und AR4 (Reste 193 – 203) zwischen der Linker-Helix 6 und 7 (Reste 350 – 357), zwischen der S1- und S2-Helix (Reste 464 – 491), zwischen der S3- und S4-Helix (Reste 560 – 585) zwischen dem TRP-Reentrant und der C-terminalen Helix 1 (Reste 767 – 852) sowie am Ende des C-Terminus (Reste 922 – 931) (vergl. Anhang Abb. 62). Das Bindemotiv LLKL umspannt die Reste 777 – 780 und liegt inmitten des nicht strukturell aufgelösten Abschnittes des TRPC6-Kanals zwischen dem TRP-Reentrant-Motiv und CH1. Korrespondierende Reste innerhalb der TRPC-Familie konnten bislang gleichfalls nicht aufgelöst werden. Verbindungen zu möglichen weiteren benachbarten Interaktionspartnern von Hyperforin während des Aktivierungsprozesses bleiben aufgrund fehlender Daten zur Konformität schließlich unaufgeklärt. Dennoch belegen verschiedene Methoden, die in dieser Arbeit zur Beurteilung der Funktion von nativen und modifizierten TRPC3/6-Kanälen angewendet wurden, dass Hyperforin und die beiden potenten Hyp-Derivate Hyp1 und Hyp13 ihre Effekte über eine spezifische Interaktion mit dem TRPC6 Bindemotiv LLKL entfalten und die Reste IMRI aus TRPC3/7, die in die TRPC6 Sequenz anstelle der Reste LLKL integriert wurden, den Aktivierungsmechanismus soweit veränderten, dass bei Zugabe von Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 im Bioassay eine Funktionseinschränkung eintrat, die wiederum bei der Zugabe von OAG nicht erfolgte. Das eine Ligandenbindung von Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 an den TRPC6-Kanal stattfindet, verdeutlichen die per Fluoreszenz-Imaging und Elektrophysiologie gewonnenen signifikanten Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit. Eine andere Methode, die die Wechselwirkung zwischen Hyperforin und dem TRPC6-Bindemotiv von einer

anderen Arbeitsgruppe angewendet wurde, kam zu einem Ergebnis, dass die besondere Rolle des TRPC6-Bindemotiv für die Effektivität von Hyperforin nochmals unterstreicht. Hierfür wurde im Besonderen der native Tryptophan-Rest W783, der sich in der Nähe der Hyperforin Bindestelle befindet, zu Nutze gemacht. Die Fluoreszenz von Tryptophan reagiert sehr empfindlich auf Veränderungen in der Umgebung, wie z. B. die Hydrophobizität, und kann daher Aufschluss über die Ligandenbindung geben. So zeigte die aufsteigende Titration von Hyperforin (1 – 50 μM) bei einem nativen TRPC6-Peptid im Vergleich zu einem mutierten TRPC6-Peptid mit der Sequenz IMRI anstelle von LLKL eine stärkere Fluoreszenzintensität. Dieses Resultat ist ein weiterer Hinweis darauf, dass das LLKL-Motiv tatsächlich eine wesentliche Rolle bei der Hyperforin-Interaktion mit TRPC6 spielt.²⁸³ Gleichwohl zeigen Untersuchungen von Aminosäuren in der Region um das Bindemotiv LLKL, dass sie für die Aktivierbarkeit des TRPC6-Kanals grundsätzlich bedeutsam sind. Das betrifft Interaktionsbereiche für Inositol-Hexaphosphat (Reste 842 – 868) sowie Calmodulin und den IP_3 -Rezeptor (838 – 872), die die TRPC6-Aktivität modulieren.²⁸⁴ Bei der TRPC6-Mutante L780P inmitten des Hyperforin-Bindemotives handelt es sich um eine sog. LOF-Mutante, die im Rahmen der Erforschung der renalen Erkrankung FSGS entdeckt wurde. Im Vergleich zum TRPC6-WT konnten Ca^{2+} -Influx Messungen in L780P exprimierenden HEK293-Zellen zeigen, dass nach der Applikation von DAG-Analogen DOG (100 μM) eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration signifikant reduziert war.²⁸⁵ Prolin kann aufgrund seiner cyclischen Form, die die Amino-Gruppe einbindet und keine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoff einer anderen Aminosäure aufbaut, strukturell destabilisierend auf die Bildung von sekundären Proteinstrukturen wirken.²⁸⁶ Vermutlich löst der Austausch der Aminosäure Lysin gegen Prolin eine Änderung der Konformation von TRPC6 aus, die das Gating des Kanals beeinflusst. In unseren Experimenten wurde hingegen die Aminosäure Leucin in TRPC6 gegen das strukturelle Isomer Isoleucin in TRPC3 ausgetauscht, was die Aktivierbarkeit der entsprechenden Mutanten durch DAG-Analoga nicht beeinflusste. Diese Beobachtungen verweisen somit zusätzlich darauf, dass innerhalb und um die Peptidsequenz LLKL selbst Aminosäuren bzw. Peptide lokalisiert sind, die eine wichtige Rolle in der Aktivierbarkeit des TRPC6-Kanals einnehmen.

6.4 Die selektive Aktivierung des TRPC6-Kanals durch 2,4-Diacylphloroglucinole

Der Wirkmechanismus von Hyperforin, der zu antidepressiven Effekten im neuronalen System führt wird mit der selektiven Agonisierung des Ionenkanals TRPC6 erklärt, der im Jahr 2005 von Leuner et al. erstmals postuliert wurde. Wie im Kapitel 1.1.5.1 einleitend beschrieben wurde, führt demnach die Interaktion von Hyperforin mit TRPC6 zu einem gesteuerten Ca^{2+} und Na^{+} -Influx, der zum einem über den Aufbau eines nach innen gerichteten Na^{+} -Gradienten zu einer Einschränkung der Neurotransmittertransporter-Aktivität und folglich zu einer Wiederaufnahmehemmung von Neurotransmittern wie Serotonin und/oder Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt führt und zum anderen über den Eingriff in die Ca^{2+} -Homöostase in die Regulation der synaptischen Plastizität durch BDNF-ähnliche Effekte.^{80,90,181,266} Neben seiner antidepressiven Wirksamkeit ist Hyperforin allerdings noch zusätzlich durch seine chemische Instabilität gegenüber Luftsauerstoff, Licht und niedrigen pH-Werten gekennzeichnet. Überdies besitzt Hyperforin die Eigenschaft Enzyme des Cytochrom-P450-Systems (meistens CYP3A4) und den P-Glykoprotein (P-gp) Transporter zu induzieren sowie vermehrt unerwünschten Arzneimittelwirkungen hervorzurufen.⁸⁶ Auf der Suche nach chemisch und metabolisch stabilen Hyperforin Derivate mit pharmakologischer Wirksamkeit am TRPC6-Kanal wurden strukturell vereinfachte Verbindungen, genauer 2,4-Diacylphloroglucinole (Hyp-Derivate) synthetisiert. Strukturelle Gemeinsamkeiten zu Hyperforin finden sich im Acylphloroglucinol-Grundgerüst, das mit zwei Protonenakzeptoren und einen Protonendonator ein enolisertes β -dicarbonyl System konstruiert. In der Struktur des unselektiven TRPC3/6/7 Aktivators DAG und seinen Analoga findet sich ebenfalls ein Element mit zwei Protonenakzeptoren und einem Protonendonator wieder, weshalb Montecinos-Oliva et al. nach einer in silico konformationellen Analyse davon ausgingen, dass das Pharmakophor in diesen Verbindungen durch zwei Protonenakzeptoren und einem Protonendonator gebildet wird.²⁰⁶ Trotz struktureller Gemeinsamkeiten zwischen Hyperforin und den genannten TRPC6-Aktivatoren gibt es mit Ausnahme der potenten Hyp-Derivate (z.B. Hyp1, 5, 9) keine Nachweise auf ein TRPC6-vermittelte antidepressive Wirkung einschließlich des Neurotransmitter-Reuptakes und der neuronalen Plastizität.^{287,288} Wie bereits im Kapitel 1.2.2.4.1 angedeutet wurde, stellen 2,4-Diacylphloroglucinole einerseits aufgrund ihrer antidepressiven Effekte, die sie wie Hyperforin selektiv und potent über die Aktivierung von TRPC6 induzieren, und andererseits durch ihre verbesserte chemische und metabolische Stabilität geeignete Alternativen zu Hyperforin dar. So konnten in silico und in vitro Untersuchungen belegen, dass anders als Hyperforin die 2,4-Diacylphloroglucinole an den nuklearen Rezeptor Pregnan-X-Rezeptor (PXR, ein Kernrezeptor, der die Transkription zahlreicher metabolischer Enzyme reguliert) weder binden noch stimulieren.^{82,89,289,283}

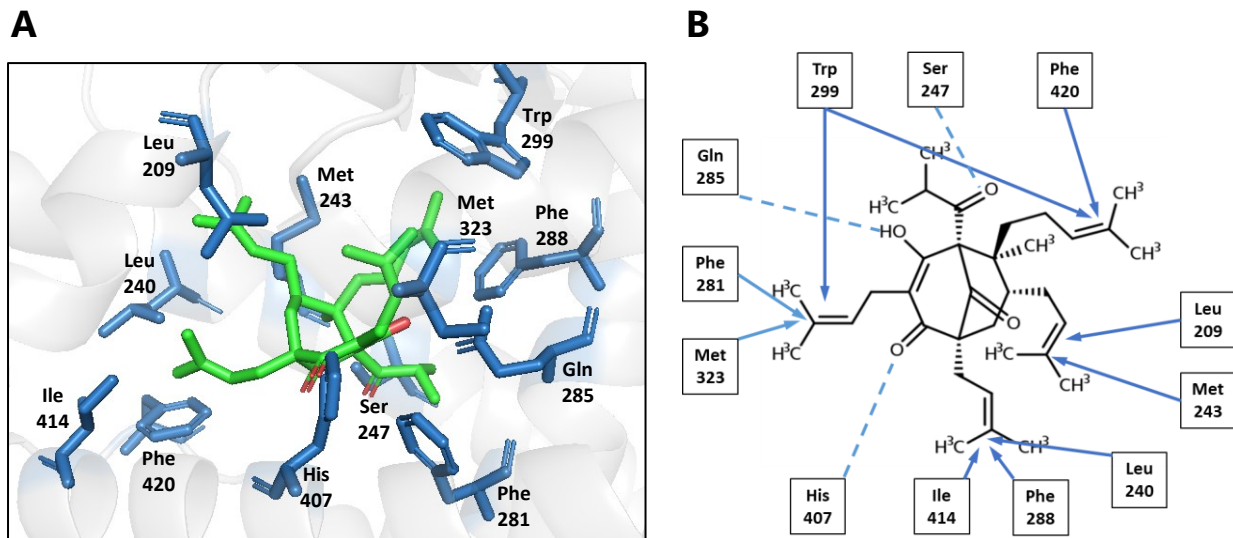


Abb. 57: Darstellung der Ligandbindungsdomäne von PXR mit Hyperforin. (A) Kristallstrukturanalyse von PXR mit Hyperforin (grün) zeigt die Interaktionspartner an (blau). Darstellung nach PDB: 1M13. (B) Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Hyperforin und der Ligandenbindungstasche von PXR. Hydrophobe Kontakte sind durch durchgezogene Linien dargestellt und Wasserstoffbindungen sind durch gepunktete Linien gekennzeichnet. Abbildung verdeutlicht die wesentlichen Kontaktstellen zwischen Hyperforin und PXR, die für seine Aktivierung benötigt werden. Durch die strukturelle Vereinfachung der Hyp-Derivate kommt es zum Wegfall entsprechender Wechselwirkungen und somit zu keiner effizienten Bindung an den PXR. (Abb. modifiziert nach Watkins et al., 2003)²⁸⁹

Unter den ersten synthetisierten und charakterisierten Hyp-Derivaten befand sich die Verbindung Hyp1. Mit Hyp13 einer von Hyp1 strukturell abgeleiteten Verbindung, die durch eine zusätzliche Butylgruppe am freien C-Atom der Phloroglucinolstruktur gekennzeichnet ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen Bioassays die signifikante und potente Aktivierbarkeit von TRPC6 bestätigt. Neben Hyperforin und Hyp1, konnte Hyp13 in vergleichbarer Effektivität und auf konzentrationsabhängiger Weise sowohl endogen exprimierte TRPC6-Kanäle in PC12-Zellen als zugleich hTRPC6 und hTRPC3LLKL im HEK293-Überexpressionssystem aktivieren. Folglich bringt Hyp13 jene Voraussetzungen mit, die benötigt werden, um TRPC6-vermittelt antidepressiv und anxiolytisch in höheren Organismen wirksam zu sein. In der Tat zeigen neuste tierexperimentelle Untersuchungen an männlichen TRPC6-WT Mäusen, dass Hyp13 die anxiolytischen Effekte von Hyperforin in den Verhaltenstests OFT, FST und NSFT konzentrationsabhängig adaptiert und dass diese Effekte anders als bei Hyperforin nicht parallel zu einer Stimulation des PXR und der CYP3A4-mRNA-Expression führen.²⁸³

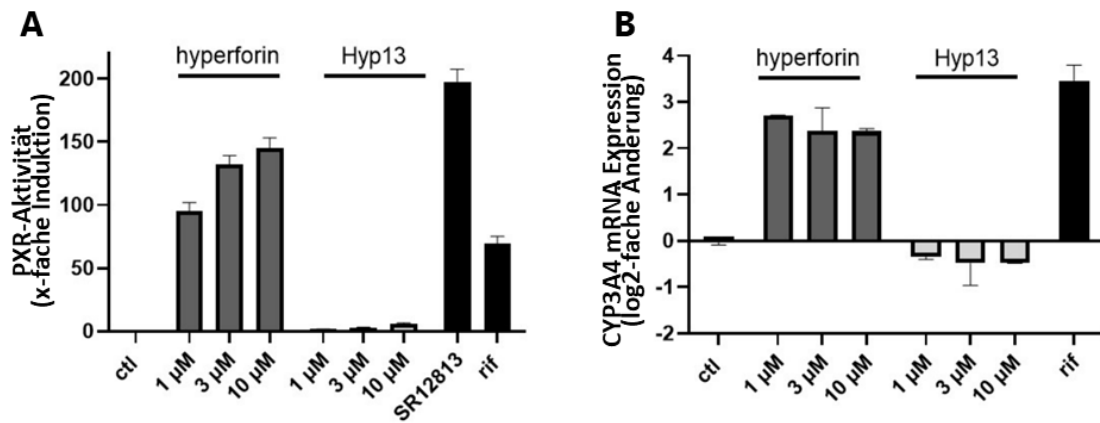


Abb. 58: Hyp13 stimuliert nicht PXR sowie die Expression von CYP3A4-mRNA. (A) Hyperforin führt anders als Hyp13 konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der PXR-Aktivität in mit GAL4-DRD transfizierten HepG2-Zellen. SR12813 und Rifampicin (rif) sind Positivkontrollen. (B) Genexpressionsanalyse von CYP3A4 präsentiert eine erhöhte Expression von CYP3A4-mRNA in HepaRG-Zellen nach der Zugabe von Hyperforin aber nicht bei Hyp13. (Abb. modifiziert nach El Hamdaoui et al., 2022)²⁸³

6.5 Depressions- und angstähnliches Verhalten in TRPC6 defizitären Tieren

Eine hinreichende Charakterisierung des Verhaltensphänotypes von TRPC6-KO oder TRPC6-KD Tieren ist eine wichtige Voraussetzung, um die pharmakologischen Effekte von Hyperforin und Hyp-Analoga in Abhängigkeit von einer bestehenden TRPC6-Aktivität beurteilen zu können. Beis et al. verwendeten in ihrer Studie eine eigens kreierte TRPC6-KO Mauslinie mit BALB/c-Hintergrund. Die männlichen Tiere durchliefen eine Verhaltensbatterie, die sich aus dem *Marble Burying Test* (MBT), OFT und ESMT zusammensetzte. Eine signifikante Verhaltensänderung zwischen TRPC6-KO und -WT Tieren konnte im OFT und ESMT beobachtet werden. In beiden Tests zeigten die TRPC6-KO Mäuse ein signifikant vermindertes exploratives Verhalten. Hingegen konnte im MBT, einem Test zur Überprüfung von objektbezogenem angstassoziiertem Verhalten, kein Unterschied zwischen beiden Testgruppen dokumentiert werden. An diesem Punkt sollte berücksichtigt werden, dass der Ausgang des MBT in manchen Studien durch das Testprotokoll, genauer der Testdauer beeinflusst werden kann. In einer Metaanalyse, die das MBT Ergebnis von SSRIs und Benzodiazepinen analysierte, konnte festgestellt werden, dass die Effektstärke der Testsubstanzen besonders in Studien mit kurzer Versuchsdauer (15 Min.) stärker war als in solchen mit langer Verhaltensdauer (30 Min.).²⁹⁰ In der Studie von Beis et al. wurde eine Testzeit von 30 Min. ausgewählt und die Anzahl der begrabenen Murmeln lag in den ersten beiden von drei Tagen in der TRPC6-KO Gruppe höher als in der Kontrollgruppe, was als eine tendenziell stärker angstassoziiertes Verhalten in der Testgruppe interpretiert werden kann. Daher könnte das MBT-Ergebnis in einem zweiten Lauf mit kürzerer Testdauer eindeutiger ausfallen. Um neben angstassoziierte Verhaltensdomänen zusätzlich depressionsassoziierte Verhaltensmuster in männlichen TRPC6-KO Mäusen mit B6;129S-Hintergrund zu skizzieren, kamen in der Studie von El Hamdaoui et al. ebenfalls verschiedene Verhaltensexperimente zum Einsatz. Im OFT und dem EPMT, zwei Verhaltensexperimenten, die ein angstverbundenes Verhalten beschreiben, zeigten die TRPC6-KO Tiere in Relation zu den TRPC6-WT Tieren, dass ihre Verweildauer, die Anzahl ihrer Übertritte und ihre Fortbewegung im Zentrum des Offenfeldes signifikant reduziert waren und dass sie signifikant mehr Zeit im EPMT bei reduzierter Fortbewegung in den Armen mit hochgezogenen Wänden als in den offenen Armen verbringen. In depressionsassoziierten Verhaltensexperimenten wie dem FST lag die Immobilitätszeit signifikant höher und im SPT wurde die Saccharoselösung signifikant weniger stark bevorzugt, was als ein Hinweis auf erlebte Hilflosigkeit und Anhedonie angesehen werden kann. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass bei der besagten Mauslinie die Inaktivität von TRPC6 einen Verhaltensphänotyp hervorbringt, der durch angst- und depressionsähnliche Eigenschaften charakterisiert ist.²⁸³

