

Aus dem
Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Die Rolle des transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)- Kanals in alveolaren Epithelzellen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

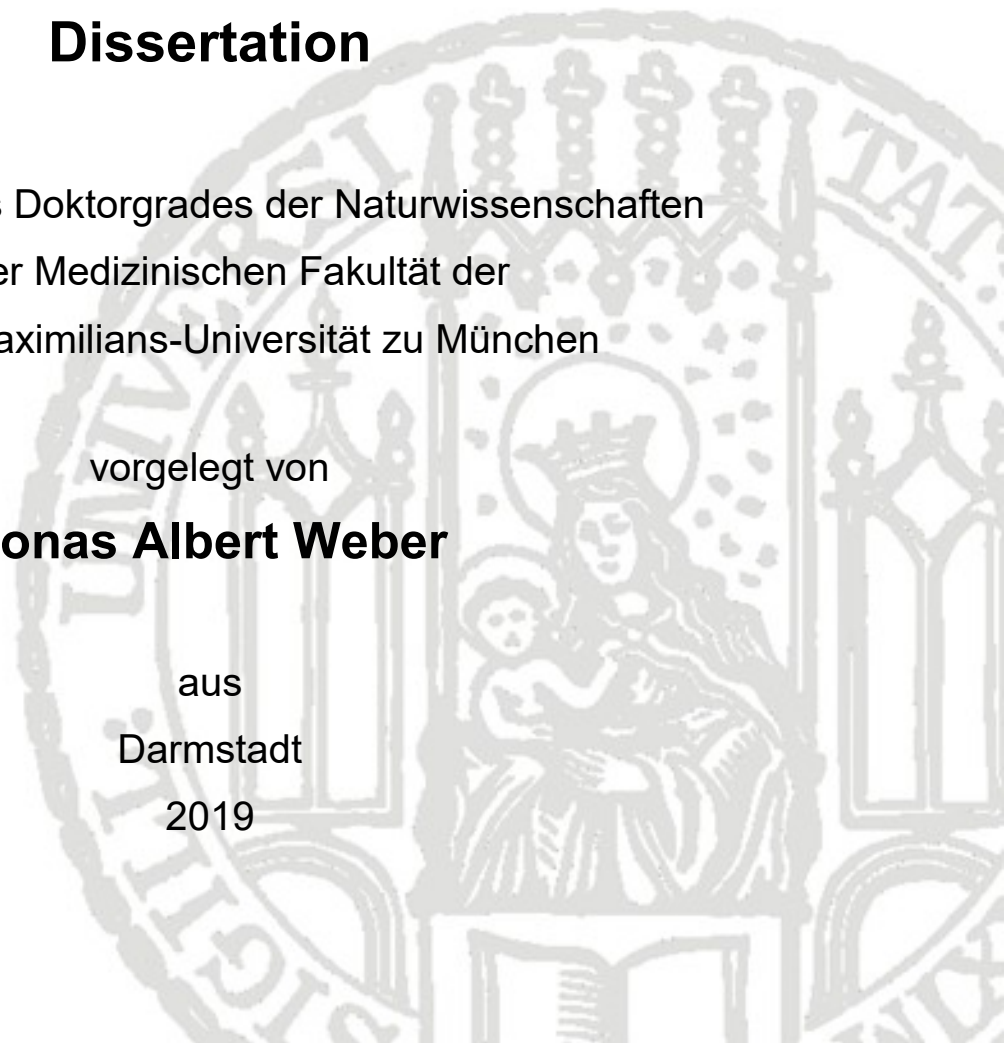
vorgelegt von

Jonas Albert Weber

aus

Darmstadt

2019



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Betreuer(in): Prof. Dr. rer. nat. Alexander Dietrich

Zweitgutachter(in): Prof. Dr. rer. nat. Heiko Hermeking

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	IX
Summary	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das respiratorische System	1
1.2 Alveolare Epithelzellen	2
1.3 Ischämie-Reperfusion-induzierter Lungenschaden.....	3
1.3.1 Pathologie des pulmonalen IRS	2
1.4 Fibrose	3
1.5 Das Lungenemphysem.....	4
1.6 Transient receptor potential (TRP)-Ionenkanäle	5
1.6.1 Die Superfamilie der TRP-Kanäle	5
1.6.2 TRPV-Kanäle	7
1.6.3 TRPV4-Kanäle	9
1.6.3.1 Aktivierung des TRPV4-Kanals	10
1.6.3.2 Gewebsspezifische Expression und Funktion des TRPV4-Kanals ..	11
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Mauslinien.....	15
2.1.2 Zelllinien.....	15
2.1.3 Primärzellen	15
2.1.4 Chemikalien	15
2.1.5 Enzyme, Kits und Marker	17
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	17

2.1.7	Laborgeräte.....	18
2.1.8	Softwareprogramme	20
2.1.9	Antikörper.....	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Zellbiologie.....	21
2.2.1.1	Zellkultur.....	21
2.2.1.2	Medienwechsel und Passagieren der Zellen	21
2.2.1.3	Isolation primärer alveolarer Epithelzellen	21
2.2.1.4	Behandlung der Zellen mit TRPV4-siRNA.....	23
2.2.1.5	Isolation primärer Lungenfibroblasten	24
2.2.1.6	Behandlung von Zellen mit TGF- β 1.....	24
2.2.2	Proteinbiochemie	25
2.2.2.1	Proteinisolierung.....	25
2.2.2.2	Isolierung der nukleären Fraktion	26
2.2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	26
2.2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.2.2.5	„Westen Blot“ und Immunfärbung.....	28
2.2.3	Histochemie	28
2.2.3.1	Einbettung von Lungen in Paraffin	28
2.2.3.2	Paraffinschnitte und Masson-Trichrom Färbung.....	29
2.2.3.3	Einbettung von Lungen in gefrorene Gewebsblöcke	30
2.2.3.4	Kryoschnitte und Immunfärbung.....	30
2.2.4	Funktionelle Messungen	31
2.2.4.1	Kontraktionsmessung im Myograph	31
2.2.4.2	Quantifizierung der Ödembildung in der isolierten, perfundierten Lunge	32
2.2.4.3	Quantifizierung der Lungenfunktion.....	35
2.2.4.4	Quantifizierung der Zellmigration.....	36

2.2.4.5	Messung des Zellwiderstands durch „Electric-Cell-substrate Impedance Sensing“ (ECIS).....	37
2.2.4.6	Quantifizierung der Zellkontraktion.....	37
2.2.5	Auswertung und Statistik.....	38
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Expression des TRPV4-Kanals in WT- und TRPV4-defizienten Lungen .	40
3.2	Kontraktion von glatten Muskelzellen der Atemwege in WT- und TRPV4-defizienten in primären Bronchien	40
3.3	TRPV4-Funktion in Myofibroblasten während der Ausbildung einer Lungenfibrose	41
3.3.1	Reduzierte Kontraktion von Fibroblasten aus TRPV4-defizienten (TRPV4 ^{-/-})-Mäusen im Vergleich zu Wild-Typ (WT)-Kontrollen	41
3.3.2	Lungenfibroblasten aus TRPV4-defizienten Mäusen migrieren schneller als Wild-Typ (WT)-Kontrollzellen.....	43
3.4	Ischämie-Reperfusion-induzierte Ödembildung.....	43
3.4.1	Ablation von TRPV4 erhöht die Ischämie-Reperfusion (IR)-induzierte Ödembildung in isolierten perfundierten Mauslungen.....	44
3.4.2	Einfluss der initialen Perfusion auf die Ischämie-Reperfusion-induzierte Ödembildung.....	45
3.4.3	TRPV4/TRPC6-defiziente Lungen zeigen eine ähnliche Ischämie-Reperfusion (IR)-induzierte Ödembildung wie WT-Lungen .	47
3.5	Lokalisation und mögliche Funktion von TRPV4-Kanälen in der Lunge	48
3.5.1	Expression von TRPV4-Proteinen in alveolaren Epithelzellen.....	49
3.5.2	TRPV4-Defizienz vermindert die Aquaporin-5-Expression in ATI-Zellen	51
3.5.3	TRPV4-Defizienz in ATII-Zellen reduziert die Produktion von „pro-Surfactant-Protein-C“ (pSP-C) aber nicht die Differenzierung zu ATI-Zellen	55
3.6	TRPV4-defiziente ATI-Zellen zeigen eine verringerte Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor of activated T cells“ (NFAT)	58

3.7 TRPV4-defiziente ATI-Zellen zeigen eine verringerte Zellmigration und -adhäsion	59
3.8 TRPV4-defiziente Mäuse zeigen Emphysem-ähnliche Lungenstrukturen und eine veränderte Lungenfunktion	62
4 Diskussion	66
4.1 Quantifizierung der TRPV4-induzierten Kontraktion in glatten Muskelzellen	66
4.2 Rolle von TRPV4-Kanälen in Fibroblasten und Myofibroblasten während der Ausbildung einer pulmonalen Fibrose	67
4.3 Funktionen von TRPV4-Kanälen während der Ausbildung eines IR-induzierten Lungenödems	67
4.4 Expression und Funktion von TRPV4-Kanälen in ATII-Zellen	69
4.5 Expression und Funktion von TRPV4-Kanälen in ATI-Zellen	70
4.6 TRPV4-defiziente ATI-Zellen zeigen eine verminderte Zellmigration und Barrierefunktion	71
4.7 Lungenhistologie und Funktion in TRPV4 ^{-/-} -Mäusen	72
5 Fazit und Ausblick	75
Literaturverzeichnis	77
Anhang	91
Publikationen	91
Vorträge und Kongressbeiträge	91
Eidesstattliche Versicherung	93
Danksagung	94
Abbildungsverzeichnis	95
Tabellenverzeichnis	98

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
4 α -PDD	4 alpha-phorbol-12,13-didecanoate
A	geschätzte inspiraotrische Kapazität
AQP-1	Aquaporin 1
AQP-5	Aquaporin 5
ATI	Alveolare-epitheliale Zellen Typ I
ATII	Alveolare-epitheliale Zellen Typ II
CCh	Carbachol
COPD	„chronic obstructive pulmonary disease“, Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
C _{rs}	„compliance of respiratory system“, Dehnbarkeit des respiratorischen Systems
C _{st}	„static compliance“, statische Dehnbarkeit des respiratorischen Systems
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EC	„Endothelial cell“, Endothelzellen
EET	Epoxyeicosatriensäure
eGFP	„enhanced GFP“, verstärktes GFP
E _{rs}	„elastance of respiratory system“, Elastizität des respiratorischen Systems
GFP	„Green fluorescence protein“, Grün fluoreszierendes Protein
H	„alveolar elastance“, Alveolare Dehnbarkeit
IC	„inspiratory capacity“, inspiraotrische Kapazität
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPF	„Idiopathic pulmonary fibrosis“, Idiopatische Lungenfibrose
IPL	Isolierte, perfundierte Lunge
IRS	„Ischemia-reperfusion-injury“, Ischämie-Reperfusionsschaden
LPS	Lipopolysaccharide
MCL	„Mean chord length“, mittlerer Alveolendurchmesser
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
Min	Minuten
MLEC	murine Lungenendothelzellen
NFAT	„Nuclear Factor of activated T-Cells“, Kernfaktor aktivierter T-Zellen
NFATc1	NFATc1 Isoform c1 des NFAT
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen
PAP	„pulmonary artery pressure“, pulmonal-arterieller Druck
PASMC	„Pulmonary artery smooth muscle cells“, pulmonale arterielle glatte Muskelzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PE	Phenyleprin

PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
pmIF	Primäre Maus Lungenfibroblasten
pSP-C	„pro surfactant Protein-C“
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
ROS	„reactive oxygen species“, reaktive Sauerstoffspezies
SP-C	„Surfactant-Protein-C“
TGF-β1	„Transforming growth factor β1“
TM	Transmembrandomäne
TRPC6	„Classical transient receptor potential channel 6“
TRPV4	„Transient receptor potential channel vanilloid 4“
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Der nicht-selektive Ca^{2+} permeable „transient receptor potential vanilloid 4“ (TRPV4)-Kanal wird in verschiedenen Lungengewebe wie den arteriellen Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Epithelzellen exprimiert. Seine genaue physiologische Funktion ist aber noch unklar. In dieser Arbeit wurden zelluläre und organspezifische Funktionen durch vergleichende Untersuchungen an Mäusen mit (Wildtyp, WT) und ohne (TRPV4-defizient, TRPV4^{-/-}) Expression des Kanals aufgeklärt. Zunächst konnte die Rolle des TRPV4-Kanals für die Kontraktion und Migration von - durch „transforming growth factor $\beta 1$ “ (TGF- $\beta 1$) differenzierten - Myofibroblasten gezeigt werden. Mit Hilfe des isolierten, perfundierten Lungenmodells aus der Maus ließ sich die Ischämie-Reperfusion-induzierte Ödembildung in - zur Transplantation bestimmten - Lungen nachbilden. In diesem Modell zeigten TRPV4^{-/-}-Lungen eine deutlich stärkere Ödembildung nach Ischämie und Reperfusion als die Kontrolllungen von WT-Tieren. Da eine TRPV4-Kanalaktivierung in pulmonalen Endothelzellen aber die Zellpermeabilität sogar erhöht, wurde hier die Rolle von TRPV4-Kanälen in der zweiten natürlichen Barriere - den alveolären Epithelzellen - untersucht. Mit Hilfe von immunhistochemischen oder mRNA-Expressions-Analysen wurden TRPV4-Kanäle im Bronchiepithel sowie in alveolaren Epithelzellen Typ I und Typ II (ATI und AII) nachgewiesen. Durch das Fehlen von TRPV4-Kanälen reduzierte sich die Expression und Plasmamembranlokalisation des wasserleitenden Proteins Aquaporin-5 (AQP-5) in ATI-Zellen im Vergleich zu WT-Kontrollzellen. Die Analyse von isolierten primären TRPV4-defizienten AII-Zellen zeigte eine verringerte Expression des „pro-Surfactant-Protein-C“ (pSP-C), ein Vorläufer-Protein des für die Verringerung der Oberflächenspannung und der Homöostase der Alveolarflüssigkeit wichtigen „Surfactant-Protein-Cs“. Obwohl die Fähigkeit von TRPV4^{-/-}-AII-Zellen zu ATI-Zellen zu differenzieren unverändert war, konnte eine verringerte Migration und eine reduzierte Zellbarriere-Funktion von TRPV4-defizienten ATI-Zellen gezeigt werden. Darüber hinaus entwickelten sich in TRPV4^{-/-}-Lungen von erwachsenen Mäusen signifikant größere Alveolen, die eine veränderte Lungenfunktion im Vergleich zu WT-Lungen hervorriefen. Die Ursache für diese Emphysem-artigen Veränderungen könnten in der verminderten SP-C-Produktion liegen und durch Reduktion der alveolaren Septen neben der geringeren Expression der Aquaporin-Proteine auch die erhöhte Ödembildung erklären. Die Ergebnisse dieser

Arbeit zeigen neuartige und wesentliche Funktionen von TRPV4-Kanälen für den Schutz und die Zellbarrierefunktion des Alveolarepithels auf.

Summary

The non-selective Ca^{2+} permeable transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channel is expressed in different lung tissues e.g. arterial endothelial, smooth muscle and epithelial cells. Its exact physiological function however remains elusive. Cellular and organ specific functions of TRPV4 channels were identified by comparative analysis of mice with (wild-type, WT) and without (TRPV4-deficient, TRPV4^{-/-}) expression of the channel in this thesis. At first, the importance of TRPV4 channels for contraction and migration of myofibroblasts differentiated by transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) was identified. Next, ischemia-reperfusion induced edema formation in lungs intended for transplantation was mimicked in the isolated perfused mouse lung model. Most interestingly, TRPV4^{-/-} lungs showed significantly higher edema formation after ischemia and reperfusion compared to WT control lungs. As activation of TRPV4 channels results even in higher permeability of endothelial cells we focused on the function of the channels in the alveolar epithelium the second natural barrier of the lung. By immunohistochemistry and mRNA profiling we detected TRPV4 in bronchial epithelium, alveolar type I (ATI) and alveolar type II (ATII) cells. Genetic ablation of TRPV4 resulted in reduced expression and plasma membrane insertion of water permeable aquaporin-5 (AQP-5) channel in ATI as well as decreased expression of pro surfactant protein C (pSP-C) a precursor protein of surfactant protein C (SP-C), which is responsible for reduction of surface tension and homeostasis of the alveolar fluid, in ATII cells. Migration of TRPV4-deficient ATI cells was reduced and cell barrier function was impaired. Moreover, adult TRPV4^{-/-} lungs developed larger alveoli and altered lung function compared to WT lungs. Reduced production of SP-C may be at least one reason for these emphysema-like changes in lungs from TRPV4^{-/-} mice. The resulting reduction of alveolar septae may - in addition to decreased production of AQP-5 - also be responsible for higher edema formation in TRPV4^{-/-} lungs. Therefore, our data highlight novel essential functions of TRPV4 channels for cell barrier function and protection of alveolar epithelial cells.

1 Einleitung

1.1 Das respiratorische System

Das respiratorische System, bestehend aus den oberen Atemwegen (Nasen-, Mundhöhle und Rachen) und den unteren Atemwegen (Kehlkopf (Larynx), Luftröhre (Trachea) und Lunge mit Bronchien, Bronchiolen und Alveolen), dient der Versorgung des Körpers mit Sauerstoff (O_2). Die Lunge nimmt Umgebungsluft auf und vermittelt den Austausch von O_2 gegen Kohlendioxid (CO_2) zwischen Luft und Blut. Aufgrund des konstanten Kontakts zur Außenwelt ist die Lunge, neben der Haut, als einziges Organ ständigen toxischen Reizen von außen ausgesetzt. Hierbei entscheiden Expositionsdauer und -stärke über eine toxische Wirkung der inhalieren Noxen [1] und eine funktionierende Epithelschicht ist für einen Schutz der Lunge von essentieller Bedeutung [2].

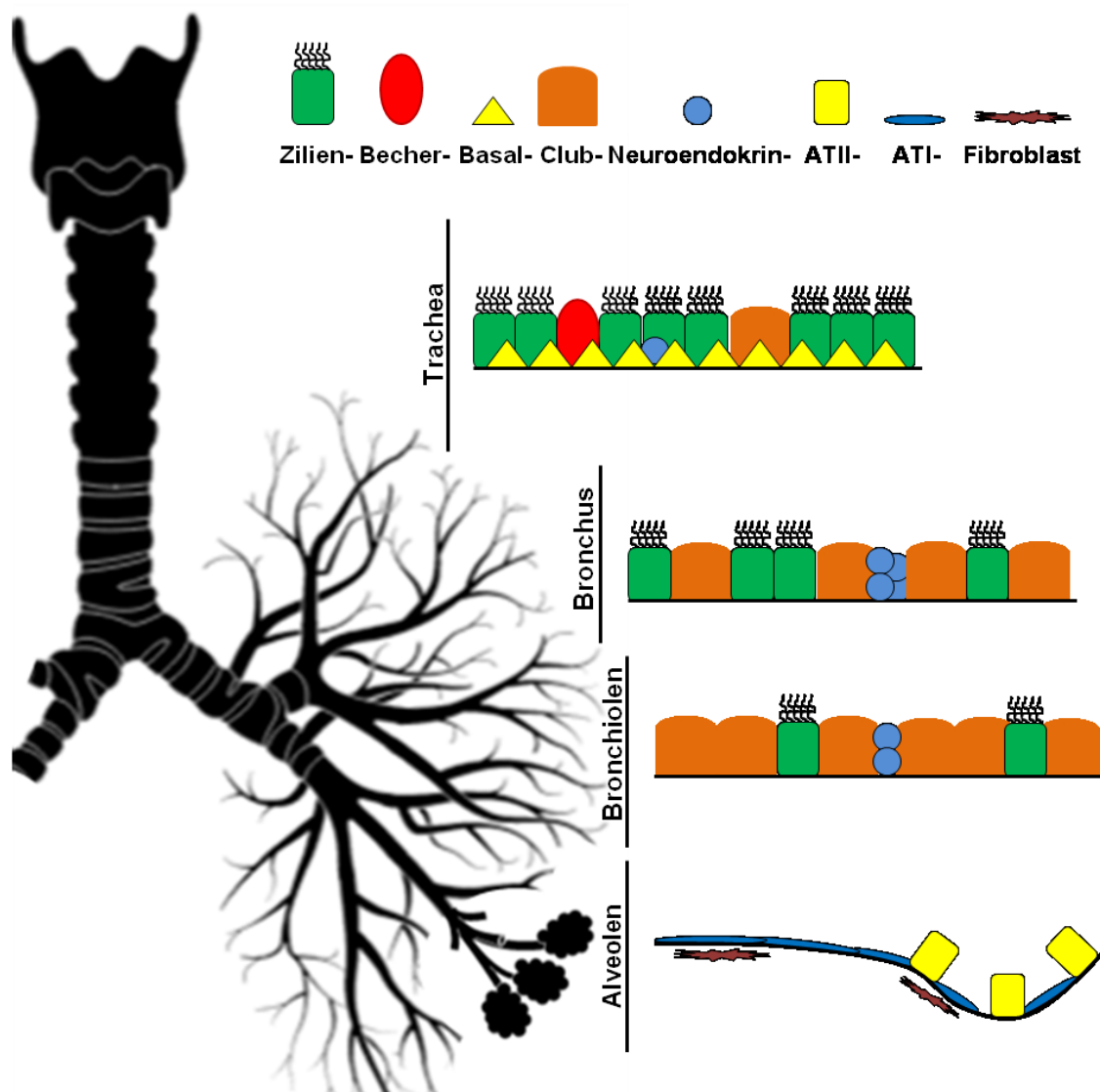


Abbildung 1: Schematischer Aufbau und Funktion des pulmonalen Systems. Darstellung des luftleitenden System mit Trachea und primärem Bronchus sowie den tieferen Bereichen mit sekundärem Bronchus, Bronchiolen und der Alveolen als Gasaustauschfläche. Gezeigt sind für die Lungenfunktion wichtige Epithelzellen wie Zilienzellen, Becherzellen, Basalzellen, Clubzellen, neuroendokrinen Zellen, Alveolarepithelzellen Typ I und II und Fibroblasten. Modifiziert nach [3].

Grundsätzlich unterscheidet man, wie in Abbildung 1 dargestellt, zwischen den luftführenden Bereichen wie Trachea, primären- und sekundären Bronchien, sowie den Bronchiolen und Alveolen die den Austausch von O_2 und CO_2 vermitteln [4]. Inhalierte Luft mit Fremdkörpern trifft zuerst auf die oberen Atemwege, bestehend aus Trachea, sowie primärem- und sekundärem Bronchus. Mukus, der von sog. Becherzellen produziert wird, bindet Partikel aus der Luft. Die Zilien auf den Ziliarzellen befördern den Großteil der Partikel in Kombination mit dem Hustenreflex wieder aus der Lunge [5]. Die Basalzellen der Trachea stellen sogenannte Vorläufer („progenitor“)-Zellen dar. Während der kontinuierlichen Erneuerung und nach Verletzung der Epithelschicht wechseln diese Zellen in ein stark proliferierendes Stadium und können zu Ziliar-, Becher- und Clubzellen differenzieren [6]. Clubzellen (Keulenzellen) sekretieren die sog. „Surfactant“-Proteine A und D, die antimikrobielle Wirkung besitzen und eine überschießende Immunreaktion verhindern. Darüber hinaus dienen sie nach Epithelschädigung als Vorläuferzellen für alveolare Epithelzellen Typ 2 (ATII), welche wiederum zu alveolaren Epithelzellen Typ 1 (ATI) Zellen differenzieren [3], [7]. Alveolare Epithelzellen und deren Funktion werden im Folgenden genauer beschrieben.

1.2 Alveolare Epithelzellen

Das Alveolarepithel erfüllt mehrere Funktionen in der Lunge. Zum einen bildet die Epithelschicht eine natürliche Barriere für die äußere Umgebung, die den Körper vor eindringenden Mikroorganismen und Giftstoffen schützt, während andererseits alveolare Epithelzellen den effizienten Gasaustausch erleichtern sollen. In der erwachsenen Lunge setzt sich das alveolare Epithel neben Fibroblasten und Makrophagen aus zwei Epithelzelltypen (ATI- und ATII-Zellen) zusammen, die für die Aufrechterhaltung der Lungenhomöostase und der Gewebereparaturen entscheidend sind [8]. ATI-Zellen bilden mit 95 - 98 % den größten Teil der alveolaren Epithelzellen [3], [9]. Es sind dünne, langgestreckte Zellen mit einer großen Zelloberfläche zur Ausbildung der natürlichen Barriere, die in unmittelbarer Nähe zum Interstitium und zu den Endothelzellen der Alveolarkapillaren aber auch den Gasaustausch erleichtern [8], [10]. ATI-Zellen bedecken die größte Oberfläche der Lunge [11] und

sind in hohem Maße permeabel für Wasser, was den Ionentransport und die Aufrechterhaltung des Flüssigkeitsgleichgewichts in der Lunge ermöglicht [12]. Spezifische Markerproteine für ATI-Zellen sind Caveolin, Podoplanin und Aquaporin-5 (AQP-5) [13]. Letztere gehören zu der wasserleitenden Proteinfamilie der Aquaporine. AQP-5 ist deren einziger Vertreter in ATI-Zellen [14]. Ein Vergleich der Expression verschiedener AQP-Vertreter im respiratorischen System ist in Abbildung 2 dargestellt.

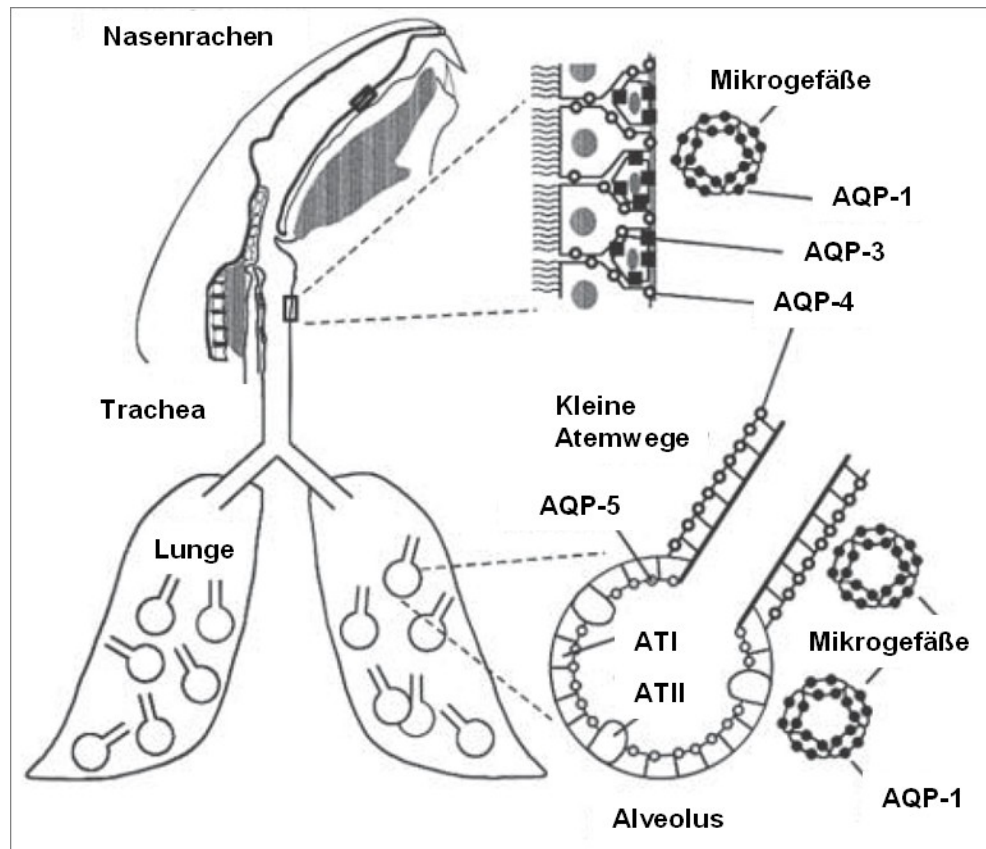


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Expression der verschiedenen Aquaporine (AQP) in der Lunge. Aquaporin-5 (AQP-5) wird ausschließlich in alveolaren-epithelialen Zellen Typ I (ATI) exprimiert; Aquaporin-1 (AQP-1) hingegen in mikrovaskulären Endothelzellen. Modifiziert nach [15].

Die restlichen 2 - 5 % der Alveolarzellen bestehen aus ATII-Zellen, die eine kubische Morphologie aufweisen und wie ATI-Zellen am Ionentransport und an der Flüssigkeitshomöostase beteiligt sind [16]. Sie sind vor allem für die Produktion, Lagerung, Sekretion und das Recycling von „Surfactant-Protein-C“ (SP-C) verantwortlich. SP-C senkt die Oberflächenspannung an der Gewebe-Luft-Barriere, erleichtert das Aufblasen und Entleeren der Lunge während des Atmens, verhindert das Kollabieren der Alveolen [17] und ermöglicht den Gasaustausch von O₂ und CO₂ zwischen Epithel und Endothel [4]. Eine genauere Darstellung der

„Surfactant“-Proteine in den Alveolen (SP-C und SP-B), mit Aufbau aus Vorläuferproteinen (pSP-C und pSP-B) und Abbau ist in Abbildung 3 dargestellt.

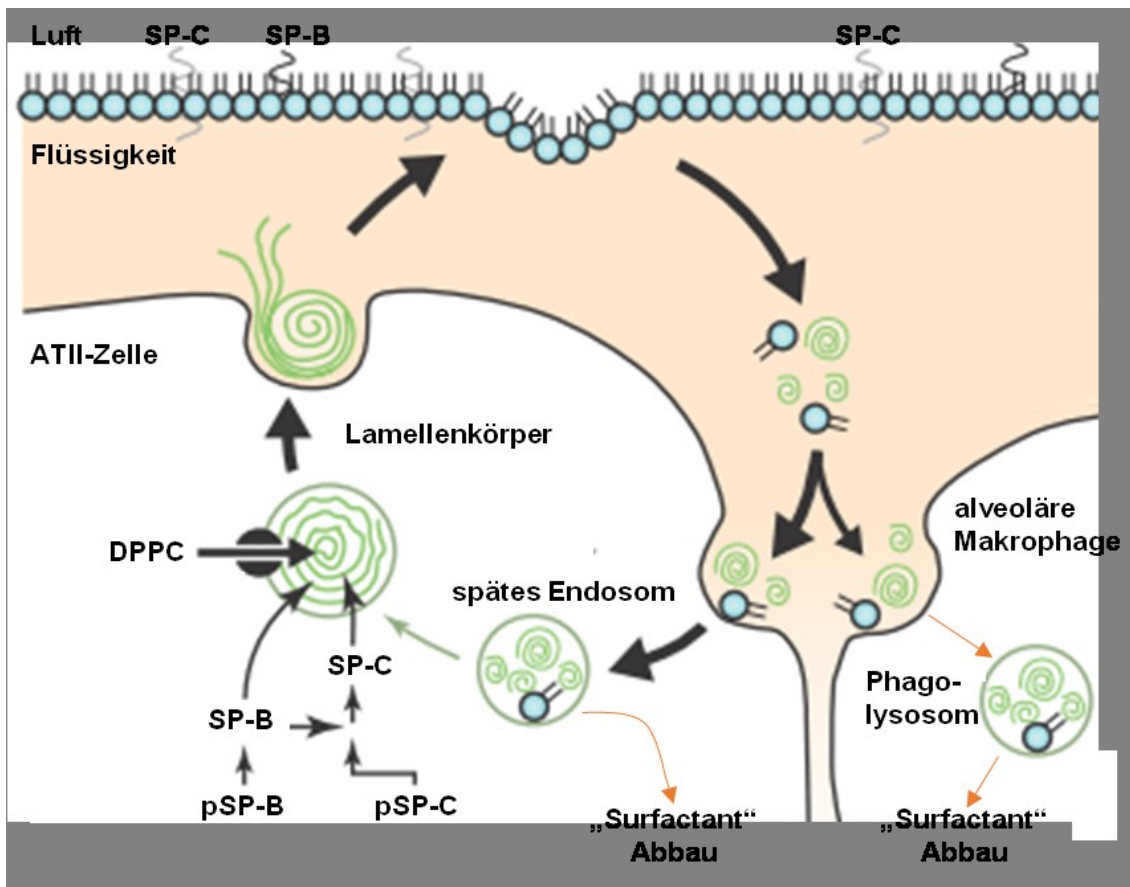


Abbildung 3: Schematische Darstellung von „Surfactant“-Produktion, -Transport und -Abbau. „Surfactant“-Proteine SP-B und SP-C werden von alveolaren-epithelialen Zellen Typ II (ATII) synthetisiert. Die Proteine pSP-B (pSP-B) und pSP-C (pSP-C) werden als Vorläuferproteine synthetisiert und in Lamellenkörpern verarbeitet. Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) bildet den Hauptbestandteil des „Surfactants“. Durch Exozytose an der apikalen Membran wird der „Surfactant“-Komplex ausgeschieden. SP-C und SP-B verbessern die Adsorption an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche. In späten Endosomen wird „Surfactant“ wieder in ATII-Zellen aufgenommen und wiederverwendet oder abgebaut. Auch durch Endozytose in alveolären Makrophagen kann „Surfactant“ durch Phago-Lysosomen abgebaut werden. DPPC: Dipalmitoylphosphatidylcholin; ATII: alveolare-epitheliale Zellen Typ II; SP-C; „Surfactant“ Protein-C; SP-B; „Surfactant“ Protein-B; pSP-C; Vorläuferprotein pSP-C; pSP-B; Vorläuferprotein pSP-B. Modifiziert nach [18].

Darüber hinaus dienen ATII-Zellen auch als Vorläufer für ATI-Zellen und können sich langfristig selbst erneuern [19]. Obwohl alveoläre Epithelzellen eine große Vielfalt von Ionen-transportproteinen und Kanälen exprimieren [20], ist ihre genaue Rolle immer noch nicht vollständig entschlüsselt.

1.3 Ischämie-Reperfusion-induzierter Lungenschaden

Der pulmonale Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) ist nach wie vor eine der größten Komplikationen bei Herz-Bypass-Operationen und Lungentransplantationen. Aufgrund des doppelten Blutversorgungssystems und der Bereitstellung von Sauerstoff aus der Alveolarventilation, sind die pathogenen Mechanismen der

Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) in der Lunge komplizierter als in anderen Organen und der Mechanismus bei weitem nicht vollständig entschlüsselt [21]. Beim Menschen sind bei über 15 % der Patienten innerhalb 72 Std. nach der Lungentransplantation und anschließender Reperfusion der transplantierten Lunge Alveolarschäden, Lungenödeme, und Sauerstoffunterversorgung zu beobachten [22], [23]. Dies kann zu einem schweren Ausfall des Primärtransplantats in bis zu 20 % aller Lungentransplantationspatienten in den ersten 90 Tagen nach der Transplantation führen und bleibt eine wesentliche Ursache für die Morbidität und Mortalität nach Lungentransplantationen [24]. IRS tritt in Folge der vorübergehenden Unterbrechung der Beatmung und Durchblutung des Lungengewebes auf. Dies löst viele verschiedene intrazelluläre und extrazelluläre physiologische Reaktionen wie erhöhte Gefäßpermeabilität und Lungenödeme, Immunsystemaktivierung mit Lymphozyten- und Neutrophileneinwanderung, und die Induktion zahlreicher Zellsignalwege aus [25]. Die Reperfusion der Lunge ist somit einerseits absolut notwendig um die Lebensfähigkeit der Lunge zu erhalten, andererseits führt aber genau diese Wiederaufnahme zur beschriebenen Lungenschädigung. Es konnte gezeigt werden, dass auch das Stoppen der Beatmung oder der Verlust des Blutflusses alleine zu ähnlichen Lungenfunktionsstörungen und zu einer Zunahme des Gefäßdrucks und der Permeabilität führt [26][27].

