

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann



Analyse des molekularen Aktivierungsmechanismus des TRPC6-Kanals und
Entschlüsselung der Funktion von TRPC6 in Lungenzellen während der Entwicklung
einer Lungenfibrose

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Susanne Maria Fiedler
aus Gräfelfing
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Dietrich
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Silke Meiners
Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2020

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | III |
| Abbildungsverzeichnis | VIII |
| Tabellenverzeichnis | XI |
| Zusammenfassung | XIII |
| Abstract | XV |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Transient Receptor Potential (TRP)-Ionenkanäle | 1 |
| 1.1.1 Die TRP-Superfamilie | 1 |
| 1.1.2 Die Unterfamilie der klassischen TRP (TRPC) Kanäle | 3 |
| 1.1.3 Gen und Proteinstruktur des TRPC6-Kanals | 6 |
| 1.1.4 Aktivatoren und Inhibitoren des TRPC6-Kanals..... | 7 |
| 1.1.5 Physiologische Funktion und pathophysiologische Bedeutung des TRPC6-Kanals außerhalb der Lunge | 10 |
| 1.2 Das respiratorische System..... | 12 |
| 1.2.1 Anatomie des Respirationstraktes | 12 |
| 1.2.2 Funktion der Lunge | 13 |
| 1.2.3 Unterschiede zwischen murinem und humanem Respirationssystem .. | 15 |
| 1.3 Expression und Funktion des TRPC6-Kanals innerhalb der Lunge..... | 15 |
| 1.4 Die Idiopathische Lungenfibrose (IPF) | 17 |
| 1.4.1 Pathogenese der IPF | 18 |
| 1.4.2 Die Rolle von Fibroblasten und Myofibroblasten für die Ausbildung einer IPF | 20 |
| 1.5 Strahlen-induzierte Pneumonitis und Lungenfibrose | 21 |
| 1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit | 22 |
| 2 Material und Methoden | 24 |
| 2.1 Material..... | 24 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.1.1 | Mauslinien..... | 24 |
| 2.1.2 | Zellen und Kulturmedien..... | 24 |
| 2.1.3 | Oligonukleotide..... | 25 |
| 2.1.4 | Plasmide..... | 27 |
| 2.1.5 | Antikörper..... | 27 |
| 2.1.6 | Puffer und Lösungen..... | 28 |
| 2.1.7 | Chemikalien..... | 31 |
| 2.1.8 | Enzyme, Kits und Marker..... | 34 |
| 2.1.9 | Verbrauchsmaterialien..... | 37 |
| 2.1.10 | Geräte..... | 38 |
| 2.1.11 | Programme..... | 39 |
| 2.2 | Methoden..... | 40 |
| 2.2.1 | Zellkultur..... | 40 |
| 2.2.1.1 | Isolation von murinen Lungenfibroblasten..... | 40 |
| 2.2.1.2 | Isolation von murinen alveolaren Epithelzellen Typ II..... | 40 |
| 2.2.1.3 | Passagieren von Zellen..... | 42 |
| 2.2.1.4 | Kryokonservierung von Zellen..... | 42 |
| 2.2.1.5 | Transfektion von Zellen..... | 43 |
| 2.2.1.6 | Behandlung von Zellen mit TGF- β 1..... | 43 |
| 2.2.1.7 | Bestrahlung von murinen Lungenfibroblasten..... | 43 |
| 2.2.2 | Isolation genomischer DNA und Analyse durch PCR zur Charakterisierung der TRPC6 ^{flox} -Maus..... | 43 |
| 2.2.3 | Klonierung des TRPC6-FRET-Konstrukts..... | 46 |
| 2.2.4 | RNA-Isolierung..... | 49 |
| 2.2.5 | mRNA Analyse durch <i>real-time quantitative reverse transcriptase</i> -PCR (qRT-PCR)..... | 49 |
| 2.2.6 | RNA Analyse durch die <i>nCounter</i> -Technologie von Nanostring®..... | 52 |
| 2.2.7 | SDS-PAGE und Western Blot..... | 54 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.2.8 | Immunozytochemie | 56 |
| 2.2.9 | Detektion der Zellproliferation durch Einbau von Ethinyl-2'-Desoxyuridin (EdU) in genomische DNA | 57 |
| 2.2.10 | Quantifizierung der Zellmigration | 58 |
| 2.2.11 | Quantifizierung der Zellviabilität im WST-1-Assay | 58 |
| 2.2.12 | Koloniebildungstest | 59 |
| 2.2.13 | Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Zellen mittels HPLC | 60 |
| 2.2.14 | Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Messung | 62 |
| 2.2.15 | Bestimmung der FRET-Effizienz | 63 |
| 2.2.16 | Elektrophysiologische Messung von Zellen | 64 |
| 2.2.17 | Statistik | 64 |
| 3 | Ergebnisse | 66 |
| 3.1 | Untersuchung zur Interaktion der Amino (N)- und Carboxy (C)-Termini des TRPC6 Kanals während der Aktivierung mit 1-Oleoyl-1-Acetyl-sn-Glycerol (OAG) und GSK-1702934A (GSK-170) | 66 |
| 3.1.1 | Generierung von N- und C-terminal markierten WT- und mutanten-TRPC6-Kanälen | 66 |
| 3.1.2 | Expression der WT- und mutanten-TRPC6 ^{TC} -Cerulean-Kanäle und Translokation in die Plasmamembran von HEK293-Zellen | 70 |
| 3.1.3 | Messung der basalen- und OAG-induzierten-Stromdichte von WT- und mutanten-TRPC6 ^{TC} -Cerulean-Kanälen durch die Patch-Clamp-Technik | 71 |
| 3.1.4 | Bestimmung der FRET-Effizienz von WT- und mutanten-TRPC6 ^{TC} -Cerulean-Kanalproteinen | 74 |
| 3.1.5 | Quantifizierung der Interaktion der N- und C-Termini des TRPC6-Kanals während der Aktivierung mit OAG und GSK-170 mittels Förster-Resonanz-Emissions-Transfer (FRET) | 76 |
| 3.2 | Charakterisierung einer globalen- und konditionalen-TRPC6-defizienten Maus | 80 |
| 3.3 | Rolle von TRPC6-Kanälen in A1275-Zellen und für die Migration von primären Lungenfibroblasten | 83 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.3.1 | Charakterisierung und TRPC-Genexpressionsanalyse von primären murinen ATII-Zellen..... | 84 |
| 3.3.2 | Genexpressionsanalyse von WT- und TRPC6-defizienten-ATII-Zellen nach TGF β -induzierter Epithelial-mesenchymaler-Transition | 85 |
| 3.3.3 | Analyse der Proteinexpression in WT- und TRPC6-defizienten-ATII-Zellen nach TGF- β 1-induzierter epithelial-mesenchymaler-Transition..... | 86 |
| 3.3.4 | Analyse der Migration von WT- und TRPC6-defizienten-ATII \rightarrow ATI-Zellen | 89 |
| 3.4 | Analyse der Migration von WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten | 90 |
| 3.5 | Rolle von TRPC6-Kanälen während der Ausbildung einer Strahlen-induzierten Lungenfibrose..... | 92 |
| 3.5.1 | TRPC-Genexpressionsanalyse von bestrahlten WT-Lungenfibroblasten | 93 |
| 3.5.2 | Genexpressionsanalyse von Myofibroblasten-Markern in WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten nach Bestrahlung | 94 |
| 3.5.3 | Quantifizierung des Hydroxyprolinegehalts in WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten nach Bestrahlung..... | 95 |
| 3.5.3.1 | Quantifizierung der Proliferationsrate von WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten | 96 |
| 3.5.3.2 | Analyse der Zellviabilität von WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten nach Bestrahlung..... | 98 |
| 3.5.3.3 | Analyse des klonogenen Überlebens von WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten nach Bestrahlung | 99 |
| 4 | Diskussion..... | 100 |
| 4.1 | Untersuchung der N- und C-terminalen Interaktion des TRPC6-Kanals während der Kanalaktivierung..... | 101 |
| 4.2 | Charakterisierung der konditionalen TRPC6-defizienten-Maus..... | 104 |
| 4.3 | Analyse der Funktion von TRPC6 während der TGF- β 1-induzierten epithelial-mesenchymalen-Transition | 105 |

| | |
|---|-----|
| 4.4 Analyse der Funktion von TRPC6 während der strahlungsinduzierten Myofibroblasten-Differenzierung von Lungenfibroblasten | 107 |
| 5 Fazit und Ausblick | 111 |
| Literaturverzeichnis..... | 112 |
| Eidesstattliche Erklärung | 129 |
| Danksagung | 130 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanäle..... | 2 |
| Abbildung 2: Aufbau der sieben TRP Unterfamilien..... | 3 |
| Abbildung 3: Struktur des TRPC6-Kanals..... | 4 |
| Abbildung 4: Aktivierung von TRPC3, TRPC6 und TRPC7..... | 5 |
| Abbildung 5: Proteinstruktur des humanen TRPC6-Kanals.. | 7 |
| Abbildung 6: TRPC6 gain-of-function und loss-of-function Mutationen. | 11 |
| Abbildung 7: Aufbau des Bronchialbaums.. | 13 |
| Abbildung 8: Gasaustausch zwischen Alveolen und Kapillaren..... | 14 |
| Abbildung 9: Pathogenese der idiopathischen Lungenfibrose..... | 19 |
| Abbildung 10: Genstruktur des mutierten Allels der TRPC6 ^{flox} -Maus von Zebrabio.. | 44 |
| Abbildung 11: Prinzip der nCounter-Technologie von Nanostring®.. | 53 |
| Abbildung 12: Prinzip der EdU-Klick-Reaktion..... | 57 |
| Abbildung 13: Prinzip des Zell-Migrationsassay mittels Silikoneinsätzen von Ibidi..... | 58 |
| Abbildung 14: Prinzip des WST-1-Zellviabilitätsassay..... | 59 |
| Abbildung 15: FIAsh-EDT ₂ (fluorescein arsenical helix binder 1,2-Ethandithiol) Markierung des TC (tetra-cystein)-Motivs. | 62 |
| Abbildung 16: Agarosegel mit aufgetrennten DNA-Fragmenten nach Verdau der Plasmid-DNA durch spezifische Restriktionsenzyme zum Nachweis der korrekten Insertion der TRPC6-cDNA in den pcDNA3.1-Cerulean-Vektor..... | 67 |
| Abbildung 17: Agarosegel mit aufgetrennten DNA-Fragmenten nach Verdau der Plasmid-DNA durch spezifische Restriktionsenzyme zum Nachweis der korrekten Insertion der kodierenden Sequenz des TC-Motivs in pcDNA3.1-TRPC6-Cerulean.. | 68 |
| Abbildung 18: Vektor pcDNA3.1 mit mTRPC6 ^{TC} -Cerulean-cDNA..... | 68 |
| Abbildung 19: Struktur des N- und C-Terminus des TRPC6 ^{TC} -Cerulean-Kanalproteins. (A)..... | 69 |
| Abbildung 20: Subzelluläre Lokalisation der WT- und mutanten-TRPC6 ^{TC} -Cerulean-Kanalproteine..... | 70 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 21: Patch-Clamp-Analyse der basalen- und 1-Oleoyl-1Acetyl-sn-Glycerol (OAG)-induzierten-Stromdichten von WT- und mutanten-TRPC6 ^{TC} -Cerulean-Kanalproteinen in HEK293-Zellen. (A-D) | 72 |
| Abbildung 22: Patch-Clamp-Analyse der basalen- und 1-Oleoyl-1Acetyl-sn-Glycerol (OAG)-induzierten-Stromdichten von WT- und M131T-TRPC6-IRES-EGFP in HEK293-Zellen. (A-B)..... | 74 |
| Abbildung 23 FRET-Effizienz von WT- und mutanten-TRPC6 ^{TC} -Cerulean-Kanalproteinen in HEK293-Zellen. (A-D) | 75 |
| Abbildung 24: Messung OAG-induzierter FRET-Abnahmen von WT- und mutanten-TRPC6 ^{TC} -Cerulean-Kanalproteinen in HEK293-Zellen. (A-D)..... | 78 |
| Abbildung 25: Messung GSK-170-induzierter FRET-Abnahmen von WT- und mutanten-TRPC6 ^{TC} -Cerulean-Kanalproteinen in HEK293-Zellen..... | 79 |
| Abbildung 26: Quantifizierung der zeitlichen Kinetiken von OAG- und GSK-170-induzierten FRET-Signalen im Vergleich zu den Kinetiken OAG-induzierter Stromdichten von WT- und mutanten-TRPC6 ^{TC} -Cerulean-Kanalproteinen in HEK293-Zellen. | 80 |
| Abbildung 27: Agarosegel mit aufgetrennten PCR-Produkten aus genomischer DNA von WT-, WT/fl-, fl/fl- und fl/fl X Sox2-Cre-Mäusen..... | 82 |
| Abbildung 28: Nachweis der TRPC6-Protein-Expression in murinen Lungenlysaten mittels Western Blot-Analyse. (A)..... | 83 |
| Abbildung 29: Charakterisierung von murinen ATII-Zellen mittels Immunofluoreszenz..... | 84 |
| Abbildung 30 TRPC-mRNA-Expressionsanalyse in murinen ATII-Zellen..... | 85 |
| Abbildung 31: mRNA-Expressionsanalyse nach TGF-β1-induzierter epithelialer-mesenchymaler-Transition (EMT) in ATII-Zellen. (A,B) | 86 |
| Abbildung 32: Analyse der Proteinexpression in ATII-Zellen nach TGF-β1-induzierter epithelialer mesenchymaler Transition (EM) mittels Western Blot.. | 87 |
| Abbildung 33: Proteinanalyse nach TGF-β-1-induzierter EMT in ATII-Zellen mittels Immunofluoreszenz. | 88 |
| Abbildung 34: Quantifizierung der Zellmigration in WT- und TRPC6 ^{-/-} -ATII → ATI-Zellen. | 90 |
| Abbildung 35: Quantifizierung der Zellmigration in WT- und TRPC6 ^{-/-} -Lungenfibroblasten. | 91 |

| | |
|---|------------|
| Abbildung 36: Direkte mRNA-Expressionsanalyse von mit ionisierender Strahlung behandelten primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) mittels Nanostring®-nCounter-Technologie..... | 93 |
| Abbildung 37 : MRNA-Expressionsanalyse von mit ionisierender Strahlung behandelten primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) mittels qRT-PCR.. | 95 |
| Abbildung 38: Quantifizierung von Hydroxyprolin in mit ionisierender Strahlung behandelten primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) mittels High performance liquid chromatography (HPLC). | 96 |
| Abbildung 39: Analyse der DNA-Syntheserate von WT- und TRPC6^{-/-}-primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF).. | 97 |
| Abbildung 40: Analyse der Zellviabilität von bestrahlten WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten (pmLF) mittels WST-1-Assay..... | 98 |
| Abbildung 41: Analyse des klonogenen Überlebens von bestrahlten WT- und TRPC6^{-/-}-primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) mittels Koloniebildungstest. | 99 |
| Abbildung 42: Vereinfachtes hypothetisches Modell zur Interaktion der Amino (N)- und Carboxyl (C)-Termini des TRCP6-Kanals vor und während der Aktivierung mit OAG oder GSK-170..... | 104 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: TRPC6-regulierende Substanzen..... | 7 |
| Tabelle 2: Mauslinien..... | 24 |
| Tabelle 3: Zelllinien..... | 24 |
| Tabelle 4: Primäre murine Zellen | 24 |
| Tabelle 5: Kulturmedien und Zusatzstoffe | 25 |
| Tabelle 6: Murine Nanostring® Oligonucleotide..... | 25 |
| Tabelle 7: Plasmide | 27 |
| Tabelle 8: Primärantikörper | 27 |
| Tabelle 9: Sekundärantikörper | 28 |
| Tabelle 10: HEPES gepufferte Saline (HBS), 2x | 28 |
| Tabelle 11: HEPES gepuffertes Wasser..... | 28 |
| Tabelle 12: Laemmli-Puffer, 6x | 29 |
| Tabelle 13: Laufpuffer, 10x für SDS-Gelelektrophorese..... | 29 |
| Tabelle 14: LB Medium..... | 29 |
| Tabelle 15: PBS, 10x..... | 29 |
| Tabelle 16: PBST, 1x..... | 30 |
| Tabelle 17: RIPA Lysepuffer | 30 |
| Tabelle 18: TAE-Puffer, 50x | 30 |
| Tabelle 19: TE Puffer, 1x | 30 |
| Tabelle 20: Transferpuffer, 10x..... | 31 |
| Tabelle 21: TRIS-SDS-Puffer pH 6,8 (4x)..... | 31 |
| Tabelle 22: Chemikalien | 31 |
| Tabelle 23: Enzyme..... | 34 |
| Tabelle 24: Marker | 35 |
| Tabelle 25: Kits | 35 |
| Tabelle 26: Verbrauchsmaterialien..... | 37 |
| Tabelle 27: Geräte..... | 38 |
| Tabelle 28: Software | 39 |
| Tabelle 29: PCR Ansatz für den Nachweis der loxP-Stelle. | 44 |
| Tabelle 30: PCR Programm für den Nachweis der loxP-Stelle. | 44 |
| Tabelle 31: Primer zur Charakterisierung der TRPC6 ^{flox} -Mäuse..... | 45 |
| Tabelle 32: PCR-Ansatz zum Nachweis des Exon 2. | 45 |

| | |
|--|-----------|
| Tabelle 33: PCR-Programm zum Nachweis des Exon 2..... | 45 |
| Tabelle 34: Primer mit Restriktionsstellen | 46 |
| Tabelle 35: PCR-Ansatz für das Einfügen von Restriktionsschnittstellen | 46 |
| Tabelle 36: PCR-Programm für das Einfügen von Restriktionsschnittstellen .. | 46 |
| Tabelle 37: Reaktionsansatz für Site-directed-mutagenesis | 47 |
| Tabelle 38: PCR-Programm für Site-directed-mutagenesis | 48 |
| Tabelle 39: HPLC-aufgereinigte-Oligonukleotide für die site-directed-mutagenesis..... | 48 |
| Tabelle 40: Sequenzieroligonukleotide..... | 49 |
| Tabelle 41: c-DNA-Synthese-Reaktionsansatz..... | 50 |
| Tabelle 42: Reaktionsansatz für q-RT-PCR | 50 |
| Tabelle 43: Murine q-RT-PCR-Oligonukleotide | 51 |
| Tabelle 44: qPCR-Programm | 52 |
| Tabelle 45: Schmelzkurve (Lightcycler 480 II Program: Melting Curve) | 52 |
| Tabelle 46: 30x Working Oligonukleotide-Pool A und B | 53 |
| Tabelle 47: Mastermix für Hybridisierung (12 Reaktionen)..... | 53 |
| Tabelle 48: Ansatz für 1x Trenngel..... | 55 |
| Tabelle 49: Ansatz für 1x Sammelgel..... | 55 |
| Tabelle 50: Aussaat-Schema für den Koloniebildungstest..... | 59 |
| Tabelle 51: Standardverdünnungen von Hydroxyprolin | 61 |
| Tabelle 52: Verdünnungsreihe für die Standardkurve..... | 61 |

Zusammenfassung

Der für Kationen permeable Ionenkanal TRPC6 gehört zur Familie der klassischen *transient receptor potential* (TRPC)-Kanäle und wird über G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Nach Agonistbindung an den Rezeptor entstehen durch Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch Phospholipasen C Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). Letzteres aktiviert den Ca²⁺ Einstrom durch TRPC3, TRPC6 und TRPC7, die deswegen als Rezeptor-operierte Kanäle (*receptor-operated channel*, ROC) bezeichnet werden. Obwohl die Strukturen vieler TRPC-Kanäle in der letzten Zeit durch Kryoelektronenmikroskopie aufgeklärt wurden, konnten Veränderungen der Proteinkonformation durch Kanalaktivierung mit 1-oleoyl-1-acetyl-sn-glycerol (OAG), ein Membran-permeables Analog von DAG, bisher nicht beschrieben werden. Um den molekularen Aktivierungsmechanismus des TRPC6-Kanals zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion des Amino (N)- und Carboxyl (C)-Terminus während der Kanalaktivierung in *human embryonic kidney* (HEK) 293-Zellen untersucht. Durch eine intramolekulare Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Analyse zwischen dem mit *small fluorescein arsenical hairpin* (FIAsH) markierten Tetracystein-Motif am N- und dem dem Cerulean-Fluoreszenzprotein fusionierten C-Terminus konnte erstmalig eine Konformationsänderung während der Aktivierung des TRPC6-Kanals nachgewiesen werden (Fiedler *et al.*, 2019). Nach Zugabe von OAG oder des TRPC6-Aktivators GSK-1702934A nahm die Interaktion zwischen beiden Termini deutlich ab. Für TRPC6-Kanäle mit Mutationen (M131T, G108S), die in Patienten mit fokaler Glomerulosklerose – einer Erkrankung der Niere - identifiziert wurden und in einer neu produzierten Mutante, war das FRET-Signal signifikant geringer (Fiedler *et al.*, 2019). Diese Daten zeigen, dass eine FIAsH-Markierung von Ionenkanälen eine geeignete Methode ist, Konformationsänderungen während der Öffnung des Kanals und seiner Mutanten zu studieren.

Zytoplasmatisches Ca²⁺ spielt als *second messenger* eine bedeutende Rolle in einer Vielzahl von physiologischen Funktionen. Ein erhöhter Ca²⁺-Einstrom durch TRPC6-Kanäle ist unter anderem an der Entstehung einer Lungenfibrose beteiligt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass TRPC6-defiziente Mäuse in einem Bleomycin-induzierten Fibrose-Modell partiell vor einer Lungenfibrose geschützt waren. Während der Ausbildung einer Fibrose führt eine Differenzierung von Fibroblasten zu

Myofibroblasten zu einer übermäßigen Produktion von extrazellulären Matrixproteinen und zur Versteifung des Lungengewebes. Neben chronischen Mikroverletzungen der Lunge können auch Bestrahlungen zur Therapie von Lungentumoren und Brustkrebs Lungenfibrosen in den Patienten hervorrufen. In der vorliegenden Arbeit konnte nun nachgewiesen werden, dass mRNA der TRPC6-Kanäle neben der TGF- β 1-induzierten-Myofibroblastendifferenzierung von Lungenfibroblasten auch während der Strahlungs-induzierten Myofibroblastendifferenzierung vermehrt exprimiert wird. Eine Rolle von TRPC6 auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von alveolaren Epithelzellen des Typ II (ATII) und an der Migration von ATII Zellen, die zu alveolaren Epithelzellen des Typs I (ATI)-Zellen differenziert wurden, konnte hingegen ausgeschlossen werden.