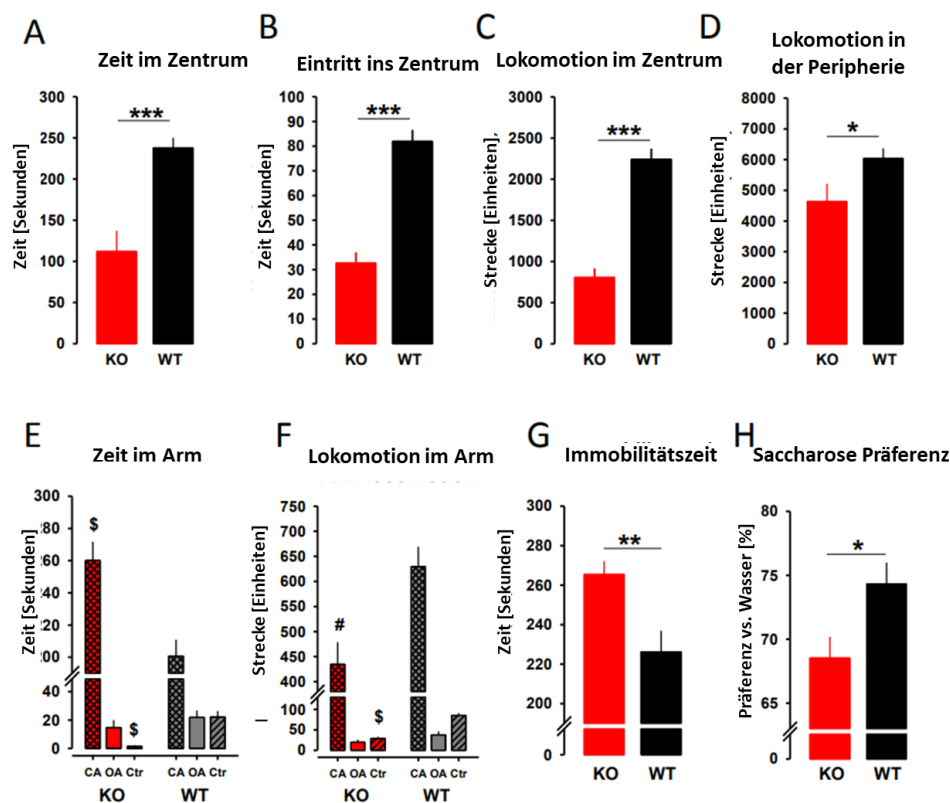


Abb. 59: TRPC6-KO Maus zeigt im Vergleich zur TRPC6-WT Maus angst- und depressionsähnliches Verhalten. (A) – (D) Verhalten im OFT. (E) und (F) Verhalten im EPMT mit (OA – offener Arm; CA – geschlossener Arm; CTR – Zentrum). (G) Verhalten im FST. (H) Verhalten im SPT. (Abb. modifiziert nach El Hamdaoui et al., 2022)²⁸³

Anders als in den Studien von Beis et al. und El Hamdaoui et al. konnten in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen der TRPC6-KO und -WT Maus beiderlei Geschlechtes im OFT erfasst werden. Allerdings liegt bei der Betrachtung der Aufenthaltszeit im Zentrum des Offenfeldes in der männlichen Gruppe eine auffällig breite Streuung der Werte vor, die ein möglicher Grund für eine fehlende klare Differenz im Genotyp sein kann. Darüberhinaus betrug die Testzeit 10 Min. zwischen Intervallzeiten von 15 Min. In der Studie von El Hamdaoui et al. lag hingegen eine Pause von drei Tagen zwischen einzelnen Verhaltensexperimenten und der OFT wurde über eine Testzeit von 20 Min. vollzogen. Demnach muss bei der Betrachtung des OFT-Ergebnisses in dieser Arbeit berücksichtigt werden, dass durch die kürzere Testzeit die basale Aktivität der TRPC6-KO Maus vermutlich nicht registriert werden konnte.²⁹¹ Ein möglicher Grund für die Beobachtung eines depressions- und angstassoziierten Verhaltensphänotypes in der TRPC6-KO Maus könnten Veränderung in bestimmten neuronalen Gehirnstrukturen sein. So zeigen Ergebnisse in der Studie von El Hamdaoui und Kollegen, dass die neuronale Erregbarkeit der DG-Körnerzellen und CA1-Pyramidalneuronen im Hippokampus, in der eine erhöhte Expression von TRPC6 stattfindet, in TRPC6-KO Tieren vermindert ist.

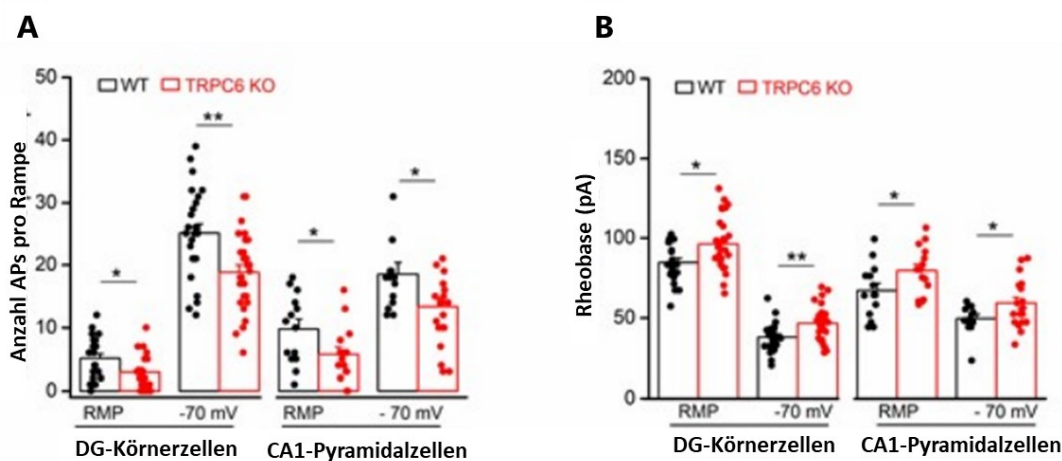


Abb. 60: Reduzierte hippocampale Zell-Erregung in TRPC6-KO Tieren. Whole-Cell Patch-clamp-Aufnahmen wurden in DG-Körnerzellen und CA1-Pyramidalzellen von TRPC6-KO und -WT Maus Gehirnschnitten durchgeführt. (A) AP (Aktiospotential) pro Rampe und (B) Rheobase (minimaler Strom, der für die Auslösung eines APs nötig ist) zeigen, dass die neuronale Erregbarkeit in TRPC6-KO Tieren vergleichsweise zum TRPC6-WT signifikant erniedrigt ist. (Abb. modifiziert nach El Hamdaoui et al., 2022)²⁸³

Die neuronale Erregbarkeit ist für den Erhalt wichtiger physiologischer Abläufe im Gehirn wie der Langzeitpotenzierung (LTP), die ihrerseits die synaptische Plastizität beeinflusst, ein wesentlicher Faktor, der in der Depressionserkrankung beeinträchtigt vorliegt. Der Hippokampus ist wie in Kapitel 1.2.2.3 beschrieben eine stressempfindliche Hirnregion und spielt durch seine Verknüpfungen zu Emotionen verarbeitenden Gehirnregionen wie der Amygdala und dem Kortex eine wichtige Rolle in der Regulation von Stimmung. Neben dem Empfinden von Freude, die ebenfalls durch den Hippokampus kontrolliert wird, führt eine entsprechende Dysfunktionalität des Hippokampus mitunter zu Kernsymptomen der Depression, zu denen eine gedrückte Stimmung und Anhedonie gezählt werden. Eine weitere wichtige hippocampale Aktivität, die in vielen depressiven Patienten zusätzlich zu den affektiven als beeinträchtigt vorliegt, betrifft die kognitive Funktion.^{292,293} Griesi-Oliveira et al. untersuchten auf Grundlage einer in einem Individuum mit Autismus-Spektrum-Störung (engl.: autism spectrum disorder, ASD) vorgefundene TRPC6-Mutante die biologische Relevanz dieser Mutation. Hierzu verwendeten sie TRPC6-KO Tiere mit B6;129S-Hintergrund und stellten eine verminderte Exploration im OFT und EPMT fest und keine Beeinträchtigung der sozialen Interaktion im Geselligkeitstest. Damit konnten sie über diese Verhaltenstests primär das angstassoziierte Verhalten in TRPC6-KO Nagern bestätigen wie das zuvor von Beis et al. und später von El Hamdaoui et al. in ihren Studien erfolgt ist. Dass in Verhaltensdomänen mit sozialer Interaktion, wie dem Geselligkeitstest keine signifikanten Unterschiede zwischen TRPC6-WT und -KO Tieren auftraten, begründeten die Autoren damit, dass das Fehlen einiger ASD-ähnlicher Verhaltensweisen in Mausmodellen weit verbreitet sei und auf inhärente Differenzen zwischen dem genetischen Hintergrund von Mensch und Maus zurückzuführen sind.²⁹⁴ Unseren verhaltensexperimentellen

Daten zufolge, die mit dem Versuchstier gleichen Hintergrundes durchgeführt wurde, erbrachten bei der Analyse der relativen Interaktionszeiten zwischen sozialen und nicht sozialen Objekten im Geselligkeitstest zwar ebenfalls keinen Unterschied im Genotyp, aber bei der Betrachtung der absoluten Interaktionszeiten konnte herausgefunden werden, dass weiblichen TRPC6-KO Tieren im Vergleich zum WT das soziale Objekt nicht signifikant präferieren, wodurch ein Defizit im Sozialverhalten nicht ausgeschlossen werden kann.

6.6 Die antidepressive und anxiolytische Wirkung von Hyperforin und Hyp-Analoga im Tiermodell und Verbindungen zum TRPC6-Kanal

Die antidepressive und anxiolytische Wirkung von Hyperforin wurde in der Vergangenheit in verschiedenen tierexperimentellen Studien mit Nagern belegt.^{70,76,257,258} In einigen Studien konnte darüberhinaus eine enge Verbindung zwischen der Wirkung von Hyperforin und der Funktionalität des TRPC6-Kanals hergestellt werden. So wurden in einer Veröffentlichung mit männlichen C57BL/6J-Tieren, die der Stressart Chronischer unvorhersehbarer milder Stress (CUMS) ausgesetzt waren, eine Abnahme der Zink-Konzentration im Blut, im präfrontalen Kortex und Hippokampus gemessen werden, die durch eine auf Hyperforin basierenden Behandlung über sechs Wochen normalisiert werden konnte. Vorausgegangene Studien geben Hinweise darauf, dass der TRPC6-Kanal an der Regulation der Zink-Homöostase wesentlich beteiligt ist.^{295,296} Über dies bewirkte in diesem Experiment die Gabe von Hyperforin eine Wiederherstellung des durch CUMS ausgelösten Rückgangs der BDNF-Proteinkonzentration im Hippokampus und somit in jener wichtigen zerebralen Region, die bei einer Depression morphologisch und funktionell beeinträchtigt vorliegt. Dass durch Hyperforin über den des TRPC6-Kanal Phosphorylierungskaskaden in Gang gesetzt werden, die eine BDNF-ähnliche Wirkung erzeugen, wurde eingangs genauer in Kapitel 1.2.2.3 beschrieben. Bekanntlich greift der NMDA-Rezeptorblocker Ketamin in multiple neurobiologische Prozesse ein. Dabei konnte noch nicht vollends geklärt werden, welcher Aktivierungsmechanismus hauptsächlich für diese Wirkung verantwortlich ist. In Versuchen mit Nagern konnte jedenfalls gezeigt werden, dass die antidepressive Aktivität mit einer Zunahme der Neuroplastizität einhergeht und vor allem im präfrontalen Kortex und im Hippokampus stattfindet.^{297,298} Auf molekularer Ebene sind diese Vorgänge abhängig von einem komplexen Zusammenspiel zwischen Glutamatrezeptoren, Ca²⁺-Kanälen, dem zytosolischen Ca²⁺-Spiegeln und Ca²⁺-abhängigen Proteinen wie Akt, ERK, mTOR und BDNF.^{10,299} Yang et al. setzten sich mit der Bedeutung der Ca²⁺-Homöostase für die antidepressive Aktivität von Ketamin auseinander und zeigten, dass die lokale Blockade des NMDA-Rezeptors durch Ketamin oder die Blockade der spannungsempfindlichen Calciumkanäle vom T-Typ durch den

unselektiven Calciumkanalblocker Mibefradil in der lateralen Habenula bei Ratten und in einem Mausmodell für Depression eine antidepressive Wirkung induzieren.³⁰⁰ In einer Studie von Pochwat et al. wurde anschließend der Effekt einer Einzel- und Kombinationsdosis von Hyperforin und Lanicemin, ein NMDA-Rezeptor Antagonist und Antidepressivum, das anders als Ketamin sich durch weniger psychotomimetische und dissoziative Nebenwirkungen auszeichnet, auf die Ca^{2+} -Homöostase und das depressionsähnliche Verhalten in C57BL/6J-Mäusen untersucht. Die Beteiligung von TRPC6-Rezeptoren an der antidepressiven Aktivität von Hyperforin wurde in dieser Studie dahingehend aufgedeckt, als dass eine Vorbehandlung der Testtiere mit dem TRPC6-Antagonisten Larixylacetat und dem Akt-Kinase-Inhibitor MK-2206, die durch Hyperforin induzierte antidepressive Wirkung im TST aufgehoben wurde. Des Weiteren besaß Hyperforin die Fähigkeit, die durch den Akt-Kinase-Inhibitor MK-801 induzierten Störungen im Verhaltenstest NORT zu verbessern. Damit stimmten diese Ergebnisse mit jenen aus in vitro Experimenten überein, wonach die biologische Wirkung von Hyperforin mit der Aktivierung des TRPC6-Kanals zusammenhängt und infolgedessen nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden zur Phosphorylierung von Akt-Kinasen führen.³⁰¹ Beobachtungen von Liu et al. zufolge kam es in einem Ratten-Depressionsmodell, das CUMS und Isolation ausgesetzt war, zu einer reduzierten TRPC6-Expression und beeinträchtigter Kognition im Gehirn. Kognitive Defizite konnten im MWMT, einem Test zur Beurteilung von räumlichem Lernen und Gedächtnis erfasst werden, sowie im Hippokampus in dem eine reduzierte Langzeitpotenzierung (LTP) ermittelt werden konnte. Die Verabreichung von Hyperforin konnte diese Veränderungen revidieren. Neben der verminderten Expression von TRPC6 konnten in Gehirnproben des depressiven Tiermodells weitere morphologische Veränderungen detektiert werden, die die synaptische Plastizität negativ beeinflussen. Konkret betraf es die Dendritenlänge, die Dichte dendritischer Dornenfortsätze und die Menge an PSD-95 (postsynaptic density protein 95, Markerprotein für die synaptische Plastizität), die verringert vorlagen. Aus Versuchen mit beispielsweise primären Hippokampus Neuronen, die mit Hyperforin inkubiert wurden, sowie Neuronen und Gehirnschnitten TRPC6-transgener Mäuse ist bekannt, dass TRPC6-vermittelt die Synaptogenese moduliert wird, was sich in der Zunahme synaptischer Proteine sowie Formation der Dendritenfortsätze äußert und Konsequenzen auf das räumliche Lernen und Erinnerungsvermögen hat.^{90,302} Die genannten Ergebnisse zur antidepressiven Wirkung von Hyperforin in tierexperimentellen Studien lassen eine Verbindung zu TRPC6 erkennen, die davor vielfach nachgewiesen wurde und mit der Identifizierung der Bindestelle LLKL in ihrer Annahme ergänzend unterstützt wird. Während in den bisher genannten Studien die Wirkung von Hyperforin im Tiermodell präsentiert wurde zeigen El Hamdaoui und Kollegen in Ihrer Arbeit erstmals zusätzlich die Wirkung von Hyp-Derivaten im Verhaltensversuch mit TRPC6-WT Mäusen. Demnach löste die Gabe von Hyp13 in männlichen TRPC6-WT Tieren mit B6;129S-Hintergrund konzentrationsabhängig anxyolytische Effekte im OFT, FST und NSFT aus. Ein

Grund für diese Beobachtung legen die Ergebnisse elektrophysiologischer Untersuchungen von TRPC6-WT und TRPC6-KO Maus Gehirnschnitten des Hippokampus nahe, wonach Hyperforin in TRPC6-WT DG-Körnerzellen anders als in TRPC6-KO Auswirkungen auf evozierte APs und auf das Membranpotenzial hat.²⁸³

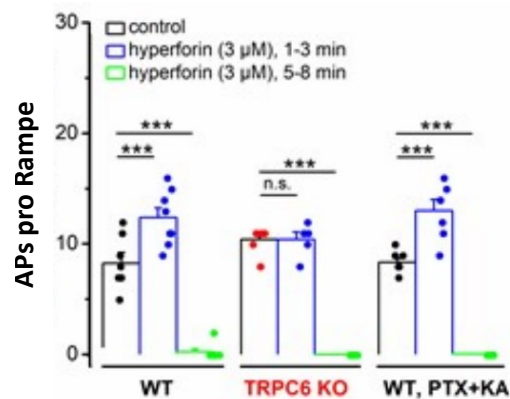


Abb. 61: Verlust der Hyperforin-induzierten Erregung in DG-Körnerzellen von TRPC6 KO-Mäusen. Whole-Cell Patch-Clamp-Aufnahmen von DG-Körnerzellen in Hippokampus-Gehirnschnitten zeigen, dass bei 3 μM Hyperforin APs in TRPC6-WT aber nicht in TRPC6-KO induziert werden. Die Zugabe von Kynurenin Säure (KA) und Picrotoxin (PTX), um die schnelle synaptischen Übertragung durch Hyperforin zu blockieren, wurde in den ersten drei Minuten im TRPC6-WT nicht erreicht. (Abb. modifiziert nach El Hamdaoui et al., 2022)²⁸³