1.3.1 Pathologie des pulmonalen IRS

Der pulmonale IRS besteht unter anderem aus einer schnellen und komplexen Entzündungsreaktion, die mit Endothel- und Epithelverletzung einhergeht. Der exakte Mechanismus des Reperfusionsschadens in der Lunge ist nicht geklärt, verschiedene Tiermodelle belegen aber, dass Lungenverletzungen häufig innerhalb der ersten Sekunden bis Stunden nach der Reperfusion auftreten [28]. Ischämie und anschließende Reperfusion ist begleitet von einer Stressreaktion mit der schnellen und robusten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [29]. Zusätzlich kommt es zur Hochregulierung von NADPH-Oxidasen [30], Nuklearfaktor- κ B [31] und Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) [32]. Diese Reaktionen leiten dann Zell- und Gewebsschäden, eine Aktivierung verschiedenster Zelltypen, Lipidmembranperoxidation und Sekretion von inflammatorischen Zytokinen ein [33]. Lungenverletzung ausgelöst durch Lipopolysaccharide (LPS), zeigen eine schnelle Einwanderung von Neutrophilen als Reaktion auf entzündliche Chemo- und Zytokine, die in der Lunge freigesetzt werden [34]. Zusätzlich kommt es durch die Hypoxie zu

einem Abbau des intrazellulären Adenosintriphosphats (ATP) und einem Anstieg des Abbauprodukts Hypoxanthin, welches wiederum zu H_2O_2 und ROS abgebaut wird [22], [30]. Nach der Reperfusion aktivieren ROS und Zytokine Neutrophile, welche zusammen mit Thrombozyten und Stickoxiden (NO) zum Reperfusion-induzierten Gefäßschäden und einer erhöhten Lungengefäßpermeabilität führen [26]. Dies begünstigt die Entwicklung von Lungenödemen und somit den Verlust der Lungenfunktion [35]. Auch strukturelle und funktionelle Veränderungen des „Surfactant“ (u.a. „Surfactant-Protein-C“ (SP-C)) könnten zum alveolaren Reperfusionsschaden beitragen [36]. transient rezeptor potential (TRP)-Kanälen wird ebenfalls eine Beteiligung am Ischämie-Reperfusionsschaden zugesagt. Der klassische „transient rezeptor potential“ Kanal Typ 6 (TRPC6) ist essentiell für die Ausbildung eines Ödems nach Ischämie und Reperfusion. TRPC6-defiziente Mäuse zeigten einen abgeschwächten Ischämie-induzierten Ca^{2+} -Einstrom und eine beeinträchtigte Barrierefunktion der Endothelzellen [37]. Nach akuter Lungenverletzung durch Inhalation von Chlorwasserstoffsäure [38] oder in der Niere [39], wurden Ödem-induzierende Effekte durch den TRPV4-Kanal ebenfalls identifiziert. Ob TRPV4 beim alveolaren Ischämie-Reperfusionsschaden schädigende oder protektive Eigenschaften besitzt wird allerdings noch kontrovers diskutiert.

1.4 Fibrose

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) ist die häufigste Form der interstitiellen Lungenerkrankungen und verläuft chronisch progressiv. Charakteristisch für die irreversible IPF sind eine zunehmende Atemnot und Kurzatmigkeit (Dyspnoe), trockener Husten und eine stetige Abnahme der Lungenfunktion. Die Überlebensprognose bei den vorwiegend älteren Menschen ist schlecht [40], [41]. Medikamente wie Pirfenidon oder Nintedanib können das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen, Heilung ist nur durch Lungentransplantation möglich [40]. Die genauen Ursachen der Lungenfibrose sind unbekannt. Risikofaktoren wie beispielsweise Rauchen oder Umweltverschmutzung bilden die Grundlage für anhaltende Verletzung der Alveolarzellen. Vernarbung und übermäßige Ablagerung von Kollagen im Lungeninterstitium führen letztendlich zur Ausbildung der Fibrose [42]. Man vermutet, dass wiederholte Verletzung der Alveolarepithelzellen, den entscheidenden Anstoß für die Ausbildung einer Fibrose darstellen [43]. Werden Alveolare Epithelzellen Typ I (ATI) beschädigt, erfahren Alveolare Epithelzellen Typ II

(ATII) eine Proliferation, um die freiliegenden Basalmembranen abzudecken. Unter normalen Konditionen sterben stark proliferierende ATII-Zellen und differenzierte ATI Pneumozyten verbleiben. Unter pathologischen Bedingungen und in Gegenwart von transformierendem Wachstumsfaktor beta (TGF β) sammeln sich Fibroblasten in diesen Schadensbereichen an und differenzieren sich zu Myofibroblasten, die Kollagen und andere Proteine sekretieren [43]. Myofibroblasten stellen zudem eine Zwischenform zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen dar, was zu einer erhöhten Kontraktion führt [44]. Es konnte hier bereits gezeigt werden, dass der TRPV4-Kanal die Differenzierung von Myofibroblasten begünstigt [45].

1.5 Das Lungenemphysem

Im Gegensatz zur Vernarbung der Lunge durch zu stark proliferierende Myofibroblasten während der Ausbildung einer Lungenfibrose, ist für das Lungenemphysem eine Vergrößerung der Lufträume, abwärts der terminalen Bronchiolen, aufgrund der Zerstörung von Aleolarepten charakteristisch [46]. Auch die kombinierte Form der Lungenfibrose im unteren Lappen und Emphysem im oberen Lappen („combined pulmonary fibrosis and emphysema“, CPFE) [47], [48] ist beschrieben. Neben dem Rauchen, als häufigster Ursache für Lungenemphyseme, führt auch die Inhalation von Dämpfen und giftigen Gasen zur Schädigung der Alveolen [49]. Eine Vergrößerung der Alveolen reduziert die Oberfläche der Alveolar-kapillarmembran und dadurch den Austausch von O₂ und CO₂ [50]. Dies führt zu einer erhöhten inspiratorischen Kapazität (IC), Lungen „Compliance“ (C), sowie einer Reduktion der Dehnbarkeit der Lunge („Elastance“, E). Eine symptomatische Therapie kann zur Verbesserung der Lungenfunktion führen [51], aber eine Heilung ist nur durch eine Lungentransplantation möglich. Die beschriebene Vergrößerung der Alveolen, auch durchschnittliche, mittlere Alveolenbreite („mean chord length“, MCL) genannt, wird durch Veränderung der Epithelzellen bedingt (zusammengefasst in [52]). Änderungen in der Expression und / oder Zusammensetzung der „Surfactant“-Proteine haben direkten Einfluss auf die Alveolarfunktion und führen zu verminderter Lungendehnbarkeit und erhöhter Oberflächenspannung [53]. Ein erhöhtes Risiko für einen alveolaren Kollaps und eine Verringerung der Gesamtoberfläche für den Gasaustausch sowie der Diffusionskapazität der Alveolar-kapillarmembran sind die Folgen [54]–[57]. Aus

diesem Grund können Therapien mit „Surfactant-Protein-C“ und „-B“ die Lungenstruktur und Funktion verbessern [58].

1.6 Transient receptor potential (TRP)-Ionenkanäle

„Transient receptor potential“ (TRP)-Kanäle sind unselektive, Kationen-permeable Proteine. Erstmals wurden diese 1969 in einer spontanen Mutante der Taufliege „Drosophila melanogaster“ beschrieben. Die Photorezeptoren der Mutante reagierten auf konstante Lichtreize mit einem vorübergehenden (transienten) Membranstrom [59]. 20 Jahre später wurde das aus 1275 Aminosäuren bestehende TRP-Gen schließlich von Montell und Rubin kloniert [60]. In Säugern werden TRP-Kanäle in allen Geweben exprimiert und stellen hier multimodale Sensoren für ein weites Spektrum an äußeren- und inneren-, physikalischen- und chemischen Stimuli dar [61], [62]. Auch in der Ca^{2+} Homöostase spielen TRP-Kanäle eine entscheidende Rolle [63]. In der Lunge sind sie beteiligt an einer Vielzahl pathophysiologischen Vorgängen und Krankheitsbildern wie beispielsweise den chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) [64], [65], Asthma [66], [67], Lungenödemen [37], [68] und Lungenfibrose [69].

1.6.1 Die Superfamilie der TRP-Kanäle

Die TRP-Kanal-Superfamilie umfasst in Säugetieren 28 Mitglieder, unterteilt in 6 Familien: TRPC („classical“ oder „canonical“, TRPC1 - 7), TRPA („ankyrin“, TRPA1), TRPM („melastatin“, TRPM1 – 8), TRPV („vanilloid“, TRPV1 – 6), TRPP („polycystin“, TRPP1 – 3) und TRPML („mucolipin“, TRPML1 -3).

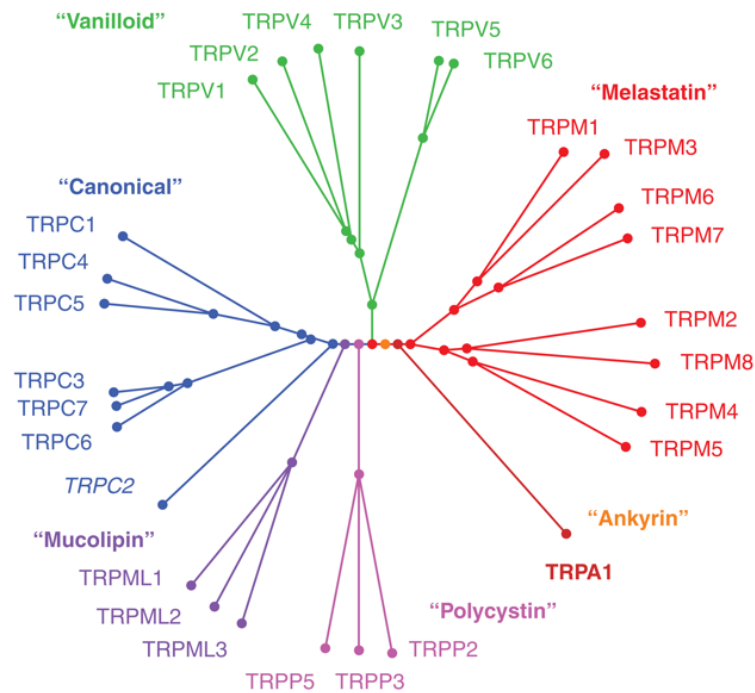


Abbildung 4: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanäle. Nach Homologien in der Aminosäuresequenzen wird die Superfamilie der TRP's in 6 Unterfamilien eingeteilt. TRPC („classical“ oder „canonical“, TRPC2 ist im Menschen ein Pseudogen), TRPV („vanilloid“), TRPM („melastatin“), TRPA1 („ankyrin“), TRPP („polycystin“) und TRPML („mucolipin“) [70].

Eine weitere Familie stellt TRPN (NOMP-c, „no mechanoreceptor potential C“) dar, der bisher nur in „Drosophila melanogaster“, „C.elegans, Xenopus“ und Zebrafisch nachgewiesen wurde [71]–[74]. Strukturelle Gemeinsamkeiten aller TRP-Kanäle sind sechs Transmembrandomänen, mit einer Porenregion zwischen der 5. und 6. Domäne, sowie intrazellulären Amino (N)- und Carboxy (C)-Termini [75]. Durch die Anordnung von 4 Untereinheiten zu Homo- bzw. Heterotetrameren entsteht eine funktionelle Einheit, die unselektiv Kalziumionen (Ca^{2+}) aber auch Natriumionen (Na^+) in die Zelle leitet. Eine Ausnahme bilden die Kalzium-selektiven TRPV5- und TRPV6-Kanäle [76]. Die TRP-Familien unterscheiden sich in der Länge der intrazellulären C- und N-Termini und in ihren strukturellen und funktionellen Domänen (Abbildung 5). Die stark konservierte TRP-Domäne im C Terminus mit der sogenannten TRP-Box ist nur in Vertretern der TRPC-, TRPV- und TRPM-Familie vertreten [77]. Ihr wird eine Bedeutung in der Membranlokalisierung, sowie Kanalöffnung und Bindung von Phosphatidylinositol-bisphosphaten (PIP_2) zugeschrieben [78], [79]. Nur TRPC-, TRPV- und TRPA-Kanäle besitzen N-terminale Ankyrin-Domänen, wobei TRPA1 mit 14 die meisten besitzt [80]. Ihre genaue Rolle in TRP-Kanälen ist nicht vollständig geklärt, allerdings geht man davon aus, dass sie für die Heteromerisierung und Membranlokalisierung [81], für die Vermittlung

mechanischer Reize [82] oder für die Bindung verschiedener Liganden wichtig sind [83].

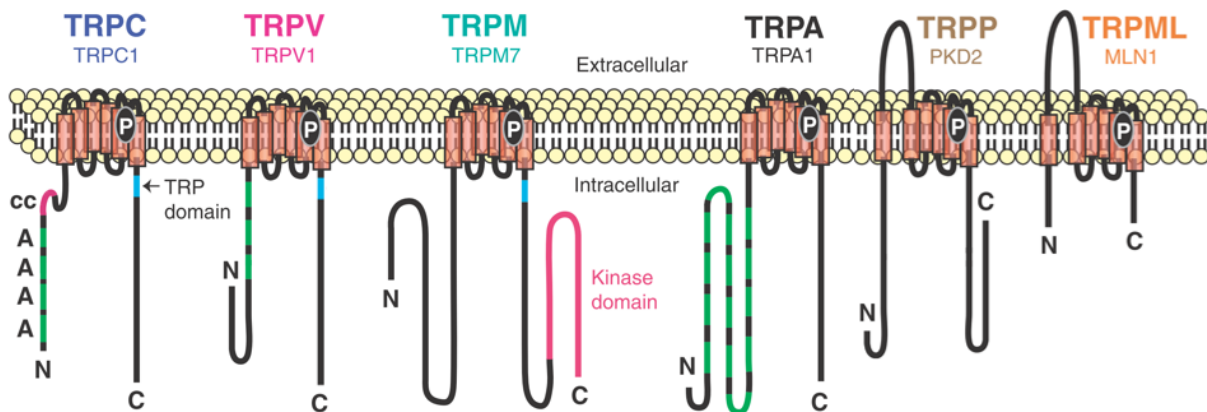


Abbildung 5: Aufbau der 6 TRP-Kanäle in Säugern. Ankyrin-Domänen (A), „Coiled-Coil-Domäne“ (cc), Kinase Domäne („Kinase domain“), TRP-Domäne („TRP domain“) und Porenregion (P) (modifiziert [84]).

TRPM6 und TRPM7 stellen so genannte „chanzymes“ („channel und enzyme“) dar, die C terminal eine Proteinkinase besitzen [85]. Die Kanalfunktion ist zwar nicht direkt an Kinasefunktion gekoppelt, aber die Interaktion zwischen Kinase- und Kanaldomäne spielt eine regulierende Rolle bei der Kanalaktivität im Zusammenhang mit Magnesium [86], [87].

1.6.2 TRPV-Kanäle

Die Familie der „transient receptor potential vanilloid“ (TRPV)-Kanäle wurde 1997 bei der Suche nach dem Rezeptor für Capsaicin, dem wohl prominenteste Vanilloid und der scharfe Bestandteil in Chilischoten, entdeckt [88]. Die Unterfamilie der TRPV-Kanäle besteht aus 6 Mitgliedern (TRPV1-TRPV6) und kann hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion in 4 Untergruppen eingeteilt werden. TRPV1 / TRPV2, TRPV3, sowie TRPV4 sind nicht selektive Kationenkanäle, wohingegen TRPV5 / TRPV6 die einzig hochgradig Ca^{2+} selektiven Kanäle der kompletten TRP-Superfamilie darstellen [89]. Vanilloid-Kanäle besitzen zwischen 3 und 6 Ankyrin-Domänen im N-Terminus. C-Terminus, nach der 6. Transmembrandomäne liegt eine stark konservierte TRP-Box [90]. Stellvertretend für die Struktur der TRPV-Kanäle ist in Abbildung 6 der TRPV4-Kanal dargestellt.

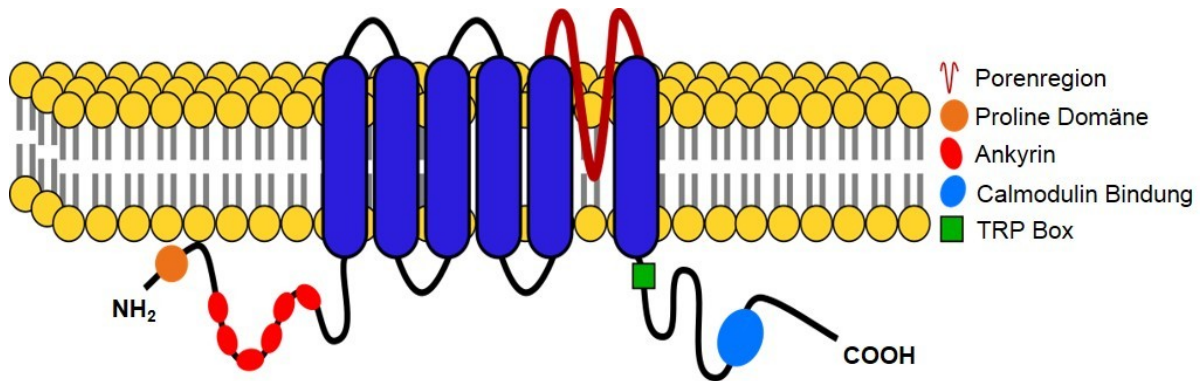


Abbildung 6: Struktur des TRPV4-Kanals. Wie alle Vertreter der TRPV-Familie besitzt auch der TRPV4 6 Transmembrandomänen mit einer Porenregion zwischen der 5. und 6. Domäne. Kanäle dieser Familie weisen zwischen 3 und 6 Ankyrin Domänen im N-Terminus auf. Die Proline-Domäne bewirkt die Bindung dieses Bereichs an PIP_2 in der Zellmembran. Die Calmodulin Bindungsstelle bewirkt durch Bindung von Ca^{2+} eine Konformationsänderung des Kanals. Modifiziert nach [91].

TRPV1 wurde als erster Kanal der Familie entdeckt. Seine Expression wurde in schmerzsensitiven Neuronen, aber auch in nicht neuronalem Gewebe nachgewiesen. Aktiviert wird der Kanal unter anderem durch Capsaicin, nicht physiologische Temperaturen größer als 42°C [92] aber auch durch Allylisothiocyanat [93]. Die Expression in bronchialen Fibroblasten und alveolaren Epithelzellen [94], [95] machen TRPV1 zu einer möglichen Zielstruktur für die Behandlung von akuten und chronischen Lungenkrankheiten [96]. TRPV2 teilt 50 % der Proteinsequenz mit TRPV1 und kommt in ähnlichen Geweben vor [89]. Im Vergleich zu TRPV1 wird er erst bei höheren Temperaturen ab 52°C aktiviert [97]. TRPV2 fungiert durch seine Aktivierbarkeit durch Dehnung in Muskelzellen auch als Mechanosensor [98] und nimmt durch die Expression in Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr ein [99]. Neben der Expression in neuronalem Gewebe wird der 3. Vertreter der Familie auch stark in der Haut und in Keratinozyten exprimiert [100]. Mäuse ohne TRPV3 können warme Temperaturen von $30 - 35^\circ\text{C}$ nicht erkennen, wohl aber schädliche Kälte und Hitze [101], [102]. Auch Mg^{2+} und ATP spielen für die Regulation des TRPV3-Kanals eine wichtige Rolle [100], [103]. TRPV5 und TRPV6 besitzen eine sehr hohe Sequenzhomologie von 75 % und weisen als einzige TRP-Kanäle eine hohe Selektivität für Ca^{2+} gegenüber anderen Kationen auf [104]. Mäuse mit einer TRPV6-Mutation zeigten Einschränkungen in der Beweglichkeit der Spermien und Befruchtungskapazität durch abnormale Ca^{2+} Aufnahme in epididymale Epithelzellen [105].

1.6.3 TRPV4-Kanäle

Der transiente Rezeptor potential vanilloid 4 (TRPV4)-Kanal ist das vierte klonierte Mitglied der Vanilloid-Familie [106] und wurde erstmals im Jahre 2000 beschrieben [107]–[109]. Der Kanal erhielt verschiedene Namen wie OTRPC4 („Osm-9 like TRPC4“), VR-OAC („vanilloid receptor-related osmotically activated channel“), Trp12 und VRL-2 [110], bevor er im Zuge einer einheitlichen Nomenklatur den Namen TRPV4 erhielt [111]. Wie die meisten TRP-Kanäle enthält TRPV4 eine konservierte TRP-Box mit der Aminosäuresequenz EWKFAR im intrazellulären C-Terminus sowie Ankyrin Domänen im N-Terminus. Das Protein besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-6) und einer Porenregion zwischen S5 und S6 [96], [106]. Vier TRPV4-Monomere bilden vorzugsweise einen funktionellen homotetrameren Komplex [112]. In Zilien des Nierenepithels wurden aber auch TRPV4/TRPP2-heteromere Komplexe identifiziert [113]. Der TRPV4-Kanal besteht aus 871 Aminosäuren mit einer Porenregion zwischen Aminosäure 663 - 668. Der Kanal zeigt eine 40 % Sequenzhomologie mit TRPV1 und TRPV2 und die 12 zentralen Aminosäuren der Porenregion zeigen sich sogar identisch [114]. TRPV4 ist ein nichtselektiver Kationenkanal mit höherer Permeabilität für Ca^{2+} und Mg^{2+} , als für Na^{2+} . In Säugerzellen zeigt der Kanal eine Selektivität von 1/6 für P_{Na} zu P_{Ca} [108].

1.6.3.1 Aktivierung des TRPV4-Kanals

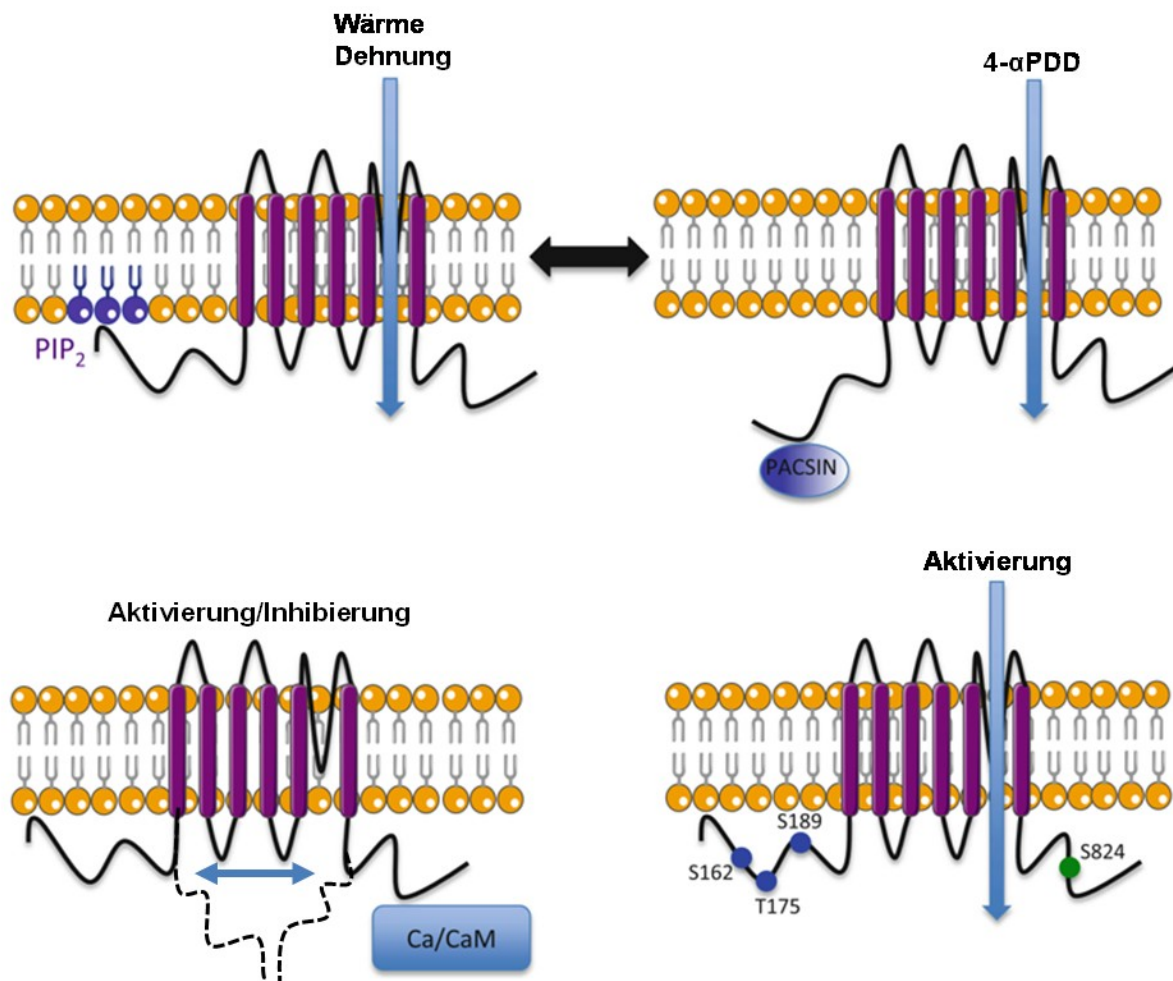


Abbildung 7: Regulation von TRPV4-Kanälen. Wenn viel PIP_2 in der Plasmamembran vorhanden ist, wird TRPV4 durch seine PI-Bindungsdomäne in einem offenen Zustand gehalten. In diesem Status kann der Kanal aktiviert werden durch Wärme und Membrandehnung. Ist PIP_2 -Konzentration gering und/oder TRPV4 von PACSIN (Protein Kinase C und Casein Kinase Substrate in Neuronen) gebunden, besteht eine geschlossene Konformation. Der Kanal ist so unempfindlich gegen Dehnung und Hitze, aber immer noch empfindlich gegen Agonisten, wie 4- α -PDD. Bei hohem intrazellulärem Ca^{2+} führt die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin zu einer Öffnung des Kanals; Geringes intrazelluläres Ca^{2+} führt zur Dissoziation von Calmodulin und somit zu einer eher geschlossenen Konformation (gestrichelte Linie). Phosphorylierungen durch Proteinkinase-A (PKA, grüner Punkt) und -C (PKC, blaue Punkte) an den gezeigten Phosphorylierungsstellen führen ebenfalls zur Steigerung der Kanalaktivität. (modifiziert nach [91])

Ein wichtiger Modulator der TRPV4-Funktion ist das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) [115]. PIP_2 ist an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert und dient als Quelle für die sekundären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3). Die N-terminale Prolin Domäne von TRPV4 (Abbildung 6) interagiert mit PIP_2 und stabilisiert den intrazellulären N-Terminus von TRPV4 in einer offenen Konformation entlang der Plasmamembran [115]. Fehlen von PIP_2 oder Überexpression von PACSIN (Protein Kinase C und Casein Kinase Substrate in Neuronen), welches am Membrantransport und Endozytose beteiligt ist, führt zur Delokalisation des N-Terminus von der

Zellmembran. Der Kanal reagiert nicht mehr auf Wärme oder osmotische Reize wie Dehnung, behält jedoch die Aktivierung durch Epoxyeicosatriensäuren (EETs) oder 4 alpha-phorbol-12,13-didecanoate (4 α -PDD) [115]. Betrachtet man die Regulierung des Kanals durch Ca²⁺ selbst, finden sich verschiedene Modelle. Watanabe et al. zeigten in transfizierten HEK293-Zellen, dass eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration die Aktivität des TRPV4-Kanals mindert [116]. Die Arbeitsgruppe um Strotmann zeigte hingegen eine positive Aktivierung des Kanals durch Ca²⁺ [117]. Im Ruhezustand bildet eine intrazelluläre Domäne vom N-Terminus einen autoinhibitorischen Komplex mit einer C-terminalen Domäne, die eine hochaffine Calmodulin-Bindungsstelle enthält (Abbildung 6). Nach Anstieg des intrazellulären Ca²⁺, bindet Ca²⁺-Calmodulin an die Bindungsstelle im C-Terminus und verdrängt die N-terminale Domäne [117]. Phosphorylierungen durch Protein Kinasen A und C können ebenfalls die Aktivität des Kanals regulieren [118].

1.6.3.2 Gewebsspezifische Expression und Funktion des TRPV4-Kanals

TRPV4-Kanäle wurden ursprünglich als extrazellulärer Sensor der Osmolarität charakterisiert [108], [109]. Der Kanal wird funktional in Endothel- [119] und Epithelzellen des respiratorischen Systems exprimiert [120], [121]. TRPV4-Kanäle sind wärmeempfindlich zwischen 24 und 38°C, können aber zusätzlich als Mechanosensoren agieren, da Sie durch Membrandehnung und Scherstress sowie durch zunehmende Viskosität aktiviert werden [91]. Darüber hinaus sind TRPV4-Proteine auch an der Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie [122], [123] und Blasenentleerung [124] beteiligt. Zahlreiche Modulatoren wurden bereits identifiziert (zusammengefasst in [125]). Aufgrund der starken Expression und Funktion des Kanals in Lungenfibroblasten, sind TRPV4-defiziente Mäuse teilweise vor einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose geschützt [45]. Im Lungenendothel, wo seine Rolle am intensivsten untersucht wurde, bewirkte die direkte oder indirekte Aktivierung von TRPV4 durch mechanischen Stress [126], hohem inspiratorischer Spitzendruck [127], [128] und hohem venösem Druck aufgrund von Herzversagen [68] eine Erhöhung der Endothelpermeabilität und führt zur Ödembildung. In anderen Geweben wie beispielsweise der Haut [129], dem Urogenitaltrakt [130] und im Hornhautepithel [131] ist der Kanal jedoch wichtig für die Aufrechterhaltung der physiologischen Zellbarriere. In trachealen Epithelzellen regulieren TRPV4-Kanäle die Schlagfrequenz der Zillien [121] und in alveolaren Epithelzellen führt ihre Aktivierung durch 4 α -Phorbolester über noch unbekannte molekulare Mechanismen

zu Lücken im Lungenseptum [132]. Darüber hinaus induzierte die Stimulation von TRPV4-Kanälen durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) eine Schutzreaktion in Form von erhöhter Zilien-Schlagfrequenz und Regulation der entzündlichen Immunreaktion [133], während ihre Hemmung das Lungenödem und die Entzündung nach Chlorexposition reduzierte [38]. TRPV4-Kanäle könnten daher auch als Chemosensoren für Giftstoffe im Lungenepithel fungieren (zusammengefasst in [134]).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die genaue Rolle von TRPV4-Kanälen für akute Lungenverletzungen ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Die Inhalation oder intratracheale Instillation schädlicher Chemikalien wie Chlorgas oder Säure verursacht eine akute Lungenschädigung, die durch eine Herabsetzung der Barrierefunktion der alveolokapillären Membran und einer Ansammlung von Entzündungszellen charakterisiert ist, was zur Bildung eines Lungenödems führt [38], [135], [136]. Eine pharmakologische Hemmung oder ein genetischer Defekt von TRPV4-Kanälen mildert diese Effekte.

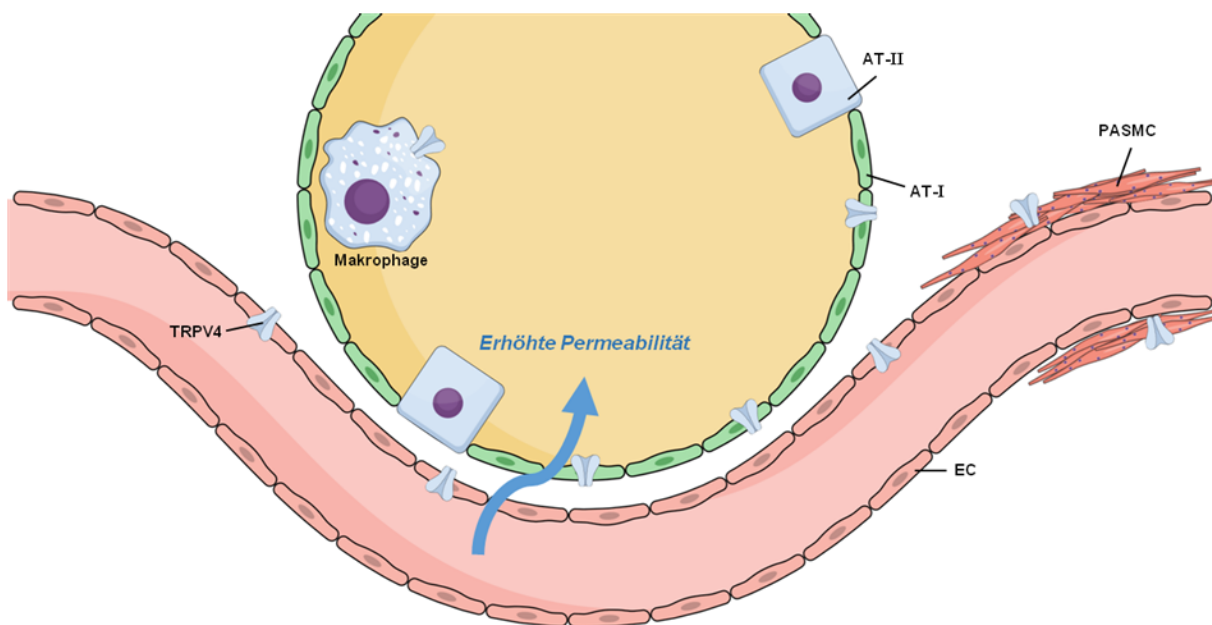


Abbildung 8: Schematische Darstellung der möglichen Beteiligung von TRPV4-Kanälen an der Bildung von Lungenödem. Nach der Inhalation von Schadstoffen könnte es durch Aktivierung von TRPV4 in Endothelzellen (EC), pulmonalen glatten Muskelzellen (PASM), alveolaren Typ 1 Epithelzellen (AT-I) und Makrophagen zu einer Schädigung der Blut-Luft-Schranke und zur Invasion von Flüssigkeit und Immunzellen in die Alveolarräume kommen. Modifiziert nach [137].

In Endothelzellen (EC) der Lungenkapillaren erhöht die TRPV4-Aktivierung die Gefäßpermeabilität und fördert somit die Proteinpermeabilität für Zellen, Proteine und Flüssigkeit. In glatten Muskelzellen der Lungenarterie vermittelt TRPV4 eine Vasokonstriktion und moduliert die Perfusion in verletzten Lungen [138]. In alveolaren Makrophagen führt die Aktivierung von TRPV4 zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und NO [139]. Es wurde ebenfalls berichtet, dass TRPV4 auf alveolaren Epithelzellen exprimiert wird. Dort haben die Kanäle aber im Gegensatz zum Alveolarendothel eine protektive Wirkung auf die Zellbarrierefunktion [129]–[131]. Der genaue Beitrag von TRPV4-Kanälen für die Barrierefunktion der Epithelzellen ist allerdings unklar.

In dieser Arbeit sollte deswegen die Funktion des TRPV4-Kanals während der Ausbildung eines Ischämie-Reperfusionsschadens und seine molekulare Funktion in alveolaren Epithelzellen mit Hilfe eines TRPV4-defizienten Mausmodells genauer untersucht werden.