Die vorliegenden *in-vitro*-Ergebnisse in kultivierten primären Zellen müssen noch in geeigneten Mausmodellen reproduziert werden, um den TRPC6-Kanal als wichtige pharmakologische Zielsubstanz für eine verbesserte Therapie der Strahlungs-induzierten Lungenfibrose zu etablieren.

Abstract

The cation-permeable ion channel TRPC6 is a member of the classic transient receptor potential (TRPC) channel family and is activated by G-protein-coupled receptors. After agonist binding to appropriate receptors cleavage of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) by phospholipase C isozymes produces inositol trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG). The latter is activating TRPC6 and induces Ca²⁺ influx into cells. Although the overall structure of many TRPC proteins, including human and murine TRPC6, were recently resolved by cryoelectron microscopy analysis, structural changes during channel activation by 1-oleoyl-1-acetyl-sn-glycerol (OAG), the membrane-permeable analog of diacylglycerol, were not defined. Moreover, data on carboxyl- and amino-terminal interactions were not provided, as the amino-terminal regions of murine and human TRPC6 were not resolved (Fiedler *et al.*, 2019). Therefore, we employed a Förster resonance energy transfer (FRET) approach using a small fluorescein arsenical hairpin (FIAsH) targeted to a short tetracysteine sequence at the unresolved amino-terminus and cerulean, a cyan fluorescent protein, as a tag at the carboxyl-terminus of the murine TRPC6 protein. After OAG as well as GSK-1702934A activation, FRET efficiency was simultaneously and significantly reduced, indicating a decreased interaction between the amino to carboxyl termini in the functional tagged murine TRPC6 tetramer (TRPC6 WT) heterologously expressed in human embryonic kidney (HEK) 293 cells (Fiedler *et al.*, 2019). There was a significant reduction in the FRET signal obtained from analysis of murine TRPC6 FRET constructs with homologous amino-terminal mutations (M131T, G108S) that had been identified in human patients with inherited focal segmental glomerulosclerosis, a condition that can lead to end-stage renal disease. A novel designed loss-of-function TRPC6 mutation (N109A) in the amino-terminus in close proximity to the carboxyl-terminus produced similar FRET ratios. These data show for the first time that FIAsH-tagging of ion channels is a promising tool to study conformational changes after channel opening and may significantly advance the analysis of ion channel activation as well as their mutants involved in channelopathies (Fiedler *et al.*, 2019).

Cytoplasmic Ca²⁺ as second messenger plays an important role in a variety of physiological functions. An increased Ca²⁺ content due to TRPC6 channel expression is involved in the development of pulmonary fibrosis. Our group has already shown in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model that TRPC6-deficient mice are partly

protected from the development of fibrosis. In pulmonary fibrosis, differentiation of fibroblasts to myofibroblasts induces excessive production of extracellular matrix proteins and stiffening of lung tissue. Next to chronic microinjuries, irradiation as therapeutic option for lung and breast cancer also initiates lung fibrosis in patients. In the present study, it has been demonstrated that TRPC6 mRNA is not only up-regulated during TGF- β 1-induced myofibroblast differentiation of pulmonary fibroblasts but also during radiation-induced myofibroblast differentiation. A role for TRPC6 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of type II alveolar epithelial (ATII) cells as well as for migration of ATII cells differentiated to alveolar type I (ATI) cells could be excluded.

These obtained in-vitro data in cultured primary cells need to be reproduced in mouse models to identify TRPC6 channels as a new pharmacological target for a better therapeutic option for patients developing radiation-induced lung fibrosis.

1 Einleitung

1.1 Transient Receptor Potential (TRP)-Ionenkanäle

TRP-Kanäle bilden eine große und diverse sog. Superfamilie von Kationen-permeablen Ionenkanälen. Im Jahr 1969 wurden TRP Proteine erstmalig in Photorezeptoren einer *Drosophila melanogaster* Mutante identifiziert. Die Photorezeptoren der Mutante reagierten auf konstante Lichtreize mit einem transienten Rezeptorpotential (*transient receptor potential, TRP*), wohingegen die Photorezeptoren der WT Fruchtfliegen ein längeres Rezeptorpotential generierten (Cosens and Manning, 1969). Das erste Gen, das für ein 1275 Aminosäuren umfassendes TRP-Kanalprotein kodiert, wurde 20 Jahre später von Montell und Rubin identifiziert (Montell and Rubin, 1989).

In Säugetieren werden TRP Kanäle in einer Vielzahl von Organen und Zelltypen exprimiert. Im Gehirn weisen TRP Kanäle eine hohe Expressionsrate auf, werden aber unter anderem auch im Herzen, Niere, Lunge, Leber, Darm und Gefäßen exprimiert (zusammengefasst in Minke and Cook, 2002). Neben Nervenzellen konnten TRP Kanäle auch in vaskulären Endothelzellen, Epithelzellen und glatten Muskelzellen gefunden werden (zusammengefasst in Hofmann *et al.*, 2000; Montell, 2001). TRP Kanäle werden neben Zellorganellen, wie dem Lysosom, hauptsächlich in der Plasmamembran von Zellen exprimiert (Lange *et al.*, 2009; zusammengefasst in Montell, 2005). Dort übernehmen sie verschiedene physiologische Funktionen, z.B. die Detektion sensorischer Stimuli wie Geschmack (Pérez *et al.*, 2002), Temperatur (Peier *et al.*, 2002) und von Pheromonen (Liman, Corey and Dulac, 1999). Außerdem spielen sie eine bedeutende Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase (van der Eerden *et al.*, 2005), der Mg^{2+} Reabsorption (Schmitz *et al.*, 2003) und der Osmoregulation (Mizuno *et al.*, 2003), sowie bei der Muskelkontraktion (Beech, 2005).

1.1.1 Die TRP-Superfamilie

Die TRP-Superfamilie besteht aus insgesamt 29 bisher bekannten Mitgliedern und kann auf Grund homologer Aminosäuresequenzen in 7 Familien eingeteilt werden: classical oder canonical TRP (TRPC), vanilloid TRP (TRPV), melastatin TRP (TRPM), ankyrin TRP (TRPA), no mechanoreceptor potential C TRP (TRPN), polycystic TRP (TRPP) und mucolipin TRP (TRPML) (Montell *et al.*, 2002; zusammengefasst in Montell, 2005 und siehe **Abbildung 1**). Vertreter der TRPN-Unterfamilie wurden bisher

in *D. melanogaster*, *C. elegans* und Zebrafischen, aber nicht in Säugetieren nachgewiesen (Walker, Willingham and Zuker, 2000). Die TRP-Superfamilie der Säugetiere besteht also aus 28 Kanälen in sechs Familien.

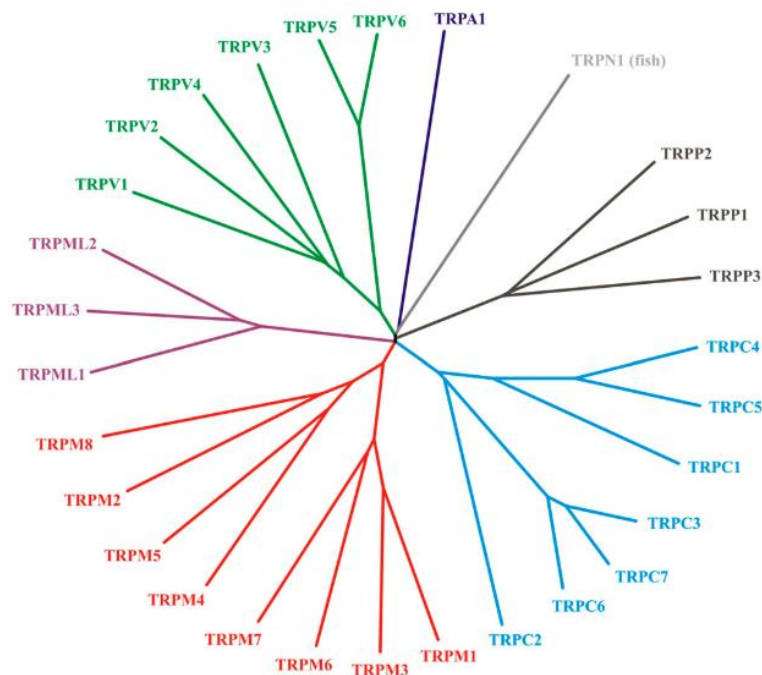


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanäle. TRP-Kanäle werden nach Homologie der Aminosäuresequenzen in sieben Familien eingeteilt. Zu beachten ist, dass der TRPN1-Kanal nicht in Säugetieren exprimiert wird und der TRPC2-Kanal in Menschen ein Pseudogen ist (Nilius and Szallasi, 2014).

TRP-Kanäle bestehen aus einem intrazellulären Amino (N) und Carboxy (C)-Terminus, und sechs Transmembrandomänen (TMD) mit einer porenbildenden Region zwischen TMD5 und TMD6 (Montell, Birnbaumer and Flockerzi, 2002). Durch Bildung von Tetrameren entstehen funktionelle Kationenkanäle, die unselektiv mono- und divalente Kationen leiten (zusammengefasst in Owsianik *et al.*, 2006). Neben der Bildung von Homotetrameren wurden auch funktionelle Heterotetrameren innerhalb einer Familie, wie auch zwischen den Mitgliedern verschiedener Familien beschrieben. Einzig TRPC1 bildet als Homotetramer keinen funktionellen Kationenkanal, geht aber einen heteromeren Komplex mit allen Mitgliedern der TRPC Familie und mit TRPP2 ein (Dietrich, Fahlbusch and Gudermann, 2014; Storch *et al.*, 2012; Kobori *et al.*, 2009). TRPC6 bildet Heterotetramere innerhalb der TRPC3/6/7-Unterfamilie, sowie mit TRPC1, TRPC4 und TRPC5 (Hofmann *et al.*, 2002; Strübing *et al.*, 2003). Auch ein mit TRPC1 und TRPV4 gebildeter heteromerer Komplex wurde beschrieben (Alessandri-Haber *et al.*, 2009). Die TRP-Kanalfamilien unterscheiden sich durch die Länge der intrazellulären C- und N-Termini und der Anzahl und Art funktioneller Domänen (**Abbildung 2**). Die im N-Terminus lokalisierten Ankyrin-Domänen werden

nur in Vertretern der TRPC-, TRPV-, TRPA- und TRPN-Familie gefunden. Sie spielen vermutlich eine Rolle bei der Tetramerisierung der TRP-Monomere und können, wie für den TRPV1-Kanal beschrieben, verschiedene Liganden wie ATP und Calmodulin binden (zusammengefasst in Venkatachalam and Montell, 2007; Lishko *et al.*, 2007). Die aus 25 Aminosäuren bestehende TRP-Domäne mit einer „EWKFAR“-TRP Box existiert nur in der TRPC-, TRPM- und TRPN-Familie (zusammengefasst in Venkatachalam and Montell, 2007). TRPM7 und TRPM6 weisen als einzige TRP-Kanäle eine α -Typ Serin/Threonin Kinase-Domäne im C-Terminus auf (Fleig and Chubanov, 2014; Chubanov and Gudermann, 2014).

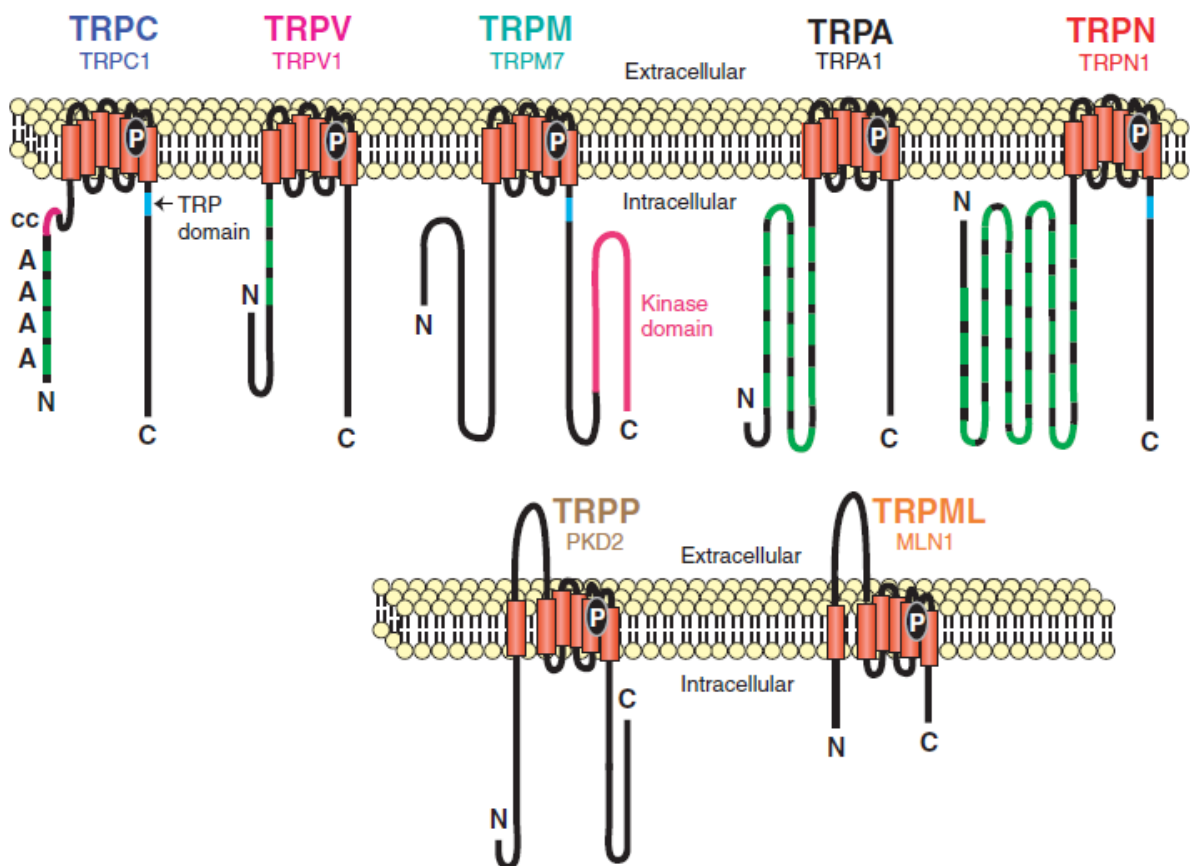


Abbildung 2: Aufbau der sieben TRP Unterfamilien. Repräsentative Mitglieder der einzelnen TRP-Familien mit charakteristischen funktionellen Sequenzdomänen sind dargestellt: Ankyrin Domänen (A), Coiled-Coil-Domäne (cc), Proteinkinasedomäne (Kinase domain), TRP Domäne (TRP domain) und Porenbildende Region (P) (Montell, 2005).

1.1.2 Die Unterfamilie der klassischen TRP (TRPC) Kanäle

Die TRPC-Unterfamilie umfasst sieben Mitglieder, wobei TRPC2 im Menschen als Pseudogen existiert (zusammengefasst in Venkatachalam and Montell, 2007). In Mäusen wird TRPC2 in den Neuronen des vomeronasalen Organs exprimiert und ist an der Pheromondetektion beteiligt (zusammengefasst in Yildirim and Birnbaumer,

2007). Im Menschen können die TRPC-Kanäle nach ihrer Aminosäuresequenz-Homologie und Funktion in vier Unterfamilien unterteilt werden: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5 (zusammengefasst in Vazquez *et al.*, 2004). Alle Mitglieder der TRPC Familie besitzen drei bis vier Ankyrin-Domänen im N-Terminus sowie sog. *Coiled-Coil*-Domänen in beiden zytoplasmatischen Termini. Unmittelbar nach der sechsten Transmembrandomäne ist die konservierte TRP-Box lokalisiert und eine Calmodulin- und IP₃-Rezeptor-bindende (CIRB)-Region, die auch Phosphoinositide bindet (zusammengefasst in Dietrich and Gudermann, 2014; Kwon, Hofmann and Montell, 2007). Die Struktur des TRPC6-Kanals ist in **Abbildung 3** dargestellt.

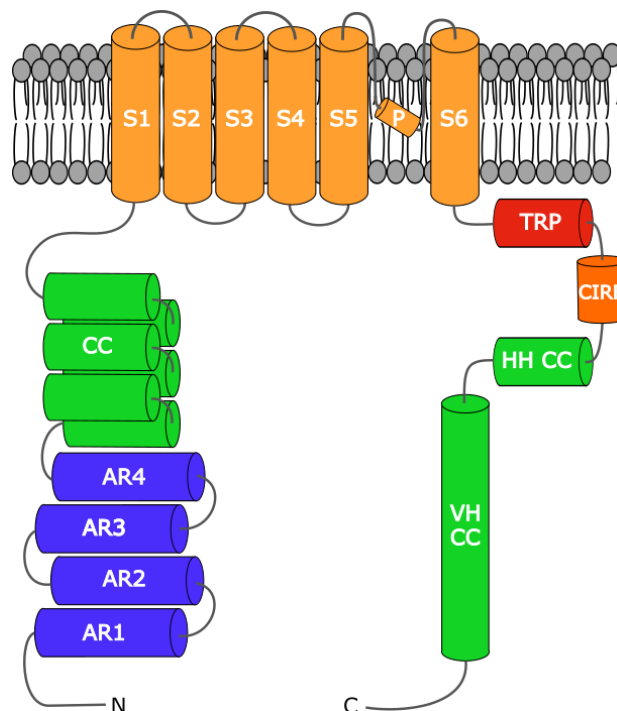


Abbildung 3: Struktur des TRPC6-Kanals. Der TRPC6-Kanal besteht aus 6 Transmembrandomänen (*membran-spanning helices* S1 – S6) mit einer Porenregion (P) zwischen S5 und S6. Vier Ankyrin-Domänen (*Ankyrin repeats* AR1 – AR4) und eine *Coiled-Coil*-Region (CC) sind im Amino-Terminus (N) lokalisiert. Im C-Terminus befindet sich die TRP-Domäne und eine weitere CC-Region, die in einer horizontalen und vertikalen Helix angeordnet ist (HH, VH) (Abb. nach Azumaya *et al.*, 2018 erstellt)

TRPC1 wurde als erstes Mitglied der TRPC-Familie kloniert (Zhu *et al.*, 1995; Wes *et al.*, 1995) und ist nahezu ubiquitär im Gewebe des Menschen und der Maus exprimiert (zusammengefasst in Nilius and Owsianik, 2011). TRPC4 und TRPC5 haben eine Sequenzhomologie von 78 % und besitzen als einzige TRP-Kanäle eine PDZ-Bindestelle (benannt nach den ersten drei Proteinen in denen die Domäne entdeckt wurde: *post synaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1), and *zonula occludens-1 protein* (ZO-1)) im N-Terminus durch die das Gerüstprotein NHERF (*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*) binden kann (zusammengefasst in Nilius and Flockerzi, 2014). TRPC4 ist unter anderem in Niere

und Gehirn exprimiert (zusammengefasst in Freichel *et al.*, 2005; Zechel *et al.*, 2007). TRPC5 wird im zentralen Nervensystem exprimiert, wo es eine bedeutende Rolle für die Funktionen der Amygdala und beim Angst-bedingten Verhalten einnimmt (Riccio *et al.*, 2009). TRPC3, TRPC6 und TRPC7 haben eine 65 – 78 % identische Aminosäurezusammensetzung und werden direkt durch Diacylglycerol (DAG), das durch Rezeptor-aktivierte Phospholipasen C (PLC) generiert wird, geöffnet (Hofmann *et al.*, 1999; zusammengefasst in Trebak *et al.*, 2003). Die Bindung eines Agonisten an einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wie Angiotensin II an den AT₁-Rezeptor, aktiviert spezifische PLC-Isoformen, die Plasmamembran-gebundenes Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) hydrolysieren. Die entstehenden Produkte sind Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und DAG. Letzteres aktiviert direkt den Ca²⁺-Einstrom durch TRPC3, TRPC6 und TRPC7, die deswegen als Rezeptor-operierte Kanäle (*Receptor-operated channel, ROC*) bezeichnet werden (Yamaguchi *et al.*, 2018; Ilatovskaya *et al.*, 2014; Satoh *et al.*, 2007 und siehe **Abbildung 4**). Kürzlich konnte auch die Aktivierung von TRPC4 und TRPC5 durch OAG nach der Dissoziation des Proteins NHERF von der PDZ-Bindestelle der Kanäle, nachgewiesen werden (Storch *et al.*, 2017).

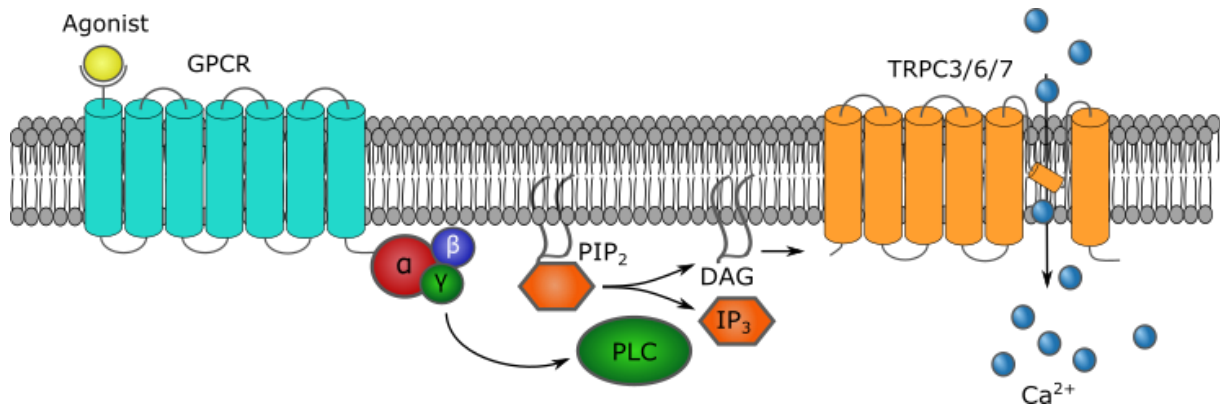


Abbildung 4: Aktivierung von TRPC3, TRPC6 und TRPC7. Bindung eines Agonisten an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (*G-protein-coupled receptor, GPCR*) aktiviert die Phospholipase C (PLC) die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) aus der Plasmamembran in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. DAG aktiviert TRPC3, TRPC6 und TRPC7 was zu einem Ca²⁺-Einstrom ins Zytoplasma führt.