Das Hyp-Derivate nicht nur selektiv den Ca^{2+} -Influx über den TRPC6-Kanal in vereinzelt neuronähnlichen Zellen fördern, sondern auf diese Weise auch neuronale Prozesse im Hippokampus anstoßen, die mit jenen des Hyperforin vergleichbar sind, präsentierten Leuner et al. in ihrer Publikation. So ahmte das Hyp-Derivat Hyp2 analog zu BDNF in Pyramidenneuronen der CA1- und CA3-Region im Ratten-Hippokampus neurotrophe Effekte nach. Hyp2 vermag durch eine verstärkte Freisetzung von Neurotransmittern in CA1-Pyramidenneuronen durch die Verbindung zu CA3-Pyramidenneuronen erhöhte Frequenzen von Miniatur-Erregungspotentialen auszulösen.⁹⁰

6.6.1 TRPC6-vermittelte Effekte beeinflussen die Kognition im Tiermodell

Wie in den vorausgegangenen Kapiteln vorgestellt wurde, führt die Dysfunktionalität oder der Verlust von TRPC6 im Gehirn zur Ausbildung eines depressions- und angstassoziierten Verhaltensphänotyps im Tierversuch, der durch die Gabe von Hyperforin und effektiven Hyp-Derivaten in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration verhindert werden kann. Unsere tierexperimentellen Studienergebnisse verweisen nun zusätzlich auf die essenzielle Bedeutung von TRPC6 für kognitive Prozesse hin, zu denen zerebrale Leistungen wie z.B. Wahrnehmung, räumliche Orientierung, Lern- und Erinnerungsvermögen gezählt werden. Kognitive Störungen treten bei depressiven Patienten verhäuft auf und persistieren selbst dann, wenn eine depressive Episode abgeklungen ist.³⁰³ Xie et al. beschäftigten sich in ihrer Studie mit der Herabregulation des TRPC6-Kanals in DG-Neuronen und den daraus resultierenden Effekten auf Hippokampus-abhängige Abläufe im Gehirn. In Verhaltensexperimenten, die die Kognition adressieren, zeigten männliche TRPC6-KD Mäuse mit C57BL/6J-Hintergrund im SAB-Test einen reduzierten alternierenden Wechsel in die Arme des Y-Mazes, was darauf hindeutet, dass das Kurzzeitgedächtnis beeinträchtigt war. Auch war in dieser Gruppe das soziale Gedächtnis nach einer Testzeit von vier Wochen gestört, was sich in einer signifikant kürzeren Aufenthaltszeit in der dreigliedrigen Testkammer und kürzeren Interaktionszeiten mit dem neuen sozialen Objekt im Vergleich zum bekannten sozialen Objekt zeigte. Hingegen konnte kein signifikanter Unterschied in der sozialen Interaktion ermittelt werden. Im NORT und MWMT führte der Knock-down von TRPC6 zu keiner statistisch relevanten Veränderung des Lern- und Erinnerungsvermögens, obwohl im MWMT die mit shRNA-TRPC6 behandelten Mäuse am letzten Testtag von insg. fünf eine signifikant längere Fluchtlatenzzeit aufwiesen, was auf ein leichtes Defizit im räumlichen Lernen hindeutet. Im OFT zeigten die mit shRNA-TRPC6 behandelten Mäuse eine Steigerung der lokomotorischen Aktivität im Vergleich zu jener in der Kontrollgruppe. Darüber hinaus verbrachten die Tiere in der mit shRNA-TRPC6 behandelten Gruppe weniger Zeit im zentralen Bereich des offenen Feldes als die Kontrollgruppe. Damit können diese Ergebnisse mit jenen von El Hamdaoui et al. erbrachten Ergebnissen verglichen werden, wonach TRPC6-KO Tiere ebenfalls ein angsthähnliches Verhalten im OFT darlegten.²⁸³ Die Ergebnisse von Xie et al. implizieren, dass die Blockade der TRPC6-Expression im DG eine Reihe spezifischer Verhaltensmuster erzeugt, die in Kontext mit denen auf zellulärer Ebene gemachten Beobachtungen gestellt werden können. Dort führte der TRPC6-KD zu einer minimierten Bildung von dendritischen Dornenfortsätze in DG-Neuronen und geringeren PSD95-, pAkt- und CREB-Spiegel im Hippokampus. Der Knock-down wurde mit einer Messung der TRPC6-mRNA-Expression im Gehirngewebe beider Tiergruppen (Gruppe 1 = injiziert mit shRNA-TRPC6, Gruppe 2 = injiziert mit shRNA-Kontrollvirus) überprüft. Statistisch wurde die TRPC6-mRNA-Expression mit einer Signifikanz von *** $p < 0.001$ bei $n = 3$ gehemmt.³⁰⁴ Unsere verhaltensexperimentellen Resultate mit TRPC6-KO Tieren, die zu einer weiteren

Charakterisierung des TRPC6-KO Phänotyps herangezogen wurden, bestätigen anhand der deutlichen Unterschiede zum TRPC6-WT im SORT und NORT ebenfalls eine Beeinträchtigung des Lern- und Erinnerungsvermögens. In unserer Verhaltensstudie präsentieren die TRPC6-KO Tiere im Vergleich zu den TRPC6-WT Tieren keinen Unterschied in der prozentualen Präferenz neuer sozialer Objekte. Allerdings konnten wir nach unserer Ausführung durchaus eine signifikante Veränderung in der absoluten Interaktionszeit bestimmen, wonach die weiblichen TRPC6-KO Tiere nicht bevorzugt mehr Zeit mit dem sozialen Objekt (BL6/J-Maus) als mit dem nicht-sozialen Objekt (Metallring) verbrachten (siehe Kapitel 5.3.5). Die klare Differenz im BPT belegt, dass TRPC6 für die Präferenz bestimmter Gerüche kritisch zu bewerten ist. Im Allgemeinen werden Nager im Rahmen der sozialen Kommunikation vom Urin eines Artgenossen angezogen. Wie bereits vorgestellt zogen TRPC6-KO Tiere in unserem Verhaltensversuch die Interaktion mit sauberer Einstreu stärker vor als die von einer anderen Maus zuvor benutzten Einstreu. Dadurch ist denkbar, dass eine fehlende TRPC6-Aktivierung die soziale Kommunikation und neuronale Prozesse, die das Präferenzverhalten für bestimmte Gerüche steuern negativ beeinflusst.^{305,306} Eine Möglichkeit den Aspekt der sozialen Kommunikation zu verifizieren, stellt ein Geruchspräferenztest mit nichtsozialen Präparaten wie z.B. Bananen- oder Mandelextrakt dar.³⁰⁷ In wie weit TRPC6 im olfaktorischen System involviert ist und was für eine Rolle dieser Ionenkanal in Bezug dazu für die Entstehung und Progression von neuropsychiatrischen Erkrankungen spielt, muss wissenschaftlich intensiver untersucht werden. Zahlreiche Studien belegen eine Verbindung zwischen einer beeinträchtigten olfaktorischen Funktion und der Depressionserkrankung. Dabei können unterschiedliche Formen wie die Registrierung und Identifikation von Gerüchen sowie die Diskriminierung zwischen verschiedenen Gerüchen betroffen sein.^{308,309} Das eine fehlende TRPC6-Funktion zu kognitiven Einschränkungen führt, demonstrierten in der Vergangenheit auch weitere Arbeitsgruppen. Zhou et al. analysierten in ihrer Studie zur Rolle von TRPC6 in der Formation exzitatorischer Synapsen u.a. den Einfluss von TRPC6 in transgenen Mäusen mit TRPC6-Überexpression. Im verhaltensexperimentellen Ansatz wurden die Versuchstiere dem MWMT unterworfen, um speziell das räumliche Lernen und Gedächtnis der Mäuse zu testen. Sie konnten über diesen Versuch herausfinden, dass eine TRPC6-Steigerung zu einer Verbesserung des Lern- und Erinnerungsvermögens führt, die in neurologischen Erkrankungen wie der Depression gestört vorliegen.^{302,310} Eine weiterführende Untersuchungen von Hippocampus-Neuronen mit TRPC6-Überexpression ergab, dass die Dichte dendritischer Dornenfortsätze (Spines) stark erhöht war. Im Gegensatz dazu reduzierte die Herunterregulierung von TRPC6 durch zwei RNAi-Konstrukte (C6i-1 und C6i-2), die auf TRPC6 abzielen die Spinesdichte deutlich.³¹¹ Leuner et al. prüften später, ob Hyperforin in Abhängigkeit von TRPC6 in CA1- und CA3-Pyramidalzellen die Morphologie und Spines in den Dendriten wie BDNF beeinflusst und konnten hierfür zutreffende Belege liefern.⁹⁰ Stacheldichte und -formation spielen in der Kommunikation zwischen Synapsen und in der

Anpassungsfähigkeit an endogenen und exogenen Veränderungen im Gehirn eine wesentliche Rolle. Demnach wird eine Dysfunktionalität in der strukturellen und funktionellen Plastizität in Verbindung mit der Pathogenese der Depression gebracht.³¹²⁻³¹⁴

6.7 Schnittmengen zwischen der Depressions- und Alzheimer-Erkrankung und die Rolle von TRPC6

Wie im Kapitel 6.6.1 vorgestellt wurde, deuten immer mehr Hinweise darauf hin, dass Störungen kognitiver Abläufe in der Depression ein wichtiges Symptom dieser psychiatrischen Erkrankung sind. In diesem Zusammenhang ist es zunehmend erforderlich geworden die Depression als ein relevanter Risikofaktor für andere neuronale Erkrankungen wie der Alzheimerkrankheit (AD) zu sehen, die vordergründig mit einer beeinträchtigten Kognition einhergeht.³¹⁵⁻³¹⁷ Patientenbasierte Studien zeigen, dass der Grad der Ausprägung depressiver Symptome mit der Wahrscheinlichkeit an Alzheimer zu erkranken erhöht ist.^{318,319} In einer Studie zur Bestimmung des Einflusses von behandelbaren bzw. modifizierbaren Risikofaktoren konnte zudem berechnet werden, dass bei Personen über 65 Jahren eine erfolgreiche Therapie der Depression die Wahrscheinlichkeit Alzheimer zu entwickeln um 4 % senkt. Zum Vergleich liegt der Beitrag von weiteren Risikofaktoren wie mangelnde körperliche Bewegung (2,6 %), soziale Isolation (2,3 %) und Diabetes (1,2 %) deutlich darunter.³²⁰ Wie eingangs beschrieben wurde, spielen Neurotrophine eine wichtige Rolle in der Pathogenese affektiver Störungen (siehe Kapitel 1.1.3.1). Gleiches trifft auch auf die AD zu, wodurch sich auf neurobiologischer Ebene Schnittmengen zwischen beiden zerebralen Erkrankungen ergeben. Der Transkriptionsfaktor CREB spielt für die Kognition eine kritische Rolle und steuert maßgeblich die Genexpression von Proteinen, die für das Langzeitgedächtnis und die synaptische Plastizität entscheidend sind, wie z.B. BDNF.^{321,322} BDNF ist ein Wachstumsfaktor mit zentraler Triebkraft für die synaptischen Plastizität und der Gedächtnisbildung. Verminderte BDNF-Spiegel können zur Degeneration spezifischer neuronaler Neuronenpopulationen und zur fortschreitenden Atrophie von Neuronen im von AD betroffenen Gehirn beitragen. So wurden auch in Patienten mit erhöhtem Risiko eine AD zu entwickeln erhöhte BDNF-Serumspiegel mit einer verbesserten kognitiven Funktion bei AD in Verbindung gebracht.³²³ Die Alzheimer-Pathologie ist durch Akkumulation von Amyloid- β -Peptid ($A\beta$), Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau und neuronalem Abbau im Gehirn gekennzeichnet. Im Zusammenhang mit der AD wird eine BDNF-Depletion mit Tau-Phosphorylierung, $A\beta$ -Akkumulation, Neuroinflammation und neuronaler Apoptose in Verbindung gebracht.³²⁴ Wie aus einer weiteren Veröffentlichung zu entnehmen ist, kann durch eine Genregulierung von BDNF-Antisense-RNA BDNF signifikant hochreguliert, die $A\beta$ -induzierte Neurotoxizität minimiert und die Lebensfähigkeit der Zellen verbessert werden.³²⁵ Eine Studie, die

explizit die Rolle von TRPC6 in der Pathogenese der AD vorstellte, verweist darauf, dass TRPC6 spezifisch mit dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP) interagiert, die γ -Sekretase-Spaltung von APP moduliert und schließlich die A β -Produktion reduziert. Zusätzlich zeigen Experimente mit Mäusen, die aus einer Kreuzung von APP/PS1-Mäusen mit transgenen TRPC6-Mäusen hervorgehen und damit TRPC6 überexprimierten eine deutliche Verringerung sowohl der Plaquebelastung als auch der A β -Spiegel und eine Verbesserung der Performance im MWMT.³²⁶ Angesichts speziesspezifischer Unterschiede zwischen Nagern und Menschen können die gewonnenen Daten aus Alzheimer-Tiermodellen den klinischen Zustand von Patienten in seiner Komplexität kaum widerspiegeln, geschweige die Wirksamkeit von Wirkstoffen in klinischen Studien vorhersagen, was die hohe Ausfallsrate von entsprechenden Medikamenten in der klinischen Entwicklung erklärt.³²⁷ Basierend auf dieser methodischen Problematik initiierten Tao et al. einen neuen Ansatz indem sie induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) von sporadischen Alzheimer-Patienten zu reifen kortikalen Neuronen ausdifferenzierten, um die AD vor einem patientenspezifischen genetischen Hintergrund zu modellieren und zu untersuchen. Diese Neuronen wiesen eine erhöhte A β - und phosphorylierte Tau-Level und zugleich eine reduzierte TRPC6-Expression auf. Die Behandlung der ausdifferenzierten iPS-Zellen mit Hyperforin gleichete letztlich die erhöhten A β - und Tau-Werte aus, was belegt, dass eine spezifische Stimulation von TRPC6 die A β -Zunahme in menschlichen Alzheimer-Neuronen hemmt.^{326,328} In diesem Zusammenhang konnte schon vor wenigen Jahren in einer Untersuchung menschlicher Blutproben von Patienten mit Alzheimer und milder kognitiver Beeinträchtigung reduzierte TRPC6 mRNA-Spiegel in verschiedenen Stadien der Erkrankung bzw. Störung entdeckt werden. Die verminderte Expression von TRPC6 konnte in Neuronen der CA1- und DG-Zellschicht sowie in Interneurone des Hippokampus nachgewiesen werden und somit in einer Gehirnregion, die bei der Depression funktional als auch strukturell geschädigt vorliegt und zugleich für die hohe Rate an therapieresistenten Patienten unter medikamentöser Betreuung mitverantwortlich ist.³²⁹

6.8 Der Einfluss des Geschlechts auf das depressions- und angstähnliche Verhalten im Tiermodell

Wie in zahlreichen Veröffentlichungen publiziert wurde, leiden annähernd doppelt so viele Frauen an einer Depression als Männer.³³⁰ Des Weiteren divergieren beide Geschlechter in der Symptomatik und Entwicklung einer Depression sowie im Therapieerfolg mit Antidepressiva voneinander.^{331,332} Warum statistisch häufiger Frauen als Männer an einer Depression leiden konnte bisher nicht lückenlos geklärt werden. Das Geschlecht selbst ist jedenfalls ein Faktor von vielen, welches das Risiko an eine Depression zu erkranken erhöht. Weibliche Sexualhormone wie Östrogene oder Progesteron sind erwiesenermaßen an synaptischer Plastizität, Neurotransmission, Neuroprotektion sowie am Aufbau und an der Gestaltung emotionaler und kognitiver Funktionen im Gehirn beteiligt.^{333,334} Damit greifen sie regulierend in neuronale Bereiche ein, die in der Pathogenese der Depression fehlreguliert ablaufen. Einige Studien legen nahe, dass ein Zusammenhang zwischen einem anhaltenden niedrigen Östrogenspiegel oder einem schnellen Östrogenrückgang wie z.B. in der Prämenstruations-, Pränatalphase und Perimenopause und dem Ausbruch einer Depression besteht.^{335,336} In zwei repräsentativen Studien aus den Jahren 2016 und 2018 konnte zudem eine Assoziation zwischen der Einnahme von oralen Kontrazeptiva und einem erhöhten Risiko einer Depressionsdiagnose, Inanspruchnahme antidepressiver Therapien und suizidalen Handlungen festgesellt werden.^{337,338} Paradoxerweise schließen die meisten Studien, die biologische Mechanismen hinter dem depressions- und angstähnlichen Verhalten im Tiermodell zum Untersuchungsgegenstand erheben, weibliche Tiere aus. In vielen Fällen wird diese Entscheidung damit begründet, dass der Östruszyklus bei den Weibchen zu einem zyklusabhängigen Verhalten führt und folglich zu einer Verzerrung der Datenergebnisse.³³⁹ In unserer Verhaltensexperimentellen Studie nahmen wir uns deshalb vor den Östruszyklus der weiblichen Tiere zu kontrollieren, indem Vaginalabstriche entnommen und ausgewertet wurden. In der Test- und Kontrollgruppe war die Verteilung der Zyklusphasen annähernd gleichverteilt, woraus geschlossen werden kann, dass Differenzen in den untersuchten Verhaltensdomänen im Genotyp begründet liegen müssen. Interessanterweise zeigen unsere Daten deutlich, dass in allen Verhaltensexperimenten die Effekte zwischen den beiden weiblichen Gruppen am stärksten auseinandergingen. In den Verhaltensexperimenten SORT, NORT und BPT, die nach einer 2-Way-ANOVA Analyse signifikante Unterschiede im Faktor Genotyp vorzuweisen hatten, konnten durch eine nachgeschaltete Post-Hoc-Analyse diese signifikanten Differenzen primär dem weiblichen Geschlecht zugeordnet werden. Vermutlich werden bei der Aktivierung von TRPC6 neurologische Prozesse, die die synaptische Plastizität regulieren, für die Wirkung von weiblichen Sexualhormonen sensibilisiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Östradiol neurotrophe und neuroprotektive Reaktionen in hippokampalen und

kortikalen Neuronen induziert. Dabei könnte der Einfluss von Östradiol auf den Ca^{2+} -Spiegel im Zytosol eine wichtige Rolle spielen. So wird beispielsweise angenommen, dass Östradiol über L-Typ Ca^{2+} -Kanäle einen Ca^{2+} -Influx induziert, der zur Aktivierung des ERK-Signalwegs führt. Das ist ein Hinweis darauf, dass die neuronalen Effekte weiblicher Sexualhormone von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mitbestimmt wird.³⁴⁰ Während ein Eingriff in den Haushalt weiblicher Sexualhormone aufgrund relativ großer Konzentrationsschwankungen in den verschiedenen Lebensphasen als kompliziert gilt und die Rolle der einzelnen Sexualhormone in der Ätiologie und Pathophysiologie der Depression weitestgehend ungeklärt ist, stellt in diesem Zusammenhang die Modulation des TRPC6-Kanals ein attraktiveres therapeutisches Ziel dar.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit setzt sich im Wesentlichen aus drei Teilen zusammen, die gemeinsam die Effektivität eines neuen Hyp-Derivates am TRPC6-Kanal, die Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen Hyperforin und dem TRPC6-Kanal sowie schliesslich die neurobiologische Bedeutung des TRPC6-Kanals für kognitive Abläufe im Gehirn durch verhaltensexperimentelle Untersuchungen im Tiermodell beschreiben.