Die Ziele dieser Arbeit werden wie folgt definiert:

- Bestätigung der bisher beschriebenen Rolle von TRPV4 in glatten Muskelzellen und in Myofibroblasten während der Ausbildung einer pulmonalen Fibrose
- Aufklärung der alveolaren TRPV4-Expression
- Einfluss einer TRPV4-Deletion auf die Ischämie-Reperfusions-induzierte Ödembildung in der ex-vivo Mauslunge
- Analyse der molekularen Funktion von TRPV4 in alveolar Typ I (ATI)- und alveolar Typ II (ATII)-Epithelzellen
- Identifikation möglicher Veränderungen in der Lungenarchitektur und -funktion nach Deletion des TRPV4-Gens

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mauslinien

Tabelle 2: Mauslinien

Mauslinie	Genetischer Hintergrund
TRPC6 ^{-/-} [140]	C57BL / 6
TRPV4 ^{-/-} [141], [142]	C57BL / 6
Wild Typ (aus der gleichen Kolonie)	C57BL / 6

2.1.2 Zelllinien

Tabelle 3: Zelllinien

Zelllinie	
HEK293 T	Humane embryonale Nierenzellen
MEF	Murine embryonale Fibroblasten

2.1.3 Primärzellen

Tabelle 4: Primäre murine Lungenzellen

Primäre murine Lungenzellen

ATI	Alveolare Typ I Epithelzellen
ATII	Alveolare Typ II Epithelzellen
MLEC	Maus Lungen Endothelzellen
pmIF	Primäre murine Lungenfibroblasten

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe	7328.2
Acetonitril	Merck Millipore	100030
Agarose (ATII)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	A9414-250g
Agarose (pmFI)	Carl Roth, Karlsruhe	100030
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe	K029.1
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	215589
BSA (Kälber Serum Albumin)	Sima Aldrich, Deisenhofen	9418
Calciumchlorid/ CaCl ₂ x H ₂ O	Sima Aldrich, Deisenhofen	C3306
Chloroform	Carl Roth; Karlsruhe	3313.4
Collagenase TypI	Merck Millipore, Darmstadt	C1-28
Complete Ultra Mini Tablette	Roche, Basel	05892970001
DAPI	Sigma Aldrich, Deisenhofen	32670

Dispase (ATII)	Corning, New York	354235
DMSO steril	Sima Aldrich, Deisenhofen	D2650-5X5MI
DNase I	PanReac®AppliChem	A3778, 0500
Essigsäure	VWR, Darmstadt	UN2789
Ethanol reinst (>99,5 %)	Carl Roth, Karlsruhe	5054.3
Ethidiumbromid	Sima Aldrich, Deisenhofen	E4391
Formaldehyd 37 %	Sima Aldrich, Deisenhofen	252549
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe	9105.3
Hematoxylin Lösung	Sima Aldrich, Deisenhofen	HHS16-500ML
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen	126/317126
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe	9105.3
4-(2Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure		
HEPES Puffer pH 7,5 (1 M)	Pan Reac® AppliChem	A6916, 0125
Höchst 33342 [10 mg/ml]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	62249
Isopropanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen	6752.3
Kaliumchlorid/ KCl	Carl Roth; Karlsruhe	6781.1
Kaliumdihydrogenphosphat/ KH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe	6875.2
Kaliumhydroxid/ KOH	Carl Roth, Karlsruhe	2526.1
Ketamin 10 %	Medistar, Ascheberg	04-03-92-64/23
Kochsalzlösung 0,9 %	Braun,	08609255
Krebs-Henseleit-Puffer	Sigma Aldrich, Deisenhofen	K3753
Kupfer-II-Sulfat/ Cu(II)SO ₄	Sigma Aldrich, Deisenhofen	C8027
Magnesiumchlorid/ MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe	KK36.2
Mercaptoethanol	Merck Millipore, Darmstadt	805740
Mercaptoethanol (RNA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	M6250-10ml
Methanol/ MeOH	Carl Roth, Karlsruhe	P717.1
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe	T145.2
Nagellack, klar	Wild Shine, Basingstoke, GB	E4063
Natriumchlorid/ NaCl	Carl Roth, Karlsruhe	9265.1
Natriumhydrogencarbonat/ NaHCO ₃	Carl Roth, Karlsruhe	HN01.1
Natriumhydrogenphosphat/ Na ₂ HPO ₄	Carl Roth, Karlsruhe	T876.1
Natriumhydroxid/ NaOH	Carl Roth, Karlsruhe	HN01.1
Natriumlaurylsulfat/ SDS	Sigma Aldrich, Deisenhofen	L-3771-500g
Ponceau S	Applichem, Darmstadt	A2935
Rompun	Bela pharm, Vechta	L4390
Roti®-Histokit 2	Carl Roth, Karlsruhe	T160
Rotiphorese Gel	Carl Roth, Karlsruhe	3029.1
Salzsäure Konz. (37 %, 12M)	Merck Millipore, Darmstadt	100317
Stickstoff (N ₂) flüssig	Linde, München	N2 flüssig
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe	2367.1
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe	AE15.2
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe	3051.2
Tween 20	Sigma Aldrich, Deisenhofen	P2287
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe	9713.1

Ziegenserum	Bio-West	S2000-100
-------------	----------	-----------

2.1.5 Enzyme, Kits und Marker

Tabelle 6: Enzyme, Kits und Marker.

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
BCA Assay	Thermo Fisher, Schwerte	23225
DNA GeneRuler 100bp, 1kb	Fermentas, Waltham; USA	SM0241, SM0312
Luminata Forte W. HRP Substrat	Merck Millipore, Schwalbach	WBLUF0100
Masson-Goldner-Trichrom-Färbekit	Carl Roth, Karlsruhe	3459
SDS-Gel-Marker	Fermentas, Waltham, USA	26616, 26625, 26634
SuperSignal West Dura	Thermo Fisher, Schwerte	34075
SuperSignal West Pico	Thermo Fisher, Schwerte	34077

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
Cryomold Einbettenschälchen	Sakura Finetek	4557
Deckgläser	Neolab, Heidelberg	1-6230
Einmal Skalpelle Cutfix®	Braun, Melsungen	130285_v
Einmal-.Sterilfilter 0,2 µM	GE Healthcare®, Little Chalfont; UK	M10462200
Einmal-Sterilfilter 40 µm/100 µm	BD Falcon™, Amsterdam	352340/352360
Einmal-Sterilfilter 70 µM	Corning®, New York, USA	431751
Falcon® Petri Dish	Corning®, New York, USA	351029
Flügelkanüle	TERUMO Surflo®, Leuven, Belgien	SV-2132
Ibidi® Silikon Einsatz	Ibidi® GmbH, Martinsried	80209
ImmEdge Stift	Vector, Burlingame, USA	H-4000
Immersol™ 518F	Carl Zeiss, Jena	130612
Kanüle Sterican® 21 G	Braun, Melsungen	2050806
Kanüle Sterican® 30 G	Braun, Melsungen	4656300
Kimtech Science	Kimberly-Clark, Irving, USA	7558
Kryogefäß 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht	72.379
Kulturflaschen T25 / T75	Sarstedt, Nümbrecht	83.3910/ 83.3911
Nylonfilter 10 µM (ATII)	Sefar, Heiden	3A03-0010-102-00
Nylonfilter 100 µM (ATII)	Sefar, Heiden	3A03-0100-115-01
Nylonfilter 20 µM (ATII)	Sefar, Heiden	3A03-0020-102-10
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe	H868
Objektträger Superfrost® Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	J1800AMNT

Parafilm	PARAFILM MIS, Neenah, USA	PM-992
RBS®35	Sigma aldrich, Deisenhofen	8346-12
Reaktionsgefäß 50 ml/15 ml	Sarstedt, Nümbrecht	62.548.009 62.554.502
Roti® PVDF Membran	Carl Roth, Karlsruhe	T8301
Spritze 1 ml Inject®	Braun, Melsungen	91660178
Spritze 10 ml Inject®	Braun, Melsungen	4606108V
Thermo Clean DC	Bioanalytic, Freiburg	002512-0500
Zellkulturschalen 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht	
Zellkulturschalen 3,5 cm	Sarstedt, Nümbrecht	

2.1.7 Laborgeräte

Tabelle 8: Laborgeräte

Geräte	Firma
Autoklaviersystem	Hp Medizintechnik, Oberschleißheim
Bent cannula type 73-0723	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Binokular SD30	Olympus, Hamburg
CO ₂ -Inkubator Heracell150i	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Dokumentationssystem für DNA-Gelelektrophorese	Peqlab, Erlangen
DynaMag-Spin Magnet	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Elektrophoresekammer Proteine	Peqlab, Erlangen
FlexiVent™ FX Module 2	Scireq®, Emka, Montreal, Kanada
Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
Gefrierschrank U410 -80 °C	Eppendorf, Hamburg
Heizplatte	VWR, Darmstadt
Hitzesterilisator FunctionLine Instruments	Heraeus, Thermo Fisher Scientific., Schwerte
ISAMATEC Tubing Pump	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Isoliertes perfundiertes Lungenmodell/ IPL-2	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Kippschüttler	Peqlab, Erlangen
Konfokalmikroskop LSM 880	Carl Zeiss, Jena
Kryokonservierungsbox	Nalgene, Sigma Aldrich, Deisenhofen
Kryostat	Leica, Wetzlar
LAUDA E100 Ecoline Staredition	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
MEGA STAR 1.6 R Zentrifuge	VWR, Darmstadt
Microliter Sryinges 25 µl	Hamilton, Bondanuz, Schweiz
Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mini Zentrifuge	Nippon Genetics, Dueren
MINIVENT type 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Mirax Desk Scanner (Objektträger Scanner)	Carl Zeiss, Jena

Myograph 610M	DMT, USA
Odyssey®Fc Western Blot Imaging	LI-COR, Lincoln, USA
Oedema Balance Module/EBM type 713	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
OP-Besteck	FST, Berlin
Osmometer Vapro 5520	Wescor Inc., Logan, USA
PALM MicroBeam	Carl Zeiss, Jena
PALM RoboSoftware	Carl Zeiss, Jena
Perfusion Kanüle type 73-0723	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
pH Elektrode SenTix 81	WTW, Weilheim
pH-Meter Inolab pH7110	WTW, Weilheim
Photometer	Tecan, Crailsheim
Pinzette 15012-12 (ILM)	S&T Dumont, Neuhausen, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg/Gilson, Middelton
Pipetus® Junior	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
PLUGSYS® Module Servo Controller/SCP type 704	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
PLUGSYS® TAM-A/DLP type 13388	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
PLUGSYS® TAM-A/P75 type 17111	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Precellys® 24 Homogenisator	Berlin instruments, Bretonneux, Frankreich
Schüttelinkubator	Thermo Fisher, Schwerte
Spannungsquelle Peqpower	Peqlab, Erlangen
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Thermomix Probentemperierer	Eppendorff, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 20 Labfuge	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Mikro 22R Labfuge	Hettich, Tuttlingen
Tracheale Kanüle	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Transferkammer Westernblot	Biorad, München
Vakuumpumpe BUC21	Vacubrand, Wertheim
VCM type 681	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Vortexgerät Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad Tauchsieder	MGW, Lauda, Lauda-Königshofen
Wilover AFL 40 Phako, Zellkulturmikroskop	Hund, Wetzlar
Zentrifuge Labfuge 400	Thermo Fisher Scientific., Schwerte
Zentrifuge Rotana/R E1210	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Sorval RC5C Plus	Sorval, Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.1.8 Softwareprogramme

Tabelle 9: Softwareprogramme

Software	Herausgeber	Anwendung
flexiWare Software	Scireq, Montreal, Canada	Lungenfunktionsmessung
Graphpad Prism 7	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA	Statistik, graphische Auswertung
Image Studio Lite	LI-COR, Lincoln, USA	„Western Blot“
ImageJ	Wayne Rasband (NIH)	Bildauswertung
LabChart 8 Reader	ADInstruments, Sydney, Australien	Myograph
Pulmodyn® Software	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten	IPL
Zen Software	Carl Zeiss, Jena	Konfokalmikroskopie

2.1.9 Antikörper

Tabelle 10: Antikörper

Antikörper	Artikelnummer	Hersteller	Verdünnung
Anti-Aquaporin 1	AQP-001	Alomone Labs	1:1000 1:100 IHC-F
Anti-Aquaporin 5	AQP-005	Alomone Labs	1:1000 WB 1:100 IHC-F
Anti-beta Actin	A3554-POX	Sigma Aldrich	1:10000 WB
Anti-FITC	F9806	Sigma Aldrich	1:80 IF
Anti-goat HRP	A5420	Sigma Aldrich	1:10000 WB
Anti-mouse CD16/CD32	553142	BD Biosciences	15 µl auf 10 ml
Anti-mouse CD45	553076	BD Biosciences	15 µl auf 10 ml
Anti-Podoplanin (PP)	AF3244	R&D systems	1:500 WB
Anti-Prosurfactant Protein C (pSP-C)	AB3786	Chemicon International	1:20000
Anti-rabbit POX	A-6154	Sigma Aldrich	1:10000 WB
Anti-TRPV4	ab39260	Abcam	1:1000
Anti-Vinculin	V9131	Sigma Aldrich	1:5000 WB
Chicken anti-gfp	A10262	Thermo Fisher	1:200 IHC-F
Goat anti-Chicken	A11039	Thermo Fisher	1:400 IHC-F
Goat anti-Rabbit Dylight 549	EI-1549-1.5	Vector Lab	1:200 IHC-F
Goat anti-Rabbit IgG	A32731	Thermo Fisher	1:500 IHC-F

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologie

2.2.1.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei konstanten 37 °C, 5 % CO₂ sowie 90 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Die Arbeiten mit Zellen fanden im laminaren Luftstrom unter sterilen Bedingungen statt, um die Gefahr von Kontamination zu minimieren. Es wurde außerdem darauf geachtet die Dauer für Mikroskopie, Medienwechsel und das Passagieren so gering wie möglich zu halten.

2.2.1.2 Medienwechsel und Passagieren der Zellen

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um adhärent wachsende Zellen. Alle 24-48 Std. wurde das Wachstum der Zellen am Lichtmikroskop kontrolliert. Wiesen die Zellen kein konfluentes Wachstum auf, wurde das Medium gewechselt um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Bei Erreichen von 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert, um sie für eine weitere Expansion aufzuteilen bzw. für Versuchsansätze auszusäen. Zur Passagierung wurde das Kulturmedium von den konfluenten Zellen abgesaugt und mit 10 ml PBS ohne Mg²⁺/Ca²⁺ gewaschen um alle Proteine und Ionen zu entfernen, die möglicherweise die Trypsinaktivität verringern. Anschließend wurde Trypsin/EDTA (0,04 %/0,03 %) hinzugegeben um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Zellablösung wurde die Reaktion durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml bzw. 50 ml konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde im passenden Medium resuspendiert und zur Weiterkultivierung in einem Verhältnis von 1/3 bis 1/10 ausgesät.

2.2.1.3 Isolation primärer alveolarer Epithelzellen

In dieser Arbeit wurden die alveolaren Epithelzellen Typ II (ATII) direkt isoliert. Aufgrund der geringen Verbreitung dieser Zellen wurden je Isolation 5 Mäuse im Alter von 3-5 Monaten verwendet. Nach 5 - 6 Tagen Inkubation auf Plastikschaalen differenzieren diese Zellen zu alveolaren Typ I (ATI) Epithelzellen aus. Die Präparation und Isolation der Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Mutze et al. [8], nach Dopps und Corti et al. [143], [144]. Ein Tag vor der ATII Isolation wurden pro verwendeter Maus 2 Petrischalen des Typs Falcon® „Petri Dish“ mit je 10ml DMEM

sowie 15µl CD16/CD32 und CD45 beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Diese Antikörper binden während der Isolation einen Großteil der kontaminierenden Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Am Tag der Isolation wurden die Lösungen aus Tabelle 11 hergestellt.

Tabelle 11: Medien für murine alveolare-epitheliale Zellen Typ I und Typ II

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
1 % Agaroselösung	
DMEM	5 ml
Agarose (ATII)	50 mg
Minus-Medium (Isolation)	
DMEM	250 ml
Penicillin/Streptomycin	1 %
HEPES	2,5 ml
Plus-Medium (Isolation)	
DMEM	250 ml
Penicillin/Streptomycin	1 %
DNAseI	10 mg
HEPES	2,5 ml
Medium (Kultivierung)	
DMEM	50 ml
FBS	10 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
Stopp-Medium	
DMEM	500 ml
FBS	10 %
Penicillin/Streptomycin	1 %

Zur Isolation wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet, das Fell in 70 % Ethanol getränkt und die Maus in Rückenlage fixiert. Die Trachea wurde freigelegt und über einen kleinen Einschnitt eine abgestumpfte Kanüle eingebunden. Das Abdomen wurde geöffnet und die Nierenarterie durchtrennt. Das Diaphragma wurde entfernt, das Sternum vorsichtig geteilt und die Rippenbögen aufgespannt. Der Thymus wurde im Ganzen entfernt, um eine Immunzellkontamination zu verhindern. Die linke Herzkammer wurde durch eine Schnitt geöffnet und über die rechte Herzkammer ein Katheter in die Pulmonalarterie eingeführt. Über diesen wurde mit 10 ml 0,9 % NaCl gespült, bis die Lunge vollständig weiß erschien. Über den Tubus wurden 1,5 ml Dispase und 0,3 ml Agaroselösung (37°C) eingefüllt. Der Tubus wurde

entfernt und die Trachea sofort abgebunden. Nach Aushärten der Agarose wurde die Lunge aus dem Thorax geschnitten und ohne Herz in 1 ml Dispase für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Alle weiteren Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Lungenflügel wurden separiert und die Zellen in 5 ml Plus-Medium mittels zweier Pinzetten herausgestrichen. Die vereinigten Zellen wurden durch eine 100 µm, 20 µm und 10 µm Nylon Membran filtriert und jeweils mit Plus-Medium gespült. Das Filtrat wurde auf 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 200 x g, 15°C (Beschleunigung Stufe 5 und Bremse Stufe 1), für 10 Minuten zentrifugiert. Die beschichteten Platten vom Vortag wurden mit Minus-Medium gespült und mit 1 ml Minus-Medium benetzt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Nach der Zentrifugation wurden die Zellpellets resuspendiert, vereinigt und zu je 5 ml pro beschichteter Platte in Minus-Medium ausgesät. Nach 30 Minuten bei 37 °C wurden die Zellsuspensionen wieder abgenommen, die Platten mit je 5 ml Minus-Medium 5 bis 8 mal gespült und die Lösungen vereinigt. Diese wurden für weitere 30 Minuten auf unbeschichteten Platten inkubiert um schneller anwachsende Fibroblasten zu entfernen. Der Überstand wurde wie zuvor vereinigt, gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml FCS-haltigen Medium resuspendiert und 2×10^6 Zellen pro Kavität einer 6-Lochplatte für weitere Versuche ausgesät.

2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit TRPV4-siRNA

Um ein transientes Ausschalten des Kanals zu erreichen wurden ATI-Zellen mit siRNA („Dharmacon Accell siRNA Delivery“) gegen den TRPV4-Kanal behandelt. ATII-Zellen wurden wie in der jeweiligen Versuchsbeschreibung ausgesät und an Tag 2 mit 1 µM siRNA in Hungermedium (0,1 % FCS) überführt. An Tag 6 wurden die Zellen je 1-mal mit Hungermedium gewaschen und in Hungermedium aufgenommen. Als Kontrolle diente ein nicht-kodierender „Non-targeting Pool“ der Acell siRNA in Hungermedium.

Tabelle 12: Sequenzen der verwendeten „Accell SMARTpool“ siRNAs spezifisch für TRPV4 mRNA und Kontroll siRNAs aus dem non-targeting pool

Sequenzname	Sequenz
Accell SMARTpool siRNA A-040742-13	CCAUUGACCUGUUGGAGUC
Accell SMARTpool siRNA A-040742-14	GCAACAUGCGUGAAUUCAU
Accell SMARTpool siRNA A-040742-15	UUACCAGUAUCAAGACUU
Accell SMARTpool siRNA A-040742-16	CUCUUGUGUAUUUUUUUUU UGGUUUACAUGUCGACUAA UGGUUUACAUGUUUUUCUGA
Accell Non-targeting Pool D-001910-10-20	UGGUUUACAUGUUUUCCUA UGGUUUACAUGUUGUGUGA UGGUUUACAUGUUGUGUGA

2.2.1.5 Isolation primärer Lungenfibroblasten

Zur Isolation von alveolaren Fibroblasten wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation getötet und der Thorax geöffnet. Nach Durchtrennung der Nierenarterie wurde die Lunge über einen Katheter durch die Pulmonalarterie mit PBS gespült, bis sie komplett blutleer war. Die Lungenflügel wurden entnommen und in eiskaltes PBS überführt. Unter der Sterilwerkbank wurden die Lungenflügel in eine 10 cm Kulturschale in 5 ml Kulturmedium (Tabelle 1) überführt und mit einem Skalpell in 1-2 mm² Stücke geschnitten. Für den Verdau, wurden 5 mg Collagenase 1 hinzugegeben und für 2 Std. bei 37 °C und 400 Umdrehungen pro Minute im Inkubationsschüttler inkubiert. Das verdaute Gewebe wurde durch einen 70 µm Filter in ein 50 ml Reaktionsgefäß gefiltert, mit dem flachen Ende einer Spritze durch den Filter gedrückt und mit 10 ml PBS gespült. Die Zellsuspension wurde bei 400 x g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und auf eine 10 cm Kulturschale ausgesät. Je nach Konfluenz wurden die Zellen alle 2 bis 3 Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet.

Tabelle 13: Medium für primäre murine Lungenfibroblasten (pmLF).

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
DMEM/F12	500 ml
FCS	20 %
Penicillin / Streptomycin	1 %

2.2.1.6 Behandlung von Zellen mit TGF-β1

Zur Induktion der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wurden Fibroblasten mit TGF-β1 behandelt. Fibroblasten wurden wie in der jeweiligen

Versuchsbeschreibung ausgesät und am nächsten Tag für 24 Std. in Hungermedium (0,1 % FCS) überführt. TGF- β 1 (gelöst in 0,1 % BSA in PBS) wurde in einer Konzentration von 2 ng/ml in Hungermedium 48 Std. auf die Zellen gegeben. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel.

2.2.2 Proteinbiochemie

Proteine wurden mittels „Western Blot“ detektiert und quantifiziert. Zunächst wurde die Gesamtheit der Proteine aus Zellen bzw. Geweben isoliert und die Konzentration bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden im Polyacrylamidgel („SDS-Page“) anhand einer elektrischen Spannung entlang des Größengradienten aufgetrennt. Im „Western Blot“ wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran übertragen und das zu analysierende Protein mittels Antikörperfärbung detektiert.

2.2.2.1 Proteinisolierung

Zur Isolierung von Proteinen wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem RIPA-Puffer (Tabelle 14) mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst. Für eine 10 cm Schale wurden 500 μ l, für eine Kavität einer 6-Lochplatte 100 μ l Puffer verwendet. Dem RIPA-Puffer wurde vor dem Gebrauch eine Complete Mini Tablette mit Protease-Inhibitor gelöst in 10 ml Puffer zugeben.

Tabelle 14: Zusammensetzung des RIPA-Puffers.

Konzentration	Substanz
1 %	Igepal CA 630
0,5 %	Na-deoxycholat
0,1 %	SDS (Natriumlaurylsulfat) in 1 x PBS

Das Lysat wurde unter gelegentlichem Schütteln für 60 Minuten auf Eis gestellt und im Anschluss bei 14000 Umdrehungen pro Minute, 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C gelagert.

Zur Proteinisolierung wurde das Lungengewebe durch Zugabe von Keramikugeln mit dem Precellys®24 Homogenisator (2 x 30sec/6000 Umdrehungen pro Minute) zerkleinert. Anschließend wurde der zerkleinerten Lunge 500 μ l RIPA-Puffer plus Protease-Inhibitor pipettiert und weiter wie bei der Proteinisolierung aus Zellen verfahren.

2.2.2.2 Isolierung der nukleären Fraktion

Um den Transkriptionsfaktor „Nuclear Factor of activated T-Cells“ (NFAT) nachzuweisen mussten die Proteine aus dem Zellkern isoliert werden. Die nukleäre Fraktion wurde mit dem „Nuclear Extraction Kits“ (Active Motif, Carlsbad, USA) nach Herstellerprotokoll isoliert. Nach Ablösen der Zellen wie in 2.2.2.1 wurden die Zellen durch Inkubation in hypotonem Puffer lysiert und nach Zugabe eines Detergenz die zytoplasmatische Fraktion im Überstand abzentrifugiert. Die Zellkerne im Pellet wurden lysiert und die nukleären Proteine mit einem Detergenz-freien Lyse-Puffer herausgelöst. Nach Zentrifugation wurde die nukleäre Fraktion im Überstand abgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Lysate erfolgte mit dem „BCA-Protein Assay Kit“ der Firma Pierce gemäß der Herstellerangaben. Das Prinzip beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} in Anwesenheit von Protein im alkalischen Medium (Biuret-Reaktion). Einwertiges Kupfer bildet mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Chelatkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm, der kolorimetrisch erfasst und über eine Standardkurve quantifiziert werden kann.

2.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch die Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese („SDS-Page“) werden Proteine, entlang eines elektrischen Feldes, entsprechend Ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die Proteine werden zuerst im Sammelgel auf einer Ebene konzentriert und anschließend im Trenngel aufgetrennt. Durch das Anlegen einer Spannung laufen die, durch das Natriumdodecylsulfat einheitlich negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode, wobei große Proteine langsamer durch die definierte Gelstruktur wandern, als kleinere Proteine. Ein definierter Molekulargewichtsmarker, der farblich markiert ist, zeigt die Lauffront des Gels sowie die Größen der Proteine auf der jeweiligen Höhe. Die Zusammensetzung des Trenngels ist in Tabelle 15 dargestellt, die des Sammelgels in Tabelle 16.

Tabelle 15: Zusammensetzung des 10 %igen Trenngels.

Lösung	Menge für 10 % Gel
Acrylamid / Bisacrylamid 30 %	2,5 ml
4 x TRIS / HCL pH 8,8	1,875 ml
H ₂ O (Millipore)	3,06 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS) in H ₂ O	50 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	10 µl

Tabelle 16: Zusammensetzung des 10 %igen Sammelgels.

Lösung	Menge für 10 % Gel
Acrylamid / Bisacrylamid 30 %	0,65 ml
4 x Tris / HCL pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O (Millipore)	3,05 ml
10 % APS in H ₂ O	50 µl
TEMED	10 µl

Die zuvor in 2.2.2.2 bestimmten Proteine wurden auf die gewünschte Konzentration mit RIPA-Puffer verdünnt und mit 6 x Lämmli-Puffer (Tabelle 17) versetzt. Die so denaturierten Proteine wurden für 10 Minuten bei 95 °C und 300 Umdrehungen pro Minute aufgekocht und für 15 Minuten ins Ultraschallbad gegeben.

Tabelle 17: Zusammensetzung des 6 x Lämmli - Puffers.

Konzentration	Substanz
375 Mm	4x Tris/ SDS Puffer (pH 6,8)
48 %	Glycerin
6 %	SDS (Natriumlaurylsulfat)
0,03 %	Bromphenolblau
9 %	β-Mercaptoethanol

Das Gel wurde in Laufpuffer gestellt, und je Tasche wurden 20 µl Proteinlysate mit gleicher Proteinkonzentration geladen. Das Gel lief im Sammelgel bei konstanten 70 V, im Trenngel bei 100 V bis die gewünschte Auftrennung erreicht war.

Tabelle 18: Laufpuffer für die Gelelektrophorese.

Konzentration	Substanz
250 mM	Tris Base
1,920 M	Glycin
35 mM / 1 %	SDS (Natriumlaurylsulfat)

2.2.2.5 „Western Blot“ und Immunfärbung

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden im „Western Blot“ auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran übertragen. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer (Tabelle 19) bei konstanten 20 mA (bzw. 180 mA für NFATc1 und NFAT5) für 20 Std. und 4 °C.

Tabelle 19: Transferpuffer für den „Western Blot“.

Konzentration	Substanz
250 mM	Tris Base
1,920 M	Glycin
7 mM	SDS (Natriumlaurylsulfat)

Der korrekte Transfer wurde im Anschluss mittels Ponceau-S überprüft. Nach ausreichendem Waschen wurden durch Inkubation der Membran für 2 Std. in 5 % Milchpulver in PBST unspezifische Bindungen geblockt. Dadurch band der im Anschluss zugegebene Erstantikörper nur dort, wo er eine größere Bindungsaffinität aufwies, als das Milchpulver. Die Erstantikörper wurden wie in Tabelle 10 verdünnt und für 20 Std. bei 4 °C inkubiert. Nach ausreichendem herunterwaschen des nicht gebundenen Erstantikörpers in PBST (Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween) wurde der Filter für weitere 2 Std. bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper (Tabelle 10) in PBST inkubiert. Nach erneutem waschen in PBST konnte durch Hinzugabe des entsprechenden Substrates (Tabelle 6) das Chemilumineszenzsignal am Odyssey®Fc-Gerät der Firma LI-COR detektiert werden.

2.2.3 Histochemie

Die Histochemie ermöglicht eine strukturelle Analyse, sowie die Färbung bestimmter Proteine oder Zellstrukturen in situ. Zur strukturellen Auswertung der mittleren Alveolarlänge („mean chord length“, MCL) wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet, da diese Methode aufgrund der schonenden Entwässerungsschritte die strukturellen Begebenheiten genau abbildet. Für Antikörperfärbungen wurden gefrorene Gewebsblöcke im Kryostat geschnitten, da Paraffin die Bindungen sowie die Intensitäten der Antikörper beeinflussen kann.

2.2.3.1 Einbettung von Lungen in Paraffin

Die Maus wurde narkotisiert und fixiert. Zu Beginn der Präparation wurde die Lunge über die Trachea mit 2,5% (m/v) Glutaraldehyd gefüllt und abgebunden. Die Lunge freigelegt und durch transkardiale Perfusion mit PBS wurde das Blut aus der Lunge

gespült. Hierzu wurde eine Flügelkanüle mit einer 10 ml Spitze in die linke Herzkammer eingestochen und durch sehr langsames Drücken gespült. Ohne Luft ins System zu bringen, wurde im Anschluss nochmals mit 4 % PFA (Paraformaldehyd) in PBS gespült. Die Lunge wurde entnommen, in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml 4 % PFA überführt und für 24 Std. bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift in 70 % Ethanol wurde die Lunge in eine Einbettkassette geladen. In der Infiltrationsanlage wurde dann die Lunge in definierte Schritten (Tabelle 20) in einer Alkoholreihe entwässert. Der Alkohol wurde durch Xylol verdrängt und anschließend durch Paraffin ersetzt. Die paraffinierten Schnitte wurden aus den Kassetten entnommen, halbiert und mit der Schnittfläche nach unten in Metallkassetten mit Paraffin aufgefüllt. Nach 1 Std. auf einer Kühlplatte wurden die Blöcke herausgelöst und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 20: Dehydrierung und Paraffin Infiltration.

Schritt	Lösung	Dauer
1	50 % Ethanol	1,5 Std.
2	50 % Ethanol	1,5 Std.
3	70 % Ethanol	3,0 Std.
4	70 % Ethanol	3,0 Std.
5	80 % Ethanol	3,0 Std.
6	96 % Ethanol	3,0 Std.
7	100 % Ethanol	3,0 Std.
8	100 % Ethanol	3,0 Std.
9	Xylol 1. Bad	3,0 Std.
10	Xylol 2. Bad	3,0 Std.
11	Paraffin 1. Bad	3,0 Std.
12	Paraffin 2. Bad	3,0 Std.
13	Paraffin 3. Bad	3,0 Std.

2.2.3.2 Paraffinschnitte und Masson-Trichrom Färbung

Die Blöcke wurden vor Beginn der Arbeit für mindestens 30 Minuten auf einer Kühlplatte auf -20°C abgekühlt. Am Mikrotom wurden die Blöcke eingespannt und mit einer Dicke von 5 µm geschnitten. Diese wurden in ein 37°C Wasserbad überführt um sie zu strecken und nach dem Aufnehmen mit einem Objektträger (Superfrost® Plus, Menzel-Gläser) über Nacht bei 37°C getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Vor der Färbung wurden die Paraffinschnitte für 10 Minuten bei 65°C erwärmt und das Paraffin durch 2 maliges waschen in Xylol entfernt. Gefärbt wurde nach Vorlage des Protokolls des „Masson-Goldner-Trichrom-Färbekit“ von Roth. Für ein besseres Ergebnis wurden 8 Minuten in Eisenhämatoxilinlösung, 6 Minuten in Goldner-Lösung

1, 1 Minute in Goldner-Lösung 2 und 5 Minuten in Goldner-Lösung 3 gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe von Roti®-Histokit 2 luftdicht verschlossen und bei 4°C gelagert.

2.2.3.3 Einbettung von Lungen in gefrorene Gewebsblöcke

Das Spülen und Fixieren der Lunge erfolgte wie in 2.2.3.1 beschrieben mit dem Unterschied, dass hier das PFA in 0,1 M Phosphatpuffer aus NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 gelöst wurde und die Lunge nicht mit 2,5% (m/v) Glutaraldehyd gefüllt wurde. Die fixierte Lunge wurde dann bei Raumtemperatur für 24 Std. in 4 %PFA geschüttelt, 24 Std. in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und für weitere 24 Std. in 18 % Saccharose entwässert. Die Lungen wurden wie die in Paraffin eingebetteten Lungen zerteilt und in Einbetterschälchen gelegt. Anstelle des Paraffin wurde hier ein „O.C.T.TM Gemisch“ von „Tissue-Tek“ (Sakura) verwendet und das Gewebe direkt am Kryostat bei -25 C eingefroren. Die Blöcke wurden bei -80°C gelagert.

2.2.3.4 Kryoschnitte und Immunfärbung

Die Blöcke wurden für mindestens 30 Minuten in den Kryostat gelegt um diese auf -20°C zu erwärmen. Die Blöcke wurden mit „O.C.T.TM Gemisch“ auf dem Haltestempel befestigt und in 10 µm Schnitte geschnitten. Diese wurden auf Superfrost® Plus Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden mit einem hydrophoben Stift („ImmEdge Pen“) umrandet um das Verlaufen der Antikörperlösung zu verhindern und 1 Std. bei Raumtemperatur getrocknet. Nach einem Waschschrift für 10 Minuten in PBS wurden die Schnitte für 30 Minuten geblockt. Die Blocklösung enthielt 0,2 % Triton X-100, sowie 5 % Ziegenserum. Ohne Waschschrift wurde nun mit dem Erstantikörper (Tabelle 10), verdünnt in Blocklösung, für 20 Std. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte 5-mal für 6 Minuten in PBS gewaschen und 1 Std. bei Raumtemperatur mit Zweitantikörper (Tabelle 10) in Blocklösung inkubiert. Nach 5 weiteren Waschsritten folgte eine Inkubation in Höchst für 3 Minuten um die Zellkerne zu färben. Nach 3-maligem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit „Dako“ Eindeckmedium luftdicht verschlossen und bei 4°C gelagert. Gefärbte Kryoschnitte wurden auf einem Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss Imager.M2, Carl Zeiss, Jena) und auf einem konfokalen Mikroskop (LSM 880, Carl Zeiss) quantifiziert. Die Färbungsintensität der Membranlokalisierung wurde entlang einer Linie vom Kern über Zytosol und in die Plasmamembran gemessen und mittels ImageJ quantifiziert.

2.2.4 Funktionelle Messungen

2.2.4.1 Kontraktionsmessung im Myograph

Mit dem Myograph können Kräfte, die Muskeln bei der Kontraktion ausüben quantifiziert werden. Hierzu werden Gefäßringe zwischen 2 bewegliche Haken gespannt und über einen Kraftwandler die Geschwindigkeit sowie Intensität der Kontraktion in Spannung (V) umgewandelt. Primäre Bronchien sowie die Aorta wurden aus WT und TRPV4^{-/-}-Mäusen isoliert, von Bindegewebe gesäubert und in Ringe geschnitten. Die Ringe wurden auf die Haken des Myographen (Abbildung 9) gespannt und die Kraftmessung auf 0 gesetzt. Die Kammern enthielten physiologischen Krebs-Henseleit-Puffer bei 37 °C, begast mit Carbogengas (95 % O₂, 5 % CO₂).

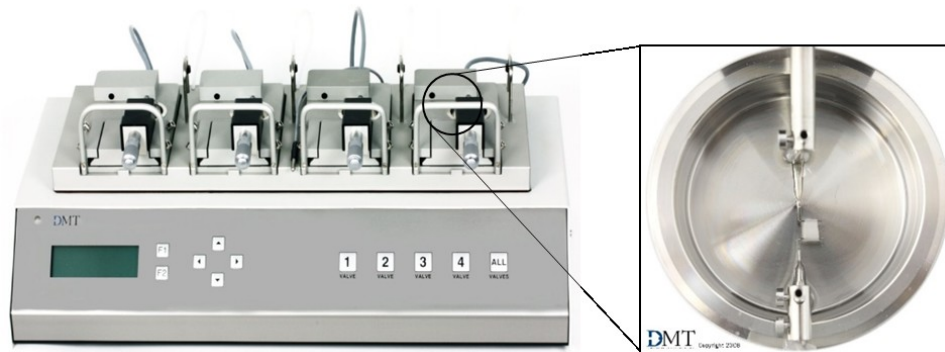


Abbildung 9: 610M Myograph (DMT) zur Messung der Kontraktion von Gefäßen und Bronchien. Die Vergrößerung zeigt eine der 4 Kammern mit aufgespanntem Bronchus. (Abbildung modifiziert nach DMT.dk)

Während der einstündigen Equilibrierungszeit wurde die Vorspannung stufenweise auf 2 mN erhöht. Mit 120 mM KCl wurde eine Membran Depolarisation ausgelöst und spannungsabhängige Kalziumkanäle aktiviert. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch eine TRP-Kanal unabhängige Kontraktion und diente als Positivkontrolle. Gewebe, welches keine Kontraktion zeigte, wurde verworfen. In Bronchien diente CCh (Carbachol), ein Acetylcholinanalogon, zur Aktivierung des muskarinischen Acetylcholinrezeptor und löste eine Kontraktion der bronchialen glatten Muskelzellen aus. Bronchien wurden schrittweise mit 0,5 µM, 1 µM und 10 µM CCh stimuliert. Nach 15 minütiger Kontraktionsdauer wurde mit 10 µM Atropin, einem Antagonisten am muskarinischen Acetylcholinrezeptor, relaxiert. In Aorten wurden 10 µM PE (Phenyleprin), ein Agonist am α₁-Adrenorezeptor, verwendet um glatte Gefäßmuskulatur zu kontrahieren. CCh wurde in den Aorten zur Relaxation verwendet, da es über muskarinische Acethylcholinrezeptoren die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) einen Vasodilator

im Endothel induziert. In beiden Geweben folgte eine erneute Vitalitätskontrolle mit 120 mM KCl. Die Kontraktion wurde im Verhältnis zur initialen KCl-Kontraktion normalisiert.