Den sog. ROC-Kanälen stehen die durch die internen Speicher operierten Kanäle (*store-operated channels, SOC*) gegenüber. Das zweite Spaltungsprodukt, IP₃, bindet an den IP₃-Rezeptor in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), was zur Entleerung der internen Ca²⁺-Ionen ins Zytoplasma führt. Die verminderte Ca²⁺-Konzentration im ER aktiviert STIM (*stromal-interacting molecule*)-Proteine in der ER-Membran welche einen Ca²⁺-Einstrom ins Zytoplasma durch Aktivierung der Orai1 SOC-Kanäle induzieren (zusammengefasst in Smyth *et al.*, 2006).

1.1.3 Gen und Proteinstruktur des TRPC6-Kanals

Das Gen das für den humanen, 931 Aminosäure langen, TRPC6-Kanal kodiert, ist auf Chromosom 11q21-q22 lokalisiert und besitzt 13 Exons (D'Esposito *et al.*, 1998). Das murine TRPC6-Gen ist auf Chromosom 9 lokalisiert, umfasst ebenfalls 13 Exons, ist jedoch um eine Aminosäure kürzer. Die Aminosäuresequenz von murinen und humanen TRPC6 weist eine 94 % Übereinstimmung auf (Aminosäuresequenzanalyse mit Ensembl). Der Aufbau des TRPC6 Kanals wurde bereits ausführlich in Abschnitt 1.1.2 beschrieben. TRPC6 besitzt zwei Glykosilierungsstellen im extrazellulären Loop zwischen S1-2 (Asn₄₇₃) und S3-4 (Asn₅₆₁), welche für die geringe Basalaktivität des Kanals verantwortlich sind (Dietrich *et al.*, 2003). Die molekulare Struktur des humanen, wie auch des murinen homotetrameren TRPC6-Kanals wurde vor Kurzem durch Kryoelektronenmikroskopie mit einer Auflösung von 3,8 Å dargestellt (Tang *et al.*, 2018; Azumaya *et al.*, 2018). Der Kanal besteht aus einer glockenförmigen Struktur, die die Transmembrandomänen in der Plasmamembran stützt (**Abbildung 5**). Die Interaktion der Ankyrin-Domänen im N-Terminus und der *Coiled-Coil*-Domänen im C-Terminus tragen zur Stabilisierung des Tetramer-Komplexes bei (Tang *et al.*, 2018).

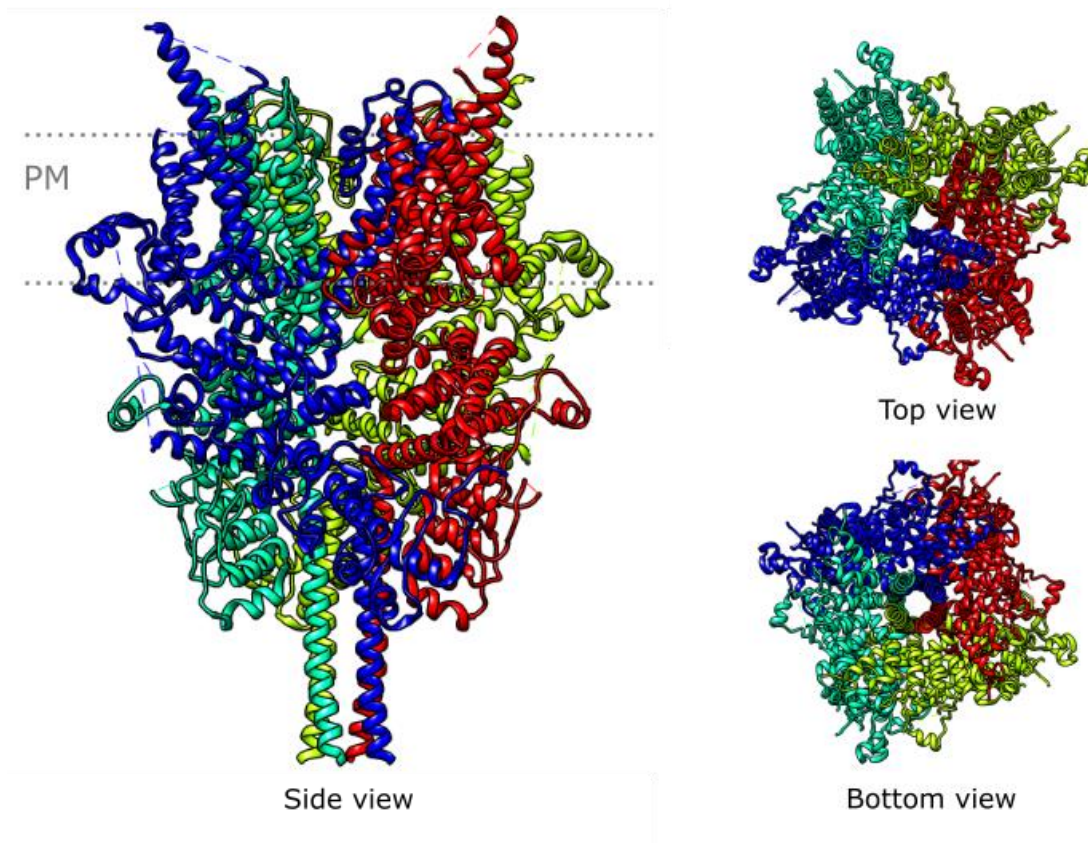


Abbildung 5: Proteinstruktur des humanen TRPC6-Kanals. Die vier TRPC6-Monomere, die ein Homotetramer bilden, sind in türkis, blau, rot und gelb dargestellt. Die Seitenansicht (*Side view*) des Tetramers mit Lokalisation des Kanals in der Plasmamembran (PM), sowie die Aufsicht (*Top view*) und Ansicht von Unten (*Bottom view*) werden gezeigt (erstellt mit UCSF Chimera, PDB (Protein data bank) ID: 5YX9 von Tang *et al.*, 2018).

Für den humanen TRPC6-Kanal konnte der N-Terminus nicht vollständig aufgelöst werden. Die strukturelle Anordnung der ersten 84 Aminosäuren bleibt somit ungewiss (Tang *et al.*, 2018). Auch für den murinen TRPC6-Kanal war es nicht möglich die Struktur der Aminosäuren 1 – 92 mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie aufzulösen (Azumaya *et al.*, 2018).

1.1.4 Aktivatoren und Inhibitoren des TRPC6-Kanals

Alle nachfolgend im Detail beschriebenen Aktivatoren und Inhibitoren des TRPC6-Kanals sind initial in einer Übersichtstabelle dargestellt (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: TRPC6-regulierende Substanzen.

| Substanz | TRPC6 | Weitere TRP-Kanäle |
|------------------|-------|--|
| La ³⁺ | - | - (alle, bis auf TRPM2) |
| Gd ³⁺ | - | - (alle, bis auf TRPM2) |
| Clotrimazol | - | - (TRPM2, TRPM3, TRPV4 + (TRPV1, TRPA1) |

| | | |
|--|--------------------------|----------------------------|
| SKF-96365 | - | - (TRPM2, TRPM3 und TRPV4) |
| Norgestimat | - | - (TRPC3, TRPC5) |
| Larixol- und Larixylacetat | -* | - (TRPC3, TRPC7) |
| Larixyl-N-Methylcarbammat (SH045) | -* | - (TRPC3, TRPC7) |
| OAG | + | + (TRPC2, TRPC3, TRPC7) |
| Flufenamat | + | - (TRPC3, TRPC7) |
| Hyperforin | + | / |
| GSK-170 | + | + (TRPC3) |
| 4m – 4p | + | + (TRPC3, TRPC7) |
| C20 | allosterischer Modulator | / |

-, inhibierende Wirkung; +, aktivierende Wirkung, / keine Wirkung bekannt, *, hohe Selektivität für TRPC6

Alle TRP-Kanäle, ausschließlich des TRPM2-Kanals, werden durch Seltenerdmineralionen wie La^{3+} und Gd^{3+} inhibiert. Für TRPC6 konnte eine IC_{50} von 4 – 6 μM La^{3+} -Ionen, sowie eine IC_{50} von 1,9 μM für Gd^{3+} -Ionen bestimmt werden (Inoue *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2002). Für TRPC4 und TRPC5 wurde später jedoch eine Konzentrationsabhängige Aktivierung durch La^{3+} - und Gd^{3+} -Ionen gezeigt (Jung *et al.*, 2003). Das Antimykotikum Clotrimazol wurde zunächst als spezifischer TRPM2-Inhibitor beschrieben, blockiert jedoch auch TRPC6, TRPM3 und TRPV4, wohingegen es aktivierend auf TRPV1 und TRPA1 wirkt (Hill, McNulty and Randall, 2004; Harteneck, Klose and Krautwurst, 2011; Meseguer *et al.*, 2008). Die Verbindung 1-[β -(3-(4-methoxyphenyl)propoxy)-4-methoxyphenethyl]-1H-imidazol-Hydrochlorid (SKF-96365) wurde ursprünglich als Inhibitor für Spannungsunabhängige Ca^{2+} -Ionenkanäle beschrieben (Clementi and Meldolesi, 1996). Später konnte für den TRPC6-Kanal eine effiziente Inhibition mit einer IC_{50} von 2 μM in einem heterologen Expressionssystem beschrieben werden. SKF-96365 inhibiert jedoch auch mit geringerer Potenz TRPM2, TRPM3 und TRPV4 (Harteneck, Klose and Krautwurst, 2011). Eine höhere Selektivität für TRPC3 und TRPC6 konnte für das synthetische Gestagen Norgestimat mit einer IC_{50} von 3,0 und 5,2 μM festgestellt werden, welches ab einer Konzentration von 10 μM auch TRPC5 inhibiert (Miehe *et al.*, 2012). Die höchste Selektivität für eine Inhibition von TRPC6 konnte für die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe Larixol- und Larixylacetat mit einer 5- bis 12-fachen Selektivität

gegenüber TRPC3 und TRPC7 detektiert werden (Urban *et al.*, 2015). Chemisches *Remodeling* von (+)-Larixol entschlüsselte Larixyl-N-Methylcarbamat (SH045) als potenten TRPC6 Inhibitor in elektrophysiologischen Messungen von heterologen Expressionssystemen (IC_{50} Einwärtsstrom = 5,8 nM; IC_{50} Auswärtsstrom = 5,2 nM) mit einer deutlich erhöhten Selektivität gegenüber TRPC3 (IC_{50} Einwärtsstrom = 440 nM; IC_{50} Auswärtsstrom = 634 nM). In einem murinen isolierten-perfundierten-Lungenmodell konnte SH045 die Lungen-Ischämie-Reperfusionsschaden-induzierte Ödembildung signifikant im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle verringern und ist damit ein potentieller TRPC6-Inhibitor zum therapeutischen Einsatz (Häfner *et al.*, 2018).

OAG ist ein Analogon des Membran-permeablen DAG und somit ein Aktivator der TRPC3/6/7-Unterfamilie. In isolierten Lungen von WT-Mäusen, jedoch nicht in TRPC6-defizienten Mäusen, konnte durch OAG eine hypoxische Vasokonstriktion induziert werden (Fuchs *et al.*, 2011). Der unspezifischen Kationenkanal-Blocker Flufenamat stellte sich im heterologen Expressionssystem als Aktivator für TRPC6 heraus, wohingegen er inhibitorisch auf TRPC3 und TRPC7 wirkt. Auch in primären glatten Muskelzellen der Pfortader und Lungenendothelzellen konnte ein Flufenamat-induzierter TRPC6-Kationenstrom gemessen werden (Inoue *et al.*, 2001; Weissmann *et al.*, 2012). Hyperforin, das ein natürlicher Bestandteil des Antidepressivums St. John's wort / Johanniskraut ist, wirkt ab einer Konzentration von 10 μ M aktivierend auf TRPC6, jedoch nicht auf TRPC3 (Leuner *et al.*, 2007). Hyperforin induziert jedoch auch die Freisetzung von Zn^{2+} und Ca^{2+} aus internen Speichern (Tu, Gibon and Bouron, 2010). Der synthetische hydrophile Agonist GSK1702934A (GSK-170) ist ein potenter TRPC3- und TRPC6-Aktivator. In *Patch-Clamp*-Experimenten von mit rekombinanten humanen TRPC3- und TRPC6-transduzierten HEK293-Zellen konnten TRPC3- und TRPC6-Ströme mit einer EC_{50} von 0,08 mM und 0,44 mM induziert werden (Xu *et al.*, 2013). Die Pyrazolopyrimidine-basierten TRPC3/6/7-Aktivatoren 4m – 4p haben eine EC_{50} im nanomolaren Bereich, besitzen jedoch eine höhere Potenz für TRPC3 und TRPC7 gegenüber TRPC6 (Qu *et al.*, 2017). Neben neuen synthetischen Aktivatoren wurde der allosterische Modulator C20 entdeckt, der selektiv TRPC6-, jedoch nicht TRPC3- und TRPC7-Einströme, potenziert. Die kombinierte Aktivierung von TRPC6 in humanen Thrombozyten mit OAG und C20 (10 μ M) induzierte einen signifikanten Anstieg des Ca^{2+} -Einstroms gegenüber der alleinigen Aktivierung mit OAG (Häfner, Urban and Schaefer, 2019).

1.1.5 Physiologische Funktion und pathophysiologische Bedeutung des TRPC6-Kanals außerhalb der Lunge

Die cDNA für den murinen TRPC6-Kanal wurde zuerst aus dem Gehirn isoliert, welches neben der Lunge eine der höchsten Expressionsraten aufweist (Boulay *et al.*, 1997). Im Gehirn nimmt der TRPC6-Kanal eine relevante Funktion bei Lernvorgängen ein. So induziert die Überexprimierung des Kanals die Ausbildung von exzitatorischen Synapsen und transgene TRPC6-Mäuse zeigen signifikant bessere Ergebnisse im Morris-Wasserlabyrinth, was auf eine deutlich verbesserte Gedächtnisleistung und ein verbessertes räumliches Lernvermögen schließen lässt (Zhou *et al.*, 2008). Des Weiteren zeigen TRPC6-defiziente Mäuse weniger erforschendes Verhalten im quadratischen *Open-Field*-Test und im Radialarm-Labyrinth. Das Angst-bezogene Verhalten der TRPC6^{-/-}-Mäuse ist jedoch nicht unterscheidbar zu dem von WT-Mäusen (Beis, Schwarting and Dietrich, 2011). TRPC6 wurde auf Proteinebene in Synzytiotrophoblasten von Plazenten im ersten und dritten Trimester nachgewiesen, mit einer erhöhten Expression um den Geburtstermin (Clarson *et al.*, 2003). TRPC6 nimmt dabei durch Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Plazenta während der Schwangerschaft ein.

Im Herzen spielt TRPC6 zusammen mit TRPC1 eine bedeutende Rolle für die Ausbildung einer Herzmuskelhypertrophie. So wurde nachgewiesen, dass TRPC1/6-defiziente Mäuse auf eine chronischen Hypoxie mit einem geringeren pulmonalarteriellen Druck, einer verminderten Rechtsherzhypertrophie und einem reduzierten Gefäßumbau im Vergleich zu WT-Mäusen reagieren (Xia *et al.*, 2014).

Durch die Identifikation von aktivierenden (sog. *gain-of-function*) und inaktivierenden (sog. *loss-of-function*) Mutationen im TRPC6-Kanal von Patienten mit einer autosomal dominant vererbten Form der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) wurde eine essentielle Rolle des TRPC6-Kanals für die Filtrierfunktion im Glomerulus der Niere entdeckt (Reiser *et al.*, 2005; Winn *et al.*, 2005; Mottl *et al.*, 2013; Riehle *et al.*, 2016). Während der FSGS kommt es durch eine Störung des glomerulären Filtrationsprozesses der Niere zu einer Proteinurie, was letztlich zu einer terminalen Niereninsuffizienz führen kann.

Bislang sind 16 TRPC6-*missense*-Mutationen für die familiäre und sporadische FSGS beschrieben (siehe **Abbildung 6**).

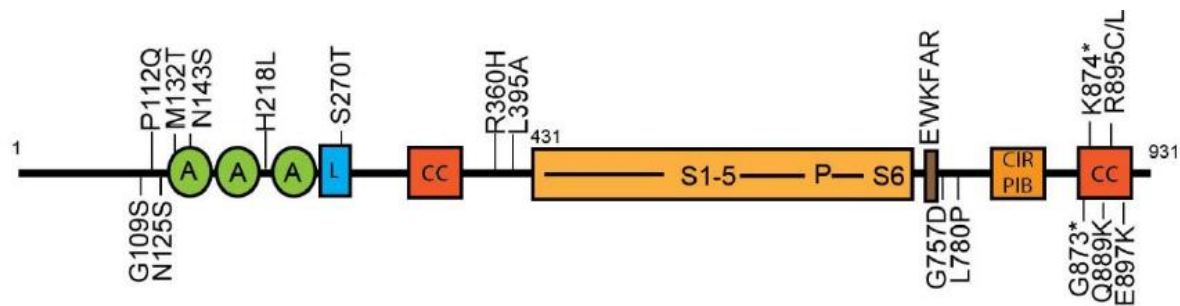


Abbildung 6: TRPC6 *gain-of-function* und *loss-of-function* Mutationen. TRPC6-Mutationen, die bei FSGS-Patienten mit Proteinurie gefunden wurden, sind dargestellt (z.B. G109S) (modifiziert von Dietrich and Gudermann, 2014).

Die erste TRPC6-Mutation wurde 2005 in einer großen Familie mit FSGS, welche eine *missense*-Mutation an Position 112 des TRPC6-Gens trägt, identifiziert. Die Mutation führte zu einer Prolin-Glutamin-Substitution (P112Q) an Position 112 des TRPC6 Gens. Für die Mutation wurde ein erhöhter TRPC6-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom nach Aktivierung mit Agonisten wie Angiotensin II beschrieben (Winn *et al.*, 2005). Ebenso konnten für die Mutanten R895C und E897K in einem heterologen Expressionssystem erhöhte TRPC6-Stromamplituden im Vergleich zu WT-TRPC6 gemessen werden (Schlöndorff *et al.*, 2013).

Die N-terminale G109S-Mutation wurde initial durch *in-silico*-Analyse als *loss-of-function*-Mutation beschrieben (Santin *et al.*, 2009). Durch spätere von Riehle und Kollegen durchgeführte *Calcium-Imaging*-Experimente, wurde die Mutation hingegen als *gain-of-function*-Mutation charakterisiert (Riehle *et al.*, 2016).

Hinsichtlich der N-terminalen S270T-*Missense*-Mutation, die in der DAG-sensitiven Lipid-Domäne lokalisiert ist, konnten bisher keine signifikanten Unterschiede in den Ca^{2+} -Strömen im Vergleich zu WT-TRPC6 gemessen werden (Reiser *et al.*, 2005; Riehle *et al.*, 2016). Im Gegensatz dazu zeigte die M132T-Mutante, die mit einer FSGS im Kindesalter assoziiert ist, im Vergleich zu WT-TRPC6-Kanälen einen 10-fach erhöhten Ca^{2+} -Einwärtsstrom und damit die höchste Einwärts-Stromdichte aller bisher beschriebenen TRPC6-Mutanten (Heeringa *et al.*, 2009).

Die Mutationen des TRPC6-Gens N125S, L395A, G757D, L780P und R895L wurden durch Calcium-Imaging-Analysen als *loss-of-function*-Mutation charakterisiert (Riehle *et al.*, 2016).

Der zugrunde liegende Wirkmechanismus, der dazu führt, dass durch aktivierende und inaktivierende TRPC6-Mutaten eine FSGS induziert wird, ist bisher nicht vollständig entschlüsselt. Für einige der FSGS-assoziierten Mutationen konnte eine konstitutive Aktivierung des *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)-Signalwegs in menschlichen

Podozyten beschrieben werden (Schlöndorff *et al.*, 2013). Der NFAT-Signalweg könnte die Transkription von Genen kontrollieren, die für die Funktion und Aufrechterhaltung der Podozyten wichtig sind, so dass eine Veränderung des NFAT-Signals zu einer Funktionsstörung der Podozyten und daraus folgend zur Entstehung einer FSGS führen könnte.

1.2 Das respiratorische System

Das respiratorische System setzt sich aus dem Respirationstrakt und der Atempumpe (ventilierenden System), bestehend aus Zwerchfell und Rippenmuskulatur, zusammen. Die Inspiration wird von einer Kontraktion des Zwerchfells begleitet, was zu einer Erweiterung der Brusthöhle und der Entstehung eines Unterdrucks in der Pleurahöhle führt. Dies bedingt eine Expansion der Lungenflügel und einen Einstrom der Atemluft. Mit der Relaxation des Zwerchfells kommt es zur Verengung der Brusthöhle und einer Senkung des Unterdrucks im Pleuralspalt, wodurch das Lungenvolumen verkleinert wird und überschüssige Luft nach außen abgegeben wird. Zusätzlich kann die äußere und innere Zwischenrippenmuskulatur durch Anheben und Absenken der Rippen das Volumen des Brustkorbs verändern (Purves *et al.*, 2006).

1.2.1 Anatomie des Respirationstraktes

Der menschliche Respirationstrakt unterteilt sich in vier anatomische Regionen beginnend mit der extrathorakalen Region (Nasenhöhle und Nasenvorhof, Mundhöhle und Mundvorhof, sowie Pharynx und Larynx) zur Aufnahme der Einatemluft. Mit der intrathorakalen Region (Trachea, Haupt-, Lappen- und Segmentbronchien, mittlere und kleine Bronchien) kommt es ab den Hauptbronchien zur dichotomen Aufzweigung der Atemwege mit durchschnittlich 23 Verzweigungen. Die bronchiolare Region (*Bronchioli* bis zu den *Bronchioli terminales*) geht in die alveolär-interstitielle Region (*Bronchioli respiratorii*, *Ductuli* und *Sacculi alveolaris*) über, in welcher durch dichte Vernetzung mit Kapillaren der Gasaustausch stattfindet (**Abbildung 7**) (Matthys and Seeger, 2008; Ehmke, 2010).