Das bestimmte 2,4-Diacylphloroglucinole bzw. Hyp-Derivate den TRPC6-Kanal im Calcium-Imaging und elektrophysiologischen Ionenstrom-Messungen selektiv aktivieren, können wurde vor einigen Jahren von Leuner et al. vorgestellt. In diesem Zusammenhang wurde gleichwegs nachgewiesen, dass Hyp-Derivate ähnlich zu Hyperforin über den TRPC6-Kanal auf neuronaler Ebene morphologische Veränderungen in den Dendriten hippocampaler Neurone herbeiführen können, die bei der Depressionserkrankung beeinträchtigt vorliegen und infolgedessen die synaptische Plastizität nachteilig beeinflussen. Wie in dieser Studie publiziert wurde, hat sich das Hyp-Derivate Hyp1 (EC_{50} 2,71) im Calcium-Imaging als potent und in der Wirkstärke vergleichbar zu Hyperforin (EC_{50} 1,51) erwiesen. Basierend darauf wurde Hyp1 chemisch modifiziert und ein neues Hyp-Derivat synthetisiert. Durch das Einfügen einer Butylgruppe an der einzig freien Position des 2,4-Diacylphloroglucinol-Grundgerüsts entstand die Verbindung Hyp13. Um die Effektivität von Hyp13 in Zellen mit endogener TRPC6-Expression und mit TRPC6-Plasmid-DNA transienter Transfektion näher zu charakterisieren, wurden im vorliegenden Forschungsprojekt das Calcium-Imaging-Verfahren und die Patch-clamp-Technik angewendet. In PC12-Zellen konnte sowohl eine signifikante Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als auch eine signifikante Zunahme der Ionenströme nach der Applikation von Hyp13 nachgewiesen werden. Diese Effekte wurden in PC12-Zellen, die nach einer transienten Transfektion eine dominant negative TRPC6-Mutante exprimierten, signifikant reduziert. Das Hyperforin-ähnliche Wirkprofil von Hyp13 konnte darüber hinaus durch die Messung einer konzentrationsabhängigen Veränderung des Ca^{2+} -Einstroms sowie des Ionenstroms nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wurde ebenfalls in HEK293-Zellen mit TRPC6-Expression gemacht. Damit demonstrieren diese Ergebnisse, dass die Modifikation der sechsten Position des Benzolringes z.B. durch eine kurze Acylkette wie in Hyp13 die Wirkung von 2,4-Diacylphloroglucinole am TRPC6-Kanal nicht von sich aus reduziert. Diese Erkenntnis trägt zu einem besseren Verständnis der Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen Hyp-Derivate und dem TRPC6-Kanal bei, in dem zukünftig beim Strukturdesign neuer Hyp-Derivate die sechste Position am Benzolring für chemische

Modifikationen stärker berücksichtigt werden kann, um die Effektivität dieser TRPC6-Aktivatoren zu verbessern.

Im nächsten Teil galt es aufbauend auf die Erkenntnisse aus dem ersten Teil dieser Dissertation herauszufinden, ob Hyperforin und Hyp13 ihre selektive TRPC6-Aktivität durch eine direkte Interaktion mit einem Bindemotiv in TRPC6 erreichen. Basierend auf Sequenzhomologien und funktionellen Daten wird die TRPC-Familie in drei Gruppen eingeteilt. Dabei bilden TRPC3/6/7 die Gruppe der DAG-sensitiven TRPCs, in der eine Sequenzidentität von über 70 % vorliegt. Zur Identifizierung der Aminosäuren in TRPC6, die mit Hyperforin interagieren und sich von jenen in der TRPC3 und TRPC7 unterscheiden, wurde in einer zielgerichteten Mutagenese nicht-identische Aminosäuren in TRPC3 und TRPC6 gegenseitig ausgetauscht. Dabei konnte mittels der Calcium Imaging Methode in von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Voruntersuchung das Bindemotiv LLKL in der Position 777-780 zwischen dem TRP-Reentrant-Motiv und der C-terminalen Helix 1 des humanen TRPC6 detektiert werden. Die darauffolgende vertiefte Charakterisierung der Mutanten TRPC6IMRI und TRPC3LLK in HEK293-Zellen führte zum Ergebnis, dass TRPC6IMRI den von Hyperforin induzierten Ca^{2+} -Influx im Calcium-Imaging und die gesteigerten Ionenströme im Patch-Clamp-Verfahren signifikant herabsetzt. In TRPC3LLKL exprimierenden HEK293-Zellen konnten diese Effekte wieder revidiert werden und es wurden Messwerte erreicht, die mit jenen in TRPC6 exprimierenden HEK293-Zellen vergleichbar und konzentrationsabhängig waren. Parallel zu Hyperforin zeigte auch Hyp13 ein vergleichbares Aktivitätsprofil. Hingegen führte die Applikation von DAG-Analoga sowohl in den nativen als auch modifizierten TRPC3 und TRPC6 exprimierenden HEK293-Zellen zu keiner Veränderung der Aktivität. Die Ergebnisse unserer Daten zeigen erstmalig, dass die selektive TRPC6-Aktivierbarkeit von Hyperforin und Hyperforin-Derivaten wie Hyp13 im HEK293-Überexpressionssystem auf eine Interaktion mit dem Bindemotiv LLKL basieren.

Der letzte Teil fokussiert sich auf die phänotypische Charakterisierung der TRPC6-KO Maus (Stamm: B6;129S-Trpc6tm1Lbi/Mmjax). Verschiedene Publikationen zeigen, dass TRPC6-KO Mäuse unterschiedlicher Stämme in depressions- und angstassoziierten Verhaltensdomänen in Gegenüberstellung zu TRPC6-WT Mäusen signifikant defizitär sind. Diese Beobachtungen decken sich bspw. mit elektrophysiologischen Untersuchungen von Gehirnschnitten dieser Tiere, in denen hippokampale Neurone eine signifikante Senkung der neuronalen Erregbarkeit aufweisen, was wiederum ein Hinweis darauf ist, dass die neuronale Transmission beim Fehlen des TRPC6-Kanals fehlreguliert verläuft. Um neben dem depressions- und angstverbundenen Verhalten auch weitere Verhaltensdomänen zu bewerten, die vorrangig die Kognition adressieren, wurde eine Verhaltensbatterie für TRPC6-KO und -WT Mäuse beiderlei Geschlechter durchgeführt. Im SORT, NORT, BPT und ST konnten signifikante Unterschiede im Genotyp identifiziert werden. Das Ergebnis verweist somit auf die relevante Bedeutung von TRPC6 für neuronale Prozesse, die das Lern- und

Erinnerungsvermögen, die Geselligkeit und die Bevorzugung bestimmter Gerüche steuern und bei der Depressionserkrankung sowie weiteren neurologischen Erkrankungen beeinträchtigt vorliegen. Signifikante Verhaltensunterschiede konnten insbesondere bei den weiblichen Tieren festgestellt werden. Damit deuten die vorliegenden Studiendaten zusätzlich auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied hin, wie er vorrangig bei depressiven Patienten auftritt, wonach statistisch fast doppelt so viele Frauen als Männer an der Depression leiden. Die signifikante Reduktion der kognitiven Gedächtnisleistung und ein teils mangelndes Vermögen im sozialen Verhalten der TRPC6-KO Tieren ist eine Beobachtung, die nicht ausschliesslich bei depressiven Patienten gemacht wird. An dieser Stelle können die vorliegenden Ergebnisse aus der tierexperimentellen Studie für die Erforschung der Ätiologie und Pathogenese weiterer psychiatrischer sowie neurodegenerativer Erkrankungen bedeutsam werden.

8. VERZEICHNISSE

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
AAR	Alternate arm returns
Abb.	Abbildung
ad	bis zu
AKT	Protein Kinase B
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Analysis of variance
AP	Aktionspotential
AP-1	Aktivator Protein 1
APA	American Psychiatric Association
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Ankyrin-repeat
ASD	Autism spectrum disorder
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bzw.	beziehungsweise
BL6 Maus	Black 6 mouse
bp	Base pair
BPT	Bedding preference test
BSA	Bovines Serumalbumin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
C57BL/6J	C57 black 6 mouse junior
CA	Cornu ammonis
[Ca²⁺]_i	Intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration
CaM	Calmodulin
CaMKIV	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängigen Kinase IV
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CCD-Kamera	charge-coupled device camera
CH	C-terminale Helix
Cm	Membrankapazität
cm	Zentimeter
CMSM	Chronic mild stress model,
CRAC-Kanal	Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺ channels
CREB	cAMP response element-binding protein
CRIB	Cyclic adenosine monophosphate response element binding protein
Kryo-EM	Kryogenetische Elektronen Mikroskopie
CSDSM	Chronic social defeat stress model
ctl	Kontrolle
CYP3A4	Cytochrom-P450-3A4
DAG	Diacylglycerol

DALY	Disability-adjusted life years
DNA	Deoxyribonucleic acid
DAS	Dual-serotonerge Antidepressiva
DG	Gyrus dentatus
DH5α-Bakterien	Kompetenter Stamm aus E. coli
DMEM	Dulbecco's modified medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	Dominant negativ
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DOG	1,2-dioctanoyl-sn-glycerol
DpnI	Restriktionsenzym aus dem Bakterium Diplococcus pneumon
DPPGN	Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde e. V.
DSM-5	Diagnostic and statistical manual of mental disorders fifth edition
DV	Differentialverstärker
E. coli	Escherichia coli
EC₅₀	Mittlere effektive Konzentration
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EPMT	Elevated plus maze test
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
ES	embryonale Stammzelle
ESMT	Elevated star maze test,
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
eYFP	Enhanced yellow fluorescent protein
F	Fluoreszenz
FCS	Fetal calf serum
ff.	fort folgende
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
FST	Forced swim test
FRS2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2
g	Gramm
G/C-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GDB	Global burden of diseases
GluR1	Glutamat Rezeptor Subtyp 1
GOF	Gain-of-function
GPCR	G protein-coupled receptor
GTPasen	Guanosintriphosphat-bindende Hydrolase
GΩ	Gigohm
HEK293-Zellen	Human embryonic kidney 293-Zellen
HEPES	2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPA axis	Hypothalamic-pituitary-adrenal axis
HRP	Horseradish peroxidase
HS	Horse serum

hTRPC	Human TRPC
Hyp	Hyperforin-Derivat
H1-Rezeptor	Histamin 1 Rezeptor
I	Ampere
i.d.R.	in der Regel
I/V	Strom/Spannung
IC₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICD	Intrazelluläre cytoplasmatischen Domäne
ICD-10	International statistical classification of diseases and related health problems tenth edition
I_{CRAC}	Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺ channels current
IP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kbp	Kilobase pair
KD	Knock-down
kDa	Kilodalton
KO	Knock-out
LB	Lysogeny broth
LDBT	Light-Dark Box Test
LH	Linker-Helix
LHM	Learned helplessness model
LOF	Loss-of-function
LTD	Long-term depression
LTP	Long-term potentiation
Lux	Beleuchtungsstärke
M	Molar
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBT	Marble burying test
MBU	Mouse Behavior Unit
MDD	Major depressive disorder
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHR	Melastatin homology region
Min.	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mOsm	Miliosmol
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
mTRPC	mouse TRPC
mV	Millivolt
MWMT	Morris water maze test
MΩ	Megaohm
M₁-Rezeptor	Muskarinerges Rezeptor Subtyp 1
NaSSA	Noradrenerge und spezifisch serotonerge Antidepressiva
NCBI	National Center for Biotechnology Information of the Institute of Health

NERT	Noradrenalin Rücktransporter
NFAT	Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen
NGF	Nerve growth factor
NHERF	Na ⁺ /H ⁺ exchange regulation factor
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NORT	Novel object recognition test
ns	nicht signifikant
NSFT	Novelty-suppressed feeding test
NT	Neurotrophin
N-Terminus	Amino-Terminus
OAG	1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
OFT	Open Field test
OPA	Operationsverstärker
P	Permeabilität
pA	Pikoampere
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC12-Zellen	Pheochromocytoma 12-Zellen
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Proteindatenbank
pF	Pikofarad
PGK	Phosphoglyceratkinase
P-gp	P-Glykoprotein
pH	Potentia Hydrogenii
PH	Poren-Helix
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC-γ	Phospholipase C-γ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD-95	Postsynaptic density protein 95
PVC	Polyvinylchlorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p-Wert	Signifikanzwert (probabilitas)
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
Ras	Rat sarcoma virus
Rf	Rückkopplungswiderstand
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
Rm	Membranwiderstand
ROCE	receptor operated calcium entry
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Revolutions per minute
Rs	Zugangswiderstand
RT	Raum Temperatur
RTK	Rezeptor Tyrosine Kinase
rTRPC	rat TRPC
S	Segment

SAB	Spontaneous alternation behavior
SAG	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol
SAP	Spontaneous alternation performance
SAR	Same arm returns
SD	Standard deviation
SDM	Site directed mutagenesis
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sek.	Sekunden
SEM	Standard error of the mean
SERCA	Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase
SERT	Serotonin Rücktransporter
shRNA	Small hairpin RNA
SNDRI	Selektive Noradrenalin-und Dopamin-Wiederaufnahme-Inhibitor
SNRI	Serotonin und Noradrenalin-Reuptake-Inhibitor
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SOCE	Store operated calcium entry
sog.	so genannte
SORT	Spatial object recognition test
SPF	Spezifiziert Pathogen-frei
SPT	Succrose preference test
SSNRI	Selektive Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitor
SSRI	Selektiven-Serotonin-Reuptake-Inhibitor
ST	Sociability test
STIM1	Stromal interaction molecule 1
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TARC	Translational Animal Research Center
TCA	Trizyklika
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
T_m	Melting temperatur
T-maze	T-geformte Box
TMD	Transmembranäre Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trk	Tropomyosin-Rezeptorkinase
TRP	Transient receptor potential channel
TRPA	TRP ankyrin
TRPC	TRP classical
TRPM	TRP melastatin
TRPML	TRP mucolipin
TRPN	TRP no mechanoreceptor potential C
TRPP	TRP polycistin
TRPV	TRP vanilloid
TRPY	TRP yeast
TST	Tail suspension test
u.a.	unter anderem
U_k	Kommandopotential

U_p	Pipettenpotential
ut	untransfizierten
UV	Ultraviolettstrahlung
vergl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
WT	Wild-Typ
YFP	Yellow fluorescent protein
YLD	Years lived with disability
Y-maze	Y-geformte Box
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nerven System
α	Alpha
α₁-Rezeptor	Adrenerger Rezeptor Subtyp 1
β	Beta
γ	Gamma
λ	Lambda
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm²	Mikrometer zum Quadrat
μM	Mikromolar
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraensäure
3D	3-dimensional
5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
ø	Durchmesser
∞	Unendlichzeichen
°C	Grad Celcius
%	Prozent
-/-	Homozygot
+/-	Heterozygot
+/+	Homozygot
±	Plusminuszeichen

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Grafik mit Symptomen der unipolaren Depression und Einstufung des Schweregrades nach dem ICD-10 Klassifikationssystem.	7
Abb. 2: Global burden diseases (GBD) gemessen in DALYs für das Jahr 2019.	2
Abb. 3: Intrazelluläre Signaltransduktionskaskade bei TrkB-Rezeptor Aktivierung durch BDNF.	13
Abb. 4: Grafische Illustration der Prä- und Postsynapse (A) noradrenerger und (B) serotonerger Neuronen einschließlich der Effekte verschiedener Antidepressiva.	15
Abb. 5: Chemische Struktur von Hyperforin.	18
Abb. 6: Chemische Struktur von Hyperforin, Tetrahydrohyperforin und Aristoforin.	20
Abb. 7: Chemische Strukturen von Hyperforin, DAG, Phloroglucinol und Hyp-Derivaten.	21
Abb. 8: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Superfamilie.	25
Abb. 9: Strukturtopologie der TRP-Kanal-Superfamilie.	29
Abb. 10: Aktivierungsmechanismen der TRPC-Kanäle.	32
Abb. 11: Kryo-EM Modell des menschlichen TRPC6-Kanals.	34
Abb. 12: Funktionell und strukturell beeinträchtigte Hirnareale bei depressiven Patienten.	37
Abb. 13: BDNF und Hyperforin induzierte Effekte auf die synaptische Plastizität.	39
Abb. 14: Chemische Strukturen ausgewählter selektiver und unselektiver TRPC6-Aktivatoren.	41
Abb. 15: Chemische Strukturen ausgewählter selektiver und unselektiver TRPC6-Inhibitoren.	45
Abb. 16: Der Fluoreszenzindikator Fura-2AM.	74
Abb. 17: Messung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration mit der Calcium-Imaging-Apparatur am Beispiel von PC12-Zellen.	75
Abb. 18: Patch-Clamp-Messkonfigurationen.	80
Abb. 19: Schematische Darstellung eines Patch-Clamp-Verstärkers und Schaltkreises.	82
Abb. 20: Alignment von TRPC6-WT und TRPC6-KO Primer Paaren mit der DNA-Sequenz von mTRPC6 und der PGK-Promotor-Sequenz.	83
Abb. 21: Schematische Abbildung der Verhaltenstestbatterie nach Jene et al.	84
Abb. 22: Schematische Darstellung des Spontaneous Alternation Behaviour Tests (SABT).	88
Abb. 23: Schematischer Ablauf des Spatial Object Recognition Tests (SORT).	90
Abb. 24: Schematische Illustration des Open Field Tests (OFT).	91
Abb. 25: Schematische Darstellung des Novel Object Recognition Tests (NORT).	92