2.2.4.2 Quantifizierung der Ödembildung in der isolierten, perfundierten Lunge

Die Ischämie-Reperfusion-induzierte Ödembildung wurde mit der isolierten, perfundierten Lunge (IPL) von Hugo Sachs gemessen (Abbildung 10).

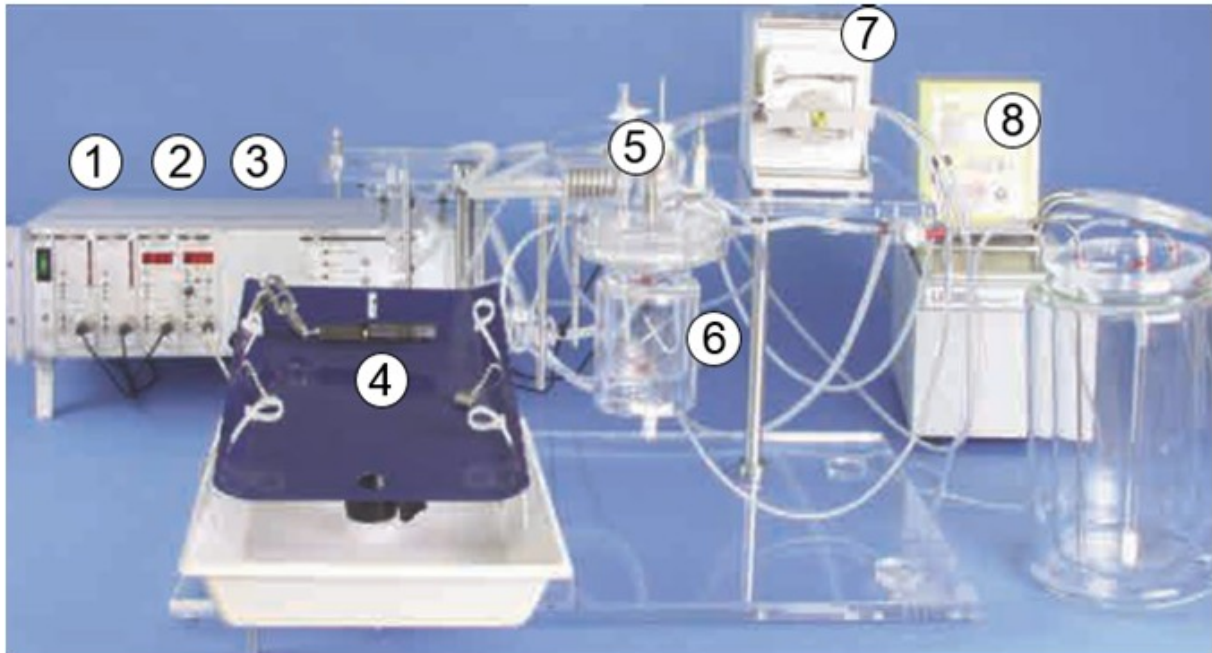


Abbildung 10: Isoliertes, perfundiertes Lungenmodell (Hugo Sachs). 1. Miniventilator, 2. VCM Kontrollmodul, 3. Plugsys Modul, 4. Präparationstisch, 5. Gewichtsmesser und Blasenfalle, 6. Beheizbare Lungenkammer, 7. Schlauchpumpe, 8. Wasserbad. (Abbildung modifiziert von *Isolated perfused lung system*. Hugo Sachs)

Die Präparation und der Versuchsablauf wurde nach Weissmann et al. durchgeführt [37]. Zur Vorbereitung wurde das Wasserbad zur Beheizung der Lungenkammer vorgewärmt, sowie die Elektrolytlösung (Tabelle 21) hergestellt. Dazu wurden je 100 ml Perfusionslösung 2,2 ml aus einer 8,4 %-igen Natriumhydrogencarbonat Stocklösung hinzugefügt und für ca. 30 Minuten mit Carbogengas (95 %O₂, 5 %CO₂) begast.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Elektrolytlösung zur Perfusion der isolierten, perfundierten Lunge.

Perfusionslösungen	Konzentration	Substanz
Natriumhydrogencarbonat	0,1848 mg/ml	Natriumhydrogencarbonatlösung Elektrolytlösung II N
Elektrolytlösung II N 200ml ILM-Perfusionslösung Hergestellt von der Apotheke Klinikum der LMU München, Lagerung bei RT	7,19 g	Natriumchlorid
	0,33 g	Kaliumchlorid
	0,27 g	Magnesium Hexahydrat
	0,36 g	Calciumchlorid Dihydrat
	0,15 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	2,67 g	Glucose-Monohydrat
	51,28 g	Hydroxyethylstärke 200000/0,5
	1000 ml	Aqua ad injectabilia

Die Maus wurde intraperitoneal mit Ketamin (100 mg/kg KG) und Xylazin (0,7 mg/kg KG) anästhesiert und antikoaguliert mit Heparin (500 IE/kg KG). Nach negativ ausfallender Reflexkontrolle wurde die Maus auf dem Präparationstisch, unterhalb des dort befestigten Gewicht- / Beatmungsmoduls (5. In Abbildung 10), fixiert. Durch stumpfes entfernen der Speicheldrüse und der umgebenden Muskulatur wurde die Trachea freigelegt und über einen Inzision die Beatmungskanüle eingebunden (Abbildung 11).

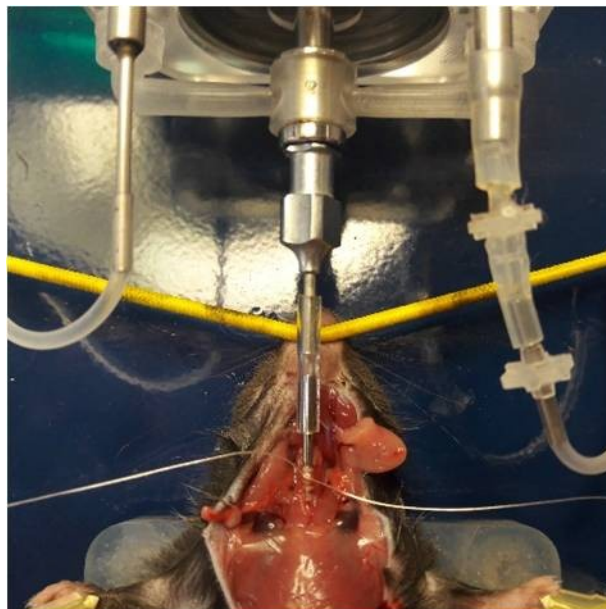


Abbildung 11: Intubierte Maus. An Gewichtsmesser und Beatmungsmodul angeschlossene Kanüle, eingebunden an die Trachea der narkotisierten Maus.

Am VCM Modul (2. In Abbildung 10) wurde die Positivbeatmung gestartet und die korrekte Beatmung optisch durch Heben und Senken des Brustkorbs kontrolliert. Der Zeitraum zwischen eigener Atmung der Maus und artifizieller Beatmung musste so

gering wie möglich gehalten werden, um einem Verkleben der Alveolen entgegenzuwirken. Nach dem Durchchnitt des Diaphragmas wurde das Sternum vorsichtig geteilt und die Rippenbögen aufgespannt. Der Thymus wurde entfernt und mittels Ligatur der Pulmonalarterie die Kanüle für den Zufluss der Elektrolytlösung eingebunden (Abbildung 12).

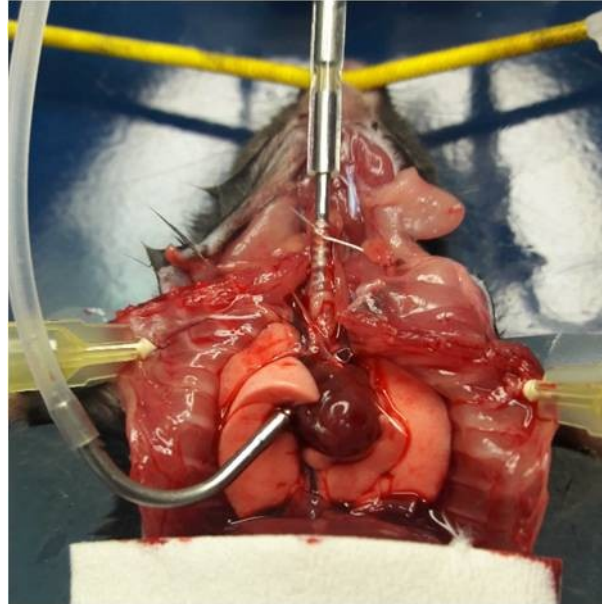


Abbildung 12: Geöffneter Thorax und Zuflusskanüle eingebunden in die Pulmonalarterie.

Hierbei war zu beachten, dass sowohl der komplette Zulauf als auch die Blasenfalle luftleer waren, um eine Lungenembolie zu vermeiden. Durch Punktion des linken Ventrikel wurde die Abflusskanüle gelegt (Abbildung 13) und, nach Erhöhung der Perfusion auf 0,5 ml/min, auf einen pulmonal-arteriellen Druck („pulmonary artery pressure“, PAP) von kleiner als 20 cmH₂O eingestellt, bevor die Kanüle eingebunden wurde.

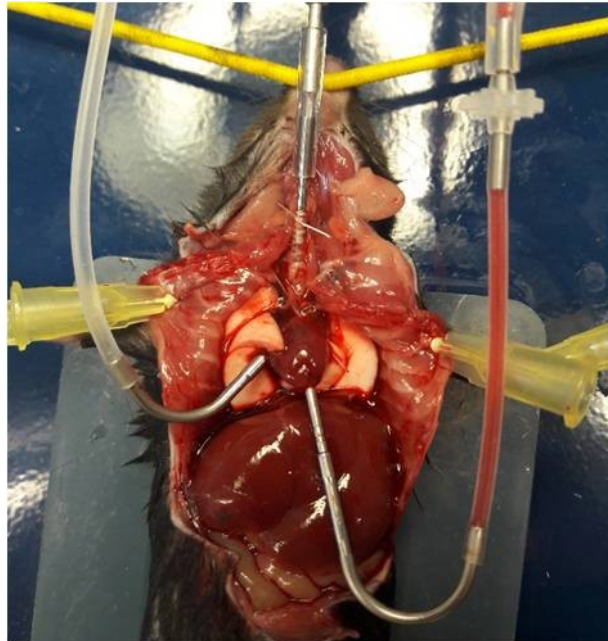


Abbildung 13: Mauslunge kurz vor Herausschneiden aus dem Thorax mit eingebundenem Zu- und Abfluss.

Speiseröhre und Aorta wurden durchtrennt. Durch leichtes ziehen am Gewichtsmodul mit der Trachealkanüle wurde die Lunge entlang der Wirbelsäule vom Thorax freigeschnitten und in die Lungenkammer überführt. Der Perfusionsfluss wurde schrittweise auf 2 ml/min erhöht. Das Gewicht wurde auf null zurückgesetzt und die Lunge für 15 Minuten perfundiert um. Je nach Protokoll folgten nun 90 Minuten Perfusionsstop (Ischämie) mit einer 120 minütigen Reperfusion mit 2 ml/min oder 210 Minuten kontinuierliche Perfusion als Kontrolle. Nach Beenden der Perfusion wurde das Gewicht in feuchtem- und nach 24 Std. Trocknung bei 50°C, in trockenem Zustand gemessen um über die Differenz die Aufnahme von Ödemflüssigkeit zu quantifizieren.

2.2.4.3 Quantifizierung der Lungenfunktion

Zur Überprüfung der physiologischen Lungenfunktion wurden anästhesierte Mäuse mit Hilfe des FlexiVent™ FX Module 2 vermessen. Die Narkose muss ausreichend für eine Unterdrückung des Atemreflexes sein, damit die Maus nicht gegen die mechanische Beatmung des Flexivent™-Moduls atmet. Eine zu hohe Dosierung ist allerdings kontraproduktiv, da die Maus schneller stirbt und dies zu einem Versteifen und Verkleben der Alveolen führt. Um ein langsames Anfluten der Narkose zu erreichen, wurden 1 ml Ketamin sowie 200 µl Xylazin in 6 ml isotonischer Kochsalzlösung angesetzt. Der Maus wurden dann subkutan 20 µl / g Körpergewicht injiziert. Nach negativ ausfallender Reflexkontrolle wurde die Trachea freigelegt und wie in 2.2.4 erklärt eine Kanüle eingebunden. Diese wurde mit der

Beatmungskassette des Flexivent™ verbunden. Die EKG Nadeln wurden nach Vorgabe von Scireq angelegt um Vitalwerte abzulesen. Die Messung der Lungenfunktion wurde mit dem sogenannten „mouse mechanic scan“ durchgeführt.

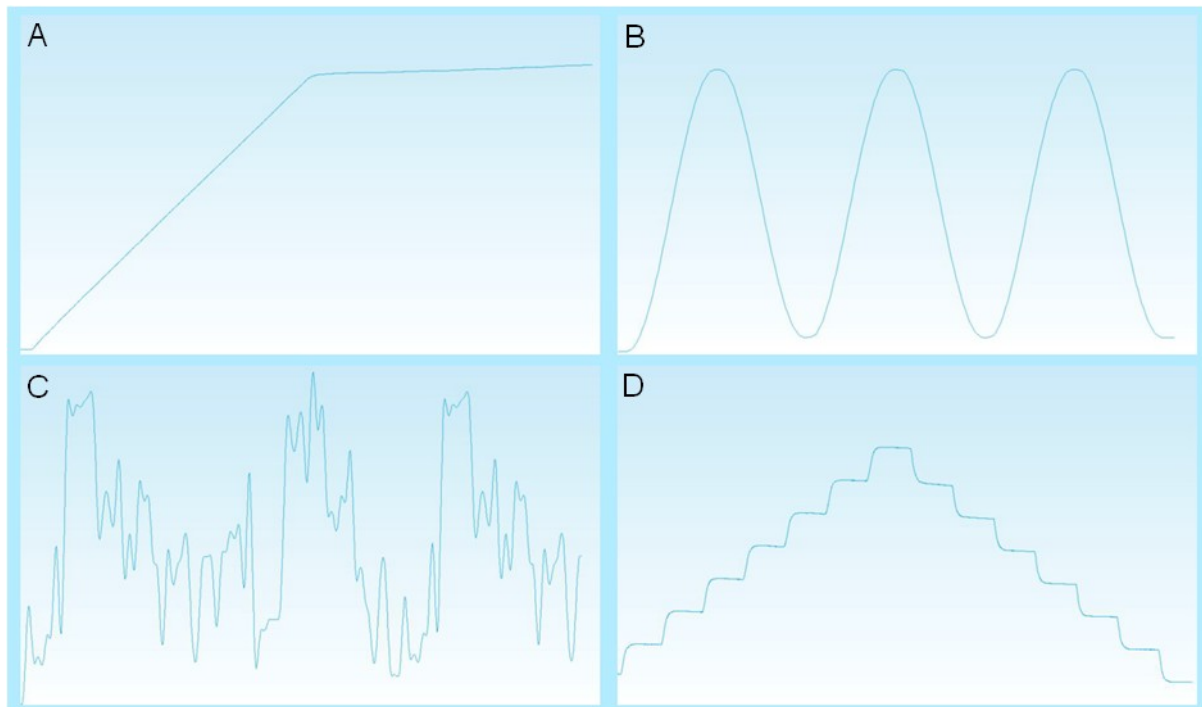


Abbildung 14: Darstellung der verschiedenen Atemmanöver. A: Tiefer Atemzug zur Untersuchung der totalen Lungenkapazität. B: "snap shot" zur Untersuchung der Lungendehnbarkeit. C: "quick prime" um zwischen oberen- und unteren Atemwegen zu unterscheiden. D: „pressure volume loop“ um die Menge der aktiv inhalierbaren Luft zu messen. (Abbildung modifiziert nach „measuring respiratory mechanics with the flexivent“, Emka)

Der „mouse mechanic scan“ fasst die 4 unterschiedliche Atemmanöver zusammen um Lungenparameter wie Lungenvolumen, Lungendehnbarkeit, Atemwegswiderstand sowie Unterschiede zwischen oberen- (Trachea und Bronchien) und unteren Atemwegen (Alveolen) zu untersuchen und ist in Abbildung 14 nochmals genauer dargestellt. Der „scan“ wurde je 3-mal durchgeführt. Bei gleichbleibenden Werten wurde der jeweils mittlere für die Auswertung herangezogen. Im Anschluss an die Messung wurde die Lunge zur PFA-Fixierung entnommen oder die Maus durch zervikale Dislokation getötet.

2.2.4.4 Quantifizierung der Zellmigration

Um die Migration und somit indirekt die Wundheilung zu untersuchen, kamen in dieser Arbeit die Ibidi® Silikoneinsätze zur Anwendung. Diese bieten, im Vergleich zum herkömmlichen „Scratch-assay“ bei dem mittels einer Pipettenspitze eine Wunde in den konfluenten Zellrasen gekratzt wird, den Vorteil, dass hier die entstehende Lücke standardisiert ist.

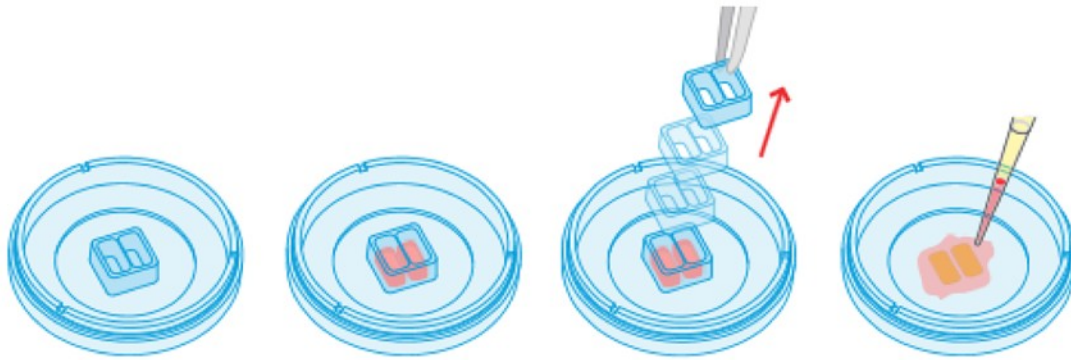


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Migrationsversuchs mittels Ibidi® Silikoneinsätzen. (Abbildung modifiziert nach ibidi.com)

Die isolierten Zellen aus 2.2.1.3 bzw. 2.2.1.4 wurden gezählt und 15.000 (pmLF) bzw. 44.000 (ATII)-Zellen pro Kavität in 70 μ l Medium in einen 2-Loch-Einsatz ausgesät. Um Proliferation auszuschließen und nur Migration zu quantifizieren, wurden die Zellen 24 Std. vor Abnehmen der Einsätze in Hungermedium (Kulturmedium mit 0,1 % FCS) gehalten. Die Einsätze wurden mit einer Pinzette abgelöst, im Anschluss die Zellen einmal mit Hungermedium gespült und aufgefüllt. Es wurden Bilder vor Ablösen, direkt nach Ablösen, sowie nach 1, 3, 5, 8, 12 und 24 Std. aufgenommen und die verbleibende Lücke mit Hilfe der Software ImageJ vermessen.

2.2.4.5 Messung des Zellwiderstands durch „Electric-Cell-substrate Impedance Sensing“ (ECIS)

Die morphologische Veränderung der Zellen und der Einfluss auf den Zellwiderstand wurden mit Hilfe des ECIS („Electric-Cell-Substrate Impedance sensing“, Applied Biophysics, Troy/NY, USA) gemessen. Mit dem Gerät werden Veränderungen in Zellmorphologie, Wachstumsdichte und Beschaffenheit der Zell-Zell- bzw. Zell-Elektrode Kontakte in nach Anlegen einer Wechselspannung (2000 Hz) durch Messung des elektrischen Widerstands (Impedanz) quantifiziert. Die 8W10E+ ECIS Kammern wurden mit 10 mM L-Cystein für 10 Minuten gereinigt und anschließend für mehrere Stunden mit fötalem Kälberserum (FCS) beschichtet. Ohne Waschschritt wurden je Well 10×10^5 primär isolierte ATII-Zellen ausgesät und während der Differenzierung zu ATI-Zellen über 160 Std. die gemessene Impedanz kontinuierlich aufgezeichnet.

2.2.4.6 Quantifizierung der Zellkontraktion

Nach der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten sollte ihre veränderte Kontraktionsfähigkeit in der Kollagen-Matrix analysiert werden. Dazu werden primär

isolierte Lungenfibroblasten in einer Kollagen-Gel-Matrix ausgesät und mit TGF- β 1 inkubiert, um eine Differenzierung zu Myofibroblasten zu induzieren. Die Mischung zur Herstellung der Matrix setzte sich zusammen aus 8 Teilen gekühlter Kollagenlösung (PureCol®), 1 Teil steriles 5x DMEM (1:1 aus 10 x DMEM und Millipore H₂O) sowie 1 Teil Millipore H₂O. Der pH-Wert der Mischung wurde auf 7,2-7,6 eingestellt. Alle bisherigen Schritte erfolgten bei 4°C auf Eis. 400 μ l der Kollagenlösung und 100 μ l pmLF Zellsuspension (3×10^6 Zellen/ml) wurden gemischt und pro Kavität einer 24-Lochplatte ausgesät. Nach 2 Std. bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank polymerisierte das Gel. Nach Zugabe von 1 ml pmLF Hungermedium (0,1 % FCS) mit 2 ng/ml TGF- β 1 bzw. Lösungsmittelkontrolle wurde für 48 Std. bei 37°C inkubiert. Um die Gelkontraktion zu initiieren, wurde das Gel mit einem Spatel von der Wand der Wellplatte gelöst. 120 Minuten nach Ablösen wurden Bilder aufgenommen und mittels der Software ImageJ der Umfang der kontrahierten Gelmatrix vermessen.

2.2.5 Auswertung und Statistik

Für die allgemeine Auswertung und Darstellung der experimentellen Daten, wurden die klassischen Programme EXCEL, PowerPoint und Word von Microsoft Office® verwendet. Messungen der isolierten Lunge, Lungenfunktionsmessungen, „Western Blots“ sowie Messungen am Myograph wurden mit den in Tabelle 9 erwähnten Softwareprogrammen durchgeführt und für weitere Auswertungen in Excel exportiert. Zur Ermittlung des mittleren Alveolendurchmessers (MCL) wurden aus mehreren Lungenschnitten 10 - 20 Bilder mit Hilfe des 20 x-Objektivs in zufällig ausgewählten Bereichen aufgenommen und mit einem Linienraster und Punkten überlagert. Die Unterbrechungen der Linien auf der Alveolarwand (L_{septa}) und im Luftraum lokalisierten Punkten (P_{air}) wurden gezählt und als $MCL = \frac{\sum P_{\text{air}} \times L(p)}{\sum L_{\text{septa}} \times 0,5}$ berechnet, wobei $L(p)$ die Linienlänge pro Punkt ist. Die wissenschaftliche Darstellung und statistische Analyse aller Daten erfolgte mittels GraphPad Prism der Firma GraphPad Software. Zunächst wurde mit „D’Agostino und Shapiro-Wilk“ auf Normalverteilung analysiert. Waren alle Werte normalverteilt, wurde parametrisch mittels „Welch’s Test“ getestet, bei nicht normalverteilten Daten folgte ein nicht-parametrischer Test wie der „Mann-Whitney-Test“ oder die „Bonferroni Verteilung“. Je nach experimentellen Aufbau und Anzahl der Messgruppen wurde der einfache t-Test oder die Varianzanalyse „Two Way Anova“ angewandt. Fehlerbalken wurden als Standardfehler des Mittelwertes („Standard

error of the mean“, SEM) angegeben. Signifikante Unterschiede entsprachen einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ (*), 0,01 (**) und 0,001 (***).

3 Ergebnisse

3.1 Expression des TRPV4-Kanals in WT- und TRPV4-defizienten Lungen

Um die Anwesenheit des TRPV4-Proteins in der in dieser Arbeit benutzten TRPV4-defizienten Mauslinie zu überprüfen, wurde die Proteinexpression mittels „Western Blot“ untersucht. Verwendet wurden 40 µg Gesamtlungenlysat. Als Positivkontrolle diente eine Zelllinie mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEF), die den TRPV4-Kanal exprimieren [145]. Als Ladekontrolle diente β-Actin.

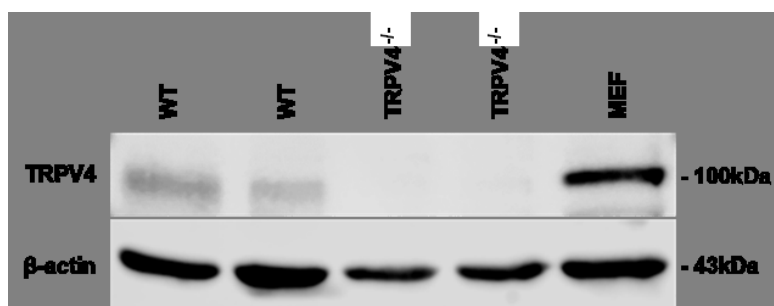


Abbildung 16: Wild-Typ (WT)- und TRPV4-defiziente (TRPV4^{-/-})-Lungenlysate wurden in einem „Western Blot“ mit einem TRPV4-spezifischen Antikörper analysiert. Murine embryonale Fibroblasten (MEF) dienen als positiv Kontrolle und β-Actin als Ladekontrolle. Es wurde je 40 µg Gesamtprotein geladen.

Der „Western Blot“ zeigte die spezifische Bande bei 100 kDa in den Wildtyp Lungen sowie in der Positivkontrolle (Abbildung 16). Da keine Proteinbande in den TRPV4^{-/-}-Lungenlysaten nachgewiesen werden konnte, wurde das Fehlen des Kanals in Lungen der verwendeten TRPV4^{-/-}-Mauslinie bestätigt.

3.2 Kontraktion von glatten Muskelzellen der Atemwege in WT- und TRPV4-defizienten primären Bronchien

Um eine Beteiligung des TRPV4-Kanals an der Kontraktion der Atemwege zu untersuchen wurden Versuche am Myographen (2.2.4.1) durchgeführt. Dazu wurde die Kontraktion von alveolaren, glatten Muskelzellen in primären Bronchien, nach Applikation von Carbachol (CCH, 10 µM), vermessen. Zum Vergleich wurden Aortenringe mittels Phenylephrin (PE, 10 µM) kontrahiert. Beide Messungen wurden auf die durch KCl (120 mM)-vermittelte Kontraktion mittels direkter Aktivierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen normiert.

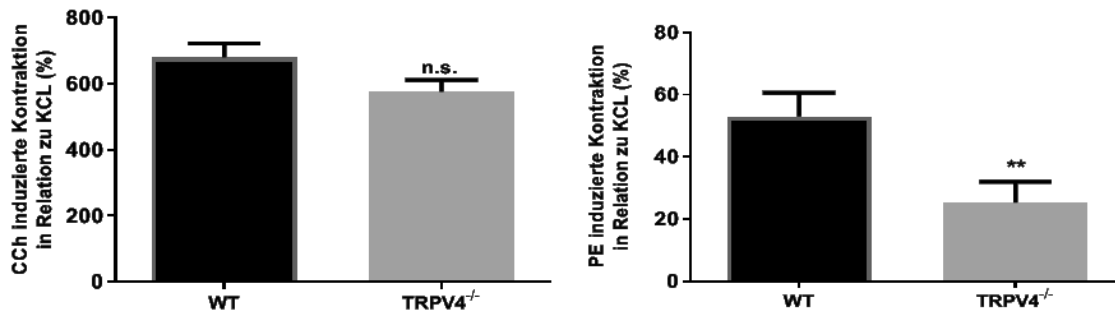


Abbildung 17: Kontraktionsmessungen am DMT "Multi Wire Myograph" mit primären Bronchialringen (links) und thorakalen Aortenringen (rechts). Die Kontraktion erfolgte nach Applikation von Carbachol (CCh, 10 μ M) bzw. Phenylephrin (PE, 10 μ M) und wurde auf die KCL (120 mM)-vermittelte Kontraktion normiert. Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 15 \pm$ SEM, ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant.

Die Messungen am Myographen zeigten, dass im Gegensatz zu den Aortenringen ein TRPV4-Defizit in primären Bronchien zu keiner veränderten Kontraktion führt. Weitere Untersuchungen zur TRPV4-Funktion in den glatten Muskelzellen der Bronchien wurden somit nicht mehr durchgeführt.

3.3 TRPV4-Funktion in Myofibroblasten während der Ausbildung einer Lungenfibrose

In Zusammenarbeit mit Katharina Hofmann konnte bereits eine wichtige Rolle des durch „transforming growth factor β “ (TGF- β) exprimierten TRPC6-Kanals an der Myofibroblasten Differenzierung und der Ausbildung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose gezeigt werden [69]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine Beteiligung der in primären Lungenfibroblasten konstitutiv exprimierten TRPV4-Kanälen an der Bildung von Myofibroblasten nachweisen [45], ohne jedoch funktionelle Messungen zur Myofibroblasten-Kontraktion und -Migration durchzuführen. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die Kontraktion und Migration von – durch TGF- β differenzierten – Myofibroblasten aus Wild-Typ und TRPV4-defizienten Mäusen verglichen.

3.3.1 Reduzierte Kontraktion von Fibroblasten aus TRPV4-defizienten (TRPV4^{-/-})-Mäusen im Vergleich zu Wild-Typ (WT)-Kontrollen

Zur Analyse der Kontraktilität wurden primäre murine Lungenfibroblasten (pmLF) wie beschrieben [69] aus Mäusen isoliert, in eine Gelmatrix gegossen und nach Applikation von TGF- β zu Myofibroblasten differenziert. Myofibroblasten tragen durch

ihre deutlich höhere Kontraktilität zu einer Versteifung der Lunge während der Ausbildung einer Fibrose bei. Diese gesteigerte Kontraktion wurde mittels eines im Labor etablierten (siehe [69]) in-vitro Gel-Kontraktionstests untersucht.



Abbildung 18: In-vitro Gel-Kontraktionstest. Aufnahmen einer Kavität einer 24-Lochplatte mit einer Gelmatrix mit TGF- β differenzierten Myofibroblasten vor der Ablösung des Gels (links) sowie 2 Std. (Mitte) und 12 Std. (rechts) nach dem Ablösen.

Abbildung 18 zeigt Aufnahmen eines Gels vor der Ablösung, sowie 2 und 12 Std. nach dem Ablösen. Maximale Unterschiede waren 2 Std. nach Versuchsbeginn zu beobachten.

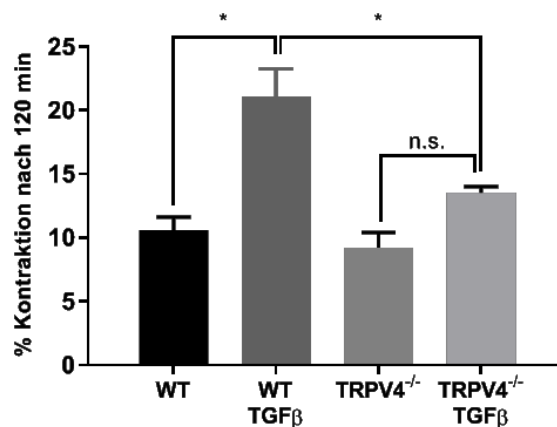


Abbildung 19: Zusammenfassung der Ergebnisse des in-vitro Gel-Kontraktionstests 2 Std. nach Ablösen des Gels von der Wand der Kavität. Primäre murine Lungenfibroblasten (pmLF) wurden für 48 Std. mit 2 ng/ml TGF- β bzw. mit Lösungsmittel behandelt. Angegeben ist die Kontraktion in %, die der Schrumpfung der Gelmatrix entspricht. Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 3$ Mäusen \pm SEM, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$.

Gel-Matrices mit Wild-Typ, TGF- β 1 differenzierten Myofibroblasten zeigten eine stärkere Kontraktion als Matrices unbehandelter Fibroblasten. Es konnte aber keine signifikante Änderung der Kontraktion der Gelmatrices mit TRPV4-defizienten Myofibroblasten im Vergleich zu unbehandelten TRPV4^{-/-}-Fibroblasten beobachtet werden. Die TGF- β 1-induzierte Differenzierung zu Myofibroblasten und / oder eine daraus folgende Kontraktionssteigerung konnte also für die TRPV4-defizienten Fibroblasten nicht festgestellt werden.

3.3.2 Lungenfibroblasten aus TRPV4-defizienten Mäusen migrieren schneller als Wild-Typ (WT)-Kontrollzellen

Die Migration von primären Lungenfibroblasten kann durch Schließen einer Lücke in einem Zellrasen quantifiziert werden.

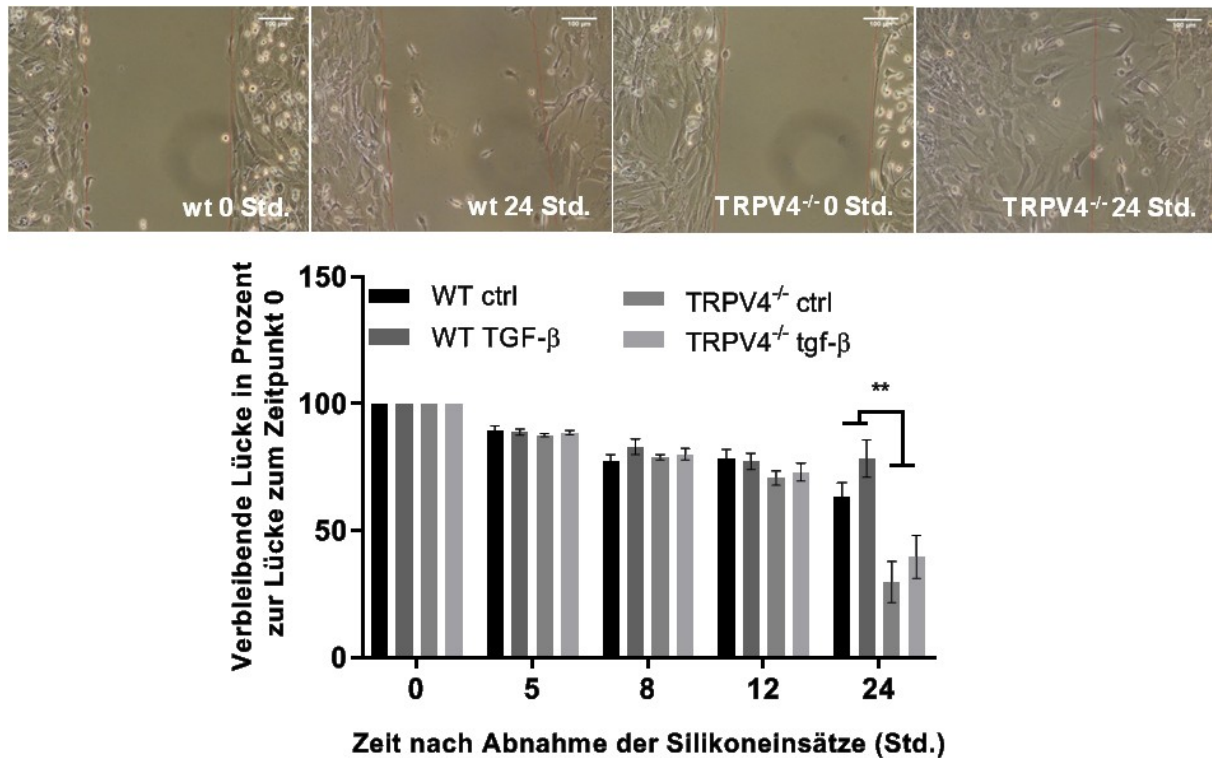


Abbildung 20: Quantifizierung der Zellmigration von WT- und TRPV4^{-/-}-(Myo)Fibroblasten. Repräsentative Aufnahmen zeigen WT- und TRPV4^{-/-}-Zellen 0 und 24 Std. nach dem Entfernen der Zellkultureinsätze und der Freigabe einer Lücke im Zellrasen. Für die Auswertung wurde die verbleibende Lücke in mit 2 ng/ml TGF-β1 oder Lösungsmittel behandelten Zellen prozentual zur Anfangsgröße bei 0 Std. gemessen. Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 3 \pm \text{SEM}$; ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$.