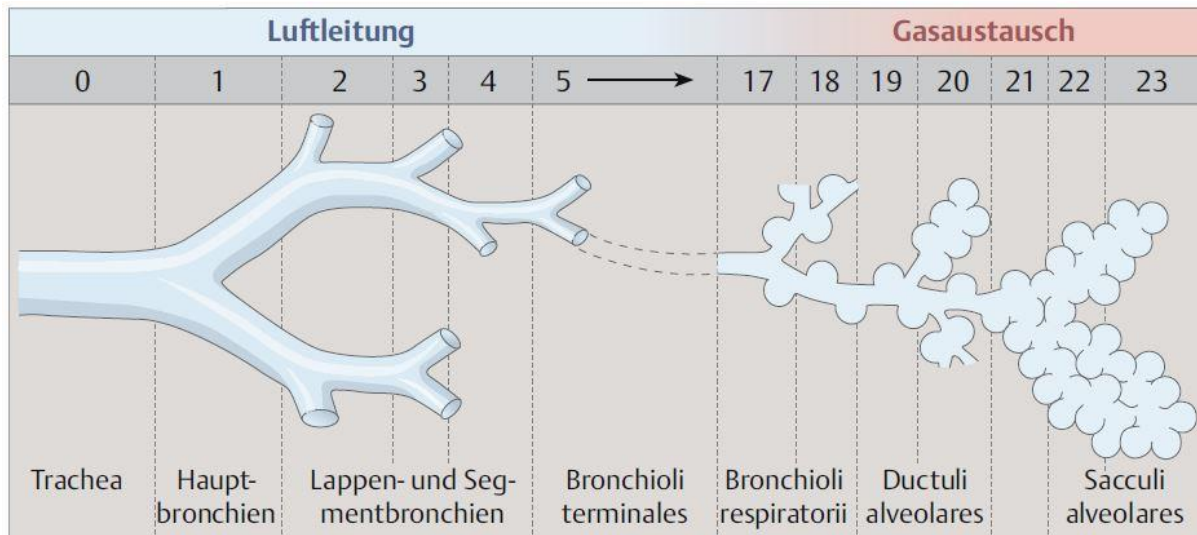


Abbildung 7: Aufbau des Bronchialbaums. Der menschliche Bronchialbaum weist ein dichotomes Verzweigungsmuster von durchschnittlich 23 Gabelungen auf. Das luftleitende System umfasst die Trachea bis zu den *Bronchioli terminales* und geht ab den *Bronchioli respiratorii* in den gasaustauschenden Teil über (Ehmke, 2010).

Die beiden Hauptbronchien münden zusammen mit Lymph-, Blutgefäßen und Nerven in den Hilus der Lungenflügel. Der rechte Hauptbronchus ist mit ca. 2,5 cm kürzer als der linke Hauptbronchus (ca. 5 cm) und teilt sich in Ober-, Mittel- und Unterlappen die aus insgesamt 10 Segmentbronchien bestehen. Die linke Lunge besteht nur aus Ober- und Unterlappenbronchus, unterteilt in 9 Segmentbronchien, und ist auf Grund des links liegenden Herzens kleiner als die rechte Lunge (Matthys and Seeger, 2008). Eine seröse Haut bestehend aus zwei Mesothelschichten, die Pleura, umschließt beide Lungenflügel. Die *Pleura visceralis* (das Lungenfell) liegt direkt der Lungenoberfläche auf und wird durch den mit Pleuralflüssigkeit gefüllten Pleuralspalt mit der *Pleura parietalis* (dem Rippenfell) verbunden. Die Pleura parietalis kleidet die Thoraxwand, die Mediastinalorgane und das Zwerchfell aus. Durch einen stetig herrschenden Unterdruck im Pleuralspalt folgt die Lunge den Thoraxbewegungen und ein Kollabieren der Lunge wird verhindert (Bungeroth, 2010).

1.2.2 Funktion der Lunge

Die Hauptaufgabe der Lunge besteht in der Aufnahme von Sauerstoff aus der Atemluft und der Abgabe von im Metabolismus entstehenden Kohlenstoffdioxid (CO₂). Durch die stetige Abgabe von CO₂ ist die Lunge auch an der Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Der Gasaustausch findet zwischen Alveolen und Kapillaren statt, welche im angrenzenden Bereich die Blut-Luft-Barriere bilden. Diese setzt sich aus den von

alveolaren Epithelzellen des Typ II (ATII), die *Surfactant* bilden, den alveolaren Epithelzellen des Typ I (ATI), der Basalmembran von Alveolarepithel und den Kapillarendothelzellen zusammen (**Abbildung 8**) (Ulfig, 2010).

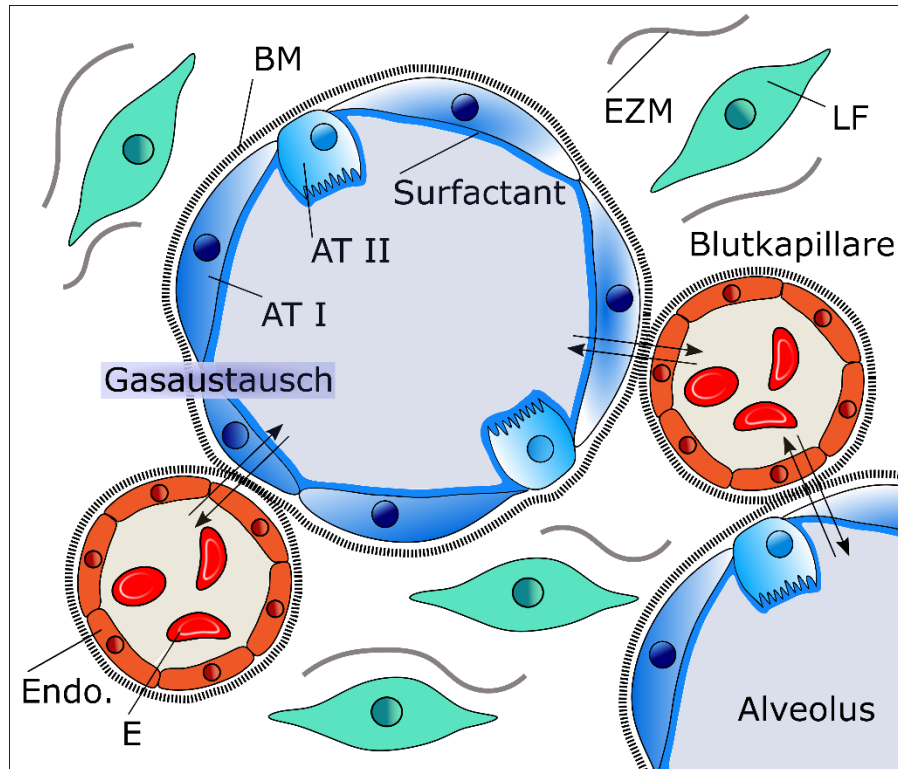


Abbildung 8: Gasaustausch zwischen Alveolen und Kapillaren. Die Blut-Luft-Schranke wird von den Endothelzellen (Endo.), welche die Kapillaren auskleiden, den Alveolarzellen des Typ II (ATII), die *Surfactant* bilden, den Alveolarzellen des Typ I (ATI) und der Basalmembran (BM) gebildet. In den Interalveolarepten befinden sich Lungenfibroblasten (LF), die extrazelluläre Matrixproteine (EZM) zur Bildung des Bindegewebsgerüsts produzieren.

Die ATII-Zellen produzieren die lipidreichen Membranproteine Surfactant Protein B und C (SPB, SPC), welche die Innenfläche der Alveolen auskleiden und durch Herabsetzen der Oberflächenspannung ein Kollabieren der Alveolen verhindern. Die hydrophilen Surfactant Proteine A und D hingegen nehmen eine immunologische Funktion ein (Wright, 2005).

Neben der Produktion und Sezernierung von Surfactant-Proteinen proliferieren und differenzieren ATII- in ATI-Zellen zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion nach Schädigung des Alveolarepithels (Evans *et al.*, 1973; Rock *et al.*, 2011). ATII-Zellen nehmen insgesamt 5 % der Alveolaroberfläche ein, wohingegen ATI-Zellen 95 % der Alveolarwand auskleiden. Eine Bindegewebschicht zwischen Alveolen und Kapillaren fehlt in der Regel, wodurch sich eine kurze Diffusionsstrecke von $< 0,5 \mu\text{m}$ ergibt (West, 2009). Dabei wird die Diffusion in Blut und Alveolarraum durch die Differenz der Partialdrücke von O_2 und CO_2 getrieben (Alveolarraum $\text{pO}_2 = 100 \text{ mmHg}$, $\text{pCO}_2 = 40$

mmHg; Blut $pO_2 = 40$ mmHg, $pCO_2 = 50$ mmHg) (Bungeroth, 2010). Lungenfibroblasten im Interstitium bilden durch Produktion extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagen und Elastin das stützende Bindegewebe der Lunge (Matthys and Seeger, 2008; White, 2015).

1.2.3 Unterschiede zwischen murinem und humanem Respirationssystem

Da in dieser Arbeit primäre Lungenzellen aus der Maus untersucht wurden und diese als Tiermodell in der Lungenforschung häufig angewendet werden, soll im Folgenden kurz auf die Unterschiede zwischen humanem und murinem Respirationssystem eingegangen werden.

Die Lunge der Maus umfasst ebenfalls 5 Lobi, welche jedoch in anderer Verteilung vorliegen. Der linke Lungenflügel besteht nur aus einem Lappen, wohingegen sich der rechte Lungenflügel aus 4 Lungenlappen zusammensetzt. Der murine Bronchialbaum weist mit 15 – 20 Verzweigungen eine geringere Anzahl an Gabelungen auf und ist monopodial statt dichotom angeordnet. Ein weiterer Unterschied ist der erhöhte Alveolarseptenanteil von 18 % des totalen Lungenvolumens bei der Maus, der im Vergleich beim Menschen nur 12 % einnimmt. Die Atemfrequenz der Maus (250 – 350 / Minute) ist deutlich erhöht. Eine weitere Besonderheit der Mauslunge ist die Restriktion von submukösen Drüsen auf die Nasenhöhle und den Knorpelspangen der Trachea, sowie die hohe Anzahl von Club-Zellen (Irvin and Bates, 2003; Nikolić, Sun and Rawlins, 2018).

1.3 Expression und Funktion des TRPC6-Kanals innerhalb der Lunge

TRPC6 wird in glatten Muskelzellen verschiedener Gewebe exprimiert. Durch Kontraktion der präkapillaren pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (*pulmonary artery smooth muscle cells, PASMC*) erhöht sich der Blutdruck im Lungenkreislauf und ihre Proliferation führt zur Muskularisierung der kleinen Lungengefäße im Verlauf einer idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH) (Weissmann *et al.*, 2006). In Lungengewebe und PASMC von IPAH-Patienten konnte eine vermehrte Expression von TRPC6 nachgewiesen werden, die zu einer PDGF (*Platelet-derived growth factor*)-induzierte Proliferation der PASMC über den c-jun/STAT3-Signalweg beiträgt (Yu *et al.*, 2003).

Bei der akuten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (aHPV), auch Euler-Liljestrand-Reflex genannt, nimmt der TRPC6-Kanal eine Schlüsselrolle ein. Der

Reflex beschreibt die lokale Vasokonstriktion in Sauerstoff-armen (hypoxischen) Bereichen der Lunge. Durch die daraus resultierende Umleitung des Blutes in normoxische Bereiche wird ein effektiver Gasaustausch und eine optimale Versorgung des Körpers mit Sauerstoff gewährleistet, auch wenn Teile der Lunge blockiert sind (Euler and Liljestrand, 1946). In TRPC6-defizienten Mäusen fehlt nach akuter Hypoxie in einem isolierten-perfundierten-Lungenmodell die regulatorische Vasokonstriktion der Lunge, was zu einer letalen Sauerstoffarmut (Hypoxämie) im systemischen Blutkreislauf dieser Mäuse führt. Die Vasokonstriktion und der Gefäßumbau nach chronischer Hypoxie ist jedoch unabhängig von der TRPC6-Expression und wird über andere molekulare Mechanismen reguliert (Weissmann *et al.*, 2006).

Eine Unterversorgung von Lungentransplantaten mit Sauerstoff während des Transports führt in den Empfängern zur Lungen-Ischämie-Reperfusion-induzierten Ödembildung (*lung ischemia reperfusion induced edema, LIRE*) (de Perrot *et al.*, 2003). In TRPC6-defizienten-Mäusen hingegen, konnte im isolierten-perfundierten-Lungenmodell nach Perfusionsstopp und Reperfusion keine Ödembildung mehr nachgewiesen werden (Weissmann *et al.*, 2012). Lungenendothelzellen der TRPC6-defizienten-Mäuse zeigten nach Hypoxie einen signifikant geringeren Ca^{2+} -Einstrom und eine geringere Abnahme der Barrierefunktion (Weissmann *et al.*, 2012). Ferner konnte die Inhibition des TRPC6-Kanals mit einem spezifischen Kanalblocker im isolierten-perfundierten-Lungenmodell die Ischämie-Reperfusion-induzierte Ödembildung deutlich reduzieren (Häfner *et al.*, 2018).

Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist ein wichtiger Prozess während der Wundheilung und des Gewebeumbaus, der aber auch zur Fibrose führen kann (zusammengefasst in Mcanulty, 2007). TRPC6 wird während des Differenzierungsprozesses kardialer und dermalen Fibroblasten vermehrt exprimiert und TRPC6-defiziente-Mäuse zeigen eine reduzierte Wundheilung nach einer dermalen oder kardialen Verletzung (Davis *et al.*, 2013). Auch pulmonale Fibroblasten zeigen eine Hochregulation des TRPC6-Kanals während der Myofibroblastendifferenzierung, welche in TRPC6-defizienten-Fibroblasten deutlich reduziert war. In einem Bleomycin-induzierten Lungenfibrose-Modell waren TRPC6-defiziente-Mäuse mit einer signifikant besseren Lungenfunktion und einer geringeren Kollagenproduktion im Vergleich zu WT-Mäusen von einer Lungenfibrose teilweise geschützt (Hofmann *et al.*, 2017).

1.4 Die Idiopathische Lungenfibrose (IPF)

Die idiopathische Lungenfibrose (*idopathic pulmonary fibrosis, IPF*) ist definiert als chronische, progredient verlaufende, fibrotisierende, interstitielle Lungenerkrankung (*interstitial lung diseases, ILD*) (Cottin *et al.*, 2019). Durch eine Funktionsstörung der alveolaren Epithelzellen und der Lungenfibroblasten kommt es zu einer erhöhten Bildung von extrazellulären Matrixproteinen und einem pathologischen Bindegewebsumbau (King Jr, Pardo and Selman, 2011).

Die IPF tritt primär bei Erwachsenen ab den 50. Lebensjahr auf und geht einher mit einer Abnahme der Lungenfunktion und einer frühen Sterblichkeit (mediane Überlebenszeit von 3 – 5 Jahren ohne Behandlung) (Raghu *et al.*, 2011). Der Krankheitsverlauf unterscheidet sich von Patient-zu-Patient von rasch- zu langsam-progressiv, aber auch ein Krankheitsverlauf gekennzeichnet von akuten Exazerbationen ist möglich. Die Ursachen einer IPF sind definitionsgemäß unbekannt, doch eine Vielzahl der Patienten hat eine positive Raucheranamnese. Ferner gelten Umweltbelastungen wie Metall- und Holzstäube, chronische Virusinfektionen (Epstein-Barr-Virus, Hepatitis C), ein abnormer gastroösophagealer Reflux und genetische Veränderungen als potenzielle Risikofaktoren (Borchardt, 2013).

Ein Update zur deutschen S2k (k für konsensbasiert) IPF-Leitlinie aus dem Jahr 2017 empfiehlt die Behandlung von IPF-Patienten mit Nintedanib oder Pirfenidon. Nintedanib ist ein Tyrosin-Kinase-Hemmer und inhibiert die Kinasefunktion mehrerer Wachstumsfaktorrezeptoren wie *Platelet-Derived Growth Factor* α und β (PDGF), *Fibroblast Growth Factor Receptor* 1 – 3 (FGFR) und *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* 1 – 3 (VEGFR) (Behr *et al.*, 2017). In Phase III Studien wurde eine signifikante Minderung des jährlichen FVC-Abfalls (FVC, forcierte Vitalkapazität als Messwert der Lungenfunktion: Maximales Gesamtvolumen an ausgeatmeter Luft nach forcierter Einatmung) um ca. 50 % nachgewiesen (Luca Richeldi *et al.*, 2014). Der genaue Wirkmechanismus des Antifibrotikums Pirfenidon ist nicht vollständig klar. In einem IPF-Tiermodell wurde aber nachgewiesen, dass es die Produktion des *Transforming Growth Factors* β 1 (TGF- β 1), des *basic-Fibroblast Growth Factor* (bFGF) und von Interferon- γ (IFN- γ) sowie die Kollagensynthese inhibiert (Oku *et al.*, 2008). Bei einer IPF im Endstadium ist eine Lungentransplantation die letzte Therapiemöglichkeit zur Erhöhung der Überlebenschancen (Thabut *et al.*, 2003).

1.4.1 Pathogenese der IPF

Der genaue Pathomechanismus der idiopathische Lungenfibrose ist nicht aufgeschlüsselt, doch mehrere Studien deuten auf ein komplexes Zusammenspiel von genetischen Risikofaktoren, Umweltbelastungen, zellulärer Seneszenz und epigenetischen Veränderungen hin, die zu einer schwerwiegenden Störung der alveolaren Epithelzell- und Fibroblasten-Funktion führt (zusammengefasst in Selman and Pardo, 2014).

Durch Alterungsprozesse anfälliger alveolare Epithelzellen unterlaufen in Folge von wiederholten Mikroverletzungen den Zelltod. Dies führt zur Migration und erhöhter Proliferation von ATII-Zellen in die betroffenen Lungenbereiche. Die ATII-Zellen sind jedoch übermäßig aktiviert und produzieren eine Vielzahl von profibrotischen Mediatoren, wie TGF- β 1, *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), *Tumour Necrosis Factor* (TNF), Osteopontin, Angiotensinogen, sowie verschiedene Matrix Metalloproteasen (z.B. MMP1, MMP7, MMP19) und Chemokine (z.B. *CXC motif chemokine 12*, CXCL12) (zusammengefasst in Martinez *et al.*, 2017). Durch diese Mediatoren werden mehrere Signalkaskaden aktiviert, inklusive TGF- β 1, HIPPO-YAP, WNT und der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg (Xu *et al.*, 2016).

Insbesondere TGF- β 1 ist in der Lage eine starke fibrotische Antwort auszulösen. Die Transduktion von alveolaren Epithelzellen mit einem Retrovirus der aktiviertes TGF- β 1 enthält, zeigte in einem Lungen-Explantmodell das Auftreten interstitieller Fibrose, gekennzeichnet durch einen Anstieg der Fibroblastenpopulation und Ausbildung von Foci, einer ATII-Hyperplasie, sowie einer erhöhten Kollagenproduktion (Xu *et al.*, 2003). Die Proliferation der Fibroblasten wird dabei über die TGF- β 1-induzierte Expression von *Fibroblast-Growth-Factor-2* (FGF-2) und der nachfolgenden Aktivierung der *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK) positiv reguliert (Khalil *et al.*, 2005).

Durch die aktivierten Signalkaskaden kommt es zur Migration von Fibrozyten über die Blutkapillaren in das geschädigte Lungengewebe (vor allem durch CXCL-12) und deren Differenzierung in Myofibroblasten. Außerdem werden lokale Lungenfibroblasten durch Sezernierung des Wachstumsfaktors PDGF rekrutiert, und differenzieren durch den TGF- β 1-Signalweg zu Myofibroblasten. Ebenso durchlaufen ATII-Zellen durch TGF- β 1-Stimulation eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (zusammengefasst in King Jr, Pardo and Selman, 2011) (**Abbildung 9**)

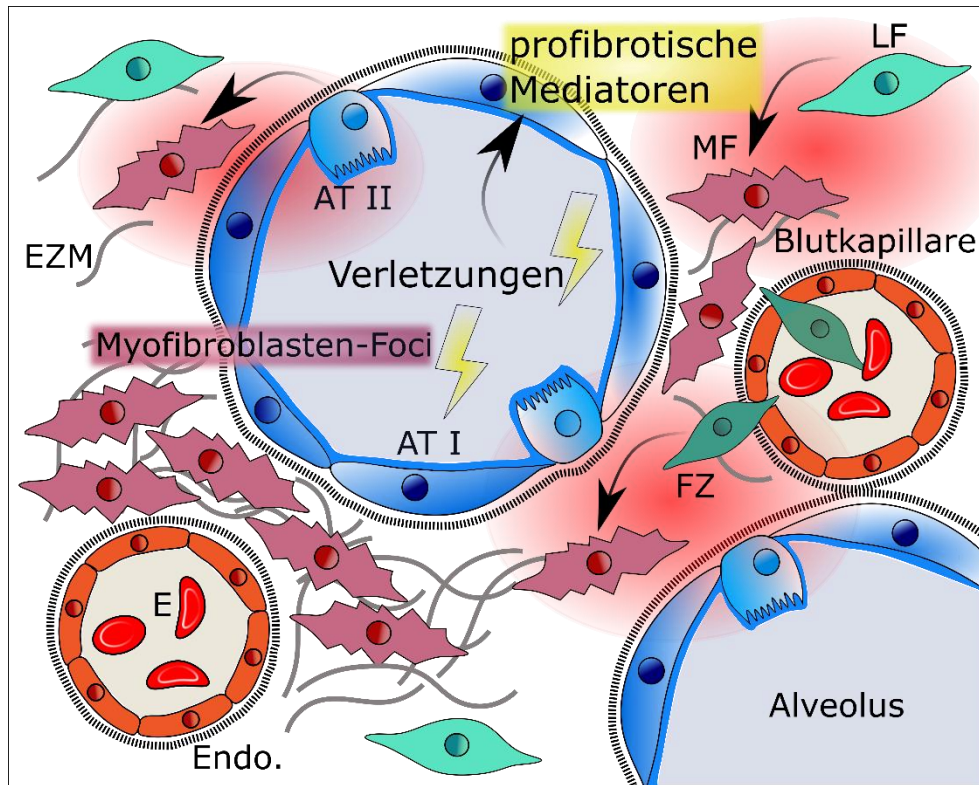


Abbildung 9: Pathogenese der idiopathischen Lungenfibrose. Wiederholte Mikroverletzungen des Alveolarepithels führen zur Sezernierung von profibrotischen Mediatoren. Diese aktivieren die Myofibroblasten (MF)-Differenzierung verschiedener Zelltypen: (I) Lungenfibroblasten (LF) (II) alveolare Epithelzellen des Typ 2 (ATII) (III) Fibrozyten aus der Peripherie (FZ). Die Myofibroblasten migrieren ins entzündete Gewebe, proliferieren verstärkt und bilden sogenannte Myofibroblasten-Herde (Foci). Durch die erhöhte Produktion extrazellulärer Matrixproteine (EZM) kommt es zur Einschränkung des Gasaustausches und Versteifung der Lunge. Erythrozyt (E), Endothelzelle (Endo.).