Abb. 26: Schematische Präsentation des Sociability Tests (ST).	93
Abb. 27: Schematische Darstellung des Light-Dark Box Tests (LDBT).	94
Abb. 28: Schematische Abbildung des Bedding Preference Tests (BPT).	95
Abb. 29: Strukturformeln von Phloroglucinol, Hyperforin, Hyp1 und Hyp13.	98
Abb. 30: Hyp13 führt zu einem konzentrationsabhängigen Ca ²⁺ -Influx in PC12-Zellen.	99
Abb. 31: Hyp13 induziert konzentrationsabhängig einen Ca ²⁺ -Influx in hTRPC6-eYFP exprimierenden HEK293-Zellen.	101
Abb. 32: Hyp13 führt zu einer konzentrationsabhängigen Veränderung des Ionenstroms in PC12-Zellen.	103
Abb. 33: Sequenzalignment der dominant negativen Mutante hTRPC6AAA.	105
Abb. 34: Fluoreszenzmikroskopie mit hTRPC6AAA-eYFP transfizierten PC12-Zellen.	106
Abb. 35: Intrazelluläre Ca ²⁺ -Messung transfizierter PC12-Zellen mit der dominant negativen TRPC6-Mutante hTRPC6AAA-eYFP.	107
Abb. 36: Hyp13 Effekt ist in transfizierten PC12-Zellen mit hTRPC6AAA-eYFP in der Whole-Cell-Aufzeichnung reduziert.	109
Abb. 37: Alignment der hTRPC6IMRI-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP DNA-Sequenz mit der hTRPC6 und hTRPC3 DNA-Sequenz bestätigt den Austausch der Aminosäuren an der richtigen Position.	113
Abb. 38: Fluoreszenzimaging transfizierter HEK293-Zellen bestätigt die korrekte Lokalisation der hTRPC3/6-Mutanten in der Plasmamembran.	115
Abb. 39: Western Blot transfizierter HEK293-Zellen präsentiert vergleichbare Proteinexpressionsintensitäten zwischen hTRPC6, hTRPC3 und Mutanten.	117
Abb. 40: Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 führen zu einem signifikanten Ca ²⁺ -Influx in hTRPC6-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP transfizierten HEK293-Zellen.	120
Abb. 41: SAG induziert eine Steigerung des Ionenstroms in mit hTRPC3-eYFP, hTRPC6-eYFP, hTRPC3LLKL-eYFP und hTRPC6IMRI-eYFP transfizierten HEK293-Zellen.	122
Abb. 42: Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 induzieren eine Steigerung des Ionenstroms in mit hTRPC6-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP transfizierten HEK293-Zellen.	124
Abb. 43: Hyperforin, Hyp1 und Hyp13 führen zu einer konzentrationsabhängigen Veränderung des Ionenstroms in mit hTRPC6-eYFP und hTRPC3LLKL-eYFP transfizierten HEK293-Zellen.	128
Abb. 44: Spontaneous Alternation Behaviour Test (SABT).	130
Abb. 45: Spatial Object Recognition Test (SORT).	131
Abb. 46: Open Field Test (OFT).	133
Abb. 47: Novel Object Recognition Test (NORT).	134
Abb. 48: Sociability Test (ST).	135
Abb. 49: Light-Dark Box Test (LDBT).	136

Abb. 50: Bedding Preference Test (BPT).	137
Abb. 51: Körpergewicht.	139
Abb. 52: Defäkationsfrequenz.	140
Abb. 53: Bestimmung der Östruszyklusphasen.	141
Abb. 54: Kryo-EM Struktur des humanen TRPC3- und TRPC6-Kanals mit Bindestellen für lipidähnliche Verbindungen.	143
Abb. 55: Präsentation der Reste in TRPC6 die mit DAG interagieren.	144
Abb. 56: Präsentation von ausgewählten TRPC6-Modulatoren Bindestellen.	148
Abb. 57: Darstellung der Ligandbindungsdomäne von PXR mit Hyperforin.	152
Abb. 58: Hyp13 stimuliert nicht PXR sowie die Expression von CYP3A4-mRNA.	153
Abb. 59: TRPC6-KO Maus zeigt im Vergleich zur TRPC6-WT Maus angst- und depressionsähnliches Verhalten.	155
Abb. 60: Reduzierte hippokampale Zell-Erregung in TRPC6-KO Tieren.	156
Abb. 61: Verlust der Hyperforin-induzierten Erregung in DG-Körnerzellen von TRPC6 KO-Mäusen.	159
Abb. 62: Sequenz-Alignment der Kanäle TRPC3/6/7 verschiedener Spezies.	202

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: EC ₅₀ -Werte ausgewählter selektiver und unselektiver Aktivatoren von TRPC6.	44
Tab. 2: IC ₅₀ -Werte ausgewählter selektiver und unselektiver Inhibitoren von TRPC6.	47
Tab. 3: Geräte und Instrumente.	57
Tab. 4: Verbrauchsmaterialien.	57
Tab. 5: Chemikalien, biologische Materialien und Kits	59
Tab. 6: Testsubstanzen.	59
Tab. 7: Antikörper.	60
Tab. 8: Plasmide.	60
Tab. 9: Zellen.	60
Tab. 10: Tiere.	60
Tab. 11: Puffer und Lösungen.	64
Tab. 12: Software.	64
Tab. 13: Primer für die Mutanten hTRPC6IMRI _{-eYFP} und hTRPC3LLKL _{-eYFP} .	68
Tab. 14: Konzentrations- und Volumenangaben der Reagenzien für einen PCR-Reaktionsansatz.	70
Tab. 15: PCR-Protokoll mit Reaktionsschritten sowie zugehörigen Temperatur- und Zeitangaben.	70
Tab. 16: Sequenzierungsprimer für hTRPC3/6 Plasmid-DNA.	72
Tab. 17: Primer Paare für die Genotyp Bestimmung von TRPC6-WT und -KO Mäusen.	83
Tab. 18: Explorationsverhaltensmuster im Spontaneous Alternation Behavior Versuch.	89
Tab. 19: Datenergebnisse aus den Verhaltensexperimenten mit Signifikanzen zwischen den Faktoren Interaktion, Genotyp und Geschlecht.	138

8.4 Literaturverzeichnis

1. Santomauro, D. F. *et al.* Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *The Lancet* **398**, 1700–1712 (2021).
2. International Classification of Diseases (ICD). World Health Organization Available at: <https://icd.who.int/browse10/2019/en>. (Accessed: 15th October 2022)
3. James, S. L. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* **392**, 1789–1858 (2018).
4. Liu, Q. *et al.* Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study. *J Psychiatr. Res.* **126**, 134–140 (2020).
5. The global burden of disease: 2004 update. World Health Organization Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43942/9789241563710_eng.pdf?sequence=1. (Accessed: 15th October 2022)
6. Malhi, G. S. & Mann, J. J. Depression. *The Lancet* **392**, 2299–2312 (2018).
7. Statistisches Jahrbuch 2019. Statistisches Bundesamt (2020) Available at: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Querschnitt/Jahrbuch/statistisches-jahrbuch-2019-dl.html>. (Accessed: 15th October 2022)
8. Psychreport 2021. Entwicklungen der psychischen Erkrankungen im Job: 2011 - 2021. DAK-Gesundheit Available at: <https://www.dak.de/dak/download/report-2533050.pdf>. (Accessed: 15th October 2022)
9. Krishnan, V. & Nestler, E. J. The molecular neurobiology of depression. *Nature* **455**, 894–902 (2008).
10. Duman, R. S., Aghajanian, G. K., Sanacora, G. & Krystal, J. H. Synaptic plasticity and depression: New insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat. Med.* **22**, 238–249 (2016).
11. Steffen, A., Nübel, J., Jacobi, F., Bätzing, J. & Holstiege, J. Mental and somatic comorbidity of depression: A comprehensive cross-sectional analysis of 202 diagnosis groups using German nationwide ambulatory claims data. *BMC Psychiatry* **20**, 1–15 (2020).
12. Rush, J. A. *et al.* Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Am. J. Psychiatry* **163**, 1905–1917 (2006).
13. Kang, H. J. & Schuman, E. M. Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus. *J. Physiol. Paris* **89**, 11–22 (1995).
14. Lohof, A. M., Ip, N. Y. & Poo, M. M. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* **363**, 350–353 (1993).
15. Nibuya M, M. S. D. R. S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.* **15**, 7539–7547 (1995).
16. Kaplan, D. R. & Miller, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 381–391 (2000).
17. Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 299–309 (2003).
18. Jin, Y., Sun, L. H., Yang, W., Cui, R. J. & Xu, S. B. The role of BDNF in the neuroimmune axis regulation of mood disorders. *Front. Neurol.* **10**, 515 (2019).

19. Gass, P. & Hellweg, R. Peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a biomarker for affective disorders? *International Journal of Neuropsychopharmacology* **13**, 1–4 (2010).
20. Polyakova, M. *et al.* BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: A systematic & quantitative meta-analysis. *J. Affect. Disord.* **174**, 432–440 (2015).
21. Martinowich, K. & Lu, B. Interaction between BDNF and serotonin: Role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* **33**, 73–83 (2008).
22. Palomer, E., Carretero, J., Benvegnù, S., Dotti, C. G. & Martin, M. G. Neuronal activity controls Bdnf expression via Polycomb de-repression and CREB/CBP/JMJD3 activation in mature neurons. *Nat. Commun.* **7**, 1–12 (2016).
23. Hong, E. J., McCord, A. E. & Greenberg, M. E. A Biological Function for the Neuronal Activity-Dependent Component of Bdnf Transcription in the Development of Cortical Inhibition. *Neuron* **60**, 610–624 (2008).
24. Baj, G., Leone, E., Chao, M. V. & Tongiorgi, E. Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16813–16818 (2011).
25. An, J. J. *et al.* Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* **134**, 175–187 (2008).
26. Maynard, K. R. *et al.* Bdnf mRNA splice variants differentially impact CA1 and CA3 dendrite complexity and spine morphology in the hippocampus. *Brain Struct. Funct.* **222**, 3295–3307 (2017).
27. Yan, Q., Radeke, M. J., Matheson, C. R., Talvenheimo, J., Welcher, A. A., Feinstein, S. C. Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* **378**, 546–547 (1997).
28. Hofer, M., Pagliusi, S. R., Hohn, A., Leibrock, J. & Barde, Y. A. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO Journal* **9**, 2459–2464 (1990).
29. Lemmon, M. A., Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
30. Bergeron, J. J. M., Di Guglielmo, G. M., Dahan, S., Dominguez, M. & Posner, B. I. Spatial and Temporal Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Activation and Intracellular Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 573–597 (2016).
31. Guilloux, J. P. *et al.* Molecular evidence for BDNF-and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Mol. Psychiatry.* **17**, 1130–1142 (2012).
32. Duman, R. S. & Monteggia, L. M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. *Biol. Psychiatry* **59**, 1116–1127 (2006).
33. Hansson, A. C. *et al.* c-fos reduces corticosterone-mediated effects on neurotrophic factor expression in the rat hippocampal CA1 region. *Journal of Neuroscience* **23**, 6013–6022 (2003).
34. Smith, M. A., Makino, S., Kvetnansky, R. & Post, R. M. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *Journal of Neuroscience* **15**, 1768–1777 (1995).
35. Kumamaru, E. *et al.* Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase. *Molecular Endocrinology* **22**, 546–558 (2008).
36. Jeanneteau, F., Garabedian, M. J. & Chao, M. V. Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4862–4867 (2008).

37. Castrén, E. & Kojima, M. Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiol. Dis.* **97**, 119–126 (2017).
38. Chen, B., Dowlatshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F., & Young, L. T. Increased hippocampal bdnf immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol. Psychiatry* **4**, 260–265 (2001).
39. Duman R. S., Voleti. B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci.* **35**, 47–56 (2012).
40. Carlezon, W. A., Duman, R. S. & Nestler, E. J. The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* **28**, 436–445 (2005).
41. Casarotto, P. C. *et al.* Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell* **184**, 1299–1313 (2021).
42. Zhang, J. C. *et al.* Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **18**, 1–12 (2014).
43. Brown, W. A. & Rosdolsky, M. The clinical discovery of imipramine. *American Journal of Psychiatry* **172**, 426–429 (2015).
44. Efinger, V., Müller, W. E. & Friedland, K. Antidepressants: Pharmacology and Biochemistry. in *NeuroPsychopharmacotherapy* 1–26 (Springer International Publishing, 2021).
45. Cyr, M. & Brown, C. S. Nefazodone: Its place among antidepressants. *Annals. of Pharmacotherapy* **30**, 1006–1012 (1996).
46. Benkert, O., Muller, M. & Szegedi, A. An overview of the clinical efficacy of mirtazapine. *Hum Psychopharmacol.* **17**, 19–22 (2002).
47. Ago, Y. *et al.* (R)-Ketamine Induces a Greater Increase in Prefrontal 5-HT Release Than (S)-Ketamine and Ketamine Metabolites via an AMPA Receptor-Independent Mechanism. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **22**, 665–674 (2019).
48. Miller, A. L. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): Clinical effects on depression and other conditions. *Alternative Medicine Review* **3**, 18–26 (1998).
49. McFadden, S. L. & Hooker, B. L. Comparing Perika St. John's Wort and Sertraline for Treatment of Posttraumatic Stress Disorder in Mice. *J. Diet. Suppl.* **17**, 300–308 (2020).
50. Niederhofer, H. St. John's wort may improve some symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder. *Nat. Prod. Res.* **24**, 203–205 (2010).
51. Sevastre-Berghian, A. C. *et al.* Characterization and biological effects of hypericum extracts on experimentally-induced - Anxiety, oxidative stress and inflammation in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* **69**, 789–800 (2018).
52. Crockett, S. L. & Robson, N. K. B. Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. *Med Aromat. Plant. Sci. Biotechnol.* **5**, 1–13 (2011).
53. Butterweck V, Wall A, Liefländer-Wulf U, Winterhoff H, N. A. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* **2** (1997).
54. De Vry, J., Maurel, S., Schreiber, R., De Beun, R. & Jentsch, K. R. Comparison of hypericum extracts with imipramine and fluoxetine in animal models of depression and alcoholism. *European Neuropsychopharmacology* **9**, 461–468 (1999).

55. Butterweck, V., Wall, A., Liefländer-Wulf, U., Winterhoff, H., Nahrstedt, A. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* **30**, 117-124 (1997).
56. Kandilarov, I. K. *et al.* Antidepressant Effect and Recognition Memory Improvement of Two Novel Plant Extract Combinations - Antistress I and Anti-stress II on Rats Subjected to a Model of Mild Chronic Stress. *Folia Med. (Plovdiv)* **60**, 110–116 (2018).
57. Linde, K., Berner, M. M., Kriston, L. (2008). St John's Wort for Major Depression. *Cochrane Database Syst. Rev.* **4**, (2008).
58. Ng, Q. X., Venkatanarayanan, N. & Ho, C. Y. X. Clinical use of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in depression: A meta-analysis. *J. Affect. Disord.* **210**, 211–221 (2017).
59. Kasper, S., Anghelescu, I. G., Szegedi, A., Dienel, A. & Kieser, M. Superior efficacy of St John's wort extract WS®5570 compared to placebo in patients with major depression: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-center trial [ISRCTN77277298]. *BMC Med.* **4**, (2006).
60. Apaydin, E. A. *et al.* A systematic review of St. John's wort for major depressive disorder. *Syst. Rev.* **5**, (2016).
61. Park, L. T., Carlos, A. Z. Jr. Depression in the Primary Care Setting. *The New England journal of medicine* **380**, 559-568 (2019).
62. Müller, W. E. Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol. Res.* **47**, 101–109 (2003).
63. Paulke, A., Nöldner, M., Schubert-Zsilavec, M. & Wurglics, M. St. John's wort flavonoids and their metabolites show antidepressant activity and accumulate in brain after multiple oral doses. *Pharmazie* **63**, 296–302 (2008).
64. Park, S. H., Sim, Y. B., Han, P. L., Lee, J. K. & Suh, H. W. Antidepressant-like effect of chlorogenic acid isolated from *Artemisia capillaris* Thunb. *Anim. Cells Syst. (Seoul)* **14**, 253–259 (2010).
65. Tian, J. *et al.* Antidepressant-like activity of adhyperforin, a novel constituent of *Hypericum perforatum* L. *Sci. Rep.* **4**, 1–6 (2014).
66. Jiang, X. *et al.* Proanthocyanidin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice via neuroinflammatory pathway. *Brain Res. Bull.* **135**, 40–46 (2017).
67. Gambarana, C. *et al.* A study of the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* on animal models. *Pharmacopsychiatry* **34**, 42–44 (2001).
68. Chatterjee, S. S. Antidepressant activity of *hypericum perforatum* and hyperforin: The neglected possibility. *Pharmacopsychiatry* **31**, 7–15 (1998).
69. Butterweck, V. *et al.* Step by step removal of hyperforin and hypericin: Activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioral models. *Life Sci.* **73**, 627–639 (2003).
70. Zanolini, P., Rivasi, M., Baraldi, C. & Baraldi, M. Pharmacological activity of hyperforin acetate in rats. *Behavioural Pharmacology* **13**, 645–651 (2002).
71. Laakmann, G. St. John's Wort in mild to moderate depression: The relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* **31**, 54–59 (1998).
72. Wonnemann, M., Singer, A. & Müller, W. E. Inhibition of synaptosomal uptake of 3H-L-glutamate and 3H-GABA by hyperforin, a major constituent of St. John's Wort: The role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. *Neuropsychopharmacology* **23**, 188–197 (2000).