In Abbildung 20 wird gezeigt, dass WT-Zellen unabhängig von einer Behandlung mit TGF-β1 nach 24 Std. eine noch um ca. 75 % offene Lücke aufwiesen, wohingegen TRPV4^{-/-}-Fibroblasten die Lücke annähernd schließen konnten. Die Deletion des TRPV4-Kanals scheint also die Migration der Fibroblasten zu fördern. Dass TGF-β1 keinen Effekt auf die Migration der Fibroblasten hatte, deutet auf ein ähnliches Migrationsverhalten von Fibroblasten und Myofibroblasten hin.

3.4 Ischämie-Reperfusion-induzierte Ödembildung

Nach einer Lungentransplantation mit daraus folgenden Unterversorgung und anschließender Reperfusion des Transplantats, stellt das Ischämie-Reperfusionsoedem die häufigste Komplikation im Patienten dar. Da wir bereits in früheren Arbeiten eine Beteiligung des TRPC6-Kanals am

Ischämie-Reperfusion-induzierten Lungenödem zeigen konnten [37], lag es nahe, in diesem Modell der isolierten, perfundierten Lunge (IPL, 2.2.4) auch mögliche Funktionen des TRPV4-Kanals zu untersuchen.

3.4.1 Ablation von TRPV4 erhöht die Ischämie-Reperfusion (IR)-induzierte Ödembildung in isolierten, perfundierten Mauslungen

Um die Rolle von TRPV4 bei der Bildung von IR-induzierten Ödemen zu untersuchen, wurden Lungen aus Wildtyp (WT)- und TRPV4-defizienten (TRPV4^{-/-})-Mäusen isoliert.

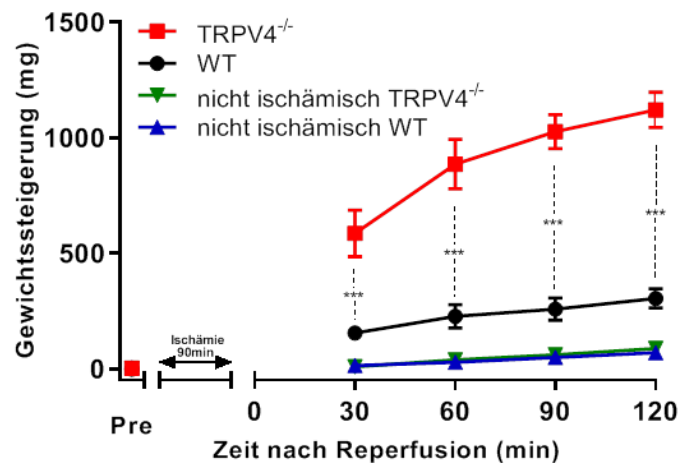


Abbildung 21: Konstante Gewichtsmessung an der isolierten, perfundierten Lunge. Vergleich von WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen nach Ischämie und anschließender Reperfusion oder unter konstanter Perfusion (nicht ischämisch). Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 5 \pm SEM$, *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$.

Nach initialer Perfusion für 15 Minuten, gefolgt von 90 Minuten Perfusionsstopp (Ischämie) und 120 Minuten Reperfusion, zeigten TRPV4-defiziente Lungen eine verstärkte Bildung von Lungenödem, was sich durch einen erheblich höheren Anstieg des Lungengewicht im Vergleich zu WT-Lungen (Abbildung 21) äußerte. Die WT-Kontroll-Lungen zeigten einen ähnlichen Gewichtsanstieg wie in unseren früher publizierten Experimenten [37].

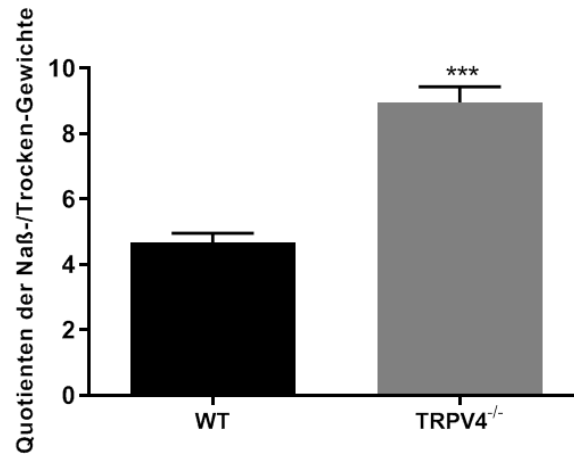


Abbildung 22: Quotienten der Nass-/Trocken-Gewichte von WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen nach Ischämie und Reperfusion im isolierten, perfundierten Lungenmodell (IPL). Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 4 \pm \text{SEM}$, *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$.

Dieses Phänomen war ebenfalls im Vergleich der Quotienten der Nass-/Trocken-Gewichte zu beobachten, die mit der aufgenommenen Flüssigkeit während der Ödembildung korrelieren (siehe Abbildung 22).

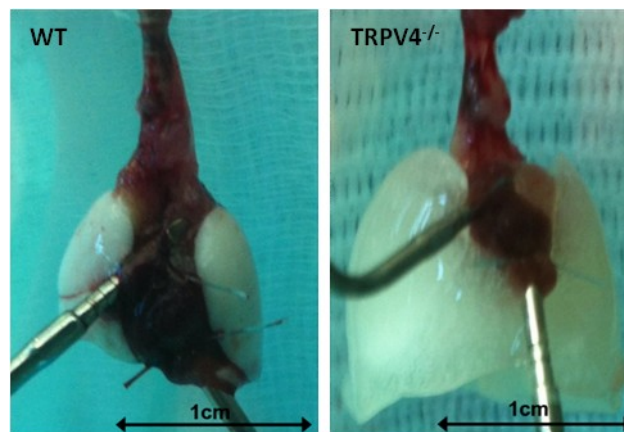


Abbildung 23: Repräsentative Aufnahmen von WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen nach Ischämie und Reperfusion im isolierten, perfundierten Lungenmodell (IPL).

Darüber hinaus waren die Unterschiede in der Ödembildung in den TRPV4^{-/-}-Lungen im Vergleich zu den WT-Lungen mit bloßem Auge sichtbar. Abbildung 23 zeigt repräsentative Bilder nach Ischämie und Reperfusion der Lungen. Deutlich erkennbar ist die größere Flüssigkeitsansammlung in den Lungen ohne TRPV4-Kanal.

3.4.2 Einfluss der initialen Perfusion auf die Ischämie-Reperfusion-induzierte Ödembildung

Da bekannt war, dass der TRPV4-Kanal auch durch Scherstress aktiviert wird, der durch eine hohe Perfusionsgeschwindigkeit verursacht werden kann, wurde der

Ischämie-Reperfusionversuch auch unter geringerer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml – anstelle von 2 ml/min – durchgeführt.

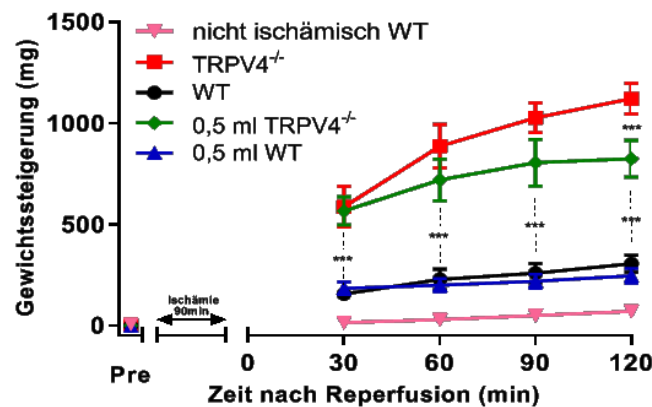


Abbildung 24: Konstante Gewichtsmessung an der isolierten, perfundierten Lunge. Vergleich von WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen nach Ischämie und Reperfusion oder unter konstanter Perfusion (nicht Ischämisch). Der initiale Perfusionsfluss wurde von 2ml/min (Standardbedingungen) auf 0,5 m/min gesenkt (0,5 ml TRPV4^{-/-}, 0,5 ml WT). Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 5 \pm SEM$, *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$.

In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass der Perfusionsfluss vor der Ischämie und Reperfusion keinen Einfluss auf die Ödembildung der WT-Lungen hatte und nur eine geringe Erhöhung der Ödembildung der TRPV4-defizienten Lungen verursachte. Einen Einfluss der möglichen Aktivierung von TRPV4 durch Scherstress in den WT-Lungen auf die Ödembildung kann also genauso ausgeschlossen werden, wie eine mögliche Vorschädigung der Lungen durch den erhöhten Perfusionsfluss.

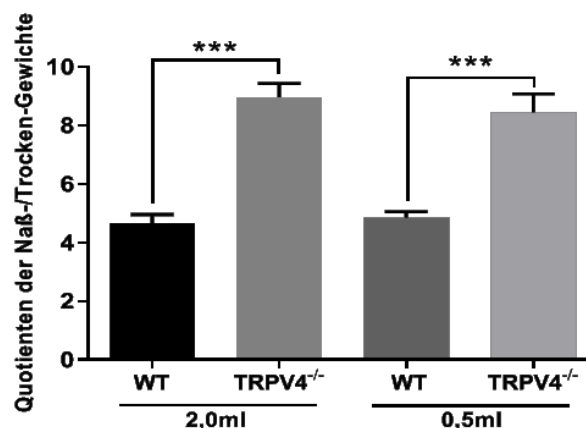


Abbildung 25: Quotienten der Nass-/Trocken-Gewichte von WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen nach Ischämie und Reperfusion im isolierten, perfundierten Lungenmodell (IPL) unter einer initialen Perfusionsgeschwindigkeit von 2,0 oder 0,5 ml/min (2,0 ml, 0,5 ml). Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 4 \pm SEM$, *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$.

Auch die Berechnung der Quotienten der Nass-/Trocken-Gewichte bestätigte dieses Ergebnis. Hier war der kleine Unterschied in der Ödembildung der TRPV4^{-/-}-Lungen nicht erkennbar und die Gewichtszunahme für die Genotypen unter beiden

Perfusionsbedingungen ähnlich, was vermutlich an der ungenaueren Messmethode lag.

3.4.3 TRPV4/TRPC6-defiziente Lungen zeigen eine ähnliche Ischämie-Reperfusion (IR)-induzierte Ödembildung wie WT-Lungen

Die bisherigen Ergebnisse stehen in deutlichem Kontrast zu Beobachtungen an TRPC6-defizienten Lungen, die aufgrund einer verringerten Endothelzellpermeabilität [37] vor IR-induzierten Ödemen geschützt sind. Deshalb haben wir ein TRPV4/TRPC6-Mausmodell entwickelt und die Ödembildung in der isolierten, perfundierten Lunge (IPL) quantifiziert.

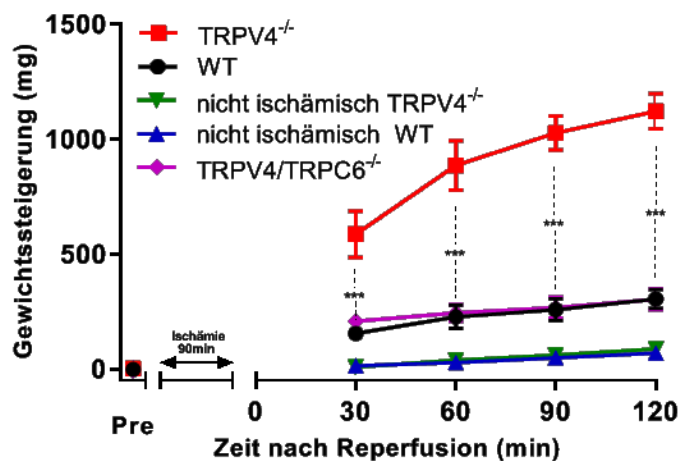


Abbildung 26: Konstante Gewichtsmessung an der IPL. WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen mit Ischämie und Reperfusion oder konstanter Perfusion (nicht ischämisch) im Vergleich zu ischämischen TRPV4/TRPC6^{-/-}-Lungen. Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 5 \pm \text{SEM}$, *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$.

Die doppelt defizienten Lungen zeigten eine ähnliche Ödementwicklung wie die WT-Lungen (Abbildung 26).

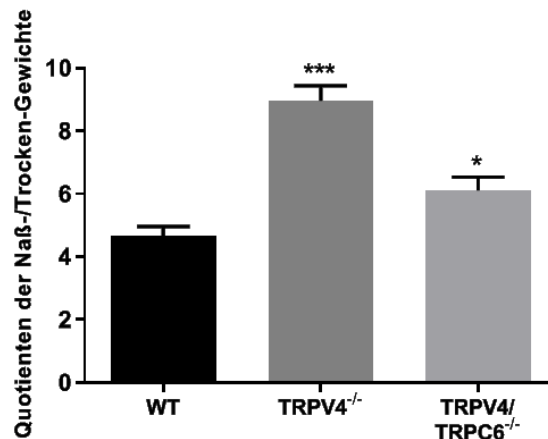


Abbildung 27: Quotienten der Nass-/Trocken-Gewichte in WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen im Vergleich zu TRPV4/TRPC6^{-/-}-Lungen nach Ischämie-Reperfusion an der IPL. Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 5 \pm \text{SEM}$, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$.

Die Berechnung der Quotienten der Nass-/Trocken-Gewichte ergaben geringe Unterschiede zwischen WT- und TRPV4/TRPC6^{-/-}-Lungen (siehe Abbildung 27). TRPV4/TRPC6-doppeldefiziente Lungen zeigten eine leicht gesteigerte Flüssigkeitsaufnahme. Die Ödem steigernden Effekte durch das TRPV4-Defizit können also zu mindestens zum Teil durch die geringere Endothelzellpermeabilität von TRPC6-defizienten Lungen reduziert werden.

3.5 Lokalisation und mögliche Funktion von TRPV4-Kanälen in der Lunge

Da der TRPV4-Kanal in hohem Maße im Lungenendothel exprimiert wird und seine Aktivierung dort zu einer Erhöhung – nicht zu einer Reduktion – der Endothelpermeabilität (zusammengefasst in [146]) führt, konzentrierten wir uns auf seine mögliche Funktion in alveolaren Epithelzellen, die die zweite natürliche Barriere für die Ödembildung darstellen.

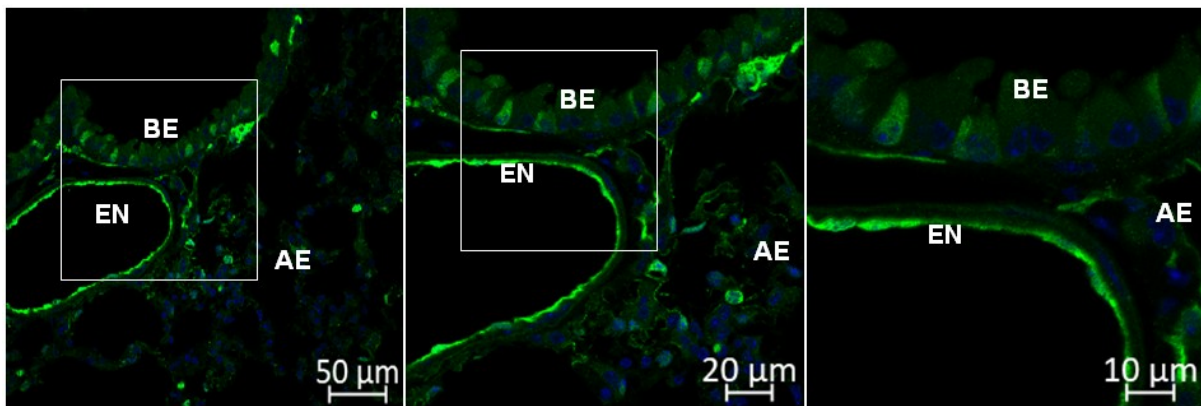


Abbildung 28: TRPV4-Expression in der Mauslunge. GFP Färbung (grün) durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper auf Lungen-Kryoschnitten von TRPV4eGFP-Reporter-Mäusen. TRPV4-Expression zeigt sich im Lungen-Endothel (EN) bronchialen Epithelzellen (BE) und in alveolaren Epithelzellen (AE). Eine Färbung der Zellkerne wurde mit Höchst-Farbstoff (blau) durchgeführt..

Eine Analyse von Mäusen, die das eGFP („enhanced green fluorescent protein“)-Reporterprotein unter der Kontrolle der „TRPV4-Promotor / Enhancer“-Region exprimieren, zeigte eine deutliche Expression des TRPV4-Proteins im Endothel sowie im Bronchial- und Alveolarepithel (Abbildung 28, grün). Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit Höchst-Farbstoff (Abbildung 28, blau).

3.5.1 Expression von TRPV4-Proteinen in alveolaren Epithelzellen

Aufschlüsse über eine mögliche Lokalisation von TRPV4-Proteinen in ATI-Zellen sollten Versuche zur Koexpression von AQP-5 und TRPV4 in Kryoschnitten der Lungen von TRPV4-eGFP Reporter-Mäusen liefern. In den Alveolen zeigte die Färbung mit einem gegen Aquaporin-5 (AQP5, (Abbildung 29, rot)) gerichteten Antikörper, einem Marker Protein für ATI-Zellen, die an der Bildung von Lungensepten beteiligt sind, eine rote Färbung in der Plasmamembran. Eine zusätzliche Grün-Färbung des Zytosols durch exprimiertes eGFP, welches durch den GFP-Antikörper erkannt wird, spiegelte die TRPV4-Expression in diesen Zellen wider (siehe Abbildung 29).

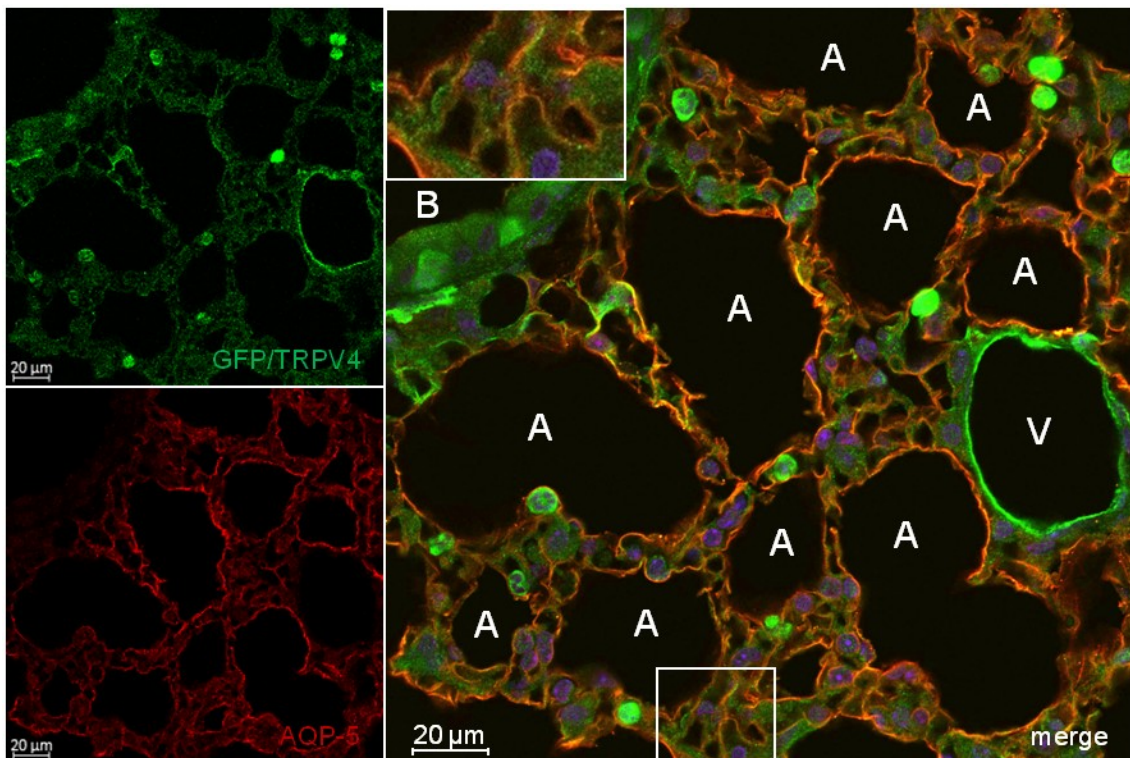


Abbildung 29: Lungen-Kryoschnitte von TRPV4eGFP-Reportermäusen wurden mit fluoreszenzgekoppelten Antisera gegen GFP und AQP-5 gefärbt. Angeregt wurde bei 488 nm für eGFP (grün, links oben) oder bei 561 nm für AQP-5 (rot, links unten). Die Kernfärbung wurde mit Hoechst-Farbstoff (blau) durchgeführt. A, Alveole; B, Bronchus; V, Gefäßsystem.

Zusätzlich konnte die Expression von TRPV4-mRNA mit der Nanostring®-Technologie in primären, murinen Lungenfibroblasten (pmLF), pulmonalen, arteriellen, glatten Muskelzellen (PASMC), alveolaren Typ II-Epithelzellen (ATII) und Endothelzellen (EC) nachgewiesen werden (Abbildung 30). Die Nanostring®-Messungen wurden von Martina Kannler durchgeführt.

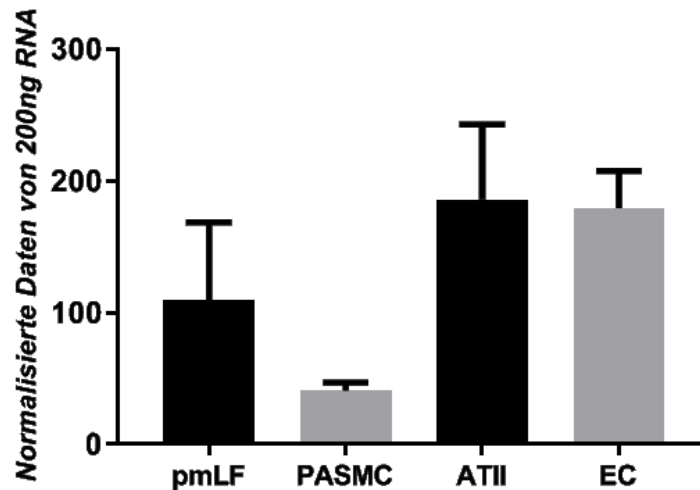


Abbildung 30: TRPV4-mRNA-Quantifizierung in Lungenzellen mit der Nanostring®-Technologie. ATII, alveolare Typ II-Epithelzellen; EC, Endothelzellen; PASMC, pulmonale, arterielle, glatte Muskelzellen; pmLF, primäre murine Lungenfibroblasten.

3.5.2 TRPV4-Defizienz vermindert die Aquaporin-5-Expression in ATI-Zellen

Die Interaktion zwischen Aquaporinen und TRP-Kanälen, wie auch die Regulierung verschiedener Aquaporine durch TRPs ist bereits beschrieben [147]–[149]. Auch die gezeigte Koexpression lässt dies vermuten. Die Färbung von Lungenschnitten mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, die für den wasserleitenden Kanal Aquaporin-5 spezifisch sind, ergab geringere Gesamtexpressionsniveaus in Septen-bildenden ATI-Zellen und verringerte Plasmamembranlokalisation in TRPV4-defizienten Lungen im Vergleich zu WT-Lungen (Abbildung 31).

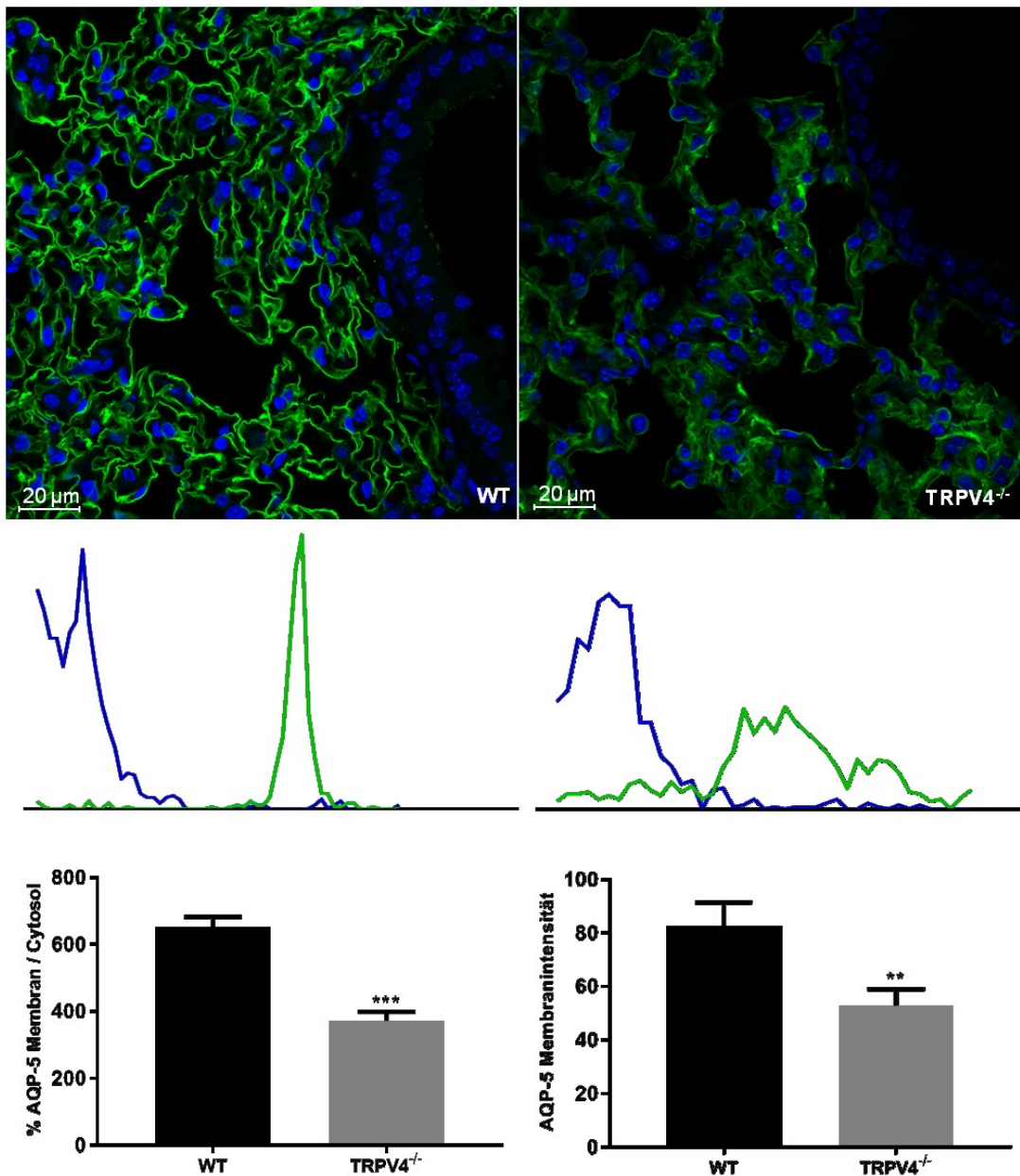


Abbildung 31: Aquaporin-5 (AQP-5) Expression und Translokation in die Plasmamembran in WT- und TRPV4^{-/-}-Alveolarepithelzellen vom Typ I (ATI). Kryoschnitte von WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen, die mit einem AQP-5-spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörper angefärbt wurden. Die Kernfärbung wurde mit Hoechst-Farbstoff (blau) durchgeführt. Repräsentative Histogramme zur Quantifizierung von AQP-5-Protein in der Plasmamembran von WT- (links) und TRPV4-defizienten ATI-Zellen (rechts). Zusammenfassungen der Quantifizierung der AQP-5-Proteinexpression in Plasmamembranen (AQP-5 in Membranen (rechts) und im Verhältnis zum Cytosol (% Aquaporin 5-Membran / Cytosol (links)). Daten zeigen Mittelwerte von n 15 (3 Mäuse) ± SEM, ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$

Diese Ergebnisse wurden durch „Western Blots“ von Lungenlysaten bestätigt, die mit einem AQP-5-spezifischen Antikörper markiert wurden (Abbildung 32).

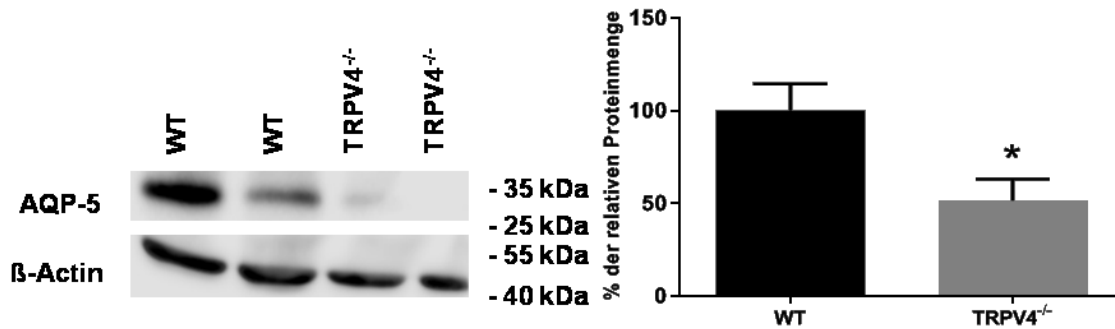


Abbildung 32: Repräsentative „Western Blot“-Analyse der Aquaporin-5 (AQP-5)-Expression in WT- und TRPV4^{-/-}-Gesamtlungenlysate (links) und Zusammenfassung der Quantifizierung der AQP-5-Expression in Lungenlysaten von TRPV4^{-/-}- und WT-Mäusen (rechts). Es wurde je 40 µg Gesamtprotein geladen. Daten zeigen Mittelwerte von $n = 6 \pm \text{SEM}$, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$.

Im klaren Gegensatz zu diesen Ergebnissen waren die Proteinspiegel von Aquaporin-1 (AQP-1) – dem Hauptvertreter der Aquaporine im mikrovaskulären Endothel – in TRPV4^{-/-}-Endothelzellen im Vergleich zu WT-Zellen nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 33).

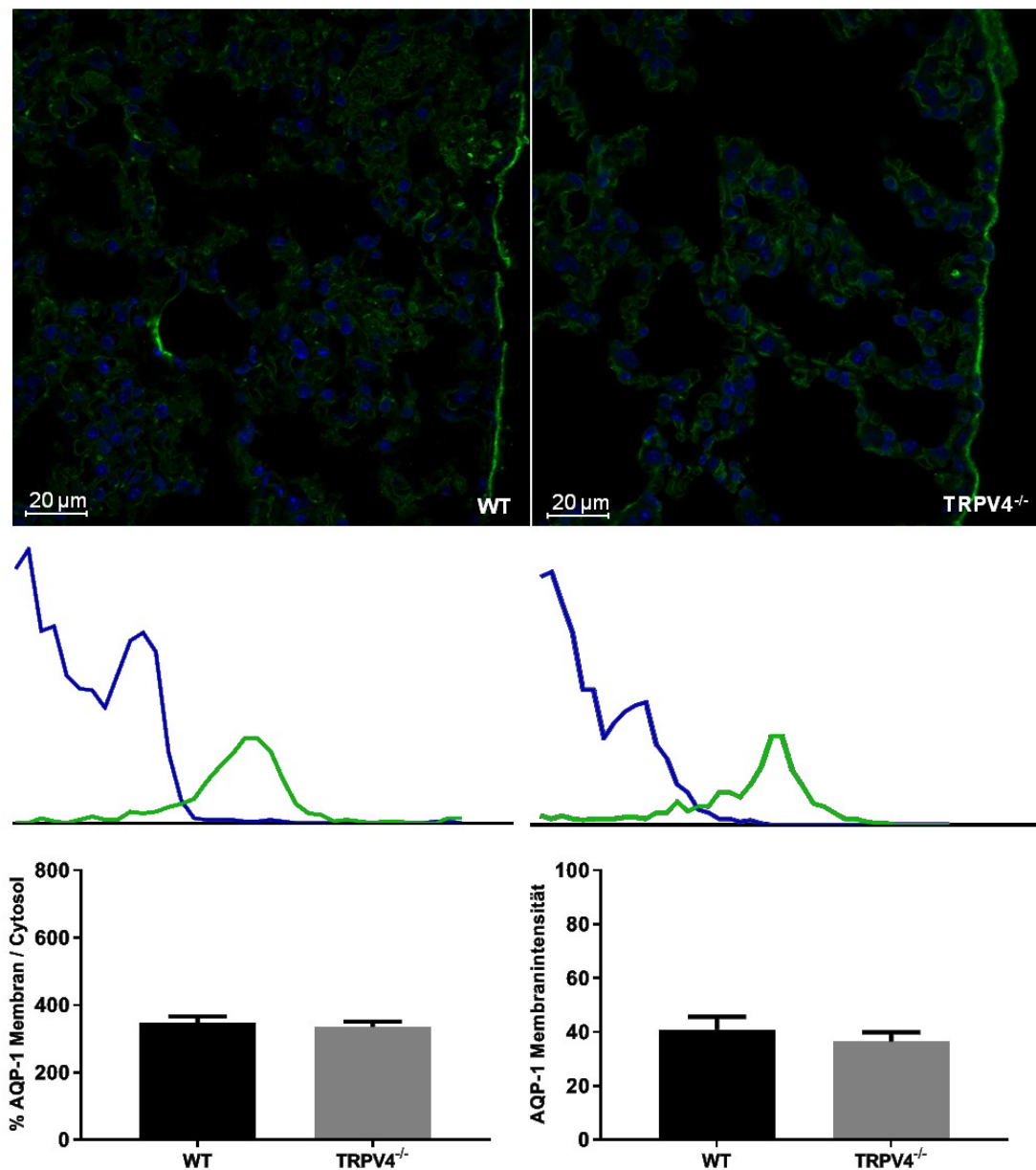


Abbildung 33: Aquaporin-1 (AQP-1) Expression und Translokation zur Plasmamembran in WT- und TRPV4^{-/-}-Endothelzellen. Repräsentative Histogramme zur Quantifizierung von AQP-1-Protein in der Plasmamembran von WT- (links) und TRPV4-defizienten Endothelzellen (rechts). Zusammenfassungen der Quantifizierung der AQP-1-Proteinexpression in Plasmamembranen (AQP-1 in Membranen (rechts)) und in Bezug auf das Cytosol (% AQP-1-Membran / Cytosol (links)). Daten zeigen Mittelwerte von n = 9 (3 Mäuse) ± SEM.

Die Expression im Endothel wurde durch „Western Blot“-Analyse bestätigt. Die AQP-1 Expression konnte in „mouse lung endothelial cells“ (MLEC), nicht aber in alveolaren Epithelzellen nachgewiesen werden (Abbildung 34).

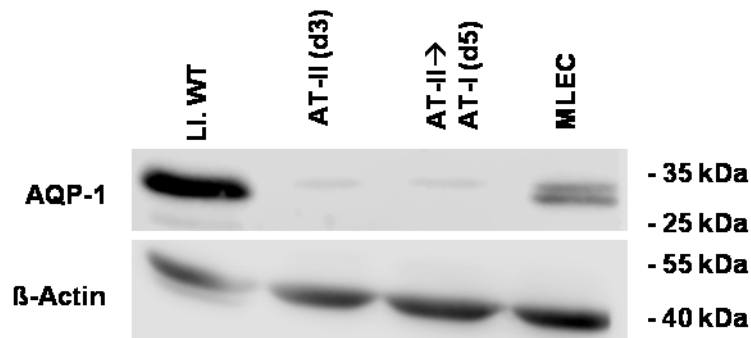


Abbildung 34: Analyse der Aquaporin-1 (AQP-1)-Expression in alveolaren Epithelzellen, die 3 oder 6 Tage lang in Plastikzellkulturschalen gezüchtet wurden, „mouse lung endothelial cells“ (MLEC) sowie Lungenlysate von Wildtyp Mäusen (LI. WT) durch „Western Blotting“. Die Expression von β -Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Es wurde je 40 μ g Gesamtprotein geladen.

3.5.3 TRPV4-Defizienz in ATII-Zellen reduziert die Produktion von „pro-Surfactant-Protein-C“ (pSP-C) aber nicht die Differenzierung zu ATI-Zellen

Um die Rolle von TRPV4-Kanälen auf zellulärer Ebene aufzuklären, wurden ATII-Zellen aus Mäusen beider Genotypen wie in 2.2.1.3 beschrieben isoliert und kultiviert. Es konnte kein morphologischer Unterschied zwischen WT- und TRPV4-defizienten Zellen festgestellt werden. Nach Kultivierung über 6 Tage auf Plastikoberflächen differenzieren diese Zellen zu ATI-ähnliche Zellen [8].