Die stark kontraktile Myofibroblasten konzentrieren sich in den geschädigten Lungenbereichen und bilden dort Zellherde, die auch als Myofibroblasten-Foci bezeichnet werden. Ein Hauptmerkmal der Myofibroblasten ist die erhöhte Expression von glatten Muskelzellaktin Alpha (α -smooth-muscle-actin, α -SMA), das sich in Stressfibern organisiert und die molekulare Grundlage der kontraktile Eigenschaft der Myofibroblasten bildet (Tomasek *et al.*, 2002). Durch einen Apoptose-resistenten Phänotyp und der erhöhten Proliferation der Myofibroblasten wird eine schnelle Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen im Lungeninterstitium begünstigt. Hauptbestandteil der produzierten extrazellulären Matrix sind fibrilläre Kollagene (vor allem Typ I und III Kollagen), Glykoproteine und Proteoglykane (z.B. Fibronectin und Laminin) (Klingberg, Hinz and White, 2013). Durch die TGF- β 1-induzierte-Expression des Serin Protease Inhibitors, *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1), wird außerdem der Abbau von Kollagen und anderen extrazellulären Matrix Proteinen vermindert (Albo *et al.*, 1994; zusammengefasst in Ghosh and Vaughan, 2012). Die abnorme Zunahme an extrazellulärer Matrix führt zu einer Zerstörung der

Lungenarchitektur mit Ausbildung von Honigwabenstrukturen (zystische fibrotische Lufträume, ausgekleidet durch bronchiolares Epithel und oft gefüllt mit Mucus und inflammatorischen Zellen), sowie einer Verdickung des Bindegewebes zwischen Alveoli und Kapillaren, die den Gasaustausch stark einschränkt und letztlich zu einer Unterversorgung der Organe mit Sauerstoff führt (zusammengefasst in King Jr, Pardo and Selman, 2011).

1.4.2 Die Rolle von Fibroblasten und Myofibroblasten für die Ausbildung einer IPF

Die pathologische Expansion von Fibroblasten und Myofibroblasten im Krankheitsverlauf führt zur beschriebenen übermäßigen Produktion von extrazellulären Matrixproteinen. Ferner induzieren Myofibroblasten durch die Sezernierung von Angiotensin Peptiden (Angiotensinogen und Angiotensin II) und Wasserstoffperoxid die Apoptose von Epithelzellen und verhindern so die Rekonstruktion von geschädigtem Alveolarepithel (Wang *et al.*, 1999; Waghray *et al.*, 2005). Verschiedene Zelltypen können nach einem profibrotischen Stimuli in Myofibroblasten differenzieren, darunter lokale Fibroblasten, Perizyten, mesenchymale Vorläuferzellen, Fibrozyten, Epithelzellen, Endothelzellen und Mesenchymalzellen (zusammengefasst in King Jr, Pardo and Selman, 2011).

Der quantitative Anteil der jeweiligen Zelltypen an der Myofibroblastenpopulation ist nicht genau bekannt. Vor allem die Beteiligung von ATII-Zellen an der Myofibroblastenpopulation ist umstritten. Sowohl *in-vitro*-, als auch *in-vivo*-Experimente im murinen System zeigen, dass bis zu 50 % der Stromazellen, zu denen auch Fibroblasten und Fibrozyten gehören, durch EMT generiert werden (Tanjore *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006). Auch in humanen ATII-Zellen konnte *in-vitro* die TGF- β 1-induzierte-Differenzierung in Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp detektiert werden (Kasai *et al.*, 2005). In anderen Veröffentlichungen konnte jedoch kein Nachweis für ein EMT von ATII-Zellen in Myofibroblasten erbracht werden (Rock *et al.*, 2011). Die EMT wird allgemein als Verlust der epithelialen Marker (E-Cadherin) bei simultaner Zunahme der mesenchymalen Marker (α -SMA, Fibronectin) beschrieben, wobei Schwellenwerte nicht definiert werden, so dass eine genaue Abgrenzung von anderen zellulären Ereignissen schwerfällt (zusammengefasst in Salton, Volpe and Confalonieri, 2019).

In sog. *lineage tracing*-Experimenten, in denen die Differenzierung von Zellen verfolgt werden können, konnte ein hoher Anteil (55 %) von Myofibroblasten, die von FoxD1-positiven Perizyten abstammen (als α -SMA⁺ und COL1⁺ definiert), identifiziert werden. Als zweithäufigster Ursprung der Myofibroblasten konnten FoxD1-unabhängige und PDGFR- α ⁺ lokale Fibroblasten ermittelt werden (Hung *et al.*, 2013). Weitere Versuche sind jedoch notwendig, um den genauen Anteil der einzelnen Zelltypen für die Myofibroblastendifferenzierung zu bestimmen.

1.5 Strahlen-induzierte Pneumonitis und Lungenfibrose

Da die Lunge eines der strahlungssensitivsten Organe ist, führt die im Rahmen einer Krebstherapie durchgeführte Bestrahlung des Thorax zu einer akuten Schädigung, die durch die ausgelöste angeborene Immunantwort in eine Strahlenpneumonitis übergeht und zur Ausbildung einer Lungenfibrose führen kann (zusammengefasst in Paiman Ghafoori, 2008).

Der Verlauf ist gekennzeichnet durch eine asymptomatische Latenzphase von 1 – 3 Monaten, in der aber bereits Lungenschäden durch DNA Doppel- und Einzelstrangbrüchen und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) innerhalb von Nanosekunden nach Bestrahlung induziert werden (zusammengefasst in Williams, Johnston and Finkelstein, 2010). Durch Interaktion der ionisierenden Strahlung mit Wassermolekülen im biologischen System werden insbesondere Superoxid-Radikal-Anion (O₂^{·-}), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Hydroxylradikale (·OH) generiert. Der durch reaktive Sauerstoffradikale induzierte oxidative Stress führt zur Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden der Zelle (zusammengefasst in Ding, Li and Sun, 2013). Hydroxylradikale reagieren beispielsweise mit der Base Guanin und generieren 8-hydroxyl-20-desoxyguanosin (8-OHdG), was letztlich den Zelltod induziert (Valavanidis, Vlachogianni und Fiotakis, 2009). Andere Folgen von DNA-Schäden können aber auch ein Zellzyklus-Arrest oder die Sekretion von Seneszenz-aktivierenden-Zytokinen wie Interleukin 6 (IL-6) sein (Rodier *et al.*, 2011).

In der darauffolgenden akuten Phase, der Pneumonitis, migrieren Entzündungsauslösende (inflammatorische) Zellen, darunter Makrophagen, mononukleäre Zellen, Mastzellen und Neutrophile in die Lufträume und das Interstitium (Haston *et al.*, 2007). Der Entzündungsprozess wird durch die erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren initiiert. In einer ersten Reaktion werden vor allem

TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-6 exprimiert (Calveley *et al.*, 2005; Finkelstein *et al.*, 1997). TNF- α erhöht die intrazelluläre ROS-Produktion, was zur weiteren Schädigung der Alveolar- und Endothelzellen führt (Chen *et al.*, 2008). Während die Wachstumsfaktoren TGF- β und FGF zu einer vermehrten Expression von EZM-Proteinen führen, die vor allem in der chronischen Phase für die Ausbildung einer Lungenfibrose von großer Bedeutung sind (Martin, Lefaix and Delanian, 2000). Die Lungenfibrose tritt in der Regel 6 – 24 Monate nach Bestrahlung auf und stabilisiert sich nach ca. 2 Jahren (McDonald *et al.*, 1995).

Zu welchem Zeitpunkt und in welchem Schweregrad die Pneumonitis, die letztlich über die Entstehung einer irreversiblen Lungenfibrose entscheidet, auftritt, ist von mehreren Faktoren anhängig. Dabei muss die totale Strahlendosis, das Volumen bestrahlter Lunge, der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Behandlungsterminen und eine zusätzliche stattfindende Chemotherapie (z.B. mit Bleomycin) beachtet werden. Dadurch ergibt sich eine starke Einschränkung des Bestrahlungsplans, der den Therapieerfolg bei Brustkrebspatientinnen negativ beeinflusst. Darüber hinaus bestimmt eine bereits bestehende Lungenerkrankung des Patienten, eine schlechte Lungenfunktion und das Vorhandensein genetischer Prädispositionen die weitere Entwicklung (zusammengefasst in Giridhar *et al.*, 2015).

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit war zum einen den molekularen Aktivierungsmechanismus des TRPC6-Kanals aufzuschlüsseln. Mittels intramolekularer FRET-Messung sollten strukturelle Veränderungen des N- und C-Terminus unter Aktivierung des Kanals mit OAG und GSK-170 detektiert werden. Dabei wurde eine vergleichende Untersuchung des WT-Kanals mit in der Nierenerkrankung FSGS detektierten TRPC6 *gain-of-function* und *loss-of-function* Mutationen durchgeführt.

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung des Einflusses von TRPC6 auf die Ausbildung einer Lungenfibrose. Da die Beteiligung von TRPC6 bei der Myofibroblastendifferenzierung von Fibroblasten durch unsere Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen werden konnte (Hofmann *et al.*, 2017), sollte nun auf zellulärer Ebene die Beteiligung von TRPC6 bei der TGF- β 1-induzierten mesenchymalen Differenzierung alveolärer Epithelzellen analysiert werden. Dazu wurde in AII-Zellen von WT- und TRPC6-defizienten-Mäusen nach TGF- β 1-Stimulation die Gen- und Proteinexpression von mesenchymalen und epithelialen Zellmarkern untersucht.

Ferner sollte die strahlungsinduzierte Myofibroblastendifferenzierung von primären murinen WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten analysiert werden. Neben der Analyse der Gen- und Proteinexpression wurde die Viabilität und klonogene Expansion der Zellen nach Bestrahlung untersucht.

Um in Zukunft *in-vivo*-Untersuchungen zur gewebsspezifischen Beteiligung von TRPC6 bei der Ausbildung einer Lungenfibrose durchzuführen, wurde die konditionale TRPC6-defiziente (TRPC6^{fllox})-Maus charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mauslinien

Tabelle 2: Mauslinien

| Mauslinie | Genetischer Hintergrund |
|--|-------------------------|
| Wildtyp | C57BL/6 |
| TRPC6 ^{-/-} (Dietrich <i>et al.</i> , 2005) | C57BL/6 |
| TRPC6 ^{flox} (Zebrabio) | |

Die Tiere (Dietrich *et al.*, 2005) wurden zehnmal in den C57/BL6-Mausstamm gekreuzt.

2.1.2 Zellen und Kulturmedien

Tabelle 3: Zelllinien

| Zelllinie | Zelltyp | Medium |
|-----------|--|---|
| HEK293T | Humane embryonale Nierenepithelzellen mit großem T-Antigen von SV40 | DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen./Strep. |

Tabelle 4: Primäre murine Zellen

| Primäre Zellen | Zelltyp | Medium |
|----------------|---|--|
| pmLF | Primäre murine Lungenfibroblasten | DMEM + 20 % FCS + 1 % Pen./Strep. |
| ATI | Primäre alveolare Epithelzellen Typ I | DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen./Strep. + 10 mM HEPES |
| ATII | Primäre alveolare Epithelzellen Typ II | DMEM + 10 % FCS |

+ 1 % Pen./Strep.

+ 10 mM HEPES

Tabelle 5: Kulturmedien und Zusatzstoffe

| Produkt | Firma | Artikelnummer |
|--|---|------------------|
| DMEM | Lonza, Basel, Schweiz | BE12-604F |
| DMEM F12 | Lonza, Basel, Schweiz | BE12-719F |
| FCS | Invitrogen, Carlsbad; USA | 10270-106 |
| Opti-MEM | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | 11058021 |
| HBSS ohne Phenolrot, mit Ca²⁺ | Lonza, Basel, Schweiz | BE10-527F |
| HBSS ohne Phenolrot, Ca²⁺, Mg²⁺ | Lonza, Basel, Schweiz | BE10-547F |
| Normocin (50mg/ml) | Invivogen, Sorrento, USA | ant-nr-1 |
| PBS | Lonza, Basel, Schweiz | BE-17-512F |
| Penicillin/Streptomycin | Lonza, Basel, Schweiz | DE-17-602E |
| Plasmocin | InvivoGen, San Diego, USA | Ant-mpp / ant-pc |
| Trypsin-EDTA | Lonza, Basel, Schweiz | BE17-161E |

2.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 6: Murine Nanostring® Oligonucleotide

| Gen | Capture-Oligonukleotide | Reporter-Oligonukleotide |
|---------------------------|--|---|
| Beta- | AAAAGAGCCTCAGGGCATCGGA | CGAAAGCCATGACCTCCGATCA |
| Aktin | ACCGCTCGTTGCCAATAGTGAT GACCTGCCTCAAGACCTAAGCG ACAGCGTGACCTTGTTTCA | CTCATGTAGTTTCATGGATGCC ACAGGATTCCATACCCAAGAAG GAAGGCTGG |
| Beta2- | ATTTGGATTTCAATGTGAGGCG | CGAAAGCCATGACCTCCGATCA |
| Microgl obulin | GGTGGAAGTGTGTTACGTAGCA GTTTCAGCATCCTCTTCTTTTCTT GGTGTTGAGAAGATGCTC | CTCAGGACATATCTGACATCTC TACTTTAGGAATTTTTTTCCCGT TCTTCAGC |

| | | |
|--------------|---|---|
| SdHa | GGCATGCAGTATTAACCCTGC CTCAGAAAGGCCAAATGCAGCT CGCAAGCACAATTCTGCGGGTT AGCAGGAAGGTTAGGGAAC | CGAAAGCCATGACCTCCGATCA CTCCTCCCTGTGCTGCAACAGT ATGTGATCGGGTAGGAAAGAG CTTTGTAA |
| GAPDH | ATCGAAGGTGGAAGAGTGGGA GTTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG ACAACCTCTGTTGAGATTATTGA GCTTCATCATGACCAGAAG | CGAAAGCCATGACCTCCGATCA CTCCAGGAAATGAGCTTGACAA AGTTGTCATTGAGAGCAATGCC AGCCCCGGC |
| TRPC1 | TAACAAAGCTGAGCTGGTTACG CGATTCTTCTAGGAAGTCTTCCA ACCCTCAAAGACGCCTATCTTC CAGTTTGATCGGGAAACT | CGAAAGCCATGACCTCCGATCA CTCGTTGTGAGCCACCACTTTG AGGGCAAAGGTTGCCAAGTAAA GGGAATTCA |
| TRPC2 | TGACCATGACGATGGTAAAGAT GCCGTACATGGCCCTGCCACG AACTCACGAACCTAACTCCTCG CTACATTCTATTGTTTTTC | CGAAAGCCATGACCTCCGATCA CTCCTTCTGGAAGGAGTTGGTG ATCATGGCAATAAGCATGTAA GTAGCACAA |
| TRPC3 | GGAGAAGCTGAGCACCACAGCT ATGGCATAGAGCCCTTCAGATA TGATCTCCAATTTGGTTTTACTC CCCTCGATTATGCGGAGT | CGAAAGCCATGACCTCCGATCA CTCATCTGCAAGGGCCCAAAGC TCTCGTTTGCAGGGAGGATGTA CGCAATCCG |
| TRPC4 | CTTTGCAGCTTAGCCCCTTTGTT TCTTCATAGTAAAAGTACAGCTG ATTTCTTTCGGGTTATATCTATC ATTTACTTGACACCCT | CGAAAGCCATGACCTCCGATCA CTCTGTCTCGAATAACGTGGAA AACGCGTTGTTCTGTTTCTCGC ACCGGATGC |
| TRPC5 | CACATTTCCATTCTTCCCTTGG ACGAGAACCATTATACTTGACAT AGGCCAACAGCCACTTTTTTTTCC AAATTTTGCAAGAGCC | CGAAAGCCATGACCTCCGATCA CTCTTAAAATGTTGGATATTGC GAAGAGTGCTTCTGCAATCAGA GTCGGGTGC |
| TRPC6 | CTCCACGTCCGCATCATCCTCA ATTTCTGGAATGAACTATTGAT CATCGCACCGTGTGGACGGCAA CTCAGAGATAACGCATAT | CGAAAGCCATGACCTCCGATCA CTCCTCCCCTCCTCAAAGTAGG AAAACCACAATTTGGCCCTTGC AAACTTCCA |

| | | |
|--------------|---|---|
| TRPC7 | GAACCTTGTGGTCGTATTTTCAGC ACCACCGAGATGACCTCAGACA AGCCAACCTGGAGTTTATGTATT GCCAACGAGTTTGTCTTT | CGAAAGCCATGACCTCCGATCA CTCACCATGGTGACATTATAAA CCCCATACAGCACGTAGCCAAT ATTCTCGAT |
|--------------|---|---|

2.1.4 Plasmide

Tabelle 7: Plasmide

| Plasmid | Plasmidgröße [Bp] | Firma |
|----------|-------------------|------------------------|
| pWPXL | 10510 | Addgene, Boston 12257 |
| pcDNA3.1 | 5446 | Invitrogene, Karlsruhe |

2.1.5 Antikörper

Tabelle 8: Primärantikörper

| Antikörper | Wirt | Verdünnung | Firma | Artikelnummer |
|------------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| α SMA | Maus | 1:2.000 WB/IF | Sigma Aldrich, Deisenhofen | A5228 |
| β -Aktin-POX (Peroxidase) | Maus | 1:10.000 WB | Sigma Aldrich, Deisenhofen | |
| CD16/32 | Maus | 0,75 μ g/ml ATII Isolation | BD, Franklin Lakes, USA | 553142 |
| CD45 | Maus | 0,75 μ g/ml ATII Isolation | BD, Franklin Lakes, USA | 553076 |
| ECAD | Maus | 1:50 IF | BD, Franklin Lakes, USA | 610181 |
| TRPC6 | Kaninchen | 1:200 WB | V. Flockerzi Labor, Homburg | 861-Affi. |
| Pro-SP-C | Kaninchen | 1:300 IF | Merck Millipore, Darmstadt | AB3786 |
| Vinculin | Maus | 1:10.000 WB | Sigma Aldrich, Deisenhofen | |

Tabelle 9: Sekundärantikörper

| Antikörper | Wirt | Verdünnung | Firma | Artikelnummer |
|--------------------------------|---------------|-------------|---|---------------|
| Anti-Kaninchen IgG-HRP | Ziege | 1:10.000 WB | Sigma Aldrich, Deisenhofen | A6154 |
| Anti-Kaninchen IgG-Alexa488 | Ziege | 1:500 IF | Life Technologies, Carlsbad, USA | A11008 |
| Anti-Maus HRP | IgG- Pferd | 1:2.000 WB | Cell Signaling, Danvers, USA | 7076S |
| Anti-Maus FITC | IgG- Ziege | 1:80 IF | Sigma Aldrich, Deisenhofen | F9006 |

(HRP, *horseradish peroxidase*)

2.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 10: HEPES gepufferte Saline (HBS), 2x

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|---|-------------------|------------------|
| Bidest. H ₂ O | 800 ml | |
| NaCl | 16,36 g | 280 mM |
| HEPES | 11,9 g | 50 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 213 mg | 1,5 mM |
| NaOH 10 M | pH 7 einstellen | |
| Bidest. H ₂ O | Auf 1 L auffüllen | |
| Lösung mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltrieren | | |

Tabelle 11: HEPES gepuffertes Wasser

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|--------------------------|--------|------------------|
| Bidest. H ₂ O | 50 ml | |
| HEPES 1 M pH 7,3 | 125 µl | 2,5 mM |

Tabelle 12: Laemmlipuffer, 6x

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|-----------------------------|-------|------------------|
| 4x Tris/ SDS Puffer pH 6,8) | 6 ml | 375 mM |
| Glycerin | 48 g | 48 % |
| SDS | 6 g | 6 % |
| Bromphenolblau | 30 mg | 0,03 % |
| β -Mercaptoethanol | 9 ml | 9 % |

Tabelle 13: Laufpuffer, 10x für SDS-Gelelektrophorese

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|----------------------------|-------------------|------------------|
| Tris Base | 30,2 g | 250 mM |
| Glycin | 144 g | 1,92 M |
| SDS | 10 g | 35 mM / 1 % |
| Millipore H ₂ O | Auf 1 L auffüllen | |

Tabelle 14: LB Medium

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|----------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Pepton/Trypton | 10 g | 1 % |
| Hefeextrakt | 5 g | 0,5 % |
| NaCl | 10 g | 171 mM |
| Millipore H ₂ O | Auf 1 L auffüllen und autoklavieren | |

Tabelle 15: PBS, 10x

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|----------------------------------|-------------------|------------------|
| NaCl | 80 g | 1,37 M |
| KCl | 2 g | 27 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 14,4 g | 101 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 2,4 g | 18 mM |
| Millipore H ₂ O | Auf 1 L auffüllen | |

Tabelle 16: PBST, 1x

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| PBS 10x | 100 ml | PBS 1x |
| Tween-20 | 5 ml | 0,5 % Tween |
| Bidest. H₂O | Auf 1 L auffüllen | |

Tabelle 17: RIPA Lysepuffer

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|-----------------------------|---|------------------|
| Igepal CA 630 | 5 ml | 1 % |
| Natriumdesoxycholat | 2,5 g | 0,5 % |
| SDS | 500 mg | 0,1 % |
| PBS, 1x | Auf 500 ml auffüllen | |
| Proteaseinhibitor | 1 Tablette auf 10 ml RIPA Puffer unmittelbar vor Gebrauch | |
| Phosphataseinhibitor | 1 Tablette auf 10 ml RIPA Puffer unmittelbar vor Gebrauch | |

Tabelle 18: TAE-Puffer, 50x

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|---------------------------------|-------------------|------------------|
| TRIS Base | 242 g | 2 M |
| Essigsäure | 57,1 ml | 1 M |
| EDTA | 37,2 g | 127 mM |
| Millipore H₂O | Auf 1 L auffüllen | |