73. Singer, A., Wonnemann, M., Müller, W. E. Hyperforin, a Major Antidepressant Constituent of St. John's Wort, Inhibits Serotonin Uptake by Elevating Free Intracellular Na⁺. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **290**, 1363–1368 (1999).
74. Müller, W. E., Rolli, M., Schäfer, C., Hafner, U. Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* **2**, 102–107 (1997).
75. Schulte-Löbber, S., Holoubek, G., Müller, W. E., Schubert-Zsilavec, M. & Wurglics, M. Comparison of the synaptosomal uptake inhibition of serotonin by St John's wort products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **56**, 813–818 (2010).
76. Chatterjee, S. S., Bhattacharya, S. K., Wonnemann, M., Singer, A. & Müller, W. E. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sci.* **63**, 499–510 (1998).
77. Duric, V. & Duman, R. S. Depression and treatment response: Dynamic interplay of signaling pathways and altered neural processes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**, 39–53 (2013).
78. Müller, W. E., Singer, A. & Wonnemann, M. Hyperforin - Antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry* **34**, 98–102 (2001).
79. Lester, H. A., Mager, S., Quick, M. W., & Corey, J. L. Permeation Properties of Neurotransmitter Transporters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**, 219–249 (1994).
80. Treiber, K., Singer, A., Henke, B. & Müller, W. E. Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). *Br. J. Pharmacol.* **145**, 75–83 (2005).
81. Leuner, K. *et al.* Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *The FASEB Journal* **21**, 4101–4111 (2007).
82. Leuner, K. *et al.* Simple 2,4-diacetylphloroglucinols as classic transient receptor potential-6 activators - Identification of a novel pharmacophore. *Mol. Pharmacol.* **77**, 368–377 (2010).
83. Wolfender, J. L., Verotta, L., Belvisi, L., Fuzzati, N. & Hostettmann, K. Structural investigations isomeric oxidised forms of hyperforin by HPLC-NMR and HPLC-MSn. *Phytochemical Analysis* **14**, 290–297 (2003).
84. Moore, L. B. *et al.* St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7500–7502 (2000).
85. Dürr, D. *et al.* St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin. Pharmacol. Ther.* **68**, 598–604 (2000).
86. Nicolussi, S., Drewe, J., Butterweck, V., Meyer zu Schwabedissen, H. E. & Meyer, H. E. Clinical relevance of St. John's wort drug interactions revisited. *Br. Pharmacol. Soc.* **177**, 1212–1226 (2019).
87. Rothley, M. *et al.* Hyperforin and aristoforin inhibit lymphatic endothelial cell proliferation in vitro and suppress tumor-induced lymphangiogenesis in vivo. *Int. J. Cancer* **125**, 34–42 (2009).
88. Gartner, M., Müller, T., Simon, J. C., Giannis, A. & Sleeman, J. P. Aristoforin, a novel stable derivative of hyperforin, is a potent anticancer agent. *ChemBioChem* **6**, 171–177 (2005).
89. Kandel, B. A. *et al.* No activation of human pregnane x receptor by hyperforin-related phloroglucinols. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **348**, 393–400 (2014).
90. Leuner, K. *et al.* Hyperforin modulates dendritic spine morphology in hippocampal pyramidal neurons by activating Ca²⁺-permeable TRPC6 channels. *Hippocampus* **23**, 40–52 (2013).
91. Cosens, D. J. & Manning, A. Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. *Nature* **224**, 285–287 (1969).
92. Minke, B., Wu, C., Pak, W. L. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in Drosophila mutant. *Nature* **258**, 84–87 (1975).

93. Montell, C. & Rubin, G. M. Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313–1323 (1989).
94. Clapham, D. E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517–524 (2003).
95. Clapham, D. E., Julius, D., Montell, C. & Schultz, G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 427–450 (2005).
96. Montell, C. *et al.* A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell* **9**, 229–231 (2002).
97. Wes, P. D. *et al.* TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9652–9656 (1995).
98. Phillips, A. M., Bull, A. & Kelly, L. E. Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron* **8**, 631–642 (1992).
99. Clapham, D. E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517–524 (2003).
100. Venkatachalam K, M. C. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* **286**, 387–417 (2007).
101. Palmer, C. P. *et al.* A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7801–7805 (2001).
102. Owsianik, G., D'hoedt, D., Voets, T., & Nilius, B. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **156**, 61–90 (2006).
103. Kalia, J. & Swartz, K. J. Exploring structure-function relationships between TRP and Kv channels. *Sci. Rep.* **3**, 1523 (2013).
104. Huffer, K. E., Aleksandrova, A. A., Jara-Oseguera, A., Forrest, L. R. & Swartz, K. J. Global alignment and assessment of TRP channel transmembrane domain structures to explore functional mechanisms. *bioRxiv* 1–33 (2020).
105. Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C. & Peng, Z. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science* **13**, 1435–1448 (2004).
106. Lussier, M. P. *et al.* MxA, a member of the dynamin superfamily, interacts with the ankyrin-like repeat domain of TRPC. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 19393–19400 (2005).
107. Paulsen, C. E., Armache, J. P., Gao, Y., Cheng, Y. & Julius, D. Erratum: Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* **525**, 511–517 (2015).
108. Duan, J. *et al.* Cryo-EM structure of TRPC5 at 2.8-Å resolution reveals unique and conserved structural elements essential for channel function. *Sci. Adv.* **5**, 1–13 (2019).
109. Fan, C., Choi, W., Sun, W., Du, J. & Lu, W. Structure of the human lipid-gated cation channel TRPC3. *Elife* **7**, 1–14 (2018).
110. Xia, S., Wang, L., Fu, T. M., Wu, H. Mechanism of TRPM2 channel gating revealed by cryo-EM. *FEBS* **286**, 3333–3339 (2019).
111. Venkatachalam, K. & Montell, C. Preliminary Associations between Maternal Responsiveness, Expressions of Positive Affect in Daily Life, and Asthma-Related Immune Responses in Youth with Asthma. *Psychosom. Med.* **77**, 387–417 (2015).
112. Teng, J., Loukin, S. H., Anishkin, A. & Kung, C. A competing hydrophobic tug on L596 to the membrane core unlatches S4-S5 linker elbow from TRP helix and allows TRPV4 channel to open. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 11847–11852 (2016).

113. Tang, Q. *et al.* Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell Res.* **28**, 746–755 (2018).
114. Tsuruda P. R., Julius D. & Minor D. L. Jr. Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* **51**, 201–212 (2006).
115. Li, M., Yu, Y., & Yang, J. Structural Biology of TRP Channels. in *Transient Receptor Potential Channels: Advances in Experimental Medicine and Biology* 1-23 (Springer International Publishing, 2008).
116. Petri, E. T. *et al.* Structure of the EF-hand domain of polycystin-2 suggests a mechanism for Ca²⁺-dependent regulation of polycystin-2 channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9176–9181 (2010).
117. Hellmich, U. A. & Gaudet, R. Structural biology of TRP channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* **223**, 963–990 (2014).
118. Jiao, R., Cui, D., Wang, S. C., Li, D. & Wang, Y. F. Interactions of the mechanosensitive channels with extracellular matrix, integrins, and cytoskeletal network in osmosensation. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 1–8 (2017).
119. Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816–824 (1997).
120. Satheesh, N. J. *et al.* TRPV currents and their role in the nociception and neuroplasticity. *Neuropeptides* **57**, 1–8 (2016).
121. Lambers, T. T., Weidema, A. F., Nilius, B., Hoenderop, J. G. J. & Bindels, R. J. M. Regulation of the mouse epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 by the Ca²⁺-sensor calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 28855–28861 (2004).
122. McKemy, D. D., Neuhausser, W. M. & Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**, 52–58 (2002).
123. Asuthkar, S. *et al.* The TRPM8 protein is a testosterone receptor: I. Biochemical evidence for direct TRPM8-testosterone interactions. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 2659–2669 (2015).
124. Kraft, R. & Harteneck, C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: An overview. *Pflugers. Arch.* **451**, 204–211 (2005).
125. Vandewauw, I. *et al.* A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature* **555**, 662–666 (2018).
126. Jordt, S. E. *et al.* Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260–265 (2004).
127. Hofherr, A. & Köttgen, M. Chapter 16 TRPP Channels and Polycystins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **704**, 287–313 (2011).
128. Dong, X. P. *et al.* PI(3,5)P₂ controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca²⁺ release channels in the endolysosome. *Nat. Commun.* **1**, 1–11 (2010).
129. Slaugenhaupt, S. The Molecular Basis of Mucopolipidosis Type IV. *Curr. Mol. Med.* **2**, 445–450 (2005).
130. Vannier, B. *et al.* Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca²⁺ entry channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 2060–2064 (1999).
131. Dietrich, A., Mederos Y Schnitzler, M., Kalwa, H., Storch, U. & Gudermann, T. Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **371**, 257–265 (2005).
132. Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* **29**, 645–655 (2001).

133. Du, J. *et al.* TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel. *FASEB Journal* **28**, 4677–4685 (2014).
134. Lepannetier, S. *et al.* Activation of TRPC1 Channel by Metabotropic Glutamate Receptor mGluR5 Modulates Synaptic Plasticity and Spatial Working Memory. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 1–19 (2018).
135. Fowler, M. A., Sidiropoulou, K., Ozkan, E. D., Phillips, C. W. & Cooper, D. C. Corticolimbic expression of TRPC4 and TRPC5 channels in the rodent brain. *PLoS One* **2**, (2007).
136. Riccio, A. *et al.* mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Molecular Brain Research* **109**, 95–104 (2002).
137. Chung, Y. H. *et al.* Immunohistochemical study on the distribution of TRPC channels in the rat hippocampus. *Brain Res.* **1085**, 132–137 (2006).
138. Giampà, C., DeMarch, Z., Patassini, S., Bernardi, G. & Fusco, F. R. Immunohistochemical localization of TRPC6 in the rat substantia nigra. *Neurosci. Lett.* **424**, 170–174 (2007).
139. Amaral, M. D. & Pozzo-Miller, L. TRPC3 channels are necessary for brain-derived neurotrophic factor to activate a nonselective cationic current and to induce dendritic spine formation. *Journal of Neuroscience* **27**, 5179–5189 (2007).
140. Storch, U. *et al.* Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E37–E46 (2017).
141. Zhang, Z. *et al.* Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3168–3173 (2001).
142. Liu, C. *et al.* Depletion of intracellular Ca²⁺ stores enhances flow-induced vascular dilatation in rat small mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* **147**, 506–515 (2006).
143. Parekh, A. B., Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiological Reviews* **77**, 901-930 (1997).
144. Yeromin, A. V. *et al.* Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* **443**, 226–229 (2006).
145. Zitt, C. *et al.* Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* **16**, 1189–1196 (1996).
146. Zhu, X. *et al.* trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* **85**, 661–671 (1996).
147. Subedi, K. P., Ong, H. L. & Ambudkar, I. S. Assembly of ER-PM junctions: A critical determinant in the regulation of SOCE and TRPC1. *Adv. Exp. Med. Biol.* **981**, 253–276 (2017).
148. Liu, X., Groschner, K. & Ambudkar, I. S. Distinct Ca²⁺-permeable cation currents are activated by internal Ca²⁺-store depletion in RBL-2H3 cells and human salivary gland cells, HSG and HSY. *Journal of Membrane Biology* **200**, 93–104 (2004).
149. Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Singh, B. B., Groschner, K. & Ambudkar, I. S. Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel: Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 21600–21606 (2005).
150. Brueggemann, L. I., Markun, D. R., Henderson, K. K., Cribbs, L. L., Byron, K. L. Pharmacological and electrophysiological characterization of store-operated currents and capacitative Ca²⁺ entry in vascular smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2**, 488–499 (2006).
151. Harteneck, C., Plant, T. D. & Schultz, G. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* **23**, 159–166 (2000).

152. Smy, V., Seeby, H., Winslow, E. & Patrick, J. Novel Training Techniques for Novice Timetablers. *Communications in Computer and Information Science* **434**, 258–263 (2014).
153. Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G. & Gudermann, T. Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2. *Biochemical Journal* **351**, 115–122 (2000).
154. Azumaya, C. M., Sierra-Valdez, F., Cordero-Morales, J. F. & Nakagawa, T. Cryo-EM structure of the cytoplasmic domain of murine transient receptor potential cation channel subfamily C member 6 (TRPC6). *Journal of Biological Chemistry* **293**, 10381–10391 (2018).
155. Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G. & Gudermann, T. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7461–7466 (2002).
156. Dietrich, A. & Gudermann, T. TRPC6: Physiological function and pathophysiological relevance. *Handb. Exp. Pharmacol.* **222**, 157–188 (2014).
157. Chen, X., Sooch, G., Demaree, I. S., White, F. A. & Obukhov, A. G. Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells* **9**, (2020).
158. Wang, H. *et al.* TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. *Pharmacol. Ther.* **209**, 107497 (2020).
159. Winn, M. P. *et al.* Medicine: A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science (1979)* **308**, 1801–1804 (2005).
160. Gigante, M. *et al.* TRPC6 Mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome and atypical phenotype. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **6**, 1626–1634 (2011).
161. Heeringa, S. F., *et al.* A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. *PLoS One* **11**, (2009).
162. Riehle, M. *et al.* TRPC6 G757D loss-of-function mutation associates with FSGS. *Journal of the American Society of Nephrology* **27**, 2771–2783 (2016).
163. Bouron, A., Chauvet, S., Dryer, S. & Rosado, J. A. Second messenger-operated calcium entry through trpc6. *Adv. Exp. Med. Biol.* **898**, 201–249 (2016).
164. Hall, G., Wang, L. & Spurney, R. F. TRPC Channels in Proteinuric Kidney Diseases. *Cells* **9**, 1–24 (2019).
165. Fogo, A. B. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 76–87 (2015).
166. Wang, L., Chang, J. H., Buckley, A. F. & Spurney, R. F. Knockout of TRPC6 promotes insulin resistance and exacerbates glomerular injury in Akita mice. *Kidney Int.* **95**, 321–332 (2019).
167. Makarewich, C. A. *et al.* Transient Receptor Potential Channels Contribute to Pathological Structural and Functional Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **115**, 567–580 (2014).
168. Goonasekera, S. A. & Molkenkin, J. D. Unraveling the secrets of a double life: Contractile versus signaling Ca²⁺ in a cardiac myocyte. *J. Mol. Cell Cardiol.* **52**, 317–322 (2012).
169. Lin, B. L. *et al.* In vivo selective inhibition of TRPC6 by antagonist BI 749327 ameliorates fibrosis and dysfunction in cardiac and renal disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 10156–10161 (2019).
170. Weissmann, N. *et al.* Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19093–19098 (2006).
171. Yu, Y. *et al.* Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13861–13866 (2004).

172. Hasna, J., Nahed, R. A., Sergent, F., Alfaidy, N. & Bouron, A. The deletion of TRPC6 channels perturbs iron and zinc homeostasis and pregnancy outcome in mice. *Cellular Physiology and Biochemistry* **52**, 455–467 (2019).
173. Xu, L., Anwylt, R. & Rowan, M. J. Depression in the Hippocampus. *Nature* **387**, 497–500 (1996).
174. Pittenger, C. & Duman, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**, 88–109 (2008).
175. Chan, S. W. Y. *et al.* Hippocampal volume in vulnerability and resilience to depression. *J. Affect. Disord.* **189**, 199–202 (2016).
176. Nagy, G. A., Botond, G., Borhegyi, Z., Plummer, N. W., Freund, T. F., Hájos, N. DAG-sensitive and Ca²⁺-permeable TRPC6 channels are expressed in dentate granule cells and interneurons in the hippocampal formation. *Hippocampus* **23**, 221–232 (2013).
177. Treadway, M. T. *et al.* Illness progression, recent stress, and morphometry of hippocampal subfields and medial prefrontal cortex in major depression. *Biol. Psychiatry* **77**, 285–294 (2015).
178. Leuner, K. *et al.* Hyperforin modulates dendritic spine morphology in hippocampal pyramidal neurons by activating Ca²⁺-permeable TRPC6 channels. *Hippocampus* **23**, 40–52 (2013).
179. Li, Y. *et al.* Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* **434**, 894–898 (2005).
180. Zhou, J. *et al.* Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* **11**, 741–743 (2008).
181. Heiser, J. H. *et al.* TRPC6 channel-mediated neurite outgrowth in PC12 cells and hippocampal neurons involves activation of RAS/MEK/ERK, PI3K, and CAMKIV signaling. *J. Neurochem.* **127**, 303–313 (2013).
182. Zeng, C., Tian, F. & Xiao, B. TRPC Channels: Prominent Candidates of Underlying Mechanism in Neuropsychiatric Diseases. *Mol. Neurobiol.* **53**, 631–647 (2016).
183. Jia, Y., Zhou, J., Tai, Y. & Wang, Y. TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat. Neurosci.* **10**, 559–567 (2007).
184. Tai, Y. *et al.* TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. *J. Cell Sci.* **121**, 2301–2307 (2008).
185. Beck, B. *et al.* TRPC7 is a receptor-operated DAG-activated channel in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **126**, 1982–1993 (2006).
186. Zhang, X. & Trebak, M. Transient receptor potential canonical 7: A diacylglycerol-activated non-selective cation channel. *Handb. Exp. Pharmacol.* **222**, 189–204 (2014).
187. Schaefer, M. *et al.* Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 17517–17526 (2000).
188. Lee, Y. M. *et al.* TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach. *Am J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* **284**, 604–616 (2003).
189. Lemonnier, L., Trebak, M. & Putney, J. W. Complex regulation of the TRPC3, 6 and 7 channel subfamily by diacylglycerol and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Cell Calcium* **43**, 506–514 (2008).
190. Vazquez, G., Tano, J. Y. & Smedlund, K. On the potential role of source and species of diacylglycerol in phospholipase-dependent regulation of TRPC3 channels. *Channels* **4**, (2010).
191. Frank, J. A. *et al.* Photoswitchable diacylglycerols enable optical control of protein kinase C. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 755–762 (2016).