ATII-Zellen wurden durch Anfärben mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen das „pro-Surfactant-Protein-C“ (pSP-C) (Abbildung 35) identifiziert, das von ATII-Zellen sekretiert wird (Übersicht in [16]).

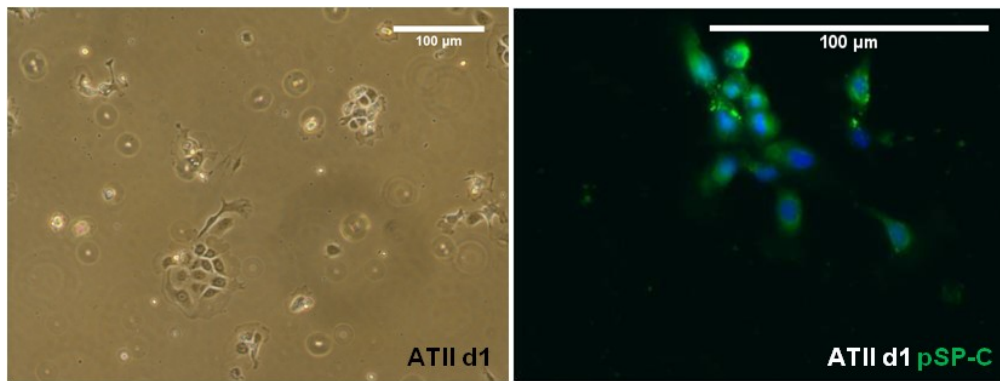


Abbildung 35: Repräsentative Zellkolonien einen Tag nach der Isolierung in einem Phasenkontrastbild (links) und angefärbt mit einem fluoreszenzgekoppelten spezifischen „pro-Surfactant-Protein-C“ (pSP-C) -Antikörper (rechts, grün). Die Kernfärbung wurde mit Hoechst-Farbstoff (rechts, blau) durchgeführt.

Die „Western Blot“-Analyse von Proteinlysaten aus ATII-Zellen ergab geringere pro-SP-C (pSP-C)-Expression in TRPV4-defizienten ATII-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen (Abbildung 36).

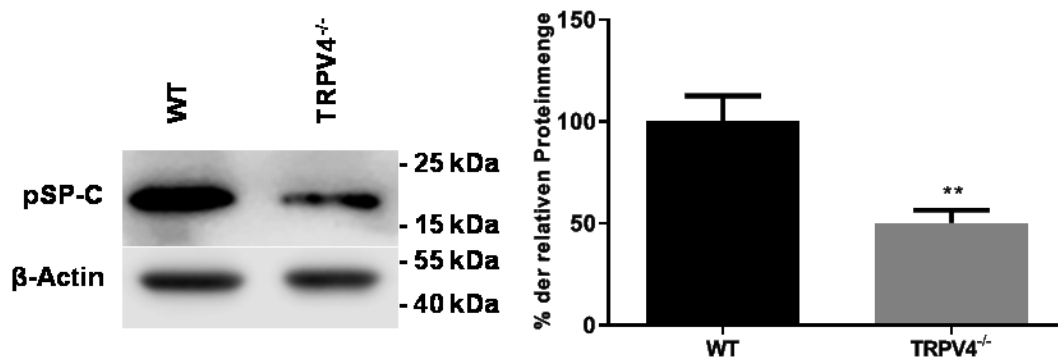


Abbildung 36: Repräsentative „Western Blot“-Analyse der „pro-Surfactant-Protein-C“ (pSP-C)-Expression in WT- und TRPV4^{-/-}-ATII-Zellen (links) und Zusammenfassung der Quantifizierung der pSP-C-Expression in TRPV4^{-/-}- und WT-ATII-Zellen (rechts). Die Expression von β-Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Es wurde je 40 µg Gesamtprotein geladen. Daten zeigen Mittelwerte von $n = 3$ (15 Mäuse) \pm SEM, ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$.

Anschließend wurden ATII-Zellen durch Züchtung in Plastikzellkulturschalen für mindestens 6 Tage, wie beschrieben [8], zu ATI-Zellen differenziert (Abbildung 37, links).

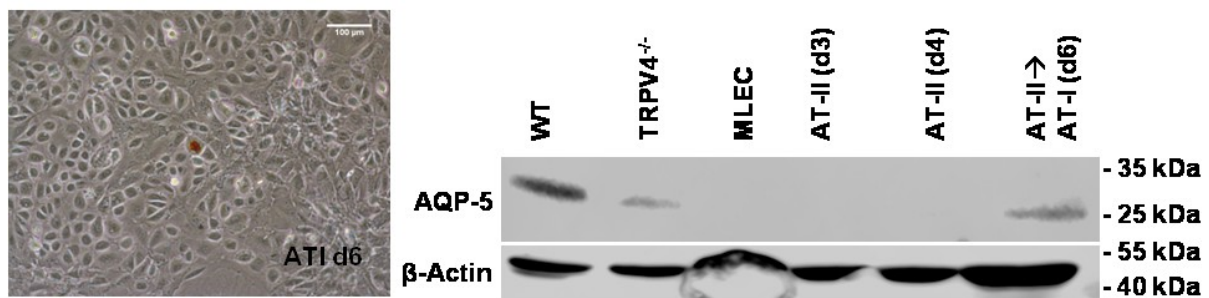


Abbildung 37: Bild von konfluenten Zellen an Tag 6 nach der ATII-Zellisolierung (links) und „Western Blot“-Analyse der Aquaporin-5 (AQP-5)-Expression in Zellen, die 3, 4 und 6 Tage lang in Plastikzellkulturschalen gezüchtet wurden (rechts). Die Expression von β -Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Es wurde je 40 μ g Gesamtprotein geladen.

Nach 6 Tagen exprimierten WT-Zellen das AQP-5-Protein als ATI-Zellmarker (Abbildung 37, rechts). Dessen Expression war in TRPV4-defizienten Zellen reduziert (Abbildung 38).

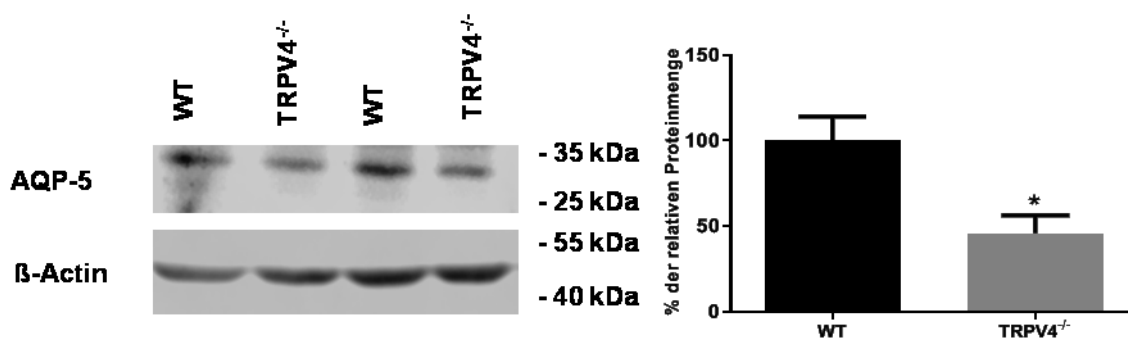


Abbildung 38: Repräsentative „Western Blot“-Analyse der Aquaporin-5 (AQP-5)-Expression in WT- und TRPV4^{-/-}-ATII-Zellen, differenziert zu ATI-Zellen (links) und Zusammenfassung der Quantifizierung der AQP-5-Expression in diesen Zellen (rechts). Die Expression von β -Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Es wurde je 40 μ g Gesamtprotein geladen. Daten zeigen Mittelwerte von $n = 3$ (15 Mäuse) \pm SEM, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$.

Um zu testen, ob TRPV4-defiziente ATII-Zellen in gleichem Maße wie WT-Zellen in der Lage sind, sich zu ATI-Zellen zu differenzieren, wurde die Expression von Podoplanin (T1 α), einem weiteren ATI-Zellmarkerprotein, analysiert. Bemerkenswerterweise war die Podoplanin-Expression in TRPV4^{-/-}-ATII-Zellen, die zu ATI-Zellen differenziert waren, nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 39).

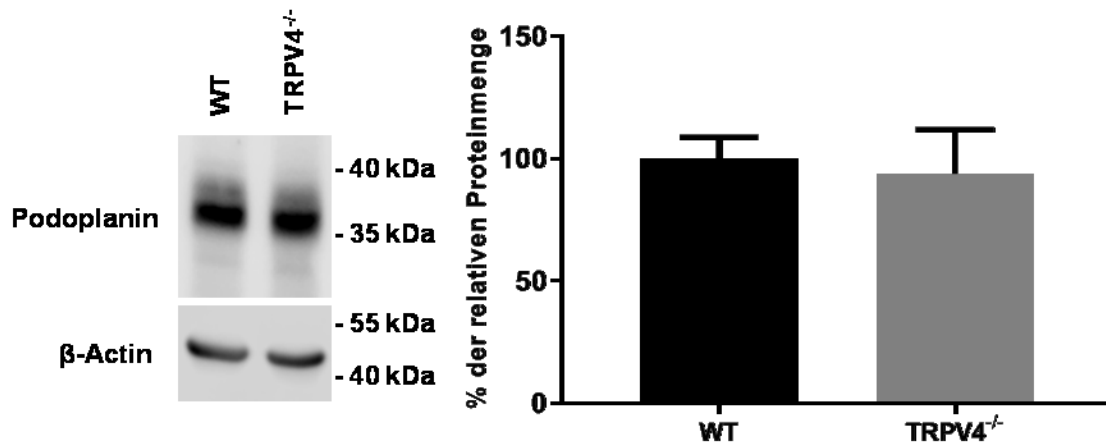


Abbildung 39: Repräsentative „Western Blot“-Analyse der Podoplanin-Expression – ein weiterer ATI-Zellmarker – in WT- und TRPV4^{-/-}-ATII-Zellen, differenziert zu ATI-Zellen (links) und Zusammenfassung der Quantifizierung der Podoplanin-Expression in diesen Zellen (rechts). Die Expression von β -Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Es wurde je 40 μ g Gesamtprotein geladen. Daten zeigen Mittelwerte von $n = 9$ (25 Mäuse) \pm SEM, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$.

3.6 TRPV4-defiziente ATI-Zellen zeigen eine verringerte Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor of activated T cells“ (NFAT)

Um die ATI-Zellfunktion weiter zu analysieren, wurden die NFATc1- und NFAT5-Konzentrationen im Kern quantifiziert. Diese waren in TRPV4^{-/-}-Zellen signifikant reduziert (Abbildung 40).

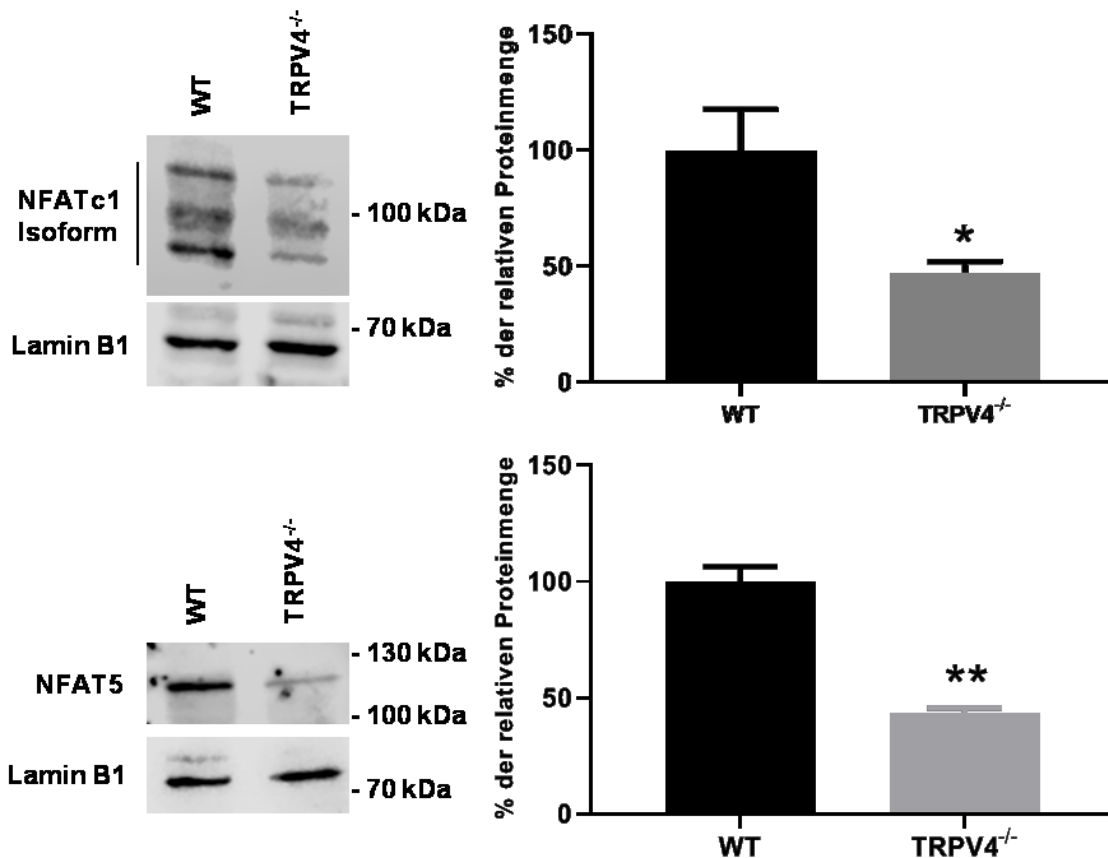


Abbildung 40: Repräsentative „Western Blot“-Analyse der „nuclear factors of activated T Cells c1“ (NFATc1)- und NFAT5-Kernlokalisation in WT- und TRPV4^{-/-}-ATI-Zellen (links) und Zusammenfassung der Quantifizierung der nuklearen NFAT-Lokalisation in diesen Zellen (rechts). Die Lamin B1-Expression diente als Ladekontrolle. Es wurde jeweils 20 μ l der isolierten Kernfraktion geladen. Daten zeigen Mittelwerte von $n = 3$ (15 Mäuse) \pm SEM, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$.

3.7 TRPV4-defiziente ATI-Zellen zeigen eine verringerte Zellmigration und -adhäsion

Die in in-vitro-Experimenten durch Lückenschluss analysierte Zellmigration in TRPV4-defizienten ATI-Zellen zeigte sich im Vergleich zu WT-Zellen deutlich verlangsamt (Abbildung 41).

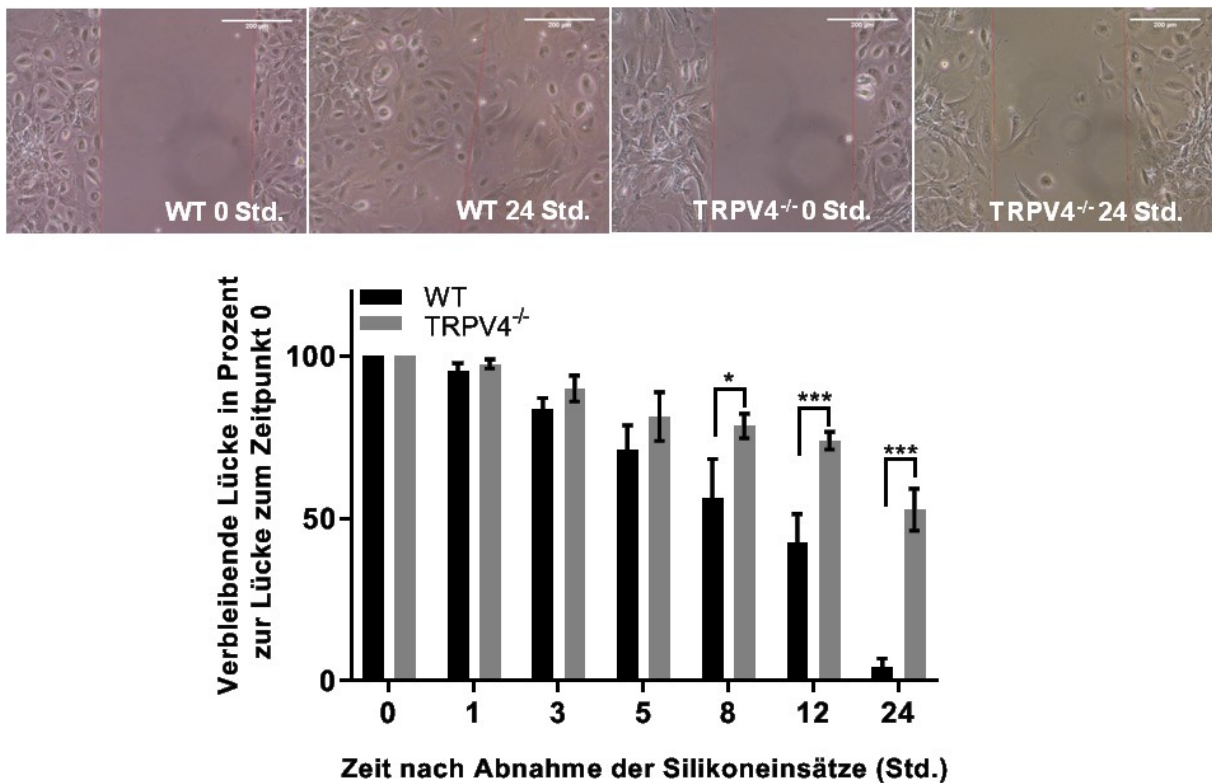


Abbildung 41: Repräsentative Bilder eines Tests zur Quantifizierung der Zellmigration 0 und 24 Std. nach Entfernen des Einsatzes (oben). Zusammenfassung der verbleibenden Lückenbreite der TRPV4^{-/-}- und WT-ATI-Zellen nach 0, 1, 3, 5, 8, 12 und 24 Std. normalisiert auf die Anfangswerte nach dem Lösen der Einsätze (unten). Daten zeigen Mittelwerte von $n = 3$ (15 Mäuse) \pm SEM, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$.

Aus Abbildung 41 wird ersichtlich, dass die Migration der WT-Epithelzellen ausreichte, um die erzeugte Lücke nach 24 Std. zu schließen. Bei TRPV4^{-/-}-Zellen war ebenfalls eine Migration in die entstandene Lücke zu beobachten, allerdings im Vergleich um ca. 50 % langsamer. Bereits nach 8 Std. unterschieden sich verbleibenden Lücken in WT und TRPV4^{-/-}-ATI-Zellen signifikant. Nach 24 Std. haben TRPV4^{-/-}-ATI-Zellen die induzierte Lücke nur um 50 % geschlossen. Ähnliche Ergebnisse wurden nach einer kurzfristigen Verminderung der Expression des TRPV4-Kanals durch spezifische sog. „small interference RNAs“ (siRNAs) beobachtet (Abbildung 42).

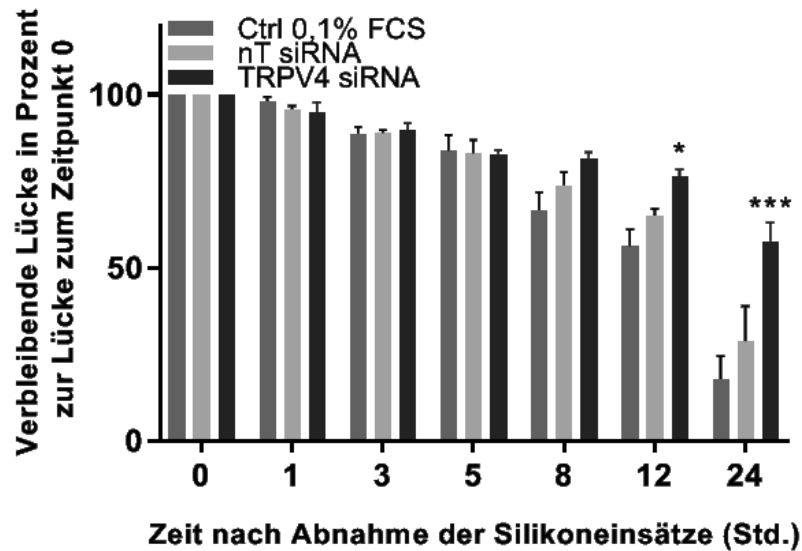


Abbildung 42: Zusammenfassung der verbleibenden Lückenbreite nach Behandlung mit TRPV4-siRNA, nicht kodierender siRNA bzw. Mediumskontrolle der TRPV4^{-/-}- und WT-ATI-Zellen nach 0, 1, 3, 5, 8, 12 und 24 Std. normalisiert auf die Anfangswerte nach dem Lösen der Einsätze. Werte angegeben in Prozent der entstandenen Lücke direkt nach Versuchsbeginn. Daten zeigen Mittelwerte von $n = 3$ Zellisolationen (15 Mäuse) \pm SEM, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$.

WT-ATI-Zellen, die mit siRNA gegen TRPV4 transfiziert wurden, zeigten eine signifikant geringere Migration als Zellen mit nicht kodierender siRNA bzw. Mediumskontrolle. Die Zellmigration nach siRNA-Behandlung (Abbildung 42) war ähnlich dem Migrationsverhalten von ATI-Zellen aus global TRPV4-defizienten Mäusen.

ATI-Zellen, die aus ATII-Zellen von WT und TRPV4-defizienten Mäusen differenziert worden waren, wurden subkonfluent auf Elektroden von Messkammern des „Electrical-Cell Impedance-Sensor“ (ECIS)-System ausgesät. WT-Zellen wiesen nach 80 Std. einen höheren Widerstand im Vergleich zu TRPV4^{-/-}-Zellen auf. Die Proliferation beider Zellen schien allerdings identisch, da WT und TRPV4^{-/-} nach 160 Std. wieder einen ähnlichen Widerstand hatten. Der TRPV4-Kanal ist also beteiligt an der Zell-Zell-Interaktion bzw. an der Zell-Matrix-Interaktion mit der Elektrode. WT-Zellen hatten einen stärkeren Kontakt zur Elektrode als Zellen ohne TRPV4. In Subkonfluente ATI-Zellen war die Zellbarrierefunktion reduziert (Abbildung 43). Die Messungen zeigten, dass TRPV4 eine Auswirkung auf den Zellwiderstand während der Differenzierung der Zellen hatte.

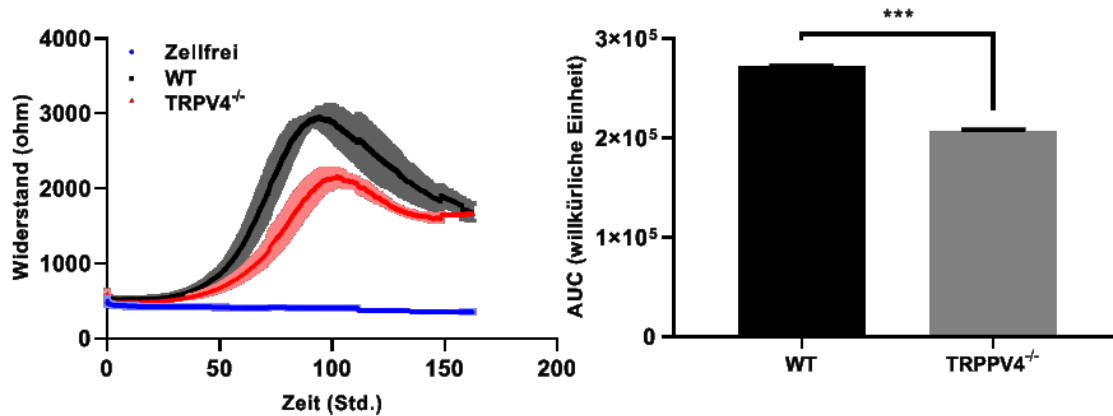


Abbildung 43: Der elektrische Zellwiderstand wurde mit einem ECIS-Gerät für WT- und TRPV4^{-/-}-ATI-Zellen für 160 Std. quantifiziert. Widerstände bei 2000 Hz für zellfreie Elektroden, WT- und TRPV4^{-/-}-Zellen. Rechter Graph zeigt AUC („Area under the curve“) für WT versus TRPV4^{-/-}. Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 5$ (25 Mäuse) \pm SEM; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$.

3.8 TRPV4-defiziente Mäuse zeigen Emphysem-ähnliche Lungenstrukturen und eine veränderte Lungenfunktion

Um Unterschiede in der Lungenanatomie als Folge einer veränderten ATI-Zellfunktion zu analysieren, wurde die mittlere Länge der alveolaren Septen in histologischen Lungenschnitten quantifiziert (Abbildung 44). Die TRPV4-Ablation erhöhte signifikant die mittlere Länge des Alveolarlumen bei erwachsenen Mäusen (47-52 Wochen alt (Abbildung 44, rechts)) im Vergleich zu WT-Lungen, während junge Mäuse (4-6 Wochen alt) keine Unterschiede zeigten (Abbildung 44, links). Lungen von 28 bis 30 Wochen alten Mäusen neigten auch zu größeren mittleren Sehnenlängen, die sich jedoch im Vergleich zu WT-Lungen nicht signifikant unterschieden (Abbildung 44, Mitte). Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Suhasini Rajan und Christian Schremmer durchgeführt.

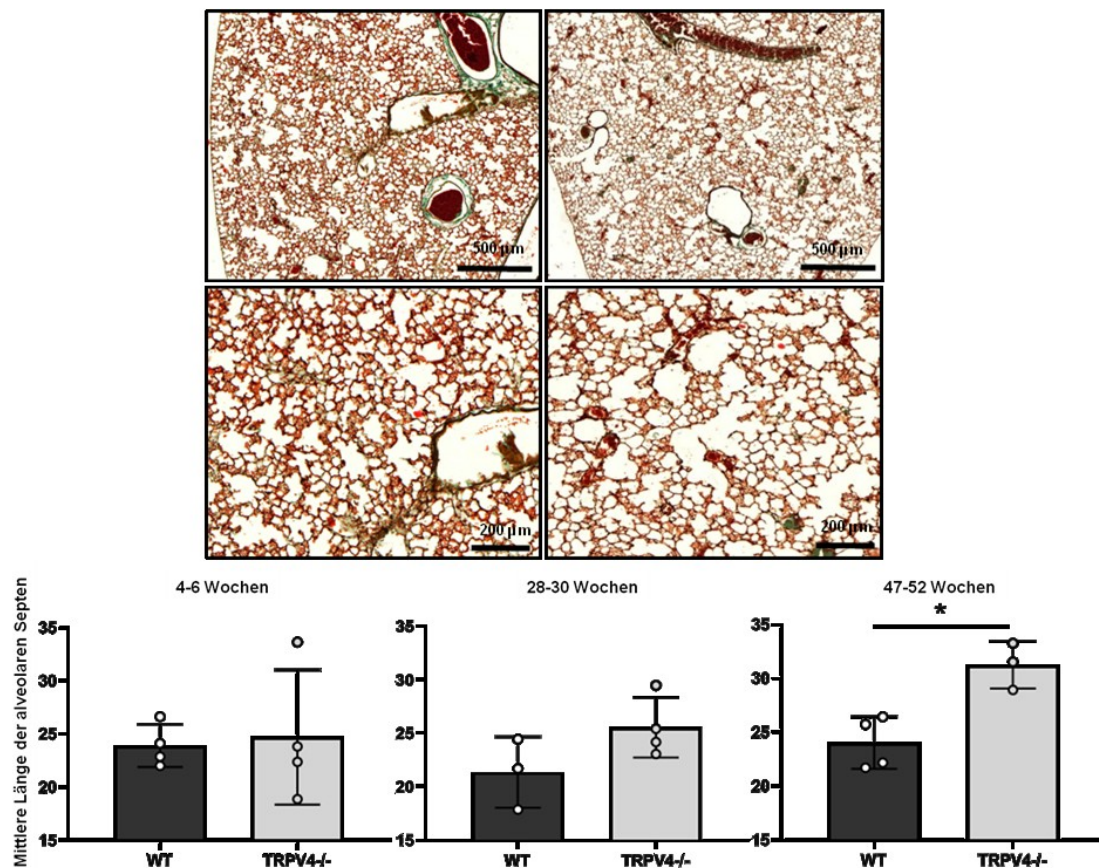


Abbildung 44: Mittlere Länge der alveolaren Septen von WT- und TRPV4^{-/-}-Mäusen. Repräsentative Bilder von Masson-Trichrom-gefärbten Lungenschnitten von 52 Wochen alten WT- und TRPV4^{-/-} Mäusen bei 5-facher Vergrößerung (obere Bilder) und bei 10-facher Vergrößerung (untere Bilder). (Quantifizierung der mittleren Sehnenlängen von 4-6, 28-30 und 47-52 Wochen alten WT- und TRPV4^{-/-} Mäusen. Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 3 \pm \text{SEM}$, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$).

Darüber hinaus war die Lungenfunktion signifikant verändert (Abbildung 45, 46, 47).

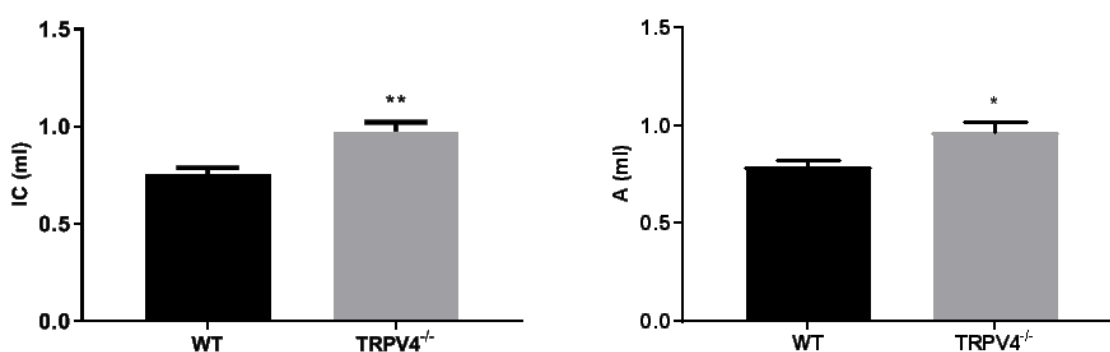


Abbildung 45: Maximale inspiratorische Kapazität (IC) und die inspiratorische Kapazität (A) von WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen. TRPV4^{-/-}-Lungen zeigten signifikant erhöhte Werte für die IC und A aufgrund der erhöhten MCL. Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 5 \pm \text{SEM}$, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$.

Abbildung 45 zeigt eine Steigerung der maximalen inspiratorischen Kapazität (IC) in TRPV4^{-/-} im Vergleich zu WT-Lungen. Auch die inspiratorische Kapazität (A), die die Differenz zwischen der totalen Lungenkapazität und dem Nullvolumen darstellt, war signifikant erhöht.

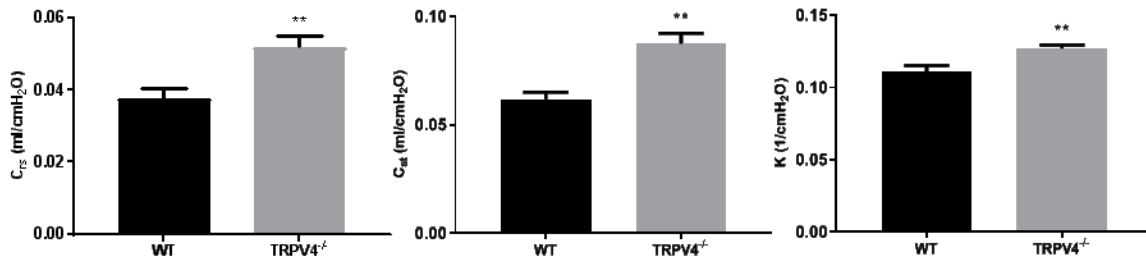


Abbildung 46: Dynamische „Compliance“ (C_{rs}), statische „Compliance“ (C_{st}) und gewichtsunabhängige „Compliance“ (K) von WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen. Aufgrund der verringerten Dichte des alveolaren Gewebes, war die Fähigkeit der Lungendehnung und damit die „Compliance“ der TRPV4^{-/-}-Lungen erhöht. Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 5 \pm SEM$, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$.

In TRPV4^{-/-}-Lungen waren die statische „Compliance“ (C_{st}) sowie die dynamische „Compliance“ (C_{rs}) ebenfalls signifikant erhöht. Diese werden beschrieben durch das Luftvolumen pro Atemzug (Tidalvolumen) geteilt durch die Differenz von endinspiratorischem bzw. inspiratorischem Spitzendruck und endexpiratorischem Druck, wobei die statische Compliance den Anteil der Compliance der Lunge zwischen den Atemzügen und somit ohne Gasfluss beschreibt. K ist eine theoretische Größe und beschreibt eine gewichtsunabhängige Compliance.

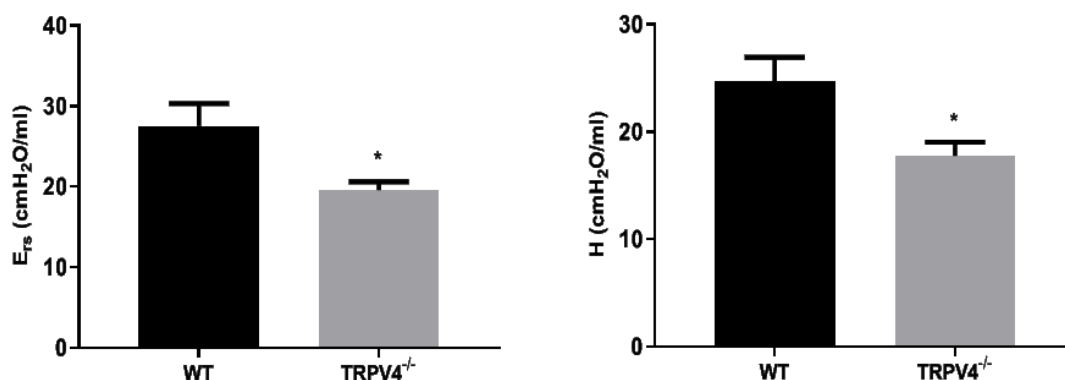


Abbildung 47: Elastischer Widerstand (E_{rs}) und alveolarer elastischer Widerstand (H) in WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen. Daten zeigen Mittelwerte von $n \geq 5 \pm SEM$, * = Signifikanzniveau $p < 0,05$.

Der elastische Widerstand (Volumenelastizitätskoeffizient, Kehrwert der „Compliance“), war in TRPV4^{-/-}-Lungen verringert. E_{rs} stellt den elastischen Widerstand des respiratorischen Systems (E_{rs}) dar, wobei H sich ausschließlich auf den elastischen Widerstand des Alveolarraums bezieht [150].

Zusammenfassend zeigten die Lungenfunktionsmessungen spezifische Charakteristika eines Lungenemphysems. TRPV4^{-/-}-Lungen wiesen eine erhöhte Inspirationskapazität und „Compliance“ (Abbildung 45, 46) sowie einen verringerten

elastischen Widerstand (Abbildung 47), der sich signifikant von WT-Mäusen des gleichen Alters unterschied.

4 Diskussion

TRPV4-Kanäle sind in einer Vielzahl von Geweben und Zellen exprimiert. Der Kanal kommt in Gehirn, Niere, Haut, Herz und Blutgefäßen vor. In der Lunge wurden TRPV4-Kanäle in Endothelzellen [151], Epithelzellen [132] und arteriellen, glatten Muskelzellen [152] identifiziert. Aufgrund seiner Aktivierung durch Hitze, Änderungen der Osmolarität und Scherstress wird vermutet, dass der Kanal an der Entwicklung mehrerer Lungenerkrankungen wie Asthma und pulmonaler Fibrose beteiligt ist (Übersicht in [119]). Der Kanal wurde auch als Sensor von toxischen Chemikalien beschrieben [110] und könnte eine akute Lungentoxizität vermitteln [153], [154]. In pulmonalen Endothelzellen wurde die Aktivierung von TRPV4-Kanälen für die Ausbildung von durch Chemikalien-induzierten Lungenödemen verantwortlich gemacht [38].

Diese Arbeit zeigt neue Funktionen von TRPV4-Kanälen in alveolaren Epithelzellen (ATI und ATII), die im Gegensatz zu der beschriebenen Rolle in pulmonalen Endothelzellen, essentiell für die korrekte Ausbildung der Epithelzellbarriere sowie der Lungenstruktur und -funktion ist. Die Regulation der pSP-C Expression sowie der AQP-5 Expression und Translation scheinen hierbei eine entscheidende Rolle zu übernehmen.