Tabelle 19: TE Puffer, 1x

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|---|----------|------------------|
| Bidest. H₂O | 50 ml | |
| Tris 1 M pH 8 | 500 µl | 10 mM |
| EDTA | 14,61 mg | 1 mM |
| Lösung mit einem 0,45 µm Filter sterilfiltrieren | | |

Tabelle 20: Transferpuffer, 10x

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|----------------------------|-------------------|------------------|
| TRIS | 30,2 g | 250 mM |
| Glycin | 144 g | 1,92 M |
| SDS | 2 g | 7 mM |
| Millipore H ₂ O | Auf 1 L auffüllen | |

Tabelle 21: TRIS-SDS-Puffer pH 6,8 (4x)

| Reagenz | Menge | Endkonzentration |
|----------------------------|---|------------------|
| TRIS | 6,05 g | 500 mM |
| SDS | 400 mg | 1 mM |
| Millipore H ₂ O | Auf 90 ml auffüllen, pH 6,8 mit NaOH und HCl einstellen, auf 100 ml auffüllen | |

2.1.7 Chemikalien

Tabelle 22: Chemikalien

| Chemikalie | Firma | Artikelnummer |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------|
| Aceton | Carl Roth, Karlsruhe | 7328.2 |
| Acetonitril | Merck Millipore, Darmstadt | 100030 |
| Agar | Applichem GmbH, Darmstadt | A0949,1000 |
| Agarose (pmLF-Isolation) | Carl Roth, Karlsruhe | 100030 |
| Agarose (ATII-Isolation) | Sigma Aldrich, Deisenhofen | A9414-250g |
| Ampicillin | Carl Roth, Karlsruhe | K029.1 |
| APS (Ammoniumpersulfat) | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 215589 |
| BAL (2,3-dimercapto-1-propanol) | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 64046-10ML |
| BSA (Bovine Serum Albumine) | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 9418 |

| | | |
|---|---|-------------|
| Calciumchlorid/ CaCl₂ x H₂O | Sigma Aldrich, Deisenhofen | C3306 |
| 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 |
| DNaseI | PanReac®AppliChem | A3778, 0500 |
| EDT (1,2-Ethanedithiol) | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 02390-25ML |
| Ethanol reinst (>99,5%) | Carl Roth, Karlsruhe | 5054.3 |
| Formaldehyd 37% | Sima Aldrich, Deisenhofen | 252549 |
| Glycin | Carl Roth, Karlsruhe | 9105.3 |
| GSK-1702934A | Focus Biomolecules, Pennsylvania | 10-1445 |
| Hefeextrakt | Carl Roth, Karlsruhe | 2363.2 |
| Heparin-Natrium | Braun, Melsungen | 126/317126 |
| HEPES | Carl Roth, Karlsruhe | 9105.3 |
| 4-(2Hydroxyethyl)piperazin- 1-ethansulfonsäure | | |
| HEPES Puffer pH 7,5 (1M) | Pan Reac® AppliChem | A6916, 0125 |
| Höchst 33342 [10 mg/ml] | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | 62249 |
| Hydroxyprolin | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 41875-100MG |
| Igepal CA 630 | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 18896 |
| Isopropanol | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 6752.3 |

| | | |
|--|--------------------------------|------------|
| Kaliumchlorid/ KCl | Carl Roth; Karlsruhe | 6781.1 |
| Kaliumdihydrogenphosphat/ KH₂PO₄ | Carl Roth, Karlsruhe | 6875.2 |
| Kaliumhydroxid/ KOH | Carl Roth, Karlsruhe | 2526.1 |
| Kochsalzlösung 0,9% | Braun, | 08609255 |
| Kupfer-II-Sulfat/ Cu(II)SO₄ | Sigma Aldrich, Deisenhofen | C8027 |
| Milchpulver | Carl Roth, Karlsruhe | T145.2 |
| Magnesiumchlorid/ MgCl | Carl Roth, Karlsruhe | KK36.2 |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat/ MgCl₂ x 6H₂O | Carl Roth, Karlsruhe | M2393 |
| Mercaptoethanol | Sigma Aldrich, Deisenhofen | M6250-10ml |
| Methanol | Carl Roth, Karlsruhe | P717.1 |
| Nagellack, klar | Wild Shine, Basingstoke, GB | E4063 |
| Natriumacetat | Merck Millipore, Darmstadt | 106268 |
| Natrium Azid | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 822335 |
| Natriumhydroxid/ NaOH | Carl Roth, Karlsruhe | HN01.1 |
| Natriumchlorid/ NaCl | Carl Roth, Karlsruhe | 9265.1 |
| Natriumdeoxycholat | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 16026 |
| Natriumhydrogenphosphat/ Na₂HPO₄ | Carl Roth, Karlsruhe | T876.1 |
| Natriumhydrogencarbonat/ NaHCO₃ | Carl Roth, Karlsruhe | HN01.1 |
| Natriumthiosulfat/Na₂S₂O₃ | Sigma Aldrich, Deisenhofen | S6672-500G |
| Natriumhypochlorit 12% | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 9062.1 |

| | | |
|---|---|-------------|
| Natriumlaurylsulfat/ SDS | Sigma Aldrich, Deisenhofen | L-3771-500g |
| Natriumtetraborat | Carl Roth, Karlsruhe | 4403.1 |
| NBD-Chlorid | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 163260 |
| OAG | Merck Millipore, Darmstadt | 495414 |
| Phalloidin-TRITC | Sigma Aldrich, Deisenhofen | P1951 |
| Phosphataseinhibitor Tabletten PhosSTOP™ | Merck Millipore, Darmstadt | 4906845001 |
| Polybren | Merck Millipore, Darmstadt | TR-1003-G |
| Proteaseinhibitor-Tabletten cOplete™ | Merck Millipore, Darmstadt | 4693132001 |
| Rotiphorese Gel | Carl Roth, Karlsruhe | 3029.1 |
| Salzsäure conc. (37% =12M) / HCl | Merck Millipore, Darmstadt | 100317 |
| Tetramethylethylendiamin/ 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 |
| Vectashield Antifade Mounting Medium | Vector Laboratories, Burlingame, USA | H-1000 |
| WST-1 | Sigma Aldrich, Deisenhofen | 5015944001 |
| Ziegenserum | Bio-West | S2000-100 |

2.1.8 Enzyme, Kits und Marker

Tabelle 23: Enzyme

| Enzyme | Firma | Artikelnummer |
|--------|-------|---------------|
|--------|-------|---------------|

| | | |
|--------------------------|---|----------|
| <i>Bam</i>HI FD | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | FD0054 |
| <i>Dpn</i>I | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | FD1703 |
| <i>Hind</i>III FD | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | FD0504 |
| <i>Kpn</i>I FD | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | FD0524 |
| T4 Ligase | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | 15224090 |
| <i>Pvu</i>II FD | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | FD0624 |
| <i>Sma</i>I FD | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | FD0664 |

Tabelle 24: Marker

| Marker | Firma | Artikelnummer |
|----------------------------|---|---------------------|
| DNA GeneRuler 100bp | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | SM0241 |
| DNA GeneRuler 1kb | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | SM0312 |
| SDS-Gel-Marker | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | 26616, 26625, 26634 |
| 6x DNA Loading Dye | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | R0611 |

Tabelle 25: Kits

| Kits | Firma | Artikelnummer |
|--|---|---------------|
| ABsolute qPCR SYBR® Green Mix | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | AB/ 1158 |
| BCA Assay | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | 23225 |

| | | |
|---|---------------------------|----------------------|
| Click-iT™ Plus Edu | Thermo Fisher Scientific, | C10637 |
| Alexa Fluor™ 488 Imaging Kit | Waltham, USA | |
| Erststrangsynthese Kit | Thermo Fisher Scientific, | K1831 |
| | Waltham, USA | |
| GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit | Sigma Aldrich, | G1N350 |
| | Deisenhofen | |
| GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit | Thermo Fisher Scientific, | K0502 |
| | Waltham, USA | |
| Luminata Forte | Merck | Millipore, WBLUF0100 |
| | Schwalbach | |
| Nanostring nCounter Elements™ XT Reagents | Nanostring, Seattle, USA | LBL-10241-01 |
| Nanostring PrepPack | Nanostring, Seattle, USA | LBL-10288-01 |
| Nanostring Cartridge | Nanostring, Seattle, USA | LBL-10260-01 |
| Nanostring Wash buffer | Nanostring, Seattle, USA | LBL-10201-01 |
| NucleoBond® Xtra Plasmid Midiprep Kit | Macherey-Nagel, Düren | 740410.10 |
| Precellys Lysing Kit (Lungengewebe) | Berlin instruments, | KT03961-1-015.2 |
| | Bretonneux, Frankreich | |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, | Venlo, 74104 |
| | Niederlande | |
| RNase-Free DNase Set (50) | Qiagen, | Venlo, 79254 |
| | Niederlande | |
| SuperSignal West Dura | Thermo Fisher Scientific, | 34075 |
| | Waltham, USA | |
| TC-FIAsh™ II In-Cell Tetracysteine Tag Detection Kit | Thermo Fisher Scientific, | T34561 |
| | Waltham, USA | |

| | |
|---|--|
| QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit | Agilent Technologies, Inc., 200516 Santa Clara, USA |
|---|--|

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 26: Verbrauchsmaterialien

| Material | Firma | Artikelnummer |
|--|--|--|
| 2-Well Silikoneinsätze mit zellfreiem Spalt | Ibidi, Planegg | 80209 |
| Deckgläser 18x18 mm | Neolab, Heidelberg | 1-6230 |
| Deckgläser 30 mm Durchmesser | Neolab, Heidelberg | 1-6292 |
| Flügelkanüle | TERUMO Surflo®, Leuven, Belgien | SV-2132 |
| Glasgefäß 4 ml Chromatographie Deckel | Chromatographie + Handel Müller, Frdolfing | 610303, 611152 |
| Kanüle 21G / 30G | Braun, Melsungen | 2050806/4656300 |
| Kimtech Feintücher | Kimberly-Clark, Irving, USA | 7558 |
| Kryogefäße 1,8 ml | Sarstedt, Nümbrecht | 72.379 |
| µ-Slide VI 0,4 | Ibidi, Planegg | 80606 |
| Nylonfilter 10/20/100 µM (ATII) | Sefar, Heiden | 3A03-0010-102-00/3A03-0020-102-10/3A03-0100-115-01 |
| Objektträger | Carl Roth, Karlsruhe | H868 |
| Parafilm | PARAFILM MIS, Neenah, USA | PM-992 |
| Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl | Sarstedt, Nümbrecht | 70.1130.210/70.7600.002/70.762 |
| PVDF Membran Roti® | Carl Roth, Karlsruhe | T8301 |
| Skalpelle Cutfix® | Braun, Melsungen | 130285_v |
| Spritze 1ml / 10ml | Braun, Melsungen | 91660178 / 4606108V |

| | | |
|--|-------------------------------------|------------------------------------|
| Sterilfilter | Corning®, New York, USA | 352340/431751/352360 |
| 40/70/100 µM | | |
| Spritzen-Sterilfilter 0,2 µM | GE Healthcare®, Little Chalfont; UK | M10462200 |
| Zellkulturschalen 35 / 100 / 150 mm | Sarstedt, Nümbrecht | 83.900.300 / 83.3902.300 / 83.3903 |
| Zentrifugenröhrchen 50 ml / 15 ml | Sarstedt, Nümbrecht | 62.548.009 / 62.554.502 |

2.1.10 Geräte

Tabelle 27: Geräte

| Geräte | Firma |
|---|--|
| CO₂-Inkubator Heracell150i | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Dokumentationssystem für DNA-Gelektrophorese | Peqlab, Erlangen |
| Elektrophoresekammer Proteine | Peqlab, Erlangen |
| FRET Fluoreszenzmikroskop Olympus IX70 | Olympus, Hamburg |
| HPLC LaChrom Elite/UV-DAD System | VWR, Darmstadt |
| Konfokalmiskroskop LSM 880 | Carl Zeiss, Jena |
| Kryokonservierungsbox | Nalgene, Sigma Aldrich, Deisenhofen |
| Lightcycler®480 II | Roche, Basel, Schweiz |
| MEGA STAR 1.6 R Zentrifuge | VWR, Darmstadt |
| Nanophotometer (Nanodrop) | Implen, München |
| Nanostring® Prep Station | Nanostring, Seattle, USA |
| Nanostring® Digital Analyzer | Nanostring, Seattle, USA |
| Odyssey®Fc Western Blot Imaging | LI-COR, Lincoln, USA |
| OP-Besteck | FST, Berlin |
| PCR Thermocycler | Peqlab, Erlangen |
| pH Elektrode SenTix 81 | WTW, Weilheim |
| pH-Meter Inolab pH7110 | WTW, Weilheim |
| Photometer | Tecan, Crailsheim |
| Pipetten | Gilson, Inc., Middleton, USA |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Pipetus® Junior | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| Polychrom V Monochromator | TILL Photonics, Martinsried |
| Prycellys® Homogeniser | Peqlab, Erlangen |
| Spannungsquelle Peqpower | Peqlab, Erlangen |
| Sterilwerkbank/ Laminarflow | Heraeus, Hanau |
| Thermomix Proben temperierer | Eppendorff, Hamburg |
| Tischzentrifuge Mikro 22R Labfuge | Hettich, Tuttlingen |
| Transferkammer Westernblot | Biorad, München |
| Verstärker EPC10 | HEKA, Lambrecht |
| Vortexgerät Genie 2 | Scientific Industries, New York, USA |
| Zellkulturmikroskop Wilover AFL 40 Phako | Hund, Wetzlar |

2.1.11 Programme

Tabelle 28: Software

| Software | Herausgeber |
|--------------------------------|---|
| ApE, A plasmid Editor | M. Wayne Davis |
| GraphPad Prism 7 | GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA |
| Image Studio Lite 4 | LI-COR, Lincoln, USA |
| ImageJ | Wayne Rasband |
| Light Cycler® 480 | Roche, Basel, Schweiz |
| Nanostring® nSolver 4.0 | Nanostring, Seattle, USA |
| PATCHMASTER | HEKA, Lambrecht |
| UCSF Chimera | RBVI, University of California, San Francisco |
| Zen | Carl Zeiss, Jena |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Sterilwerkbank durchgeführt um Kontaminationen möglichst zu vermeiden. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und ca. 95 % Luftfeuchte kultiviert. Verwendete Medien, Lösungen und andere Substanzen (siehe 2.1) wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt.

2.2.1.1 Isolation von murinen Lungenfibroblasten

Zur Isolation der primären Lungenfibroblasten wurde eine Maus im Alter von 3 – 5 Monaten verwendet.

Die Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet und in Rückenlage fixiert. Nach Anfeuchten des Fells mit 70 % Ethanol wurde der Thorax freigelegt. Das Diaphragma wurde durchtrennt, der Thorax entlang des Sternums geöffnet und die Rippenbögen aufgespannt. Die linke Herzkammer wurde durch einen ca. 3 mm großen Schnitt geöffnet um einen Abfluss zu legen. Über die Lungenarterie wurde die Lunge mittels einer Flügelkanüle mit ca. 10 ml eiskaltem PBS gespült. Die Lungenflügel wurden in eiskaltem PBS gelagert und die weiteren Isolationsschritte in der Sterilwerkbank fortgesetzt. Mit einem Skalpell wurden die Lungenflügel in 1 – 2 mm große Stücke zerkleinert und in einem Volumen von 5 ml Kulturmedium (DMEM-F12, 20 % FCS, 1 % Pen./Strept.) mit 100 µg/ml Kollagenase für 2 Std. bei 37 °C und 400 rpm in einem 50 ml Reaktionsgefäß verdaut. Das verdaute Gewebe wurde mittels eines 1 ml Spritzenstempels durch einen 70 µm Nylonfilter in ein 50 ml Reaktionsgefäß gedrückt und der Filter mit 30 – 40 ml PBS nachgespült. Die Zellsuspension wurde bei 400 x g für 5 Min. zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium gelöst und auf eine 10 mm Petrischale zur Kultivierung der Zellen überführt. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80 – 90 % wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:3 passagiert. In dieser Arbeit wurden die Fibroblasten in Passage 2 – 4 verwendet.

2.2.1.2 Isolation von murinen alveolaren Epithelzellen Typ II

Die Präparation von ATII-Zellen aus der Maus wurde gemäß eines Protokolls von Mutze und Kollegen durchgeführt (Mutze *et al.*, 2015).

Einen Tag vor der Isolation wurden zehn 100 mm Petrischalen mit jeweils 0,75 µg/ml Anti-CD16/32 und 0,75 µg/ml Anti-CD45 Antikörpern beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Zur Isolation der primären alveolaren Epithelzellen des Typ II (ATII) wurden fünf Mäuse im Alter von 3 – 5 Monaten verwendet. Die Mäuse wurden jeweils durch zervikale Dislokation getötet und in Rückenlage fixiert. Nach Anfeuchten des Fells mit 70 % Ethanol wurde die Trachea freigelegt und über einen kleinen Schnitt ein Tubus gesetzt und eingebunden. Das Diaphragma wurde durchtrennt, der Thorax entlang des Sternums geöffnet und die Rippenbögen aufgespannt. Mit zwei Pinzetten wurde der Thymus entfernt und ein ca. 3 mm großer Schnitt in der linken Herzkammer gesetzt um einen Abfluss zu legen. Eine Flügelkanüle wurde in die rechte Herzkammer eingeführt, um über die Lungenarterie das Blut aus der Lunge zu entfernen. Über die Flügelkanüle wurde die Lunge mit 10 ml einer 0,9 %igen NaCl-Lösung gespült. Eine 1 ml Spritze wurde an den Tubus angelegt, 1,5 ml Dispase und unmittelbar danach 0,3 ml einer 1 %igen Agaroselösung in DMEM appliziert. Die Lunge wurde aus dem Thorax entnommen, mit 0,9 %iger NaCl-Lösung ab gespült und für 45 Min. in 1 ml Dispase verdaut. Alle weiteren Isolationsschritte wurden unter der Sterilwerkbank durchgeführt. In einer 10 mm Petrischale mit 5 ml Plus-Medium (DMEM + 1 % Pen./Strept.; 10 mM HEPES; 0,04 mg DNaseI) wurden die Lungenflügel jeder Lunge mittels zwei Pinzetten vorsichtig mechanisch zerkleinert. Die Zellsuspensionen wurden vereinigt und durch eine 100 µm, 20 µm und 10 µm Nylonmembran filtriert. Während der Filtrationsschritte wurde die Membran mit insgesamt 400 ml Plus-Medium gespült. Das Filtrat wurde auf 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und 10 Min. bei 200 x g und 15 °C (Beschleunigung und Bremse auf Stufe 5) zentrifugiert. Die am Vortag mit Antikörper beschichteten Platten wurden während der Zentrifugation mit je 5 ml Minus-Medium (DMEM + 1 % Pen./Strept., 10 mM HEPES) gewaschen und durch Zugabe von 1 ml Minus-Medium wurde Austrocknung vermieden. Die Zellen wurden in jeweils 1 ml Minus-Medium resuspendiert, in einem 50 ml Reaktionsgefäß vereinigt und auf 50 ml aufgefüllt. Jeweils 5 ml Zellsuspension wurde auf eine der Antikörperbeschichteten Petrischalen gegeben und 30 Min. bei 37 °C im Inkubator inkubiert um Zellen hämatopoetischen Ursprungs aus der Zellsuspension zu entfernen. Die Zellen wurden in 50 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und die Petrischalen mit jeweils 5 ml Minus-Medium gespült. Um Fibroblasten aus der Zellsuspension zu entfernen wurde die 100 ml Zellsuspension auf 10 Petrischalen aufgeteilt und 25 Min. bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Reaktionsgefäßen gesammelt, die Petrischalen mit insgesamt 10 ml Minus-Medium gespült und die Zellsuspension wie zuvor zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml ATII Zellkulturmedium

(Minusmedium + 10 % FCS) resuspendiert und jeweils 2 Mio. Zellen pro Kavität einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät. Bei der Versuchsplanung wurde beachtet, dass sich ATII-Zellen nach ca. 5 Tagen in Kultur in ATI-Zellen differenzieren.

2.2.1.3 Passagieren von Zellen

Um adhärente Zellen zu passagieren wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung verwendet. EDTA bindet als Chelator divalenter Kationen die Zell-Zell-kontaktstärkenden-Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} und die Serinprotease Trypsin löst durch Spaltung spezifischer Peptidbindungen die Zellen von ihrem Untergrund.

Nach Abnahme des Mediums aus der Zellkulturschale wurden die Zellen mit 10 ml PBS gespült. Nach Zugabe von 1 ml EDTA-Trypsin und gleichmäßiger Verteilung über die Zellen wurden diese je nach Zelltyp für 2 – 10 Minuten im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Durch anschließendes vorsichtiges Anklopfen der Zellkulturschalen wurde das Ablösen der Zellen erleichtert. Zur Zell-Trypsin-Suspension wurde anschließend ein entsprechendes Volumen an Zellkulturmedium mit 10 % FCS zur Inaktivierung der Protease zugegeben. Für ein Teilungsverhältnis von 1:10 wurden die Zellen z.B. in 10 ml Zellkulturmedium gelöst und 1 ml der Zelllösung in eine neue 100 mm Zellkulturschale mit 9 ml Medium überführt.

2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitlagerung von Zellen wurden diese im flüssigen Stickstoff bei ca. -190 °C gelagert. Um die Zellen einzufrieren wurden diese wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben von der Zellkulturschale gelöst und bei 400 x g für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml des entsprechenden Zellkulturmediums mit 10 % DMSO gelöst und in ein Kryoröhrchen überführt. Dabei ist zu beachten, dass die Zellzahl nicht über 2 Mio. liegen sollte. Um ein kontrolliertes Herunterkühlen der Zellen zu garantieren, wurden die Kryoröhrchen in eine Isopropanol-Einfrierbox gegeben und für ca. 24 Std. bei -80 °C gelagert. zur Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen kurz im Wasserbad inkubiert, die Zellsuspension mit 10 ml warmen Zellkulturmedium gemischt und zentrifugiert. Dabei muss möglichst schnell gearbeitet werden, da das Gefrierschutzmittel DMSO bei Raumtemperatur zelltoxisch wirkt. Die Zellen wurde in 10 ml Zellkulturmedium gelöst und wie gewohnt kultiviert und passagiert.