192. Lichtenegger, M. *et al.* An optically controlled probe identifies lipid-gating fenestrations within the TRPC3 channel article. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 396–404 (2018).
193. Leinders-Zufall, T. *et al.* PhoDAGs Enable Optical Control of Diacylglycerol-Sensitive Transient Receptor Potential Channels. *Cell. Chem. Biol.* **25**, 215–223.e3 (2018).
194. Inoue, R. *et al.* Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipase C/Diacylglycerol and phospholipase A2/ ω -hydroxylase/ 20-HETE pathways. *Circ. Res.* **104**, 1399–1409 (2009).
195. Roshanravan, H., Kim, E. Y. & Dryer, S. E. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) modulates canonical transient receptor potential-6 (TRPC6) channels in podocytes. *Front. Physiol.* **7**, 1–12 (2016).
196. Inoue, R. *et al.* The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular α_1 -adrenoceptor-activated Ca^{2+} -permeable cation channel. *Circ. Res.* **88**, 325–332 (2001).
197. Foster, R. R. *et al.* Flufenamic acid is a tool for investigating TRPC6-mediated calcium signalling in human conditionally immortalised podocytes and HEK293 cells. *Cell Calcium* **45**, 384–390 (2009).
198. Klose, C. *et al.* Fenamates as TRP channel blockers: Mefenamic acid selectively blocks TRPM3. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 1757–1769 (2011).
199. Hu, H. *et al.* Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pflugers Arch.* **459**, 579–592 (2010).
200. Yang, G. *et al.* Activation of TRPC6 channels contributes to (+)-conocarpan-induced apoptotic cell death in HK-2 cells. *Food and Chemical Toxicology* **129**, 281–290 (2019).
201. Treiber, K., Singer, A., Henke, B. & Müller, W. E. Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). *Br. J. Pharmacol.* **145**, 75–83 (2005).
202. Galeotti, N. Hypericum perforatum (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions. *J. Ethnopharmacol* **200**, 136–146 (2017).
203. Cerpa, W. The Hyperforin Derivative IDN5706 Occludes Spatial Memory Impairments and Neuropathological Changes in a Double Transgenic Alzheimers Mouse Model. *Curr. Alzheimer Res.* **999**, 1–9 (2010).
204. Abbott, A. C., Calderon Toledo, C., Aranguiz, F. C., Inestrosa, N. C. & Varela-Nallar, L. Tetrahydrohyperforin increases adult hippocampal neurogenesis in wild-type and APP^{swe}/PS1 ΔE9 Mice. *Journal of Alzheimer's Disease* **34**, 873–885 (2013).
205. Montecinos-Oliva, C., Schuller, A., Parodi, J., Melo, F. & Inestrosa, N. C. Effects of tetrahydrohyperforin in mouse hippocampal slices: neuroprotection, long-term potentiation and TRPC channels. *Curr. Med. Chem.* **21**, 3494–3506 (2014).
206. Montecinos-Oliva, C., Schüller, A. & Inestrosa, N. C. Tetrahydrohyperforin: a neuroprotective modified natural compound against Alzheimer's disease. *Neural. Regen. Res.* **10**, 552–554 (2015).
207. Sawamura, S. *et al.* Screening of Transient Receptor Potential Canonical Channel Activators Identifies Novel Neurotrophic Piperazine Compoundss. *Mol. Pharmacol.* **89**, 348–363 (2016).
208. Qu, C. *et al.* Pyrazolopyrimidines as Potent Stimulators for Transient Receptor Potential Canonical 3/6/7 Channels. *J. Med. Chem.* **60**, 4680–4692 (2017).
209. Xu, X. *et al.* Characterization of Small Molecule TRPC3 and TRPC6 agonist and Antagonists. *Biophys. J.* **104**, 454a (2013).
210. Bai, Y. *et al.* Structural basis for pharmacological modulation of the TRPC6 channel. *Elife* **9**, 1–18 (2020).
211. Hochstrate, P. Lanthanum mimicks the trp photoreceptor mutant of Drosophila in the blowfly Calliphora. *Journal of Comparative Physiology A* **166**, 179–187 (1989).

212. Boulay, G. *et al.* Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila Transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the G(q) class of g protein. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 29672–29680 (1997).
213. Harteneck, C., Klose, C. & Krautwurst, D. Synthetic modulators of TRP channel activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **704**, 87–106 (2011).
214. Miede, S. *et al.* Inhibition of diacylglycerol-sensitive TRPC channels by synthetic and natural steroids. *PLoS One* **7**, (2012).
215. Washburn, D. G. *et al.* The discovery of potent blockers of the canonical transient receptor channels, TRPC3 and TRPC6, based on an anilino-thiazole pharmacophore. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 4979–4984 (2013).
216. Seo, K. *et al.* Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1551–1556 (2014).
217. Maier, T. *et al.* Discovery and pharmacological characterization of a novel potent inhibitor of diacylglycerol-sensitive TRPC cation channels. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 3650–3660 (2015).
218. Urban, N. *et al.* Identification and validation of larixyl acetate as a potent TRPC6 Inhibitor. *Mol. Pharmacol.* **89**, 197–213 (2016).
219. Scheuble, J., Rössler, O. G., Ulrich, M. & Thiel, G. Pharmacological and genetic inhibition of TRPC6-induced gene transcription. *Eur. J. Pharmacol.* **886**, (2020).
220. Zhou, B. *et al.* Ribemansides A and B, TRPC6 Inhibitors from *Ribes manshuricum* That Suppress TGF- β 1-Induced Fibrogenesis in HK-2 Cells. *J. Nat. Prod.* **81**, 913–917 (2018).
221. Belmaker, R. H. & Agam, G. 2008-Major Depressive Disorder-belmaker. *New England Journal of Medicine* **358**, 55–68 (2008).
222. Sakurai, M. *et al.* Serum Metabolic Profiles of the Tryptophan-Kynurenine Pathway in the high risk subjects of major depressive disorder. *Sci. Rep.* **10**, 1–13 (2020).
223. Strawbridge, R., Young, A. H. & Cleare, A. J. Biomarkers for depression: Recent insights, current challenges and future prospects. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **13**, 1245–1262 (2017).
224. Willner, P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* **83**, 1–16 (1984).
225. Dedic, N., Walser, S. M., & Deussing, J. M. Mouse Models of Depression. in *Psychiatric Disorders - Trends and Developments* 185-222 (InTech, 2011).
226. Planchez, B., Surget, A. & Belzung, C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *J. Neural. Transm.* **126**, 1383–1408 (2019).
227. Chourbaji, S. *et al.* Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice. *Brain Res. Protoc.* **16**, 70–78 (2005).
228. Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A. & Doron, R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *Journal of Visualized Experiments* **2015**, (2015).
229. Cryan, J. F., Mombereau, C. & Vassout, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **29**, 571–562 (2005).
230. Mitchell, P. J. & Redfern, P. H. Animal models of depressive illness: the importance of chronic drug treatment. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 171–203 (2005).
231. Carnevali, L., Montano, N., Tobaldini, E., Thayer, J. F. & Sgoifo, A. The contagion of social defeat stress: Insights from rodent studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **111**, 12–18 (2020).

232. Heshmati, M. *et al.* Depression and social defeat stress are associated with inhibitory synaptic changes in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience* **40**, 6228–6233 (2020).
233. Castagné, V., Moser, P., Roux, S. & Porsolt, R. D. Rodent models of depression: Forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* **55**, 1–14 (2011).
234. Mezdari, T. J., Batista, G. M., Portes, A. C., Marino-Neto, J. & Lino-de-Oliveira, C. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. *J. Neurosci. Methods* **195**, 200–205 (2011).
235. Petit-Demouliere, B., Chenu, F. & Bourin, M. Forced swimming test in mice: A review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* **177**, 245–255 (2005).
236. Cryan, J. F., Mombereau, C. & Vassout, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **29**, 571–625 (2005).
237. Walf, A. A. & Frye, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* **2**, 322–328 (2007).
238. Liu, M. Y. *et al.* Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat. Protoc.* **13**, 1686–1698 (2018).
239. Dulawa, S. C. & Hen, R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: The novelty-induced hypophagia test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **29**, 771–783 (2005).
240. Ledermann, B. Gene Manipulation and Integrative Physiology Embryonic stem cells and gene targeting. *Exp. Physiol.* **85**, 603–613 (2000).
241. Dietrich, A. *et al.* Increased Vascular Smooth Muscle Contractility in TRPC6 – / – Mice. *Mol. Cell Biol.* **25**, 6980–6989 (2005).
242. Greene, L. A. & Tischler, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 2424–2428 (1976).
243. Jeon, C. Y. *et al.* Neurites from PC12 cells are connected to each other by synapse-like structures. *Synapse* **64**, 765–772 (2010).
244. Ferreira, R. S., dos Santos, N. A. G., Martins, N. M., Fernandes, L. S. & dos Santos, A. C. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Protects PC12 Cells from Cisplatin-Induced Neurotoxicity by Activating the NGF-Signaling Pathway. *Neurotox. Res.* **34**, 32–46 (2018).
245. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology* **36**, 59–72 (1977).
246. Yamaguchi, K. *et al.* Engineered long terminal repeats of retroviral vectors enhance transgene expression in hepatocytes in vitro and in vivo. *Molecular Therapy* **8**, 796–803 (2003).
247. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. & Graham, F. L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB journal* **16**, 869–871 (2002).
248. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **13**, 5463–5467 (1977).
249. Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 3116–3120 (1979).
250. Neher, E. & Sakmann, B. Single-channel currents recorded from membrane. *Nature* **260**, 799–802 (1976).

251. Golowasch, J. & Nadim, F. Capacitance, Membrane. in *Encyclopedia of Computational Neuroscience* 1–5 (Springer International Publishing, 2020)
252. Yobas, L. Microsystems for cell-based electrophysiology. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **23**, 1907–1914 (2013).
253. Jene, T. *et al.* Temporal profiling of an acute stress-induced behavioral phenotype in mice and role of hippocampal DRR1. *Psychoneuroendocrinology* **91**, 149–158 (2018).
254. Zenclussen, M. L., Casalis, P. A., Jensen, F., Woidacki, K. & Zenclussen, A. C. Hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate heme oxygenase-1 expression in the uterus. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **5**, 1–6 (2014).
255. Hughes, R. N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **28**, 497–505 (2004).
256. Lewis, S. A., Negelspach, D. C., Kaladchibachi, S., Cowen, S. L. & Fernandez, F. Spontaneous alternation: A potential gateway to spatial working memory in *Drosophila*. *Neurobiol. Learn. Mem.* **142**, 230–235 (2017).
257. Dix, S. L. & Aggleton, J. P. Extending the spontaneous preference test of recognition: Evidence of object-location and object-context recognition. *Behavioural Brain Research* **99**, 191–200 (1999).
258. Lian, B., Gao, J., Sui, N., Feng, T. & Li, M. Object, spatial and social recognition testing in a single test paradigm. *Neurobiol. Learn. Mem.* **152**, 39–49 (2018).
259. Belzung, C. Open-Field Test. in *Encyclopedia of Psychopharmacology* 923–926 (Springer International Publishing, 2010).
260. Li, J., He, P., Zhang, J. & Li, N. Orcinol glucoside improves the depressive-like behaviors of perimenopausal depression mice through modulating activity of hypothalamic–pituitary–adrenal/ovary axis and activating BDNF- TrkB-CREB signaling pathway. *Phytotherapy Research* **35**, 5795–5807 (2021).
261. Leger, M. *et al.* Object recognition test in mice. *Nat. Protoc.* **8**, 2531–2537 (2013).
262. Lueptow, L. M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *Journal of Visualized Experiments* **2017**, 1–9 (2017).
263. Crawley, J. N. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **10**, 248–258 (2004).
264. Bourin, M. & Hascoët, M. The mouse light/dark box test. *Eur. J. Pharmacol.* **463**, 55–65 (2003).
265. Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G. & Schaefer, M. Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J. Cell Sci.* **118**, 917–928 (2005).
266. Leuner, K. *et al.* Hyperforin—a key constituent of St. John’s wort specifically activates TRPC6 channels. *The FASEB Journal* **21**, 4101–4111 (2007).
267. Kubyshkin, V. & Budisa, N. The alanine world model for the development of the amino acid repertoire in protein biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
268. Kwon, Y., Hofmann, T. & Montell, C. Integration of Phosphoinositide- and Calmodulin-Mediated Regulation of TRPC6. *Mol. Cell* **25**, 491–503 (2007).
269. Bacsa, B., Tiapko, O., Stockner, T. & Groschner, K. Mechanisms and significance of Ca²⁺ entry through TRPC channels. *Curr. Opin. Physiol.* **17**, 25–33 (2020).
270. Liu, X., Yao, X. & Tsang, S. Y. Post-Translational Modification and Natural Mutation of TRPC Channels. *Cells* **9**, 135 (2020).

271. Trebak, M. *et al.* Negative regulation of TRPC3 channels by protein kinase C-mediated phosphorylation of serine 712. *Mol. Pharmacol.* **2**, 558–563 (2005).
272. Obukhov, A. G. & Nowycky, M. C. TRPC5 activation kinetics are modulated by the scaffolding protein ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein-50 (EBP50). *J. Cell Physiol.* **201**, 227–235 (2004).
273. Tang, Y. *et al.* Association of mammalian Trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 37559–37564 (2000).
274. Venkatachalam, K., Zheng, F. & Gill, D. L. Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 29031–29040 (2003).
275. Curcic, S., Tiapko, O. & Groschner, K. Photopharmacology and opto-chemogenetics of TRPC channels—some therapeutic visions. *Pharmacol. Ther.* **200**, 13–26 (2019).
276. Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 39014–39019 (2003).
277. van Rossum, D. B. *et al.* TRP2, a lipid/trafficking domain that mediates diacylglycerol-induced vesicle fusion. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 34384–34392 (2008).
278. Cayouette, S., Lussier, M. P., Mathieu, E. L., Bousquet, S. M. & Boulay, G. Exocytotic Insertion of TRPC6 Channel into the Plasma Membrane upon G q Protein-coupled Receptor Activation. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 7241–7246 (2004).
279. Xie, J., An, S. W., Jin, X., Gui, Y. & Huang, C. L. Munc13 mediates klotho-inhibitable diacylglycerol-stimulated exocytotic insertion of pre-docked TRPC6 vesicles. *PLoS One* **15**, 1–11 (2020).
280. Yang, P. L. *et al.* GSK1702934A and M085 directly activate TRPC6 via a mechanism of stimulating the extracellular cavity formed by the pore helix and transmembrane helix S6. *Journal of Biological Chemistry* **297**, 101125 (2021).
281. Singh, A. K., Saotome, K., McGoldrick, L. L. & Sobolevsky, A. I. Structural bases of TRP channel TRPV6 allosteric modulation by 2-APB. *Nat. Commun.* **9**, 1–11 (2018).
282. Guo, W. *et al.* Structural mechanism of human TRPC3 and TRPC6 channel regulation by their intracellular calcium-binding sites. *Neuron* **110**, 1023–1035 (2022).
283. el Hamdaoui, Y. *et al.* Analysis of hyperforin (St. John’s wort) action at TRPC6 channel leads to the development of a new class of antidepressant drugs. *Molecular Psychiatry* **49**, (2022).
284. Chaudhuri, P. *et al.* Membrane translocation of TRPC6 channels and endothelial migration are regulated by calmodulin and PI3 kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 2110–2115 (2016).
285. Riehle, M. *et al.* TRPC6 G757D loss-of-function mutation associates with FSGS. *Journal of the American Society of Nephrology* **27**, 2771–2783 (2016).
286. Chiu, C. C., Singh, S. & De Pablo, J. J. Effect of proline mutations on the monomer conformations of amylin. *Biophys. J.* **105**, 1227–1235 (2013).
287. Heiser, J. H. *et al.* TRPC6 channel-mediated neurite outgrowth in PC12 cells and hippocampal neurons involves activation of RAS/MEK/ERK, PI3K, and CAMKIV signaling. *J. Neurochem.* **127**, 303–313 (2013).
288. Friedland, K. & Harteneck, C. Hyperforin: To be or not to be an activator of TRPC(6). *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **169**, 1–24 (2015).
289. Watkins, R. E. *et al.* 2.1 Å crystal structure of human PXR in complex with the St. John’s wort compound hyperforin. *Biochemistry* **42**, 1430–1438 (2003).

290. Langer, E., Einat, H. & Stukalin, Y. Similarities and dissimilarities in the effects of benzodiazepines and specific serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in the defensive marble burying test: A systematic review and meta-analysis. *European Neuropsychopharmacology* **36**, 38–49 (2020).
291. Blizard, D. A., Takahashi, A., Galsworthy, M. J., Martin, B. & Koide, T. Test standardization in behavioural neuroscience: A response to Stanford. *Journal of Psychopharmacology* **21**, 136–139 (2007).
292. LeGates, T. A. *et al.* Reward behaviour is regulated by the strength of hippocampus–nucleus accumbens synapses. *Nature* **564**, 258–262 (2018).
293. Tartt, A. N., Mariani, M. B., Hen, R., Mann, J. J. & Boldrini, M. Dysregulation of adult hippocampal neuroplasticity in major depression: pathogenesis and therapeutic implications. *Mol. Psychiatry* **27**, 2689–2699 (2022).
294. Griesi-Oliveira, K. *et al.* Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Mol. Psychiatry* **20**, 1350–1365 (2015).
295. Chevallet, M. *et al.* Functional consequences of the over-expression of TRPC6 channels in HEK cells: Impact on the homeostasis of zinc. *Metallomics* **6**, 1269–1276 (2014).
296. Szewczyk, B. *et al.* Antidepressant-like activity of hyperforin and changes in BDNF and zinc levels in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. *Behavioural Brain Research* **372**, 1120–1145 (2019).
297. Zhou, W. *et al.* Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptor-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. *European Psychiatry* **29**, 419–423 (2014).
298. Ren, Z. *et al.* Low-dose S-ketamine exerts antidepressant-like effects via enhanced hippocampal synaptic plasticity in postpartum depression rats. *Neurobiol. Stress* **16**, 100422 (2022).
299. Workman, E. R., Niere, F. & Raab-Graham, K. F. Engaging homeostatic plasticity to treat depression. *Mol. Psychiatry* **23**, 26–35 (2018).
300. Yang, Y. *et al.* Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression. *Nature* **554**, 317–322 (2018).
301. Pochwat, B. *et al.* Hyperforin potentiates antidepressant-like activity of lanicemine in mice. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, (2018).
302. Zhou, J. *et al.* Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* **11**, 741–743 (2008).
303. Conradi, H. J., Ormel, J. & de Jonge, P. Presence of individual (residual) symptoms during depressive episodes and periods of remission: A 3-year prospective study. *Psychol. Med.* **41**, 1165–1174 (2011).
304. Xie, R. *et al.* AAV Delivery of shRNA Against TRPC6 in Mouse Hippocampus Impairs Cognitive Function. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 1–15 (2021).
305. Qiu, Q., Wu, Y., Ma, L., Ramalingam, V. & Yu, C. R. Acquisition of innate odor preference depends on spontaneous and experiential activities during critical period. *Elife* **10**, (2021).
306. Athanassi, A., Dorado Doncel, R., Bath, K. G. & Mandairon, N. Relationship between depression and olfactory sensory function: A review. *Chem. Senses* **46**, 1–12 (2021).
307. Yang, M. & Crawley, J. N. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr. Protoc. Neurosci.* **8**, (2009).
308. Taalman, H., Wallace, C. & Milev, R. Olfactory functioning and depression: A systematic review. *Front Psychiatry* **8**, 1–11 (2017).
309. Croy, I. & Hummel, T. Olfaction as a marker for depression. *J. Neurol.* **264**, 631–638 (2017).