4.1 Quantifizierung der TRPV4-induzierten Kontraktion in glatten Muskelzellen

Die Expression von TRPV4 konnte in der Lunge unter anderem in glatten Muskelzellen [152], als häufigster Vertreter der TRPV-Familie, sowie in bronchialen Epithelzellen [155] nachgewiesen werden. In humanen Bronchialringen konnte die TRPV4-induzierte Kontraktion nur über die Freisetzung von Cysteinyl-Leukotrienen gezeigt werden und blieb bei deren Blockierung vollständig aus [156]. Die dargestellten Ergebnisse in Abbildung 17 zeigten zwar eine verringerte Phenylephrin-induzierte Kontraktion durch die Kanaldefizienz in thorakalen Aortenringen, aber in Bronchialringen keine – durch Carbachol induzierte – veränderte Kontraktion. In der Halsschlagader von Mäusen zeigte die Gruppe um Hartmannsgruber, dass TRPV4-Defizienz zum Ausbleiben der 4α PDD-induzierten Vasodilatation führt [157]. Sowohl Scherstress-, als auch Reperfusions-induzierte Vasodilatation waren hierbei durch den fehlenden TRPV4-Kanal signifikant

beeinträchtigt. Unterschiede in der Vasodilatation durch Acetylcholin und in der Kontraktion durch Phenylephrin blieben hier aber aus. Aufgrund der unveränderten Kontraktion in Bronchien (Abbildung 17), sowie die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit, die eher eine Rolle im pulmonalen Epithel beleuchten, wurden weitere Versuche zur Kontraktion eingestellt.

4.2 Rolle von TRPV4-Kanälen in Fibroblasten und Myofibroblasten während der Ausbildung einer pulmonalen Fibrose

Eine Veröffentlichung der Arbeitsgruppe um Prof. Olman berichtet von einer essentiellen Funktion des TRPV4-Kanals während der Ausbildung einer Lungenfibrose [45]. Mäuse ohne TRPV4-Kanal waren vor einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose geschützt. Der Kanal wird konstitutiv in Fibroblasten exprimiert und könnte nach Einwirkung von mechanischem Stress an der Myofibroblasten-Differenzierung beteiligt sein [45]. Meine Ergebnisse bestätigen diese Hypothese zum Teil, da TRPV4-defiziente, mit TGF- β -transformierte Myofibroblasten eine deutlich geringere Kontraktion zeigten als WT-Fibroblasten (siehe Abbildung 18 und 19). Darüber hinaus konnte ich aber auch eine erhöhte Migration von Fibroblasten und von TGF- β -transformierten Myofibroblasten ohne TRPV4-Kanal im klaren Gegensatz zu WT-Zellen nachweisen. Hier scheint der TRPV4-Kanal über bisher ungeklärte molekulare Mechanismen die Migration von Fibroblasten und Myofibroblasten in das Gebiet der Epithelschädigung zu behindern und damit eher die Ausbildung einer Lungenfibrose zu reduzieren. In der Literatur wurde nach TRPV4-Aktivierung einerseits eine reduzierte Zellmigration von neuroendokrinen Zellen beschrieben [158], andererseits wurde der Kanal aber auch für die effektive Migration von pulmonalen glatten Muskel- [159] und Endothel-Zellen verantwortlich gemacht. Weitere Untersuchungen sind notwendig um die genaue Rolle von TRPV4 für die Zellmigration und Ausbildung einer Lungenfibrose im Detail aufzuklären.

4.3 Funktionen von TRPV4-Kanälen während der Ausbildung eines IR-induzierten Lungenödems

Obwohl TRPV4 stark in der Lunge exprimiert wird, ist seine genaue Funktion noch umstritten (Übersicht in [125]). Aktivierung von TRPV4 in Endothelzellen durch

mechanische Beanspruchung, z.B. Dehnung [127], [128], [160] sowie durch oxidativen Stress nach Applikation von H_2O_2 [161] führten zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom, der durch den Kanal vermittelt wird. Daraufhin kommt es im Endothel zu einer erhöhten Permeabilität, die die Entstehung eines Lungenödems fördert (Übersicht in [146]). Auf diese Weise führte eine pharmakologische Blockade von TRPV4 durch den spezifischen Blocker HC-067047 zu einem verringerten Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} in Endothelzellen und schützte Mäuse vor Gefäßleckage und Lungenverletzung [128]. Das funktionelle Zusammenspiel von TRPV4- und Kalium-Kanälen zeigte sich hierbei als Bedingung für die gesteigerte Endothelpermeabilität [162]. Die durch 14,15-EET (14,15-Epoxyeicosatriensäure) verursachte TRPV4-vermittelte Erhöhung der Endothelpermeabilität wurde durch den Block der Kalium-Kanäle abgeschwächt. In dieser Arbeit wurde die Ischämie-Reperfusion-induzierte Ödembildung als eine der häufigsten und signifikantesten Ursachen für Morbidität und Mortalität nach Lungentransplantation [22] unter Verwendung des isolierten, perfundierten Lungenmodells [37] quantifiziert. Sowohl in dieser Arbeit, als auch in einer Publikation unserer Arbeitsgruppe werden in WT-Lungen nach Ischämie und Reperfusion Ödeme von ca. 300 mg erreicht. Zu unserer großen Überraschung waren TRPV4-defiziente Lungen nicht vor dem IR-induzierten Lungenödem geschützt, wie es bei $\text{TRPC6}^{-/-}$ -Mäusen beobachtet wurde [37]. Die genetische Ablation des TRPV4-Kanals führte hingegen zu einem starken Anstieg des Lungenödems (Abbildung 21) und einer höheren Zunahme der Quotienten der Nass-Trocken-Gewichte (Abbildung 22) im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe. Es ist bekannt, dass TRPV4 in Blutgefäßen auch über Scherstress aktiviert wird (Übersicht in [119]). In Mäusen führte der TRPV4-Aktivator GSK1016790A zu einer Scherstress-induzierten Relaxation der Mesenterialarterien, welche in $\text{TRPV4}^{-/-}$ -Gefäßen ausblieb [163]. Auch in Endothelzellen der Halsschlagader konnte der Effekt der Vasodilatation nach Perfusion beobachtet werden [157]. Es war somit denkbar, dass die beobachtete Ödembildung nicht durch Ischämie/Reperfusion hervorgerufen wurde, sondern durch den initialen Perfusionsfluss, der eine mechanische Endothelschädigung oder eine Scherstress-Aktivierung von TRPV4-Kanälen auslösen könnte. Diese Hypothese konnte durch Versuche mit verringertem Fluss widerlegt werden. Abbildung 24 und 25 zeigen in WT-Lungen keine Veränderung in der Zunahme des Lungengewichts, während in TRPV4-defizienten Lungen die Ödembildung leicht aber signifikant

abnahm. Eine Scherstress-aktivierte TRPV4-Aktivierung in den WT-Lungen, die durch Erhöhung der Endothelzellpermeabilität zu einer Ödembildung führt, können wir also ausschließen und eine Endothelschädigung ist wegen des geringen Unterschieds des Lungengewichts bei verschiedenen Perfusionsraten eher unwahrscheinlich. Es überwiegt der Gewichtsanstieg durch Ischämie/Reperfusion und das TRPV4-Defizit unter beiden Perfusionsbedingungen. Eine Ödembildung aufgrund der hier verwendeten Flussrate von 2 ml/min schien auch unwahrscheinlich, da in anderen Arbeiten Perfusionsraten von bis zu 10 ml/min nicht zu Scherstress-induzierten Ödemen führten [164].

Interessanterweise zeigten TRPV4/TRPC6-doppeltdefiziente Mäuse wieder eine ähnliche Ödembildung wie WT-Lungen (Abbildung 26 und 27). TRPC6 aktiviert nach Ischämie/Reperfusion einen ödemfördernden Mechanismus über eine Erhöhung der Endothelzellpermeabilität [37], während der TRPV4-Kanal eher vor der Ödembildung schützt. Beide antagonistischen Effekte scheinen sich in den TRPV4/TRPC6-doppeltdefiziente Lungen aufzuheben, so dass wieder ähnliche Effekte wie für die WT-Lungen auftraten.

4.4 Expression und Funktion von TRPV4-Kanälen in ATII-Zellen

Die erhöhte IR-induzierte Ödembildung der TRPV4-defizienten Lungen war überraschend, da viele Publikationen bereits gezeigt haben, dass die TRPV4-Aktivierung in Endothelzellen zu einer höheren Ödembildung führt [126], [132], [146]. Allerdings waren hier andere Stimuli wie mechanischer Stress [127], [128], [160], Instillation von Säure [165] oder reaktive Sauerstoffspezies durch Applikation von H₂O₂ [161] der Auslöser. Für die IR-induzierte Ödembildung hatten wir allein TRPC6-Kanäle für eine Erhöhung der Endothelzellpermeabilität verantwortlich gemacht, da TRPC6-defiziente Lungen vollständig vor dem Schaden geschützt waren [37]. Aus diesem Grund hätten wir keine Unterschiede zur Ödembildung in WT-Lungen erwartet, da endotheliale TRPV4-Kanäle in diesen IR-induzierten endothelialen Prozessen offensichtlich keine Rolle spielen. Entgegen unserer Erwartungen kam es aber zu einer stärkeren IR-induzierten Ödembildung für die TRPV4-Kanäle der Endothelbarriere offensichtlich nicht verantwortlich sind. Aus diesem Grund fragten wir uns, ob TRPV4-Kanäle der zweiten natürlichen Barriere bestehend aus alveolaren Epithelzellen für diese protektive Funktion verantwortlich

sind. Neuere Veröffentlichungen weisen auf eine entgegengesetzte Funktion des Kanals im Epithel hin. Hierzu zählt die Stabilisierung der Epithelbarriere in der Haut [129], im Urogenitaltrakt [130] und im Hornhautepithel [131]. Es wurde die Expression von TRPV4 in alveolaren epithelialen Typ I (ATI)-Zellen mittels Koexpression in Gefrierschnitten gezeigt (Abbildung 28 und 29). TRPV4-mRNA in alveolaren epithelialen Typ II (ATII)-Zellen konnte durch die Nanostring®-Technologie gezeigt werden (Abbildung 30). Um die Funktion von TRPV4-Kanälen auf zellulärer Ebene zu analysieren, wurden ATII-Zellen aus WT- und TRPV4-defizienten Mäusen isoliert, und durch die Expression von „pro-Surfactant-Protein-C“ (pSP-C) (Abbildung 35) identifiziert. Obwohl sich die TRPV4-defizienten Zellen morphologisch nicht von WT-Zellen unterscheiden, produzierten sie signifikant weniger pSP-C (Abbildung 36). Neben SP-C senken SP-B zusammen mit DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) die Oberflächenspannung an der Kontaktfläche von Luft und alveolarer Oberfläche [166]. Die hydrophileren SP-A und SP-D in den Bronchien sind hingegen an der Abwehr der Lunge beteiligt und regulieren Immunantworten. Sie machen Oberflächenantigene von Bakterien und Viren für Makrophagen erkennbar. So zeigten SP-A/D^{-/-}-Mäusen eine deutlich stärkere durch Pneumonien induzierte Lungenentzündung als WT-Kontrollen [167]. Die Rolle von SP-C bei der Vorbeugung von Alveolarödemem durch Verringerung der Oberflächenspannung als treibende Kraft für den Flüssigkeitsfluss durch die Luft-Blut-Schranke ist immer noch umstritten [168], könnte aber auch die übermäßige Ödembildung bei TRPV4^{-/-}-Mäusen erklären. Der „Surfactant“ verringert die Oberflächenspannung der Alveolen und sorgt somit für einen Druckgradienten in Richtung der Gefäße, was die Diffusion in diese Richtung begünstigt und das Alveolarinterstitium trocken hält.

4.5 Expression und Funktion von TRPV4-Kanälen in ATI-Zellen

In Gefrierschnitten der Lunge aus den eGFP-TRPV4-Reportermäusen konnte eine Expression des grün-fluoreszierenden Proteins in Zellen nachgewiesen werden, die auch den wasserführenden Kanal Aquaporin-5 (AQP-5) ein Markerprotein für ATI-Zellen exprimieren. Allerdings war die Expression von AQP-5 in der Plasmamembran dieser Zellen deutlich verringert (Abbildung 31). Um diese Daten auf zellulärer Ebene zu bestätigen wurden nun ATII- zu ATI-Zellen [8] differenziert und durch die Markerproteine AQP-5 und Podoplanin identifiziert. Die AQP-5 Proteinexpression in TRPV4^{-/-}-ATI-Zellen (Abbildung 38) war verringert, während die

Expression von Podoplanin nicht verändert war (Abbildung 39). Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass TRPV4-Defizienz und / oder eine Verringerung der SP-C Expression generell die Differenzierung von ATII- zu ATI-Zellen reduziert. In der Literatur gibt es bereits Hinweise für eine Interaktion zwischen TRPV4-Kanälen und AQP-5-Proteinen. Hypotonische Lösungen erhöhten die Assoziation und Oberflächenlokalisierung von TRPV4-Kanälen und AQP-5-Proteinen in Speicheldrüsenzellen [169], und die AQP-5-Expression wird durch TRPV4-Kanäle in Lungenepithelzellen reguliert [148]. Eine mögliche Verbindung zwischen beiden Proteinen wären die „nuclear factor of activated T cells“ (NFAT)-Transkriptionsfaktoren, die durch Ca^{2+} -Einstrom z.B. durch TRPV4-Kanäle reguliert werden. Die zytoplasmatischen NFATc1-Proteine müssen durch die Phosphatase Calcineurin A, die durch Ca^{2+} /Calmodulin aktiviert wird, dephosphoryliert werden, um im Zellkern die Expression von Zielproteinen zu regulieren. Daher haben wir die NFATc1-Konzentrationen im Kern quantifiziert und signifikant niedrigere Konzentrationen in TRPV4^{-/-}-Zellen im Vergleich zu WT-Kontrollzellen nachgewiesen (Abbildung 40). Ein wichtiger Durchbruch für das Verständnis der AQP-5 Funktion für den Wassertransport durch apikale Membranen von ATI-Zellen war die Analyse von AQP-5-defizienten Mäusen [170]. Obwohl das Fehlen von AQP-5 eine 10-fache Abnahme der alveolären Permeabilität als Reaktion auf einen osmotischen Gradienten zur Folge hatte, unterscheiden sich AQP-5^{-/-}-Mäuse in der Ausbildung eines hydrostatischen Lungenödems, sowie im Transports von isoosmolarer Flüssigkeit aus dem Alveolarraum nicht von WT-Mäusen [170], [171]. Aus diesem Grund kann eine Rolle von AQP-5 bei der Entfernung von Flüssigkeit aus dem Alveolarraum nach einem IR-induzierten Lungenödem nicht vollständig ausgeschlossen werden, scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein.

4.6 TRPV4-defiziente ATI-Zellen zeigen eine verminderte Zellmigration und Barrierefunktion

Wie unter 4.2 ausgeführt ist die Rolle von TRPV4-Kanälen für die Zellmigration nicht eindeutig geklärt. Darüber hinaus wurde in einigen Publikation berichtet, dass eine verminderte Expression von AQP-5-Proteinen zu einer reduzierten Migration von humanen epithelialen Ovarialkarzinomzellen [172], „Ishikawa“-Zellen (eine endometrialen Adenokarzinomzellen) und SPC-A1-Zellen (einer

Lungenadenokarzinom-Zelllinie) führt [173]. In SPC-A1-Zellen konnte für AQP-5 auch eine Beteiligung an Veränderungen von Zellform und Zellvolumen nachgewiesen werden [174]. Außerdem wurde AQP-5 als möglicher Marker für die Progression von Lungenkarzinomen und deren Metastasierung beschrieben [175], [176]. Aufgrund dieser Hinweise wurde die Zellmigration von ATII-Zellen, die zu ATI-Zellen differenziert wurden, quantifiziert. ATI-Zellen ohne TRPV4-Protein zeigten im Vergleich zu WT-Zellen ein deutliches Migrations-Defizit (Abbildung 41). Diese Ergebnisse konnten durch den Einsatz von TRPV4-spezifischen siRNAs reproduziert werden, so dass langfristige, kompensatorische Veränderungen in den TRPV4^{-/-}-ATI-Zellen aufgrund der globalen, konditionellen Deletion des Kanals nicht der Grund für das veränderte Migrationsverhalten sein können (Abbildung 42). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder TRPV4-Aktivierung führten in humanen und murinen mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen zu einer Reduzierung des elektrischen Widerstands und somit zu einer Erhöhung der Permeabilität [161]. In einem Model mit Hornhaut Epithel konnte hingegen gezeigt werden, dass der TRPV4-Kanal für die korrekte Ausbildung bestimmter Zell-Zell-Kontakte sog. „tight-junctions“ wichtig ist. Hier führte die Inhibition des Kanals oder seine verminderte Expression durch „shRNAs“ zu einer Reduktion der sog. „transepithelial electric resistance“ (TEER) [131]. Auch die Barrierefunktion der proliferierenden Zellen, die durch Messung der Zellimpedanz im „Electrical Cell substrate Impedance Sensing“ (ECIS) analysiert wurde, war bei wachsenden ATI-Zellen im Gegensatz zu WT-Zellen signifikant verringert (Abbildung 43). Der verringerte und langsamere Anstieg des Zellwiderstands könnte auch hier ein Indiz für eine abgeschwächte Ausbildung der „tight-junctions“ sein. Eine weitere Analyse war jedoch durch zu unspezifische Antikörper gegen Markerproteine wie Zona occludens 1 (ZO-1) und Claudin-4 nicht möglich. Die Ergebnisse liefern weitere Hinweise auf einen Zellbarriere- und Migrationsfördernden Mechanismus, an denen TRPV4-Kanäle beteiligt sind. Die genauen zellulären und molekularen Signaltransduktionswege in alveolaren Epithelzellen müssen aber noch geklärt werden.

4.7 Lungenhistologie und Funktion in TRPV4^{-/-}-Mäusen

ATII-Zellen können sich nach Lungenverletzungen während Reparaturprozessen bei erwachsenen Mäusen zu ATI-Zellen differenzieren [19], um die Barrierefunktion der Lungenalveole wiederherzustellen. Es lag somit Nahe, dass die bereits diskutierten

Ergebnisse in alveolaren Epithelzellen Typ I und Typ II auch Effekte auf die Ausbildung und Wachstum der korrekten Lungenstruktur haben. Um dabei den möglichen Einfluss von TRPV4-Kanälen zu identifizieren, wurden histologische Analysen in Lungen von jungen und erwachsenen Mäusen durchgeführt. Die „mean chord lengths“ (mittlere Länge der alveolaren Septen, MCL), als Maß für die Alveolargröße, war bei erwachsenen (47 bis 52 Wochen alten) TRPV4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 44). Ähnliche strukturelle Veränderungen wurden auch bei Defiziten anderer TRP-Kanälen wie TRPM6 festgestellt [177]. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Alveolargrößen junger (4 bis 6 Wochen alter) WT- nicht von gleichalten TRPV4^{-/-}-Lungen. Deshalb sind diese Unterschiede wahrscheinlich nicht auf Defekte in der embryonalen Lungenentwicklung, sondern eher auf anhaltende Wachstums- und Reparaturprozesse in erwachsenen Tieren zurückzuführen, obwohl für TRPV4-Kanäle bereits eine Rolle bei der Differenzierung von embryonalen Epithelzellen nachgewiesen wurde [179]. Lungen von 28 bis 30 Wochen alten TRPV4^{-/-}-Mäusen neigten auch zu größeren mittleren Sehnenlängen, die sich jedoch im Vergleich zu WT-Lungen nicht signifikant unterschieden.

Interessanterweise wurden die Emphysem-ähnlichen Veränderungen der Alveolargröße auch bei SP-C-defizienten Mäusen festgestellt [180]. Ein möglicher Grund wäre, dass der fehlende mechanische Schutz durch SP-C zu einer höheren Verletzungsgefahr und zu größeren Alveolarräumen führt. So könnten auch die verringerten pSP-C Spiegel in TRPV4^{-/-}-ATII-Zellen zu einem ähnlichen Phänotyp beitragen. In Mäusen mit Elastase („porcine pancreatic elastase“, PPE)-induzierten Emphysemen konnten ebenfalls eine reduzierte mRNA Expression der ATI und ATII-spezifischen Markern AQP-5 und SP-C nachgewiesen werden [181]. TRPV4^{-/-}-Mäuse zeigten eine – für emphysemartige Veränderungen typische – Lungenfunktion mit einer erhöhten Inspirationskapazität (Abbildung 45) und „Compliance“ (Abbildung 46), sowie einer verringerten Elastizität (Abbildung 47) im Vergleich zu WT-Mäusen des gleichen Alters. Der Verlust der Bildung von Septen aufgrund reduzierter SP-C Expression bei erwachsenen TRPV4^{-/-}-Mäusen könnte auch für einen verminderten Abfluss („clearance“) von Flüssigkeit aus dem Alveolarraum verantwortlich sein und daher eine höhere Ödembildung der TRPV4^{-/-}-Lungen erklären. Eine verminderte alveolare Regeneration sowie

übermäßige Apoptose von alveolaren Zellen führt zur Bildung von Emphysemen [182], die ebenfalls die Ödembildung begünstigt.

5 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Rolle von TRPV4 – einem Ca^{2+} permeablen Kationenkanal – für die idiopathische Lungenfibrose durch Kontraktionsversuche mit primären Lungenfibroblasten und für die Zellmigration gezeigt werden. TRPV4-defiziente, isolierte, perfundierten Lungen zeigten nach Ischämie und Reperfusion drastisch vergrößerte Ödeme im Vergleich zu WT-Kontrollen. Der Verlust von TRPV4-Kanälen führte in alveolären Epithelzellen zu einer verminderten Produktion von pSP-C in ATII- und einer geringeren AQP-5 Expression und Membranlokalisierung in ATI-Zellen. Während die Differenzierung von ATII- zu ATI-Zellen in-vitro unverändert war, zeigten TRPV4-defiziente ATI-Zellen eine deutlich schlechtere Migration und eine verminderte Zellbarrierefunktion (zusammengefasst in Abbildung 48). AQP-5 und SP-C sind wahrscheinlich an kontinuierlich ablaufenden Reparaturprozessen in Lungen erwachsener Mäuse beteiligt, was zu Emphysem-ähnlichen Veränderungen in TRPV4^{-/-}-Mäusen führt, die erst im Erwachsenenalter deutlich sichtbar sind. Lungenfunktionsmessungen bestätigten die strukturellen Emphysem-artigen Veränderungen der TRPV4^{-/-}-Mäuse. Hinweise auf einen molekularen Mechanismus lieferte die geringere nukleare Translokation des Ca^{2+} -abhängigen Transkriptionsfaktors NFATc1.

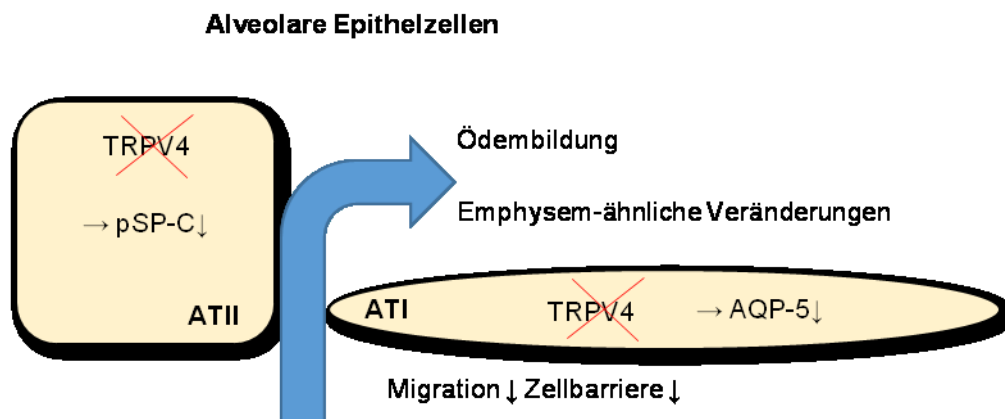


Abbildung 48: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieser Doktorarbeit. AQP-5, Aquaporin 5, ATI, alveolare Epithelzellen Typ I; ATII, alveolare Epithelzellen Typ II, pSP-C, Pro surfactant protein C.

Diese Daten stehen im klaren Gegensatz zu der häufig beschriebenen, Ödem-fördernden Rolle von TRPV4-Kanälen in Endothelzellen [126]–[128] und zeigen in alveolären Epithelzellen eine wichtige Rolle des Kanals für den Schutz vor Lungenödemen. Der molekulare Mechanismus und die zellulären

Signaltransduktionskaskaden unter Beteiligung von TRPV4-Kanälen in alveolären Epithelzellen müssen jedoch in Zukunft noch genauer aufgeklärt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] M. C. McElroy and M. Kasper, "The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair," *Eur. Respir. J.*, vol. 24, no. 4, pp. 664–73, 2004.
- [2] C. E. Barkauskas *et al.*, "Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 7, pp. 3025–3036, 2013.
- [3] T. Volckaert and S. De Langhe, "Lung epithelial stem cells and their niches: Fgf10 takes center stage," *Fibrogenes. Tissue Repair*, vol. 8, no. 7, p. 8, 2014.
- [4] R. G. Lottes, D. A. Newton, D. D. Spyropoulos, and J. E. Baatz, "Alveolar type II cells maintain bioenergetic homeostasis in hypoxia through metabolic and molecular adaptation," *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, vol. 306, no. 10, pp. L947-55, 2014.
- [5] B. J. Canning, N. Mori, and S. B. Mazzone, "Vagal afferent nerves regulating the cough reflex," *Respir. Physiol. Neurobiol.*, vol. 152, no. 3, pp. 223–42, 2006.
- [6] J. R. Rock *et al.*, "Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 31, pp. 12771–5, 2009.
- [7] D. Zheng *et al.*, "Differentiation of Club Cells to Alveolar Epithelial Cells in Vitro," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 41661, 2017.
- [8] K. Mutze, S. Vierkotten, J. Milosevic, O. Eickelberg, and M. Konigshoff, "Enolase 1 (ENO1) and protein disulfide-isomerase associated 3 (PDIA3) regulate Wnt/ -catenin-driven trans-differentiation of murine alveolar epithelial cells," *Dis. Model. Mech.*, vol. 8, no. 8, pp. 877–890, 2015.
- [9] K. C. Stone, R. R. Mercer, P. Gehr, B. Stockstill, and J. D. Crapo, "Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 6, no. 2, pp. 235–43, 1992.
- [10] J. Bhattacharya and M. A. Matthay, "Regulation and Repair of the Alveolar-Capillary Barrier in Acute Lung Injury," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, pp. 593–615, 2013.
- [11] E. R. Weibel, "On the Tricks Alveolar Epithelial Cells Play to Make a Good Lung," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 191, no. 5, pp. 504–13, 2015.
- [12] L. Dobbs, M. Johnson, J. Vanderbilt, L. Allen, and R. Gonzalez, "The great big alveolar TI cell: Evolving concepts and paradigms," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 25, no. 1, pp. 55–62, 2010.
- [13] S. Wang and R. D. Hubmayr, "Type I alveolar epithelial phenotype in primary culture," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 44, no. 5, pp. 692–9, 2011.
- [14] L. G. Dobbs, R. Gonzalez, M. A. Matthay, E. P. Carter, L. Allen, and A. S. Verkman, "Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high

- water permeability between the airspace and vasculature in rat lung,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 17, no. 95, pp. 2991–6, 1998.
- [15] Y. Song, S. Jayaraman, B. Yang, M. A. Matthay, and A. S. Verkman, “Role of aquaporin water channels in airway fluid transport, humidification, and surface liquid hydration,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 17, pp. 573–582, 2001.
- [16] H. Fehrenbach, “Alveolar epithelial type II cell: Defender of the alveolus revisited,” *Respir. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 33–46, 2001.
- [17] H. L. Halliday, “Surfactants: Past, present and future,” in *Journal of Perinatology*, 2008, pp. S47-56.
- [18] L. M. Nogee and B. C. Trapnell, “Lung Diseases Associated With Disruption of Pulmonary Surfactant Homeostasis,” in *Kendig’s Disorders of the Respiratory Tract in Children*, 2018, p. 57.
- [19] T. J. Desai, D. G. Brownfield, and M. A. Krasnow, “Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer,” *Nature*, vol. 507, no. 7491, pp. 190–4, 2014.
- [20] M. I. Hollenhorst, K. Richter, and M. Fronius, “Ion Transport by Pulmonary Epithelia,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, p. 174306, 2011.
- [21] W. A. den Hengst, J. F. Gielis, J. Y. Lin, P. E. Van Schil, L. J. De Windt, and A. L. Moens, “Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 299, no. 5, pp. H1283-99, 2010.
- [22] M. de Perrot, M. Liu, T. K. Waddell, and S. Keshavjee, “Ischemia-reperfusion-induced lung injury,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 167, no. 4, pp. 490–511, 2003.
- [23] M. K. Porteous, J. M. Diamond, and J. D. Christie, “Primary graft dysfunction: Lessons learned about the first 72h after lung transplantation,” *Curr. Opin. Organ Transplant.*, vol. 20, no. 5, pp. 506–514, 2015.
- [24] J. D. Christie, M. Carby, R. Bag, P. Corris, M. Hertz, and D. Weill, “Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part II: Definition. A consensus statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation,” *J. Hear. Lung Transplant.*, vol. 24, no. 10, pp. 1454–9, 2005.
- [25] M.-B. G., F. C.W., and M. T.R., “Animal models of acute lung injury,” *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 295, no. 3, pp. 379–99, 2008.
- [26] R. C. Allison, J. Kyle, W. K. Adkins, V. R. Prasad, J. M. McCord, and A. E. Taylor, “Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxygenation on lung vascular permeability and resistance,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 69, pp. 597–603, 1990.
- [27] C. S. H. Ng, S. Wan, A. A. Arifi, and A. P. C. Yim, “Inflammatory response to pulmonary ischemia-reperfusion injury,” *Surg. Today*, vol. 36, no. 3, pp. 205–14, 2006.

- [28] I. Matot *et al.*, "Lung injury after in vivo reperfusion: Outcome at 27 hours after reperfusion," *Anesthesiology*, vol. 109, no. 2, pp. 269–78, 2008.
- [29] A. B. Fisher, C. Dodia, Z. Tan, I. Ayene, and R. G. Eckenhoff, "Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia," *J. Clin. Invest.*, vol. 88, no. 2, pp. 674–9, 1991.
- [30] A. B. Al-Mehdi *et al.*, "Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺," *Circ. Res.*, vol. 83, no. 7, pp. 730–7, 1998.
- [31] T. Ishiyama, S. Dharmarajan, M. Hayama, H. Moriya, K. Grapperhaus, and G. A. Patterson, "Inhibition of nuclear factor κ B by I κ B superrepressor gene transfer ameliorates ischemia-reperfusion injury after experimental lung transplantation," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 130, no. 1, pp. 194–201, 2005.
- [32] G. Zhao, A. B. Al-Mehdi, and A. B. Fisher, "Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs," *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, vol. 273, no. 6, pp. L1112–L1117, 1997.
- [33] R. S. Ferrari and C. F. Andrade, "Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2015, p. 590987, 2015.
- [34] D. R. G. *et al.*, "Severe reperfusion lung injury after double lung transplantation," *Crit. Care*, vol. 6, no. 3, pp. 240–244, 2002.
- [35] M. S. Bhabra, D. N. Hopkinson, T. E. Shaw, T. L. Hooper, D. A. Fullerton, and J. Bavaria, "Attenuation of lung graft reperfusion injury by a nitric oxide donor," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 113, no. 2, pp. 327–33, 1997.
- [36] M. Ochs *et al.*, "Ultrastructural alterations in intraalveolar surfactant subtypes after experimental ischemia and reperfusion," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 160, no. 2, pp. 718–24, 1999.
- [37] N. Weissmann *et al.*, "Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice," *Nat. Commun.*, vol. 3, pp. 610–649, 2012.
- [38] S. Balakrishna *et al.*, "TRPV4 inhibition counteracts edema and inflammation and improves pulmonary function and oxygen saturation in chemically induced acute lung injury," *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, vol. 307, no. 2, pp. L158–L172, 2014.
- [39] H. Soni, D. Peixoto-Neves, M. A. Olushoga, and A. Adebisi, "Pharmacological inhibition of TRPV4 channels protects against ischemia-reperfusion-induced renal insufficiency in neonatal pigs," *Clin. Sci.*, vol. 133, no. 9, p. CS20180815, 2019.
- [40] G. Raghu *et al.*, "An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 183, no. 6, pp. 788–824, 2011.

- [41] F. F. Ferri, *Ferri's Clinical Advisor 2018 5 Books in 1*. Elsevier, 2018.
- [42] S. Harari and A. Caminati, "IPF: New insight on pathogenesis and treatment," *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 65, no. 5, pp. 537–53, 2010.
- [43] H. Loomis-King, K. R. Flaherty, and B. B. Moore, "Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 13, no. 3, pp. 377–85, 2013.
- [44] C. Hung *et al.*, "Role of lung Pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 188, no. 7, pp. 820–30, 2013.
- [45] S. O. Rahaman *et al.*, "TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 12, pp. 5225–38, 2014.
- [46] B. R. Celli *et al.*, "Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: A summary of the ATS/ERS position paper," *Eur. Respir. J.*, vol. 23, no. 6, pp. 932–46, 2004.
- [47] V. Cottin *et al.*, "Combined pulmonary fibrosis and emphysema: A distinct underrecognised entity," *Eur. Respir. J.*, vol. 26, no. 4, pp. 586–93, 2005.
- [48] V. Cottin *et al.*, "Combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome in connective tissue disease," *Arthritis Rheum.*, vol. 63, no. 1, pp. 295–304, 2011.
- [49] S. V. Kemp, M. I. Polkey, and P. L. Shah, "The Epidemiology, Etiology, Clinical Features, and Natural History of Emphysema," *Thorac. Surg. Clin.*, vol. 19, no. 2, pp. 149–58, 2009.
- [50] J. Vestbo *et al.*, "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease GOLD executive summary," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 187, no. 4, pp. 347–65, 2013.
- [51] K. S. Naunheim *et al.*, "Long-Term Follow-Up of Patients Receiving Lung-Volume-Reduction Surgery Versus Medical Therapy for Severe Emphysema by the National Emphysema Treatment Trial Research Group," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 82, no. 2, pp. 431–43, 2006.
- [52] B. Mercer, V. Lemaitre, C. Powell, and J. D'Armiento, "The Epithelial Cell in Lung Health and Emphysema Pathogenesis," *Curr. Respir. Med. Rev.*, vol. 2, no. 2, pp. 101–142, 2006.
- [53] M. E. Avery and J. Mead, "Surface Properties in Relation to Atelectasis and Hyaline Membrane Disease," *AMA. J. Dis. Child.*, vol. 97, no. 5, pp. 517–23, 1959.
- [54] A. I. Papaioannou *et al.*, "Surfactant Proteins in Smoking-Related Lung Disease," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 16, no. 14, pp. 1574–81, 2016.
- [55] J. P. Schneider, M. Arkenau, L. Knudsen, D. Wedekind, and M. Ochs, "Lung remodeling in aging surfactant protein D deficient mice," *Ann. Anat.*, vol. 211,

- pp. 158–175, 2017.
- [56] J. H. Chen, D. Y. Zhao, S. H. An, Y. J. Zheng, H. P. Wang, and H. L. Ma, “[Clinical manifestations of three cases of surfactant protein C p. V39L mutation].,” *Chinese J. Pediatr.*, vol. 55, no. 6, pp. 457–461, 2017.
- [57] A. I. Papaioannou *et al.*, “Serum levels of surfactant proteins in patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE),” *PLoS One*, vol. 11, no. 6, p. e0157789, 2016.
- [58] A. O. Selim, Z. A. Gouda, and S. A. Selim, “An experimental study of a rat model of emphysema induced by cigarette smoke exposure and the effect of Survanta therapy,” *Ann. Anat.*, vol. 211, pp. 69–77, 2017.
- [59] D. J. Cosens and A. Manning, “Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant,” *Nature*, vol. 224, no. 5216, pp. 285–7, 1969.
- [60] C. Montell and G. M. Rubin, “Molecular characterization of the *drosophila* trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction,” *Neuron*, vol. 2, no. 4, pp. 1313–23, 1989.
- [61] D. E. Clapham, “TRP channels as cellular sensors. - PubMed - NCBI,” vol. 426, no. December, pp. 517–524, 2003.
- [62] B. Minke and B. Cook, “TRP Channel Proteins and Signal Transduction,” *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 2, pp. 429–472, 2002.
- [63] D. E. Clapham, “Calcium Signaling Review,” *Cell*, vol. 80, pp. 259–268, 1995.
- [64] M. Baxter, M. A. Birrell, and M. G. Belvisi, “The Role Of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (trpv1) In Tobacco Smoke Induced Airway Inflammation,” *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 5, no. 8, pp. 837–852, 2012.
- [65] G. Zhu *et al.*, “Association of TRPV4 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 18, no. 11, pp. 2053–62, 2009.
- [66] E. Andrè *et al.*, “Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by α,β -unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents,” *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 7, pp. 2574–82, 2008.
- [67] B. F. Bessac, M. Sivula, C. A. Von Hehn, J. Escalera, L. Cohn, and S. E. Jordt, “TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons,” *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 5, pp. 1899–910, 2008.
- [68] K. S. Thorneloe *et al.*, “An Orally Active TRPV4 Channel Blocker Prevents and Resolves Pulmonary Edema Induced by Heart Failure,” *Sci Transl Med*, vol. 4, no. 159, p. 159ra148, 2012.
- [69] K. Hofmann *et al.*, “Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1863, no. 2, pp. 560–568, 2017.