2.2.1.5 Transfektion von Zellen

HEK293T-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz TransIT[®]-2020 von Mirus nach dem Herstellerprotokoll transfiziert. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausgesät, sodass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 80 % aufwiesen. Für die Transfektion wurden 2,5 µg Plasmid DNA pro Kavität einer 6-Kavitäten-Platte eingesetzt und die Zellen 48 – 72 Std. danach verwendet.

2.2.1.6 Behandlung von Zellen mit TGF-β1

Zur Induktion der Myofibroblasten-Differenzierung oder der epithelialen-mesenchymalen *Transition* (EMT) wurden Fibroblasten bzw. ATII-Zellen mit TGF-β1 behandelt. Fibroblasten wurden in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen/cm² und ATII in einer Dichte von $2,1 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät und am nächsten Tag für 24 Std. in Kulturmedium mit 0,1 % FCS („Hungermedium“) kultiviert. In 0,1 % BSA in PBS gelöstes TGF-β1 wurde in einer Konzentration von 2 ng/ml in Kulturmedium mit 0,1 % FCS für 24 Std. (ATII) bzw. 48 Std. (Fibroblasten) auf die Zellen gegeben. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit 0,1 % BSA in PBS behandelt.

2.2.1.7 Bestrahlung von murinen Lungenfibroblasten

Um eine strahlungsbedingte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu untersuchen wurden primäre murine Lungenfibroblasten mit unterschiedlichen Dosen ionisierender Strahlung behandelt und 4 Tage danach analysiert. 48 Stunden vor Versuchsbeginn wurden primäre Lungenfibroblasten in Passage 2 in einer Dichte von 10.990 Zellen / cm² in 24-Kavitäten- (für einen anschließenden WST-Assay und eine Analyse durch qRT-PCR, siehe 2.2.11 und 2.2.5) bzw. 6-Kavitäten-Platten (für die Quantifizierung von Hydroxyprolin mittels HPLC, siehe 2.2.13) in pmLF-Kulturmedium ausgesät. In einem X-Strahl RS225 mit Thoräus-Filter wurden die Zellen mit einer Gray-Dosis von 0 – 10 Gy bei 100 kV und 10 mA bestrahlt.

2.2.2 Isolation genomischer DNA und Analyse durch PCR zur Charakterisierung der TRPC6^{flox}-Maus

Zur Charakterisierung der TRPC6^{flox}-Maus mit zwei flankierenden loxP-Erkennungsstellen um das Exon 2 des TRPC6-Gens (siehe **Abbildung 10**) wurde genomische DNA aus kultivierten Zellen und Gewebe mittels des *GenElute*[™]

Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit von Sigma nach dem Herstellerprotokoll isoliert.

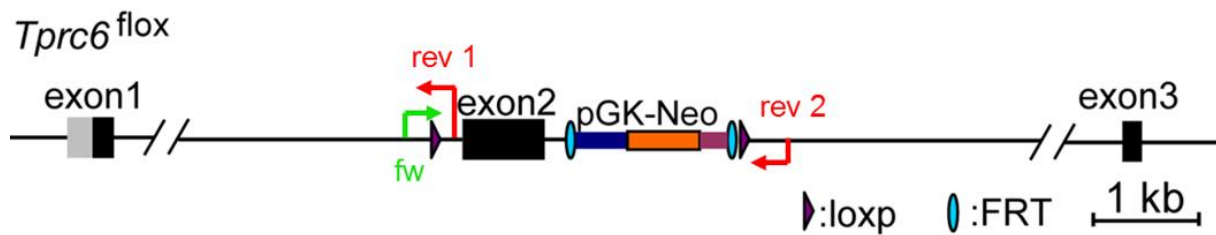


Abbildung 10: Genstruktur des mutierten Allels der TRPC6^{flox}-Maus von Zebrabio. Das TRPC6-Gen dieser Mäuse enthält zwei loxP-Stellen, die das Exon 2 und zwei FRT Stellen, die die Selektionskassette (pGK-Neo, Phosphoglycerinkinase-Promoter mit Neomycin-Resistenzgen) flankieren. Die Lokalisation der in der PCR verwendeten *forward* (*fw*)- und *reverse* (*rev 1*, *rev 2*)-Oligonukleotide wurde eingefügt (Modifiziert von Zebrabio).

In einer anschließenden PCR-Reaktion wurde die Anwesenheit einer loxP-Stelle, welche das Exon2 linksseitig (*downstream*) flankiert, nachgewiesen. Dazu wurden folgende Reagenzien in angegebener Reihenfolge in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert und die PCR nach dem angegebenen Programm durchgeführt (**Tabelle 30; Tabelle 31;Tabelle 31**).

Tabelle 29: PCR Ansatz für den Nachweis der loxP-Stelle.

| Reagenz | Volumen [µl] |
|--------------------------------------|--------------|
| gDNA | 4 |
| Oligonukleotid loxP <i>sense</i> | 1 |
| Oligonukleotid loxP <i>antisense</i> | 1 |
| H ₂ O Tridest. | 7,5 |
| EconoTaq PLUS GREEN 2x Master Mix | 11,5 |

Tabelle 30: PCR Programm für den Nachweis der loxP-Stelle.

| | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|--------------------------|------------|---------|--------|
| Initiale | 95 °C | 3 Min. | 1 |
| Denaturierung | | | |
| Denaturierung | 95 °C | 15 Sek. | 45 |
| Annealing | 63 °C | 30 Sek. | |
| Elongation | 72 °C | 4 Min. | |
| Finale Elongation | 72 °C | 10 Min. | 1 |

Tabelle 31: Primer zur Charakterisierung der TRPC6^{fllox}-Mäuse.

| Oligonukleotide | Sequenz (5' – 3') |
|-----------------------|-----------------------|
| loxP sense | TGACCTGTCATTACCTAATGC |
| loxP antisense | AAGGAAGTCAATCACCAGGG |
| Ex2 sense | CAATCACACCAGCCAATCAG |
| Ex2 antisense | GCACATCATGGAAACACACC |

Nach Kreuzung der TRPC6^{fllox}-Mäusen mit SOX2-Cre-Mäusen, die die cDNA der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promoters für den ubiquitär exprimierten SOX2-Transkriptionsfaktor tragen, wurde die durch Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des Exon 2 in allen Geweben detektiert (Hayashi, Tenzen and McMahon, 2003). Dazu wurden folgende Reagenzien in angegebener Reihenfolge in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert und die PCR nach folgendem Programm durchgeführt (**Tabelle 33; Tabelle 33**).

Tabelle 32: PCR-Ansatz zum Nachweis des Exon 2.

| Reagenz | Volumen [µl] |
|--|--------------|
| Genomische DNA | 3 |
| Oligonukleotid Ex2 sense | 2 |
| Oligonukleotid Ex2 antisense | 2 |
| H₂O Tridest. | 5 |
| EconoTaq PLUS GREEN 2x Master Mix | 13 |

Tabelle 33: PCR-Programm zum Nachweis des Exon 2.

| | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|--------------------------|------------|--------|--------|
| Initiale | 94 °C | 5 Min. | 1 |
| Denaturierung | | | |
| Denaturierung | 94 °C | 1 Min. | 45 |
| Annealing | 55 °C | 1 Min. | |
| Elongation | 72 °C | 1 Min. | |
| Finale Elongation | 72 °C | 7 Min. | 1 |

Jeweils 10 µl des PCR-Produktes und ein 100 bp DNA-Größenmarker wurden auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und die Gelelektrophorese bei konstanten 100 V für 1 Std. gestartet. Die aufgetrennten Proben wurden unter UV-Licht bei 320 nm visualisiert und fotografiert.

2.2.3 Klonierung des TRPC6-FRET-Konstrukts

Ein intramolekulares TRPC6-FRET-Konstrukt, bestehend aus einem Tetracystein-*tag* im N-Terminus und einem Cerulean-Fluoreszenzprotein im C-Terminus wurde wie im Folgenden beschrieben generiert.

In die cDNA die für den murinen TRPC6 kodiert, wurden in einer PCR-Reaktion mit mutierten Oligonukleotiden die Restriktionsstellen *KpnI* (N-Terminal) und *BamHI* (C-Terminal) eingefügt (**Tabelle 34**).

Tabelle 34: Primer mit Restriktionsstellen

| Oligonukleotide | Sequenz (5' – 3') |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Sense <i>KpnI</i> | GACTAGGTACCATGAGCCAGAGCCCGAGGTT |
| Antisense <i>BamHI</i> | ATAATGGATCCCTCTGCGGCTTTCCTCCAGCT |

Die folgenden Reagenzien wurden in einen 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und die PCR gestartet (**Tabelle 35** und **Tabelle 36**).

Tabelle 35: PCR-Ansatz für das Einfügen von Restriktionsschnittstellen

| Reagenz | Menge |
|---|---------------------|
| pDNA mTRPC6 (pcDNA3.1) | 100 ng |
| dNTP Mix (10 mM) | 1 µl |
| 10x PfU Puffer + MgSO ₄ | 2 µl |
| Oligonukleotid <i>sense KpnI</i> (10 µM) | 1 µl |
| Oligonukleotid <i>antisense BamHI</i> (10 µM) | 1 µl |
| PfU Polymerase (2,5 U/µl) | 1 µl |
| H ₂ O Tridest. | Auf 20 µl auffüllen |

Tabelle 36: PCR-Programm für das Einfügen von Restriktionsschnittstellen

| | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|-------------------------------|------------|--------|--------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C | 5 Min. | 1 |

| | | | |
|---------------------------------|-------|---------|----|
| Denaturierung | 95 °C | 1 Min. | 45 |
| Annealing und Elongation | 72 °C | 6 Min. | |
| Finale Elongation | 72 °C | 10 Min. | 1 |

TRPC6-kodierende-cDNA mit den eingefügten Restriktionsstellen wurde durch einen Verdau mit *KpnI* und *BamHI* aus dem Vektor geschnitten. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden zu 500 ng pcDNA3.1-TRPC6 2 µl FastDigest (FD) 10x Puffer und je 1 µl FD *KpnI*- und FD *BamHI*-Restriktionsenzyme hinzugegeben und mit Tridest. H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 Min. bei 37 °C und 300 Umdrehungen pro Min. in einem Thermomixer inkubiert und nach Beendigung der Inkubation auf Eis gestellt.

Der pcDNA3.1-Vektor mit der für das Cerulean-Fluoreszenzprotein kodierenden cDNA wurde ebenso durch Verdau mit *KpnI* und *BamHI* linearisiert und die mTRPC6-cDNA in den Vektor mittels Ligase inseriert. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden zu 500 ng linearer Vektor-DNA 1,5 µg *Insert* (TRPC6)-DNA, 2 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer und 1 U T4 DNA Ligase hinzupipettiert. Die Reaktion wurde mit H₂O Tridest. auf 20 µl aufgefüllt und 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch das *QuikChange II XL site-directed mutagenesis Kit* von Agilent wurde ein Tetracystein-Motiv in die für den C-Terminus von TRPC6 kodierende cDNA eingefügt. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden folgende Reagenzien in angegebener Reihenfolge pipettiert und die PCR gestartet (**Tabelle 38, Tabelle 39 und Tabelle 39**).

Tabelle 37: Reaktionsansatz für *Site-directed-mutagenesis*

| Reagenz | Menge |
|---------------------------------|---------------------|
| 10x Reaktionspuffer | 5 µl |
| pDNA | 25 ng |
| Oligonukleotid <i>sense</i> | 125 ng |
| Oligonukleotid <i>antisense</i> | 125 ng |
| dNTP Mix | 1 µl |
| DMSO | 2,5 µl (5 %) |
| H ₂ O Tridest. | Auf 49 µl auffüllen |
| Pfu Ultra HF DNA Pol. 2,5 U/µl | 1 µl |

Tabelle 38: PCR-Programm für *Site-directed-mutagenesis*

| | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|----------------------|------------|-----------------------------------|--------|
| Initiale | 95 °C | 30 Sek. | 1 |
| Denaturierung | | | |
| Denaturierung | 95 °C | 30 Sek. | 18 |
| Annealing | 55 °C | 1 Min. | |
| Elongation | 68 °C | 9 Min. (1Min./Kb Plasmidlänge) | |

Zur PCR-Reaktion wurde 1 µl *DpnI* (10 U/µl) Restriktionsenzym hinzugegeben und der Ansatz 1 Std. bei 37 °C inkubiert, um die eingesetzte, nicht mutierte und methylierte sog. *template*-DNA zu verdauen.

In das generierte WT-TRPC6-FRET-Konstrukt in pcDNA3.1 wurden die Mutationen G108S, N109A und M131T mittels spezifischer Primer (**Tabelle 39**), in gleicher Weise wie für das Tetracystein-Motiv beschrieben, eingefügt.

Tabelle 39: HPLC-aufgereinigte-Oligonukleotide für die *site-directed-mutagenesis*. Die Veränderung der Original-TRPC6-Sequenz ist rot hinterlegt.

| Mutation | Oligonukleotide sense 5' – 3' | antisense 5' – 3' |
|--------------------------------------|--|---|
| G108S | CGC TTT CTA GAT GCA GCT GAA TAT TCC AAC ATC CCA GTG GTG CGG | CCG CAC CAC TGG GAT GTT GGA ATA TTC AGC TGC ATC TAG AAA GCG |
| N109A | CCG CAC CAC TGG GAT GGC GCC ATA TTC AGC TGC A | TGC AGC TGA ATA TGG C GC CAT CCC AGT GGT GCG G |
| M131T | GTAACTGTGTGGATTAC A GGGCCAGAATGCCCTA CAGC | GCTGTAGGGCATTCTGGCCC G TGTAATCCACACAGTTAAC |
| G756D | TTTCCTACTTTGAGGAGG AC AGAACACTTCCTGTCCCC | GGGGACAGGAAGTGTTCT GT CCT CCTCAAAGTAGGAAA |
| Tetracys- tein- Motiv | CCCAAGCTTGGTACCATG TG TTGCCCGGGCTGCTGT AGCC AGAGCCCGAGGTTTCG | CGAACCTCGGGCTCTGGCT ACAG CAGCCCGGGCAACA CATGGTAC CAAGCTTGGG |

Die Plasmid DNA wurde nach dem Herstellerprotokoll des *QuikChange II XL site-directed mutagenesis Kit* von Agilent in XL1-Blue superkompetente Zellen

transformiert, die transformierten Zellen auf Agarplatten ausgestrichen und einzelne Klone in LB Medium expandiert.

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde *das GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* von Agilent verwendet und nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Alle Insertionen und Mutagenesen des mTRPC6-FRET-Konstrukts wurden durch Sequenzierung auf korrekte Insertion und unerwünschte zusätzliche Mutationen überprüft (**Tabelle 40**).

Tabelle 40: Sequenzieroligonukleotide.

| Oligonukleotid-Name | Oligonukleotide <i>sense</i> 5' – 3' |
|---------------------|--------------------------------------|
| TRPC6 Seq.823-841 | GGCTAACTAGAGAACCCAC |
| TRPC6 Seq.2576-2594 | CTCAGAGCATCATTGATGC |
| TRPC6 Seq.3022-3040 | ATCGGCTACGTTCTGTATG |

2.2.4 RNA-Isolierung

RNA wurde aus kultivierten Zellen und Lungengewebe mittels des RNeasy Mini Kits von Qiagen nach dem Herstellerprotokoll extrahiert. Wurden weniger als 1×10^5 Zellen eingesetzt wurde das Zellysate durch einminütiges vortexen homogenisiert. Gewebe wurde zweimal 30 Sek. bei 6.000 Umdrehungen pro Min. durch den *Precellys® 24 Dual*-Apparat homogenisiert. Wie im Herstellerprotokoll empfohlen, wurde bei allen Proben ein DNase Verdau auf den Reinigungssäulen durchgeführt. Die eluierte RNA wurde im *Nanodrop®*-Photometer auf ihre Konzentration und Reinheit hin gemessen. Für weitere Analysen wurde nur RNA verwendet die keine Proteinverunreinigung ($A_{260}/A_{280} \text{ nm} = 1,8 - 2 \text{ OD}$) oder Verunreinigung durch genomische DNA ($A_{260}/A_{230} \text{ nm} = 1,7 - 2 \text{ OD}$) aufwies.

2.2.5 mRNA Analyse durch *real-time quantitative reverse transcriptase*-PCR (qRT-PCR)

Zur Genexpressionsanalyse wurde eine *two-step*-qRT-PCR durchgeführt. In einer ersten Reaktion wurde aus der zuvor isolierten RNA cDNA synthetisiert und in einer zweiten Reaktion mit der cDNA Probe die qRT-PCR durchgeführt. Bei der qRT-PCR kann das jeweils gerade entstandene PCR-Produkt neben den Einsatz von sequenzspezifischen TaqMan-Sonden durch den Einsatz von Doppelstrang-bindenden-Fluoreszenzfarbstoffen in Echtzeit gemessen werden. Der

Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* interkaliert in die durch die PCR entstehende doppelsträngigen DNA. Durch Messung des *SYBR Green*-Signals nach jedem PCR Zyklus in der exponentiellen Phase kann die mRNA des Zielgens quantifiziert werden, da das Fluoreszenzsignal proportional zum gebildeten PCR-Produkt ansteigt. In dieser Arbeit wurde die mRNA-Konzentration des Zielgens prozentuell auf die mRNA-Expression des Housekeeping Gens β -Aktin bezogen.

Zur Synthese der cDNA wurde das *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* von Thermo Scientific verwendet. Folgende Reagenzien (**Tabelle 41**) wurden in ein Nuklease-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß in vorgegebener Reihenfolge pipettiert und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vermischt.

Tabelle 41: c-DNA-Synthese-Reaktionsansatz

| Reagenz | Menge |
|---|--------------------------|
| Proben RNA | 0,1 ng – 5 μ g |
| Random Hexamer Primer | 1 μ l |
| H ₂ O Nuklease-frei | Auf 12 μ l auffüllen |
| 5x Reaktionspuffer | 4 μ l |
| <i>RiboLock RNase Inhibitor</i> (20 U/ μ l) | 1 μ l |
| dNTP Mix (10mM) | 2 μ l |
| <i>RevertAid M-MuLV RT</i> (200 U/ μ l) | 1 μ l |
| Endvolumen | 20 μ l |

Der Reaktionsansatz wurde 5 Min. bei 25 °C und anschließend 60 Min. bei 42 °C inkubiert. Die Erststrangsynthese wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 70 °C abgestoppt.

Für die q-RT-PCR-Reaktion wurde pro cDNA-Probe ein Mastermix ohne Oligonukleotide in einem Nuklease-freien 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt und in einer 96-Kavitäten-Platte entsprechend vorgelegt (**Tabelle 42**). Die jeweiligen Oligonukleotide (**Tabelle 43**) wurden zupipettiert und die Reagenzien durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vermischt.

Tabelle 42: Reaktionsansatz für q-RT-PCR

| Reagenz | Volumen | Konzentration |
|--|-----------|---------------|
| 2x <i>Absolute qPCR SYBR Green Mix</i> | 5 μ l | 1x |

| | | |
|---|-------------------------|-------------------|
| Proben-DNA | 1 – 3 μ l | < 125 ng/Reaktion |
| H₂O Nuklease-frei | auf 8 μ l auffüllen | |
| Sense- + antisense- Oligonukleotide (10 μM) | 2 μ l | 1 μ M |
| Endvolumen | 10 μ l | |

Tabelle 43: Murine q-RT-PCR-Oligonukleotide

| Gen | Oligonukleotide sense 5' – antisense 5' – 3' | | Produkt [Bp] |
|----------------------------------|---|-------------------------------|-------------------------|
| αSMA/Ac | GCTGGTGATGATGCTCCC | GCCATTCCAACCAT | 81 |
| ta2 | A | TACTCC | |
| β-Actin | CTAAGGCCAACCGTGAAA AG | ACCAGAGGCATACAGGGA CA | 104 |
| PAI1 | AGGTCAGGATCGAGGTAA ACGAG | GGATCGGTCTATAACCATC TCCGT | 104 |
| TRPC1 | TGAACTTAGTGCTGACTT AAAGGAAC | CGGGCTAGCTCTTCA TAATCA | 75 |
| TRPC2 | CACGAAAGGAGCCTG AGTTTA | CCAGCAACTCGAAGCCAT AG | 78 |
| TRPC3 | TTAATTATGGTCTGG GTTCTTGG | TCCACAACCTGCACGA TGTACTION | 91 |
| TRPC4 | AAGGAAGCCAGAAAAG CTTCG | CCAGGTTCCCTCATCA CCTCT | 92 |
| TRPC5 | ATGAGGGGCTAACAG AAGA | TGCAGCCTACATTGAAAG | 210 |
| TRPC6 | GCAGCTGTTTCAGGATGAA AAC | TTCAGCCCATATCATGCCT A | 85 |
| TRPC7 | CCTACGCCAGGGATA AGTG | AAGGCCACAAATACCATGA | 205 |

Die 96-Kavitäten-Platte wurde für 2 Min. bei 800 Umdrehungen pro Min. zentrifugiert und im *Lightcycler* 480 II folgende PCR mit anschließender Schmelzkurven-Analyse gestartet (**Tabelle 45** und **Tabelle 45**).

Tabelle 44: qPCR-Programm

| | Temperatur | Zeit | Zyklen |
|----------------------|------------|---------|--------|
| Initiale | 94 °C | 15 Min. | 1 |
| Denaturierung | | | |
| Denaturierung | 94 °C | 10 Sek. | 45 |
| Annealing | 55 °C | 10 Sek. | |
| Elongation | 72 °C | 10 Sek. | |

Tabelle 45: Schmelzkurve (Lightcycler 480 II Program: *Melting Curve*)

| | <i>Acquisition Mode</i> | Zeit | <i>Acquisition (per °C)</i> | Zyklen |
|--------------|-------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| 95 °C | - | 5 Sek. | | 1 |
| 65 °C | - | 1 Min. | | |
| 97 °C | Kontinuierlich | | 5 | |

2.2.6 RNA Analyse durch die *nCounter*-Technologie von Nanostring®

Zur direkten Analyse von RNA ohne vorherige cDNA-Synthese und anschließender PCR wurde das *nCounter System* von Nanostring® verwendet. In einer Hybridisierungsreaktion binden spezifische *Capture*-Oligonukleotide die mit Streptavidin gekoppelt sind (Oligonukleotide *Pool A*) sowie spezifische Reporter-Oligonukleotide die mit einem Barcode markiert sind (Oligonukleotide *Pool B*) an die Ziel-RNA. Im zweiten Schritt werden die hybridisierten Proben über eine Streptavidin-Biotin-Reaktion an die Messzelle gebunden. In der Messzelle werden die molekularen Barcodes als sog. *Counts* detektiert, wodurch eine direkte Quantifizierung der RNA Expression stattfinden kann (**Abbildung 11**).