310. Darcet, F. *et al.* Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Front. Behav. Neurosci.* **8**, 1–13 (2014).
311. Zhou, J. *et al.* Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* **11**, 741–743 (2008).
312. Pittenger, C. DialoguesClinNeurosci-15-455. *Dialogues Clin. Neurosci.* **15**, 455–463 (2013).
313. Liu, W. *et al.* The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural. Plast.* **2017**, (2017).
314. Duman, R. S. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *European psychiatry* **17**, 306–310 (2002).
315. Ly, M. *et al.* Late-life depression and increased risk of dementia: a longitudinal cohort study. *Transl. Psychiatry* **11**, (2021).
316. Hesper, K. *et al.* Age of major depression onset, depressive symptoms, and risk for subsequent dementia: results of the German study on Ageing, Cognition, and Dementia in Primary Care Patients (AgeCoDe). *Psychol. Med.* **43**, 1597–1610 (2013).
317. Byers, A. L. & Yaffe, K. Depression and risk of developing dementia. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 323–331 (2011).
318. Kim, H. *et al.* Association between depression and the risk of Alzheimer’s disease using the Korean National Health Insurance Service-Elderly Cohort. *Sci. Rep.* **11**, 1–8 (2021).
319. Gracia-García, P. *et al.* Depression and incident alzheimer disease: The impact of disease severity. *American Journal of Geriatric Psychiatry* **23**, 119–129 (2015).
320. Livingston, G. *et al.* Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet* **390**, 2673–2734 (2017).
321. Lee, Y. S. & Silva, A. J. The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 126–140 (2009).
322. Saura, C. A. & Valero, J. The role of CREB signaling in Alzheimer’s disease and other cognitive disorders. *Rev. Neurosci.* **22**, 153–169 (2011).
323. Weinstein, G. *et al.* Serum brain-derived neurotrophic factor and the risk for dementia: The framingham heart study. *JAMA Neurol.* **71**, 55–61 (2014).
324. Wang, Z. H. *et al.* Deficiency in BDNF/TrkB Neurotrophic Activity Stimulates δ -Secretase by Upregulating C/EBP β in Alzheimer’s Disease. *Cell Rep* **28**, 655–669 (2019).
325. Guo, C. C., Jiao, C. hong & Gao, Z. M. Silencing of LncRNA BDNF-AS attenuates A β 25-35-induced neurotoxicity in PC12 cells by suppressing cell apoptosis and oxidative stress. *Neurol. Res.* **40**, 795–804 (2018).
326. Lu, R. *et al.* Reduced TRPC6 mRNA levels in the blood cells of patients with Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment. *Mol. Psychiatry* **23**, 767–776 (2018).
327. Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M. & Zhong, K. Alzheimer’s disease drug development pipeline: 2020. *Alzheimer’s and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* **6**, 1–29 (2020).
328. Tao, R. *et al.* Probing the therapeutic potential of TRPC6 for Alzheimer’s disease in live neurons from patient-specific iPSCs. *J. Mol. Cell Biol.* **12**, 807–816 (2020).
329. Papp, M. *et al.* Insufficiency of ventral hippocampus to medial prefrontal cortex transmission explains antidepressant non-response. *Journal of Psychopharmacology* **35**, 1253–1264 (2021).

330. Salk, R. H., Hyde, J. S. & Abramson, L. Y. Gender differences in depression in representative national samples: Meta-analyses of diagnoses and symptoms. *Psychol. Bull.* **143**, 783–822 (2017).
331. Young, L. J. & Pfaff, D. W. Sex differences in neurological and psychiatric disorders. *Front. Neuroendocrinol.* **35**, 253–254 (2014).
332. Kuehner, C. Why is depression more common among women than among men? *Lancet Psychiatry* **4**, 146–158 (2017).
333. Hampson, E. Estrogens, Aging, and Working Memory. *Curr. Psychiatry Rep.* **20**, 109 (2018).
334. Lu, Y. *et al.* Neuron-derived estrogen regulates synaptic plasticity and memory. *Journal of Neuroscience* **39**, 2792–2809 (2019).
335. Schmidt, P. J. *et al.* Premenstrual dysphoric disorder symptoms following ovarian suppression: Triggered by change in ovarian steroid levels but not continuous stable levels. *American Journal of Psychiatry* **174**, 980–989 (2017).
336. Hu, Z., Du, X., Yang, Y., Botchway, B. O. A. & Fang, M. Progesterone and fluoxetine treatments of postpartum depressive-like behavior in rat model. *Cell Biol Int.* **43**, 539–552 (2019).
337. Skovlund, C. W., Mørch, L. S., Kessing, L. V. & Lidegaard, O. Association of hormonal contraception with depression. *JAMA Psychiatry* **73**, 1154–1162 (2016).
338. Skovlund, C. W., Mørch, L. S., Kessing, L. V., Lange, T. & Lidegaard, J. Association of hormonal contraception with suicide attempts and suicides. *American Journal of Psychiatry* **175**, 336–342 (2018).
339. Thibaut, F. The role of sex and gender in neuropsychiatric disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* **18**, 351–352 (2016).
340. Wu, T. W., Wang, J. M., Chen, S. & Brinton, R. D. 17β -estradiol induced Ca^{2+} influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: A potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprot. *Neuroscience* **135**, 59–72 (2005).

9. ANHANG

Human	TRPC3	1	-----MREKGRQAVRGPAMFND	19
Human	TRPC6	1	MSQSPAFGPRRGS SPRGAAGAAARRNESQDYLLMDS ELGDEGCPQAPLPCYGYYPFCFRGSDNRLAHRQTVLREKGRRLANRGPAYMFS	90
Human	TRPC7	1	-----MLRNSTFKNMQRHHTLREKGRROAIRGPAYMFNE	35
Mouse	TRPC6	1	MSQSPRFVTRRGGSLKAAPGAGTRRNESQDYLLMD- ELGDDGYQLPLPPYGYYPFRGNENRLTHRRQTLREKGRRLANRGPAYMFD	89
Rat	TRPC6	1	MSQSPGFVTRRGGSPKAAPGAGARRNESQDYLLMD- ELGDDGYQLQPPYGYYPFRGNENRLTHRRQTVLREKGRRLANRGPAYMFD	89
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> AR1 AR2 AR3 </div>				
Human	TRPC3	20	RGTSLTAEEERFLDAAEYGNIPVVRKMLEESKTLNVNVDYMGQNALQLAVGNEHLEITELLKKNLARIGDALLAISKGYVRIVEAI	109
Human	TRPC6	91	RSTSLSIEEERFLDAAEYGNIPVVRKMLEECHSLNVNVDYMGQNALQLAVANEHLEITELLKKNLARVGDALLAISKGYVRIVEAI	180
Human	TRPC7	36	KGTSLTPEEERFLDAAEYGNIPVVRKMLEESKTLNFNCVDYMGQNALQLAVGNEHLEITELLKKNLARVGDALLAISKGYVRIVEAI	125
Mouse	TRPC6	90	HSTSLSIEEERFLDAAEYGNIPVVRKMLEECHSLNVNVDYMGQNALQLAVANEHLEITELLKKNLARVGDALLAISKGYVRIVEAI	179
Rat	TRPC6	90	HSTSLSIEEERFLDAAEYGNIPVVRKMLEECHSLNVNVDYMGQNALQLAVANEHLEITELLKKNLARVGDALLAISKGYVRIVEAI	179
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> AR4 LH1 LH2 </div>				
Human	TRPC3	110	LNHGFAASKRLTSPCEQLQDDFYAYDEDGTRFSDVTPII LAAHQCKYEVVHMLLMKGARIERPHDYFCCKGDCMEKQRHDSFSHS	199
Human	TRPC6	181	L SHPAFAEGKRLATSPSQSELQDDFYAYDEDGTRFSDVTPII LAAHQCKEYEVHTLLRKGARIERPHDYFCCKNDCNQKQKHSFSHS	270
Human	TRPC7	126	LNHFAFAQQRLTSPLEQLRDDD FYAYDEDGTRFSDVTPII LAAHQCKEYEVHTLLRKGARIERPHDYFCCKNECTRSQKHSFSHS	215
Mouse	TRPC6	180	LNHFAFAEGKRLATSPSQSELQDDFYAYDEDGTRFSDVTPII LAAHQCKEYEVHTLLRKGARIERPHDYFCCKTECSQKQKHSFSHS	269
Rat	TRPC6	180	LNHFAFAEGKRLATSPSQSELQDDFYAYDEDGTRFSDVTPII LAAHQCKEYEVHTLLRKGARIERPHDYFCCKTECSQKQKHSFSHS	269
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> LH2 LH3 LH4 LH5 LH6 </div>				
Human	TRPC3	200	RSRINAYKGLASPAYLSLSEDPVLTAL ELSNELAKLANIEKEFKNDYRKL SMQCKDFVVGVLDCRDSEEEVEAILNGDLES AEPLEVHR	289
Human	TRPC6	271	RSRINAYKGLASPAYLSLSEDPVMTAL ELSNELAVLANIEKEFKNDYRKL SMQCKDFVVGVLDCRNT EEEVEAILNGD VETLQ--SGDH	358
Human	TRPC7	216	RSRINAYKGLAS AAYLSLSEDPVLTAL ELSNELARLANIEEFKNDYRKL SMQCKDFVVGVLDCRDT EEEVEAILNGDVNFQV--WSDH	303
Mouse	TRPC6	270	RSRINAYKGLASPAYLSLSEDPVMTAL ELSNELAVLANIEKEFKNDYRKL SMQCKDFVVGVLDCRNT EEEVEAILNGDAETRQ--PGDF	357
Rat	TRPC6	270	RSRINAYKGLASPAYLSLSEDPVMTAL ELSNELAVLANIEKEFKNDYRKL SMQCKDFVVGVLDCRNT EEEVEAILNGDAETRQ--PGDL	357
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> LH7 LH8 LH9 S1 </div>				
Human	TRPC3	290	HKASLSRVKLAIKYEVKKFVAHPNCQQQLLSIWIYENSLGRQETIAIKCLVVLVAVLGLPFLAIYWIAPCSRLGKILRSPFMKFAHAH	379
Human	TRPC6	359	GRPNLSRLKLAIKYEVKKFVAHPNCQQQLLSIWIYENSLGRQQTMAVKFLVVLAVAIGLPFLAIYWFAPCSKMGKIMRGPFMKFAHAH	448
Human	TRPC7	304	HRPNSRLKLAIKYEVKKFVAHPNCQQQLLSIWIYENSLGRQQTMAVKFLAVFVGSIGLPFLAIYWIAPCSKMGKILRSPFMKFAHAH	393
Mouse	TRPC6	358	GRPNLSRLKLAIKYEVKKFVAHPNCQQQLLSIWIYENSLGRQQTMAVKFLVVLAVAIGLPFLAIYWCAPCSKMGKILRGPFMKFAHAH	447
Rat	TRPC6	358	ARPNLSRLKLAIKYEVKKFVAHPNCQQQLLSIWIYENSLGRQQTMAVKFLVVLAVAIGLPFLAIYWCAPCSKMGKILRGPFMKFAHAH	447
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> S2 S3 </div>				
Human	TRPC3	380	SFIIFLGLLVFNASDRFEGITLTPNITVTDYPKQIFRVKTTQF TWTEMLIMVWVLMGMMWSECKELWLEGPREYILQLWNVLDGMLSFIF	469
Human	TRPC6	449	SFTIFLGLLVNMAADRFEFGTKLLPNETSDNARQLFRMKTSCFSWMEMLIISWVIGMIWAECKE IWTQGPKEYLFELWNMLDFGMLAIFA	538
Human	TRPC7	394	SFTIFLGLLVNNAADRFEFGKTLPNETFTDYPKQIFRVKTTQF SWTEMLIMKWLGMWSECKE IWEEGPREYVHLWNVLDGMLSFIF	483
Mouse	TRPC6	448	SFTIFLGLLVNMAADRFEFGTKLLPNETSDNARQLFRMKTSCFSWMEMLIISWVIGMIWAECKE IWTQGPKEYLFELWNMLDFGMLAIFA	537
Rat	TRPC6	448	SFTIFLGLLVNMAADRFEFGTKLLPNETSDNARQLFRMKTSCFSWMEMLIISWVIGMIWAECKE IWTQGPKEYLFELWNMLDFGMLAIFA	537
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> S4 </div>				
Human	TRPC3	470	AAFTARFLAFLQATKAQQYVDSYVQESDLSEVTLPEIQYFTYARDKWLPSDPQIISEGLYAIAVVLSFSRIAYILPANESFGPLQISLG	559
Human	TRPC6	539	ASF IARFMAFWHASKAQSIIDANDTLKDLTKVTLGDNVKKYNNLARIKWDPSPQIISEGLYAIAVVLSFSRIAYILPANESFGPLQISLG	628
Human	TRPC7	484	ASF IARFMAFLKATEAQLYVDQHVDDTLHNVS LPEVAYFTYARDKWDPSPQIISEGLYAIAVVLSFSRIAYILPANESFGPLQISLG	573
Mouse	TRPC6	538	ASF IARFMAFWHASKAQSIIDANDTLKDLTKVTLGDNVKKYNNLARIKWDP TDPQIISEGLYAIAVVLSFSRIAYILPANESFGPLQISLG	627
Rat	TRPC6	538	ASF IARFMAFWHASKAQSIIDANDTLKDLTKVTLGDNVKKYNNLARIKWDP TDPQIISEGLYAIAVVLSFSRIAYILPANESFGPLQISLG	627
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> S5 PH S6 </div>				
Human	TRPC3	560	RTVKDIFKFMVIFIMVVFAMIGMFLYSYYLGAKVNAFFTVEESFKTLFWIFGLSEVTSVWLKYDHFKEIENIGVLYGVYVNTVMVV	649
Human	TRPC6	629	RTVKDIFKFMVIFIMVVFAMIGMFLNLSYYIGAKQNEAFTTVEESFKTLFWAIFGLSEVKSVINYNHFKFENIGVLYGVYVNTVMIV	718
Human	TRPC7	574	RTVKDIFKFMVIFIMVVFAMIGMFLNLSYYRGAKNPFAFTTVEESFKTLFWIFGLSEVTSVWLKYDHFKEIENIGVLYGVYVNTVMVV	663
Mouse	TRPC6	628	RTVKDIFKFMVIFIMVVFAMIGMFLNLSYYIGAKQNEAFTTVEESFKTLFWAIFGLSEVKSVINYNHFKFENIGVLYGVYVNTVMIV	717
Rat	TRPC6	628	RTVKDIFKFMVIFIMVVFAMIGMFLNLSYYIGAKQNEAFTTVEESFKTLFWAIFGLSEVKSVINYNHFKFENIGVLYGVYVNTVMIV	717
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> TRP-Helix </div>				
Human	TRPC3	650	LLNMLIAMINSSYQEI EDDADVEWKFARAKLWLSYFDDGKTLPPFSLVSPKSFVYFIMRIIN---FPKCRRRRLQKDIEMGMGNSKS	735
Human	TRPC6	719	LLNMLIAMINSSYQEI EDDADVEWKFARAKLWFSYFEEGRTPVPFNLVPSPKSLFYLLKLLKWKWSELFGHKKGFQEDAEMNKINEEK	808
Human	TRPC7	664	LLNMLIAMINSSYQEI EEDADVEWKFARAKLWLSYFDEGRTPAPFNLVPSPKSFYLLIMRIIMCLIKLCKSKAKSCENDLEMGMLNSKF	753
Mouse	TRPC6	718	LLNMLIAMINSSYQEI EDDADVEWKFARAKLWFSYFEEGRTPVPFNLVPSPKSLLYLLKFKKWMCEL IQGQKQGFQEDAEMNKRNEEK	807
Rat	TRPC6	718	LLNMLIAMINSSYQEI EDDADVEWKFARAKLWFSYFEEGRTPVPFNLVPSPKSLLYLLKFKKWMSEL IQGHKKGFQEDAEMNKRNEEK	807
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> CH1 CH2 </div>				
Human	TRPC3	736	RLN-----LFTQSNRVFESHFSNINLNPTRYQIMKRLIKRYVLKAQVDKENDEVNEGELKEIKQDISSLRYEL	806
Human	TRPC6	809	KLGI LGSHEDSLKLSLDKKQVGHNKQPSIRSSDFHLNSFNPNP RYQYQIMKRLIKRYVLQAQIDKESDEVNEGELKEIKQDISSLRYEL	898
Human	TRPC7	754	KKT-----RYQ-AGMRNSENLTANNTLSKPTRYQIMKRLIKRYVLKAQVDREDEVNEGELKEIKQDISSLRYEL	823
Mouse	TRPC6	808	KFGISGSHEDLSKFSLDKNQLAHNKQSSTRSSEDIHLNSFSNPNRQYQIMKRLIKRYVLQAQIDKESDEVNEGELKEIKQDISSLRYEL	897
Rat	TRPC6	808	KFGILGSHEDSLKFSLDNRQLAHNKQSSTRSSEDIHLNSFSNPNRQYQIMKRLIKRYVLQAQIDKESDEVNEGELKEIKQDISSLRYEL	897
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> * * * * * * </div>				
Human	TRPC3	807	LEDKSQATEELAILIHLSEKLNPSMLRCE-----	
Human	TRPC6	899	LEEKSONTEDLAELIRELGEKLSMEPNQEETNR-----	
Human	TRPC7	824	LEEKSONTADLADLIQQLSEKFGKNLNKDHRLRVNKGKDI	
Mouse	TRPC6	898	LEEKSONTEDLAELIRKLGERSLSEPKLEESRR-----	
Rat	TRPC6	898	LEEKSONTEDLAELIRKLGERSLSEKQESRR-----	
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> * * </div>				

Abb. 62: Sequenz-Alignment der Kanäle TRPC3/6/7 verschiedener Spezies. Alignment wurde mit dem Programm Clustal Omega auf der Uniprot-Website erstellt. Die sekundären Strukturelemente sind wie jene im topologischen hTRPC6-Modell in der Abb. 11 farbcodiert. Bei den beiden Sequenzen hTRPC3 und hTRPC6 sind ungeordneten Regionen mit unzureichender Strukturauflösung in der Kryo-EM-Strukturanalyse durch rot gefärbte Aminosäuren gekennzeichnet. Die grau hinterlegten Aminosäuren markieren nicht konservierte Reste innerhalb der dargestellten Sequenzen. Der schwarze Kasten verdeutlicht die Position der Hyperforin-Bindungsstelle im TRPC6-Kanal. Sternchen weisen auf PIP₂-Calmodulin Bindungsstellen hin. AR = Ankyrin repeat, LH = Linker-Helix, S = Segmentale-Helix, PH = Poren-Helix, CH = C-terminale-Helix.

10. DANKSAGUNG