- [70] M. Gees, B. Colsoul, and B. Nilius, "The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ Signaling," *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, vol. 2, no. 10, pp. 1–31, 2010.
- [71] R. G. Walker, A. T. Willingham, and C. S. Zuker, "A *Drosophila* mechanosensory transduction channel," *Science (80-.)*, vol. 287, no. 5461, pp. 2229–34, 2000.
- [72] W. Li, Z. Feng, P. W. Sternberg, and X. Z. S. Xu, "A *C. elegans* stretch receptor neuron revealed by a mechanosensitive TRP channel homologue," *Nature*, vol. 440, no. 7084, pp. 684–7, 2006.
- [73] J.-B. Shin *et al.*, "Xenopus TRPN1 (NOMPC) localizes to microtubule-based cilia in epithelial cells, including inner-ear hair cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 35, pp. 12572–7, 2005.
- [74] S. Sidi, R. W. Friedrich, and T. Nicolson, "NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction," *Science (80-.)*, vol. 301, no. 5629, pp. 96–9, 2003.
- [75] R. Gaudet, "TRP channels entering the structural era," *J. Physiol.*, vol. 586, no. 15, pp. 3565–3575, 2008.
- [76] J. Zheng, "Molecular mechanism of TRP channels," *Compr. Physiol.*, vol. 3, no. 1, pp. 221–42, 2013.
- [77] C. Montell, "Physiology, Phylogeny, and Functions of the TRP Superfamily of Cation Channels," *Sci. Signal.*, vol. 2001, no. 90, pp. re1–re1, 2001.
- [78] T. Rohács, C. M. B. Lopes, I. Michailidis, and D. E. Logothetis, "PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain," *Nat. Neurosci.*, vol. 8, no. 5, pp. 626–34, 2005.
- [79] L. Gregorio-Teruel, P. Valente, B. Liu, G. Fernández-Ballester, F. Qin, and A. Ferrer-Montiel, "The Integrity of the TRP Domain Is Pivotal for Correct TRPV1 Channel Gating," *Biophys. J.*, vol. 109, no. 3, pp. 529–541, 2015.
- [80] V. Zayats, A. Samad, B. Minofar, K. E. Roelofs, T. Stockner, and R. Etrich, "Regulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by its N-terminal ankyrin repeat domain," *J. Mol. Model.*, vol. 19, no. 11, pp. 4689–700, 2013.
- [81] I. Erler, D. Hirnet, U. Wissenbach, V. Flockerzi, and B. A. Niemeyer, "Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 33, pp. 34456–63, 2004.
- [82] R. Gaudet, "A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond," *Mol. Biosyst.*, vol. 4, no. 5, pp. 372–9, 2008.
- [83] P. V. Lishko, E. Procko, X. Jin, C. B. Phelps, and R. Gaudet, "The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity," *Neuron*, vol. 54, no. 6, pp. 905–18, 2007.

- [84] C. Montell, "The TRP Superfamily of Cation Channels," *Sci. Signal.*, vol. 2005, no. 272, pp. re3–re3, 2005.
- [85] L. W. Runnels, L. Yue, and D. E. Clapham, "TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities," *Science (80-)*, vol. 291, no. 5506, pp. 1043–7, 2001.
- [86] P. J. Milla, P. J. Aggett, O. H. Wolff, and J. T. Harries, "Studies in primary hypomagnesaemia: Evidence for defective carrier-mediated small intestinal transport of magnesium," *Gut*, vol. 20, no. 11, pp. 1028–33, 1979.
- [87] V. Chubanov, L. Mittermeier, and T. Gudermann, "Role of kinase-coupled TRP channels in mineral homeostasis," *Pharmacol. Ther.*, vol. 184, pp. 159–176, 2018.
- [88] Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., L. J. D., and Julius D., "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway.," *Nature*, vol. 389, no. 6653, pp. 816–824, 1997.
- [89] R. Vennekens, G. Owsianik, and B. Nilius, "Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels: An Overview," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 14, no. 1, pp. 18–31, 2008.
- [90] M. J. Gunthorpe, C. D. Benham, A. Randall, J. B. Davis, and J. B. Davis, "The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels," vol. 23, no. 4, pp. 183–191, 2002.
- [91] N. M. Goldenberg, K. Ravindran, and W. M. Kuebler, "TRPV4: Physiological role and therapeutic potential in respiratory diseases," *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 388, no. 4, pp. 421–36, 2015.
- [92] T. Voets, G. Droogmans, U. Wissenbach, A. Janssens, V. Flockerzi, and B. Nilius, "The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels," *Nature*, vol. 430, no. 7001, pp. 748–54, 2004.
- [93] W. Everaerts *et al.*, "The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil," *Curr. Biol.*, vol. 21, no. 4, pp. 316–21, 2011.
- [94] C. A. Reilly, J. L. Taylor, D. L. Lanza, B. A. Carr, D. J. Crouch, and G. S. Yost, "Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors," *Toxicol. Sci.*, vol. 73, no. 1, pp. 170–81, 2003.
- [95] L. R. Sadofsky, R. Ramachandran, C. Crow, M. Cowen, S. J. Compton, and A. H. Morice, "Inflammatory stimuli up-regulate transient receptor potential vanilloid-1 expression in human bronchial fibroblasts," *Exp. Lung Res.*, vol. 38, no. 2, pp. 75–81, 2012.
- [96] A. Dietrich, D. Steinritz, and T. Gudermann, "Transient receptor potential (TRP) channels as molecular targets in lung toxicology and associated diseases," *Cell Calcium*, vol. 67, pp. 123–137, 2017.
- [97] M. J. Caterina, T. A. Rosen, M. Tominaga, A. J. Brake, and D. Julius, "A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat," *Nature*,

- vol. 398, no. 6726, pp. 436–41, 1999.
- [98] D. J. Beech, K. Muraki, and R. Flemming, “Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP,” *J. Physiol.*, vol. 559, no. 3, pp. 685–706, 2004.
- [99] T. M. Link, U. Park, B. M. Vonakis, D. M. Raben, M. J. Soloski, and M. J. Caterina, “TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis,” *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 3, pp. 232–9, 2010.
- [100] S. Mandadi *et al.*, “TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP,” *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 458, no. 6, pp. 1093–1102, 2009.
- [101] M. K. Chung, H. Lee, A. Mizuno, M. Suzuki, and M. J. Caterina, “TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 20, pp. 21569–75, 2004.
- [102] A. Moqrich *et al.*, “Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin,” *Science (80-.)*, vol. 307, no. 5714, pp. 1468–72, 2005.
- [103] J. Luo, R. Stewart, R. Berdeaux, and H. Hu, “Tonic inhibition of TRPV3 by Mg²⁺ in mouse epidermal keratinocytes,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 132, no. 9, pp. 2158–2165, 2012.
- [104] J. Bin Peng *et al.*, “Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 32, pp. 22739–46, 1999.
- [105] P. Weissgerber *et al.*, “Excision of *Trpv6* gene leads to severe defects in epididymal Ca²⁺ absorption and male fertility much like single D541A pore mutation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 22, pp. 17930–41, 2012.
- [106] B. Nilius and A. Szallasi, “Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets: From the Science of Basic Research to the Art of Medicine,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 66, no. 3, pp. 676–814, 2014.
- [107] U. Wissenbach, M. Bödding, M. Freichel, and V. Flockerzi, “Trp12, a novel Trp related protein from kidney,” *FEBS Lett.*, vol. 485, no. 2–3, pp. 127–34, 2000.
- [108] W. Liedtke *et al.*, “Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor,” *Cell*, vol. 103, no. 3, pp. 525–35, 2000.
- [109] R. Strotmann, C. Harteneck, K. Nunnenmacher, G. Schultz, and T. D. Plant, “OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. 10, pp. 695–702, 2000.
- [110] N. S. Delany *et al.*, “Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2,” *Physiol. Genomics*, vol. 4, no. 3, pp. 165–74, 2001.

- [111] D. E. Clapham, L. W. Runnels, and C. Strübing, "The TRP ion channel family," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 2, no. 6, pp. 387–96, 2001.
- [112] M. Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., and Schaefer, "Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 451, no. 1, pp. 35–42, 2005.
- [113] M. Köttgen *et al.*, "TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex," *J. Cell Biol.*, vol. 182, no. 3, pp. 437–47, 2008.
- [114] N. B. Voets T, Prenen J, Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Wissenbach U, Bödding M, Droogmans G, "Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 37, pp. 33704–33710, 2002.
- [115] A. Garcia-Elias *et al.*, "Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate-dependent rearrangement of TRPV4 cytosolic tails enables channel activation by physiological stimuli," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 23, pp. 9553–8, 2013.
- [116] H. Watanabe, J. Vriens, A. Janssens, R. Wondergem, G. Droogmans, and B. Nilius, "Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca²⁺," *Cell Calcium*, vol. 33, no. 5–6, pp. 489–95, 2003.
- [117] R. Strotmann, M. Semtner, F. Kepura, T. D. Plant, and T. Schöneberg, "Interdomain interactions control Ca²⁺-dependent potentiation in the cation channel TRPV4," *PLoS One*, vol. 5, no. 5, p. e10580, 2010.
- [118] H. C. Fan, X. Zhang, and P. A. McNaughton, "Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 41, pp. 27884–91, 2009.
- [119] D. C. Hill-Eubanks, A. L. Gonzales, S. K. Sonkusare, and M. T. Nelson, "Vascular TRP Channels: Performing Under Pressure and Going with the Flow," *Physiology*, vol. 29, no. 5, pp. 343–60, 2014.
- [120] J. Li *et al.*, "TRPV4-mediated calcium influx into human bronchial epithelia upon exposure to diesel exhaust particles," *Environ. Health Perspect.*, vol. 119, no. 6, pp. 784–93, 2011.
- [121] I. M. Lorenzo, W. Liedtke, M. J. Sanderson, and M. A. Valverde, "TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 34, pp. 12611–6, 2008.
- [122] J. S. Xia, Y., Fu, Z., Hu, J., Huang, C., Paudel, O., Cai, S., Liedtke, W., and Sham, "TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension," *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 305, no. 7, pp. C690–C692, 2013.
- [123] N. M. Goldenberg, L. Wang, H. Ranke, W. Liedtke, A. Tabuchi, and W. M. Kuebler, "TRPV4 Is Required for Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction,"

- Anesthesiology*, vol. 122, no. 6, pp. 1338–48, 2015.
- [124] W. Everaerts *et al.*, “Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis,” *J. Urol.*, vol. 107, no. 44, pp. 19084–9, 2010.
- [125] A. Dietrich, “Modulators of Transient Receptor Potential (TRP) Channels as Therapeutic Options in Lung Disease,” *Pharmaceuticals*, vol. 12, p. 23, 2019.
- [126] M. Y. Jian, J. A. King, A. B. Al-Mehdi, W. Liedtke, and M. I. Townsley, “High vascular pressure-induced lung injury requires P450 epoxygenase-dependent activation of TRPV4,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 38, no. 4, pp. 386–392, 2008.
- [127] K. Hamanaka *et al.*, “TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs,” *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, vol. 293, no. 4, pp. L923-32, 2007.
- [128] M. L. *et al.*, “Transient Receptor Potential Vanilloid 4 and Serum Glucocorticoid-regulated Kinase 1 Are Critical Mediators of Lung Injury in Overventilated Mice in Vivo,” *Anesthesiology*, vol. 126, no. 2, pp. 300–311, 2017.
- [129] Y. Akazawa, T. Yuki, H. Yoshida, Y. Sugiyama, and S. Inoue, “Activation of TRPV4 strengthens the tight-junction barrier in human epidermal keratinocytes,” *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 26, no. 1, pp. 15–21, 2012.
- [130] D. A. W. Janssen *et al.*, “TRPV4 channels in the human urogenital tract play a role in cell junction formation and epithelial barrier,” *Acta Physiol.*, vol. 218, no. 1, pp. 38–48, 2016.
- [131] J. Martínez-Rendón *et al.*, “TRPV4 Regulates Tight Junctions and Affects Differentiation in a Cell Culture Model of the Corneal Epithelium,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 232, no. 7, pp. 1794–1807, 2017.
- [132] D. F. Alvarez, J. A. King, D. Weber, E. Addison, W. Liedtke, and M. I. Townsley, “TRPV4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: A novel mechanism of acute lung injury,” *Circ. Res.*, vol. 99, no. 9, pp. 988–995, 2006.
- [133] Y. A. Alpizar *et al.*, “TRPV4 activation triggers protective responses to bacterial lipopolysaccharides in airway epithelial cells,” *Nat. Commun.*, vol. 8, p. 1059, 2017.
- [134] D. Steinritz, B. Stenger, A. Dietrich, T. Gudermann, and T. Popp, “TRPs in Tox: Involvement of Transient Receptor Potential-Channels in Chemical-Induced Organ Toxicity—A Structured Review,” *Cells*, vol. 7, p. 8, 2018.
- [135] S. Herold, N. M. Gabrielli, and I. Vadász, “Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction,” *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, vol. 305, no. 10, pp. L665-81, 2013.
- [136] T. Stevens, “Functional and Molecular Heterogeneity of Pulmonary Endothelial Cells,” *Proc. Am. Thorac. Soc.*, vol. 8, no. 6, pp. 453–7, 2011.

- [137] R. E. Morty and W. M. Kuebler, "TRPV4: an exciting new target to promote alveolocapillary barrier function," *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, vol. 307, no. 11, pp. L817–L821, 2014.
- [138] W. M. Kuebler, X. Ying, and J. Bhattacharya, "Pressure-induced endothelial Ca²⁺ oscillations in lung capillaries," *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, vol. 282, no. 5, pp. L917–23, 2002.
- [139] W. M. Kuebler *et al.*, "Stretch Activates Nitric Oxide Production in Pulmonary Vascular Endothelial Cells in Situ," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 168, no. 11, pp. 1391–8, 2003.
- [140] A. Dietrich *et al.*, "Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 16, pp. 6980–6989, 2005.
- [141] A. Mizuno, N. Matsumoto, M. Imai, and M. Suzuki, "Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 285, pp. C96–101, 2003.
- [142] M. Suzuki, A. Mizuno, K. Kodaira, and M. Imai, "Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4," *J. Biol. Chem.*, 2003.
- [143] M. Corti, A. R. Brody, and J. H. Harrison, "Isolation and Primary Culture of Murine Alveolar Type II Cells," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 309–15, 1996.
- [144] L. Dobbs, "Isolation and culture of alveolar type II cells," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 258, no. 4, pp. L134–47, 1990.
- [145] P. Doñate-Macián *et al.*, "The TRPV4 channel links calcium influx to DDX3X activity and viral infectivity," *Nat. Commun.*, vol. 9, p. 2307, 2018.
- [146] S. Simmons, L. Erfinanda, C. Bartz, and W. M. Kuebler, "Novel mechanisms regulating endothelial barrier function in the pulmonary microcirculation," *J. Physiol.*, vol. 597, no. 4, pp. 997–1021, 2019.
- [147] V. K. Sidhaye, K. S. Schweitzer, M. J. Caterina, L. Shimoda, and L. S. King, "Shear stress regulates aquaporin-5 and airway epithelial barrier function," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 9, pp. 3345–3350, 2008.
- [148] V. K. Sidhaye, A. D. Guler, K. S. Schweitzer, F. D'Alessio, M. J. Caterina, and L. S. King, "Transient receptor potential vanilloid 4 regulates aquaporin-5 abundance under hypotonic conditions," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 12, pp. 4747–4752, 2006.
- [149] D. C. Blaydon and D. P. Kelsell, "Defective channels lead to an impaired skin barrier," *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. 20, pp. 4343–4350, 2014.
- [150] Scireq, "FLEXIVENT FX BASIC TRAINING PRESENTATION," 2018, pp. 21–31.
- [151] S. Earley, T. J. Heppner, M. T. Nelson, and J. E. Brayden, "TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels,"

- Circ. Res.*, vol. 97, no. 12, pp. 1270–1279, 2005.
- [152] X.-R. Yang, M.-J. Lin, L. S. McIntosh, and J. S. K. Sham, “Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle,” *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, vol. 290, no. 6, pp. L1267–L1276, 2006.
- [153] D. L. Cioffi, K. Lowe, D. F. Alvarez, C. Barry, and T. Stevens, “TRPping on the Lung Endothelium: Calcium Channels That Regulate Barrier Function,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, no. 4, pp. 765–776, 2009.
- [154] S. Herold, N. M. Gabrielli, and I. Vadász, “Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction,” *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 305, pp. L665-681, 2013.
- [155] J. M. Fernández-Fernández *et al.*, “Functional coupling of TRPV4 cationic channel and large conductance, calcium-dependent potassium channel in human bronchial epithelial cell lines,” *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 457, no. 1, pp. 149–59, 2008.
- [156] M. A. McAlexander, M. A. Luttmann, G. E. Hunsberger, and B. J. Udem, “Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Activation Constricts the Human Bronchus via the Release of Cysteinyl Leukotrienes,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 349, pp. 118 – 125, 2014.
- [157] V. Hartmannsgruber *et al.*, “Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression,” *PLoS One*, vol. 2, no. 9, p. e827, 2007.
- [158] R. Zaninetti *et al.*, “Activation of TRPV4 channels reduces migration of immortalized neuroendocrine cells,” *J. Neurochem.*, vol. 116, no. 4, pp. 606–15, 2011.
- [159] E. Martin *et al.*, “Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells,” *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 464, no. 3, pp. 261–72, 2012.
- [160] J. Yin *et al.*, “Negative-feedback loop attenuates hydrostatic lung edema via a cGMP-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 4,” *Circ. Res.*, vol. 102, no. 8, pp. 966–74, 2008.
- [161] K. Suresh *et al.*, “Hydrogen peroxide-induced calcium influx in lung microvascular endothelial cells involves TRPV4,” *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, vol. 309, no. 12, pp. L1467-77, 2015.
- [162] M. T. Lin *et al.*, “Functional Coupling of TRPV4, IK, and SK Channels Contributes to Ca²⁺-Dependent Endothelial Injury in Rodent Lung,” *Pulm. Circ.*, vol. 5, no. 2, pp. 279–290, 2015.
- [163] S. A. Mendoza *et al.*, “TRPV4-mediated endothelial Ca²⁺ influx and vasodilation in response to shear stress,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 298, no. 2, pp. H466-76, 2010.
- [164] R. R. Vanderpool and N. C. Chesler, “Characterization of the Isolated,

- Ventilated, and Instrumented Mouse Lung Perfused with Pulsatile Flow,” *J. Vis. Exp.*, vol. 50, p. 2690, 2011.
- [165] J. Yin *et al.*, “Role of transient receptor potential vanilloid 4 in neutrophil activation and acute lung injury,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 54, no. 3, pp. 370–83, 2016.
- [166] S. H. Han and R. K. Mallampalli, “The role of surfactant in lung disease and host defense against pulmonary infections,” *Ann. Am. Thorac. Soc.*, vol. 12, no. 5, pp. 765–774, 2015.
- [167] X. Du *et al.*, “Surfactant proteins SP-A and SP-D ameliorate pneumonia severity and intestinal injury in a murine model of staphylococcus aureus pneumonia,” *Shock*, vol. 46, no. 2, pp. 164–72, 2016.
- [168] B. A. Hills, “An alternative view of the role(s) of surfactant and the alveolar model,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 87, pp. 1567–1583, 1999.
- [169] X. Liu *et al.*, “A role for AQP5 in activation of TRPV4 by hypotonicity: Concerted involvement of AQP5 and TRPV4 in regulation of cell volume recovery,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 22, pp. 15485–95, 2006.
- [170] T. Ma, N. Fukuda, Y. Song, M. A. Matthay, and A. S. Verkman, “Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 1, pp. 93–100, 2000.
- [171] L. S. King, S. Nielsen, and P. Agre, “Aquaporins and the respiratory system: Advice for a lung investigator,” *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 1, pp. 15–6, 2000.
- [172] C. Yan, Y. Zhu, X. Zhang, X. Chen, W. Zheng, and J. Yang, “Down-regulated aquaporin 5 inhibits proliferation and migration of human epithelial ovarian cancer 3AO cells,” *J. Ovarian Res.*, vol. 7, p. 78, 2014.
- [173] X. X. Jiang *et al.*, “Reduced migration of Ishikawa cells associated with downregulation of aquaporin-5,” *Oncol. Lett.*, vol. 4, no. 2, pp. 257–261, 2012.
- [174] Z. Chen, Z. Zhang, Y. Gu, and C. Bai, “Impaired migration and cell volume regulation in aquaporin 5-deficient SPC-A1 cells,” *Respir. Physiol. Neurobiol.*, vol. 176, no. 3, pp. 110–117, 2011.
- [175] T. Song *et al.*, “Expression of aquaporin 5 in primary carcinoma and lymph node metastatic carcinoma of non-small cell lung cancer,” *Oncol. Lett.*, vol. 9, no. 6, pp. 2799–2804, 2015.
- [176] H. H. Jensen, F. H. Login, J. S. Koffman, T. H. Kwon, and L. N. Nejsum, “The role of aquaporin-5 in cancer cell migration: A potential active participant,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 79, pp. 271–276, 2016.
- [177] V. Chubanov *et al.*, “Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival,” *Elife*, vol. 5, p. e20914, 2016.
- [178] K. Rashid, I. K. Sundar, J. Gerloff, D. Li, and I. Rahman, “Lung cellular senescence is independent of aging in a mouse model of COPD/emphysema,”

- Sci. Rep.*, vol. 8, p. 9023, 2018.
- [179] P. S. Nayak *et al.*, “Mechanotransduction via TRPV4 regulates inflammation and differentiation in fetal mouse distal lung epithelial cells,” *Respir. Res.*, vol. 16, no. 1, p. 60, 2015.
- [180] S. W. Glasser, E. A. Detmer, M. Ikegami, C. L. Na, M. T. Stahlman, and J. A. Whitsett, “Pneumonitis and emphysema in sp-C gene targeted mice,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 16, pp. 14291–8, 2003.
- [181] Y.-W. Lan *et al.*, “Predifferentiated amniotic fluid mesenchymal stem cells enhance lung alveolar epithelium regeneration and reverse elastase-induced pulmonary emphysema,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 10, no. 1, p. 163, 2019.
- [182] D. M. L. W. Kruk, I. H. Heijink, D. J. Slebos, W. Timens, and N. H. Ten Hacken, “Mesenchymal Stromal Cells to Regenerate Emphysema: On the Horizon?,” *Respiration*, vol. 96, no. 2, pp. 148–158, 2018.

Anhang

Publikationen

- **Jonas Weber**, Yu-Kai Chao, ..., Grimm C., Gudermann T. Dietrich A. (2019)
Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channels are essential for alveolar epithelial cell function". Zur Publikation eingereicht bei eLife.
- Hofmann K, Fiedler S, Vierkotten S, **Weber J**, ..., Dietrich A. (2017)
"Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis." Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.

Vorträge und Kongressbeiträge

- **Walther-Straub-Institut, München 2018**
„Effekt von TRPV4 auf die isolierte, perfundierte Lunge und Untersuchung zur Funktion in Endothel- und Epithelzellen“
- **Calcium Signaling Gordon Research Conference, Lucca (Italien) 2017**
“A protective role of TRPV4 in ischemia/reperfusion-induced edema formation in the lung”
- **DGPT, Heidelberg 2017**
“A protective role of TRPV4 in ischemia/reperfusion-induced edema formation in the lung”
- **DZL Meeting, München 2017**
“A protective role of TRPV4 in ischemia/reperfusion-induced edema formation in the lung”
- **TRR - CRC.152 Meeting, Herrsching 2016**
“Studying the role of TRPV4 and TRPC6 channels in lung edema formation and pulmonary fibrosis”
- **DGPT, Berlin 2016**
“Studying the role of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channels in lung edema formation utilizing an isolated perfused lung model”
- **Walther-Straub-Institut, München 2015**
“TRPV4 Funktion in Lungengeweben”

- **Young Scientists Day in Herrsching 2015**
"Revealing the function of TRPV4 in lung tissues"

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Jonas Albert Weber, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Die Rolle des transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)-Kanals in alveolaren Epithelzellen “

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 25.08.2020

Jonas Weber

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Gudermann, der mir ermöglichte, meine Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen.

Ein sehr großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Alexander Dietrich für die Betreuung meiner Arbeit. Du warst mir eine Hilfestellung bei allen praktischen und theoretischen Arbeiten. Ein großes Lob möchte ich dir aussprechen für die nahe Betreuung deiner Doktoranden, was wahrlich nicht selbstverständlich ist. Ich konnte während meiner Zeit in deiner AG vieles lernen und durfte auf diversen Kongressen über den Tellerrand schauen.

Ich werde immer mit Freude an die Arbeitsatmosphäre im „A-Team“ (AG Dietrich) zurückdenken. Vielen Dank an Bettina, Martina, Katharina, und Larissa. Ich hatte immer sehr viel Spaß mit euch zu arbeiten, zu diskutieren und den ein oder anderen sehr lustigen Abend zu verbringen. Ein besonderer Dank geht an Susanne für die vielen Diskussionen von wissenschaftlichem bis hin zu totalem Swaaaaagg, was mit Sicherheit beide Doktorarbeiten bereichert hat.

Vielen Dank an das gesamte WSI für die kollegiale und schöne Zeit.

Ein herzlicher Dank gilt meinen lieben Eltern Jutta und Andreas Weber und meinen Brüdern Lukas und Simon. Ihr habt mich immer unterstützt und mir in jeder Situation mit Rat und Tat zur Seite gestanden. In allen schwierigen Zeiten habt ihr mir Ablenkung geschenkt und Mut zugesprochen. VIELEN DANK

Auch meinen Freunden Nippel, Sascha, Saskia, Bernd, Oxel und Mark danke ich für die unzähligen Besuche, Unternehmungen, Reisen und tollen Erlebnisse, von denen hoffentlich noch viele folgen. Ihr seid toll und ich möchte euch nie missen.

Das beste Ergebnis meiner Doktorarbeit war aber sicher die Bekanntschaft mit dir, Franziska. Du begleitest mich auf allen Höhen und Tiefen unseres Lebens und motivierst mich jeden Tag aufs Neue.

An ALLE ein riesengroßes DANKESCHÖN.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau und Funktion des pulmonalen Systems.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Expression der verschiedenen Aquaporine (AQP) in der Lunge.	2
Abbildung 3: Schematische Darstellung von „Surfactant“-Produktion, -Transport und -Abbau.	3
Abbildung 4: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanäle.	6
Abbildung 5: Aufbau der 6 TRP-Kanäle in Säugern.	7
Abbildung 6: Struktur des TRPV4-Kanals.	8
Abbildung 7: Regulation von TRPV4-Kanälen.	10
Abbildung 8: Schematische Darstellung der möglichen Beteiligung von TRPV4-Kanälen an der Bildung von Lungenödemem.	13
Abbildung 9: 610M Myograph (DMT) zur Messung der Kontraktion von Gefäßen und Bronchien.	31
Abbildung 10: Isoliertes, perfundiertes Lungenmodell (Hugo Sachs).	32
Abbildung 11: Intubierte Maus.	33
Abbildung 12: Geöffneter Thorax und Zuflusskanüle eingebunden in die Pulmonalarterie.	34
Abbildung 13: Mauslunge kurz vor Herausschneiden aus dem Thorax mit eingebundenem Zu- und Abfluss.	35
Abbildung 14: Darstellung der verschiedenen Atemmanöver.	36
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Migrationsversuchs mittels Ibbidi® Silikoneinsätzen.	37
Abbildung 16: Wild-Typ (WT)- und TRPV4-defiziente (TRPV4 ^{-/-})-Lungenlysaten wurden in einem „Western Blot“ mit einem TRPV4-spezifischen Antikörper analysiert.	40
Abbildung 17: Kontraktionsmessungen am DMT "Multi Wire Myograph" mit primären Bronchialringen (links) und thorakalen Aortenringen (rechts).	41
Abbildung 18: In-vitro Gel-Kontraktionstest.	42
Abbildung 19: Zusammenfassung der Ergebnisse des in-vitro Gel-Kontraktionstests 2 Std. nach Ablösen des Gels von der Wand der Kavität.	42
Abbildung 20: Quantifizierung der Zellmigration von WT- und TRPV4 ^{-/-} -(Myo)Fibroblasten.	43
Abbildung 21: Konstante Gewichtsmessung an der isolierten, perfundierten Lunge.	44
Abbildung 22: Quotienten der Nass-/Trocken-Gewichte von WT- und TRPV4 ^{-/-} -Lungen nach Ischämie und Reperfusion im isolierten, perfundierten Lungenmodell (IPL).	45
Abbildung 23: Repräsentative Aufnahmen von WT- und TRPV4 ^{-/-} -Lungen nach Ischämie und Reperfusion im isolierten, perfundierten Lungenmodell (IPL).	45
Abbildung 24: Konstante Gewichtsmessung an der isolierten, perfundierten Lunge.	46
Abbildung 25: Quotienten der Nass-/Trocken-Gewichte von WT- und TRPV4 ^{-/-} -Lungen nach Ischämie und Reperfusion im isolierten, perfundierten Lungenmodell (IPL) unter einer initialen Perfusionsgeschwindigkeit von 2,0 oder 0,5 ml/min (2,0 ml, 0,5 ml).	46
Abbildung 26: Konstante Gewichtsmessung an der IPL.	47
Abbildung 27: Quotienten der Nass-/Trocken-Gewichte in WT- und TRPV4 ^{-/-} -Lungen im Vergleich zu TRPV4/TRPC6 ^{-/-} -Lungen nach Ischämie-Reperfusion an der IPL.	48
Abbildung 28: TRPV4-Expression in der Mauslunge.	49

Abbildung 29: Lungen-Kryoschnitte von TRPV4eGFP-Reporter-mäusen wurden mit fluoreszenzgekoppelten Antiseren gegen GFP und AQP-5 gefärbt.	50
Abbildung 30: TRPV4-mRNA-Quantifizierung in Lungenzellen mit der Nanostring®-Technologie.	51
Abbildung 31: Aquaporin-5 (AQP-5) Expression und Translokation in die Plasmamembran in WT- und TRPV4 ^{-/-} -Alveolarepithelzellen vom Typ I (ATI).	52
Abbildung 32: Repräsentative „Western Blot“-Analyse der Aquaporin-5 (AQP-5)-Expression in WT- und TRPV4 ^{-/-} -Gesamtlungenlysate (links) und Zusammenfassung der Quantifizierung der AQP-5-Expression in Lungenlysaten von TRPV4 ^{-/-} - und WT-Mäusen (rechts).	53
Abbildung 33: Aquaporin-1 (AQP-1) Expression und Translokation zur Plasmamembran in WT- und TRPV4 ^{-/-} -Endothelzellen.	54
Abbildung 34: Analyse der Aquaporin-1 (AQP-1)-Expression in alveolaren Epithelzellen, die 3 oder 6 Tage lang in Plastikzellkulturschalen gezüchtet wurden, „mouse lung endothelial cells“ (MLEC) sowie Lungenlysate von Wildtyp Mäusen (Li. WT) durch „Western Blotting“.	55
Abbildung 35: Repräsentative Zellkolonien einen Tag nach der Isolierung in einem Phasenkontrastbild (links) und angefärbt mit einem fluoreszenzgekoppelten spezifischen „pro-Surfactant-Protein-C“ (pSP-C) -Antikörper (rechts, grün).	56
Abbildung 36: Repräsentative „Western Blot“-Analyse der „pro-Surfactant-Protein-C“ (pSP-C)-Expression in WT- und TRPV4 ^{-/-} -ATII-Zellen (links) und Zusammenfassung der Quantifizierung der pSP-C-Expression in TRPV4 ^{-/-} - und WT-ATII-Zellen (rechts).	56
Abbildung 37: Bild von konfluenten Zellen an Tag 6 nach der ATII-Zellisolierung (links) und „Western Blot“-Analyse der Aquaporin-5 (AQP-5)-Expression in Zellen, die 3, 4 und 6 Tage lang in Plastikzellkulturschalen gezüchtet wurden (rechts).	57
Abbildung 38: Repräsentative „Western Blot“-Analyse der Aquaporin-5 (AQP-5)-Expression in WT- und TRPV4 ^{-/-} -ATII-Zellen, differenziert zu ATI-Zellen (links) und Zusammenfassung der Quantifizierung der AQP-5-Expression in diesen Zellen (rechts).	57
Abbildung 39: Repräsentative „Western Blot“-Analyse der Podoplanin-Expression – ein weiterer ATI-Zellmarker – in WT- und TRPV4 ^{-/-} -ATII-Zellen, differenziert zu ATI-Zellen (links) und Zusammenfassung der Quantifizierung der Podoplanin-Expression in diesen Zellen (rechts).	58
Abbildung 40: Repräsentative „Western Blot“-Analyse der „nuclear factors of activated T Cells c1“ (NFATc1)- und NFAT5-Kernlokalisation in WT- und TRPV4 ^{-/-} -ATI-Zellen (links) und Zusammenfassung der Quantifizierung der nuklearen NFAT-Lokalisation in diesen Zellen (rechts).	59
Abbildung 41: Repräsentative Bilder eines Tests zur Quantifizierung der Zellmigration 0 und 24 Std. nach Entfernen des Einsatzes (oben).	60
Abbildung 42: Zusammenfassung der verbleibenden Lückenbreite nach Behandlung mit TRPV4-siRNA, nicht kodierender siRNA bzw. Mediumskontrolle der TRPV4 ^{-/-} - und WT-ATI-Zellen nach 0, 1, 3, 5, 8, 12 und 24 Std. normalisiert auf die Anfangswerte nach dem Lösen der Einsätze.	61
Abbildung 43: Der elektrische Zellwiderstand wurde mit einem ECIS-Gerät für WT- und TRPV4 ^{-/-} -ATI-Zellen für 160 Std. quantifiziert.	62
Abbildung 44: Mittlere Länge der alveolaren Septen von WT- und TRPV4 ^{-/-} -Mäusen.	63

Abbildung 45: Maximale inspiratorische Kapazität (IC) und die inspiratorische Kapazität (A) von WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen.	63
Abbildung 46: Dynamische „Compliance“ (C_{rs}), statische „Compliance“ (C_{st}) und gewichtsunabhängige „Compliance“ (K) von WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen.	64
Abbildung 47: Elastischer Widerstand (E_{rs}) und alveolarer elastischer Widerstand (H) in WT- und TRPV4^{-/-}-Lungen.	64
Abbildung 48: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieser Doktorarbeit.	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis	VII
Tabelle 2: Mauslinien	15
Tabelle 3: Zelllinien	15
Tabelle 4: Primäre murine Lungenzellen	15
Tabelle 5: Chemikalien	15
Tabelle 6: Enzyme, Kits und Marker.	17
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 8: Laborgeräte	18
Tabelle 9: Softwareprogramme	20
Tabelle 10: Antikörper	20
Tabelle 11: Medien für murine alveolare-epitheliale Zellen Typ I und Typ II	22
Tabelle 12: Sequenzen der verwendeten „Accell SMARTpool“ siRNAs spezifisch für TRPV4 mRNA und Kontroll siRNAs aus dem non-targeting pool	24
Tabelle 13: Medium für primäre murine Lungenfibroblasten (pmLF).	24
Tabelle 14: Zusammensetzung des RIPA-Puffers.	25
Tabelle 15: Zusammensetzung des 10 %igen Trenngels.	27
Tabelle 16: Zusammensetzung des 10 %igen Sammelgels.	27
Tabelle 17: Zusammensetzung des 6 x Lämmli - Puffers.	27
Tabelle 18: Laufpuffer für die Gelelektrophorese.	27
Tabelle 19: Transferpuffer für den „Western Blot“.	28
Tabelle 20: Dehydrierung und Paraffin Infiltration.	29
Tabelle 21: Zusammensetzung der Elektrolytlösung zur Perfusion der isolierten, perfundierten Lunge.	33