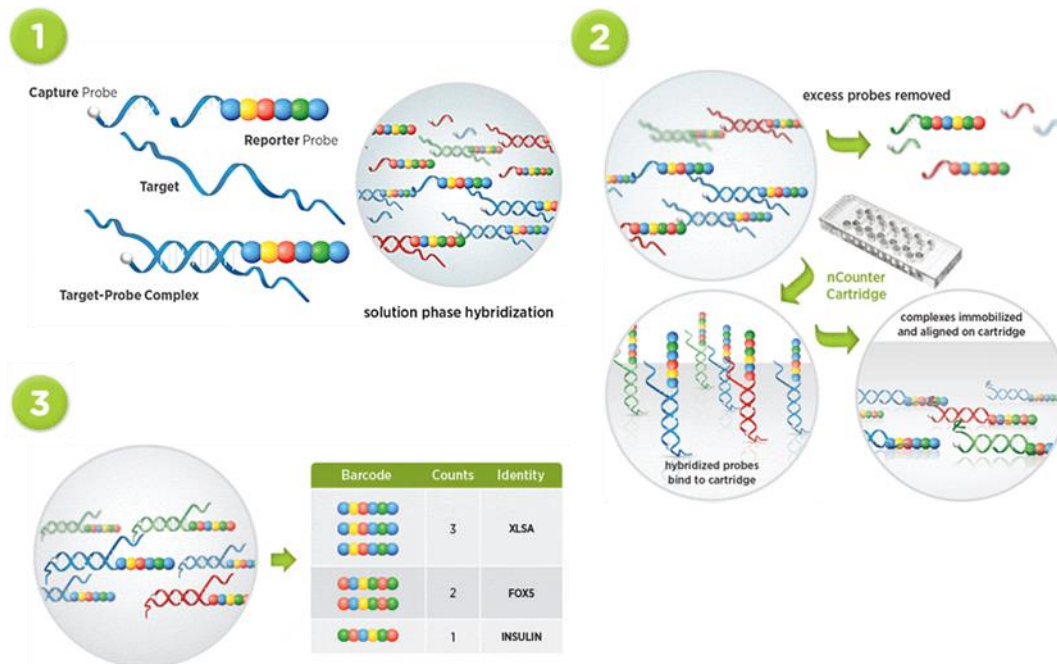


Abbildung 11: Prinzip der nCounter-Technologie von Nanostring®. Im ersten Schritt binden spezifische Streptavidin-gekoppelte *Capture*-Oligonukleotide, sowie mit einem Farbcode markierte Reporter-Oligonukleotide an die Ziel-RNA. Im nächsten Schritt wird die gebundene Ziel-RNA über eine Straptavidin-Biotin Reaktion an eine Messzelle gebunden. Im dritten Schritt wird die RNA über Detektion der Barcodes quantifiziert (modifiziert von Nanostring).

Für die Hybridisierungsreaktion wurde der PCR-Cycler auf 67 °C und der Deckel auf 70 °C vorgeheizt. Nach Auftauen der Oligonukleotid-Pools wurde jeweils ein 30x Working Oligonukleotide-Pool für A und B hergestellt (**Tabelle 46**).

Tabelle 46: 30x Working Oligonukleotide-Pool A und B

| Reaktionen | Oligonukleotide Pool A/B | TE-Tween | Finales Volumen |
|------------|--------------------------|----------|-----------------|
| 12 | 4 µl | 29 µl | 33 µl |

Dem sog. *TagSet* (mit universalem *Capture*/Streptavidin-tag und spezifischem Reporter/Barcode-tag) wurden folgende Lösungen bei Raumtemperatur hinzupipettiert (**Tabelle 47**). Dabei ist zu beachten, dass der Hybridisierungsmix nicht gevortext werden darf und deshalb nur durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt wurde.

Tabelle 47: Mastermix für Hybridisierung (12 Reaktionen)

| Reagenz | Volumen |
|-----------------------|-------------------|
| <i>TagSet</i> | 28 µl (vorgelegt) |
| Hybridisierungspuffer | 70 µl |

| | |
|---------------------------------|------------------------------|
| 30x Working Probe Pool A | 7 μ l |
| 30x Working Probe Pool B | 7 μ l |
| Endvolumen | 112 μl |

Pro Reaktionsgefäß der *12-Tube-PCR-Strips* wurden 8 μ l des Mastermix hinzugegeben und 200 ng RNA in einem Maximalvolumen von 7 μ l. Das Endvolumen von 15 μ l wurde bei höheren RNA-Konzentrationen mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die Ansätze wurden durch Anschnipsen der Reaktionsgefäße vorsichtig vermischt und im Anschluss kurz zentrifugiert. Die Hybridisierungsreaktionen wurden 16 Std. bei 67 °C im PCR-Cycler inkubiert und anschließend auf 4 °C heruntergekühlt. Nach der Hybridisierung der Proben wurden diese maximal 24 Std. danach in der *nCounter Prep-Station* vermessen.

Die Aufreinigung und Immobilisierung der hybridisierten Proben an der *nCounter Prep-Station* wurden vom Institut für Pathologie der LMU durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die *nSolver*-Software, die die Barcodes in den einzelnen Proben den Zielgenen zuordnete. Dabei entsprechen < 100 *Counts* einer schwachen Expression des Gens, 100 – 1.000 *Counts* einer moderaten Expression und > 10.000 *Counts* einer starken Genexpression. Die Negativkontrolle sollte zwischen 0 – 30 *Counts* liegen. Entsprachen die *Counts* eines Zielgens weniger als das Doppelte der Standardabweichung über den Mittelwert der Negativkontrolle, so wurde das Gen als nicht exprimiert betrachtet.

2.2.7 SDS-PAGE und Western Blot

Zur Analyse der Expression einzelner Proteine in Zellen wurden diese nach Probenaufbereitung mittels Laemmli-Puffer in einer *SDS-PAGE* (*sodium dodecyl sulfate* (=Natriumlaurylsulfat) *polyacrylamid gelelectrophoresis*) aufgetrennt, auf eine Trägermembran übertragen und die Zielproteine mittels Antikörper detektiert. Durch die Denaturierung mit dem im Laemmli-Puffer enthaltenen negativ geladenen Detergenz SDS wird die Eigenladung der Proteine maskiert und diese können nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

Adärente Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS durch einen Zellschaber von dem Zellkulturgefäß abgenommen, bei 400 x g 5 Minuten zentrifugiert und das Zelllysate in RIPA-Puffer (*radioimmunoprecipitation assay buffer*) mit Protease- und Phosphataseinhibitoren gelöst. Die Zellen wurden 60 Minuten mit dem Lysepuffer auf

Eis inkubiert und alle 10 Minuten gemischt. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 21.000 x g und 4 °C wurde bei Bedarf zunächst die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (*bicinchoninic acid*, Bicinchoninsäure) nach Herstellerprotokoll bestimmt. Im Anschluss wurde der Überstand mit 6x-Laemmli-puffer versetzt (**Tabelle 12**) und im Thermomixer für 10 Minuten bei 300 Umdrehungen pro Min. und 95 °C inkubiert. Das aus einem Trenn- (**Tabelle 48**) und Sammel-Gel (**Tabelle 49**) bestehende Polyacrylamid-Gel wurde in einer Gelapparatur gegossen.

Tabelle 48: Ansatz für 1x Trenngel

| Reagenz | Volumen |
|--|----------|
| 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid | 2,5 ml |
| 4 x Tris/HCl pH 8,8 | 1,875 ml |
| H ₂ O (Millipore) | 3,06 ml |
| 10 % APS (Ammoniumpersulfat) in H ₂ O | 50 µl |
| TEMED (Tetramethylethylendiamin) | 10 µl |

Tabelle 49: Ansatz für 1x Sammelgel

| Reagenz | Volumen |
|--|---------|
| 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid | 650 µl |
| 4 x Tris/HCl pH 8,8 | 1,25 ml |
| H ₂ O (Millipore) | 3,05 ml |
| 10 % APS (Ammoniumpersulfat) in H ₂ O | 50 µl |
| TEMED (Tetramethylethylendiamin) | 10 µl |

Die Gelapparatur wurde in die Laufkammer überführt und mit 1x Laufpuffer (**Tabelle 13**) befüllt. Pro Tasche wurden jeweils 20 µl Probe und 10 µl Protein Marker aufgetragen und die Gelelektrophorese bei 70 V gestartet. Nach Erreichen des Trenngels wurde eine Spannung von 100 V angelegt.

Nach Auftrennung der Proteine wurden diese von dem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran übertragen. Die PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) wurde ca. 15 Sekunden in 100 % Methanol aktiviert und in 1x Transferpuffer (**Tabelle 20**) gewaschen. Der Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine von dem Polyacrylamidgel auf die konditionierte PVDF-Membran wurde in einer Tank-Blotting Apparatur mit 1x Transferpuffer und bei konstanten 20 mA für 20 Stunden bei 4 °C durchgeführt.

Die Membran wurde 1 Stunde mit 5 % Milchpulver in PBST geblockt und für 14 - 16 Stunden mit Erstantikörper in entsprechender Verdünnung bei 4 °C inkubiert (**Tabelle 8**). Nach dreimaligen Waschen der Membran mit PBST für je 10 Minuten wurde die Membran für 2 Stunden mit einem HRP-gekoppelten (*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase) Zweitantikörper in entsprechender Verdünnung (**Tabelle 9**) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit PBST für je 10 Minuten gewaschen, 1 ml des Chemilumineszenz-Substrates *SuperSignal™ West Dura* von Thermo Scientific auf die Membran gegeben und die Proteine an einem *Odyssey-Lumineszenzdetektor* der Firma Li-Cor detektiert.

2.2.8 Immunozytochemie

Bei der Immunfluoreszenz von Zellen wird die intrazelluläre Lokalisation einzelner Zielproteine durch Binden eines Fluorophor-gekoppelten Antikörpers sichtbar gemacht.

Zellen wurden auf 18 x 18 mm Deckgläser in 6-Kavitäten-Platten ausgesät und nach Beendigung des Versuchs mit einer 3,7 % Formaldehyd in PBS-Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierlösung wurde schrittweis ausgetauscht, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 10 Min. bei Raumtemperatur mit 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert und zweimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden durch 60-minütige Inkubation mit einer 4 % BSA / 4 % Ziegenserum Lösung in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Zur Inkubation der Zellen mit Antikörpern wurden im Folgenden 100 µl Antikörper-Lösung auf einen mit Parafilm-bestrichenen Deckel einer 6-Kavitäten-Platte gegeben. Die Deckgläser wurden mit der Zellseite nach unten auf den Tropfen gegeben und wie folgt inkubiert. Die Erstantikörper (**Tabelle 8**) wurden in einer 2 % BSA in PBS-Lösung verdünnt und die Zellen damit in einer dunklen, feuchten Kammer für 16 Std. bei 4 °C inkubiert. Wurden zwei Erstantikörper verwendet, wurden diese hintereinander inkubiert um mögliche Kreuzreaktionen zu verhindern. Nach sechsmaligem Waschen mit einer 0,1 % BSA in PBS-Lösung wurden die Zellen mit entsprechendem Fluorophor-gekoppelten-Zweitantikörper (**Tabelle 9**) für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, gewaschen und zur Zellkernfärbung für 10 Min. in einer 2 µg/ml Höchst-Lösung in PBS inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit einer 0,1 % BSA in PBS-Lösung wurden die Zellen einmal mit Millipore-H₂O gewaschen und auf einem Objektträger mit einem Tropfen *Vectashield*-Einbettmedium eingebettet. Die

Deckgläser wurden mit durchsichtigem Nagellack an den Rändern versiegelt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Zeiss LSM 880 Konfokalmikroskop mit Laserlicht der Wellenlänge: 405 , 458 , 488 und 561 nm aufgenommen.

2.2.9 Detektion der Zellproliferation durch Einbau von Ethinyl-2'-Desoxyuridin (EdU) in genomische DNA

Eine Methode, um in der DNA-Synthese-Phase befindliche und somit proliferierende Zellen zu markieren, ist die Inkorporation von Thymidin-Analoga wie 5-Ethinyl-2'-Desoxyuridin (EdU) in die sich replizierende DNA. In einer nachfolgenden Klick-Reaktion (*click-it-reaction*) wird ein Fluorophor-gekoppeltes-Azid über Bildung eines Triazol-Rings an EdU gebunden (**Abbildung 12**). Proliferierende Zellen können durch Anregung des gebundenen Fluorophor Alexa 488 detektiert werden.

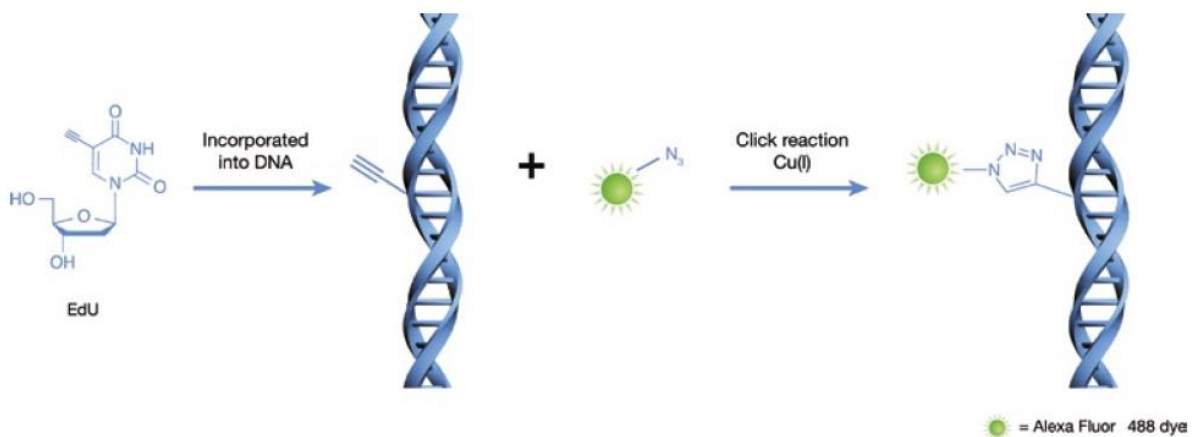


Abbildung 12: Prinzip der EdU-Klick-Reaktion. Nach Einbau von EdU (5-Ethinyl-2'-Desoxyuridin) in genomische DNA (*incorporated into DNA*) in einer Kupfer-katalysierten Klick-Reaktion (*Click reaction*) wird eine Triazolbindung zwischen der Alkylgruppe des - in die DNA eingefügten - EdU und dem fluoreszierenden Azid Alexa-Fluor 488 gebildet (Buck *et al.*, 2008).

Primäre murine Lungenfibroblasten wurden in einer Dichte von 60 – 70 % auf 18 x 18 mm Deckgläschen in 6-Kavitäten-Platten in pmLF-Kulturmedium ausgesät. Nach ca. 16 Std. wurde die entsprechende Menge an 10 mM EdU-Stocklösung hinzugegeben um eine finale Konzentration von 10 μ M zu erreichen. Die Zellen wurden für 24 Std. im CO₂-Inkubator inkubiert und die EdU-Klick-Reaktion mit vorheriger Fixierung und Permeabilisierung, wie im Herstellerprotokoll des verwendeten *Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 488 Imaging Kit* von ThermoFisher beschrieben, durchgeführt. Die Proliferationsrate wurde bestimmt, indem der Anteil der EdU-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl (Hoechst-positive-Zellen) errechnet wurde.

2.2.10 Quantifizierung der Zellmigration

Zur Untersuchung einer TGF- β 1-induzierten-Migration von Fibroblasten und ATII-Zellen wurde ein *Migrationsassay* der Firma Ibidi verwendet (**Abbildung 13**).

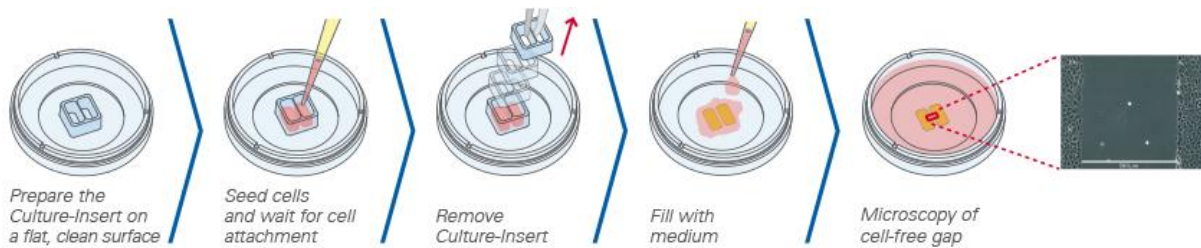


Abbildung 13: Prinzip des Zell-Migrationsassays mittels Silikoneinsätzen von Ibidi. Die Einsätze werden in 35 mm Zellkulturschalen platziert und die Zellen in den Silikoneinsätzen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz werden die Silikoneinsätze gelöst und die Migration der Zellen in die entstehende Lücke zu mehreren Zeitpunkten mittels Phasenkontrastaufnahme analysiert (Quelle: Ibidi).

Die 2-Kavitäten-Silikoneinsätze von Ibidi mit definiertem zellfreiem Spalt wurden in 35 mm Zellkulturschalen platziert. Pro Kavität eines Silikoneinsatzes wurden 15.000 Fibroblasten bzw. 44.000 ATII-Zellen in 70 μ l Zellkulturmedium ausgesät und die 35 mm Schale mit 2 ml Zellkulturmedium befüllt. Die Zellen wurden für ca. 16 Std. im CO₂-Inkubator bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz inkubiert und wie in Abschnitt 43 beschrieben mit TGF- β 1 behandelt, wobei auch das Medium in der 35 mm Schale ausgetauscht wurde. Die Silikoneinsätze wurden mit einer Pinzette entfernt und mit einem Phasenkontrastmikroskop pro Silikoneinsatz jeweils drei Aufnahmen des zellfreien Spalts nach 0, 5, 8, 12 und 24 Std. gemacht. In dem Bildbearbeitungsprogramm *Image J* wurde die Breite des Spalts zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessen und so die Migration der Zellen quantifiziert.

2.2.11 Quantifizierung der Zellviabilität im WST-1-Assay

Die Viabilität von Zellen wurde durch einen kolorimetrischen Test bestimmt. Das wasserlösliche hellgelbe Tetrazoliumsalz WST-1 (*water soluble tetrazolium*) wird in einer NAD(P)H-abhängigen-Reduktionsreaktion in dunkelgelbes Formazan gespalten (**Abbildung 14**). Der Anteil an viablen Zellen mit aktiver mitochondrialer Dehydrogenase in einer Kultur, korreliert somit direkt mit der Menge an gebildeten Formazan.

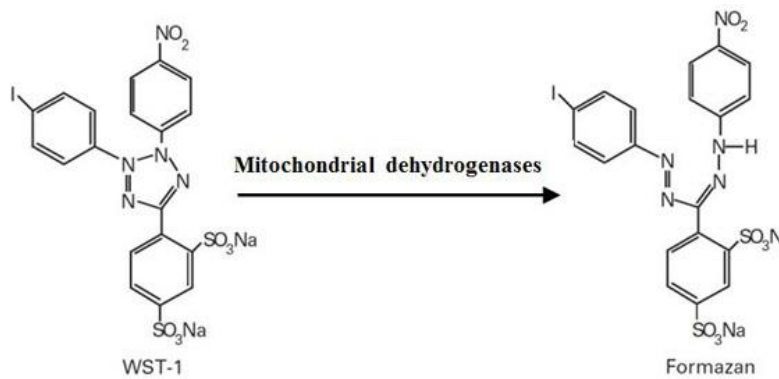


Abbildung 14: Prinzip des WST-1-Zellviabilitätsassay. Durch mitochondriale Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen wird das wasserlösliche WST-1 in den Farbstoff Formazan reduziert. Der resultierende Farbumschlag kann mittels Spektralphotometer quantifiziert werden (Quelle: Mybiosource).

Primäre Lungenfibroblasten wurden wie in 2.2.1.7 beschrieben in 24-Kavitäten-Platten ausgesät und mit Strahlendosen von 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das Medium mit 450 µl neuem Zellkulturmedium ausgetauscht und pro Well 50 µl der WST-1-Lösung hinzugegeben, um eine finale Verdünnung von 1:10 zu erhalten. WST-1-Reagenz wurde auch zu reinem Medium ohne Zellen hinzugegeben, um bei der nachfolgenden Messung die gemessene Hintergrundabsorption von den Absorptionswerten der Proben zu subtrahieren. Nach dreistündiger Inkubation im CO₂-Inkubator wurde je Ansatz 100 µl in eine 96-Well Platte überführt und die Menge an gebildeten Formazan durch Messung der Absorption bei 450 nm in einem Tecan Infinite 200 Pro Spektralphotometer bestimmt.

2.2.12 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest wird herangezogen um nach Bestrahlung von Zellen mit unterschiedlichen Strahlendosen deren Überlebensrate zu bestimmen. Dabei werden Zellen in geringer Dichte ausgesät und nach Bestrahlung die Anzahl an gebildeten Kolonien bestimmt.

Fibroblasten wurden in Passage 1 in folgenden Zellzahlen pro Kavität in 6-Kavitäten-Platten mit pmLF-Kulturmedium ausgesät (**Tabelle 50**).

Tabelle 50: Aussaat-Schema für den Koloniebildungstest

| Strahlendosis / 6-Kavitäten-Platte | Zellzahl pro Well |
|------------------------------------|-------------------|
| 0 Gy | 1000, 1500 |
| 1 Gy | 2000, 3000 |
| 2 Gy | 3000, 4000 |
| 4 Gy | 4000, 6000 |

| | |
|-------------|--------------|
| 6 Gy | 10000, 15000 |
| 8 Gy | 20000, 40000 |

Die Zellen wurden 4 Std. im CO₂-Inkubator inkubiert, um die Anhaftung an die Oberfläche der Kavität zu garantieren. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen wie in Abschnitt 43 beschrieben mit ionisierender Strahlung behandelt und zur Koloniebildung 14 Tage im CO₂-Inkubator inkubiert. Die Zellen wurden in 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert und mit 0,3 % Methyleneblau in 80 % Ethanol gefärbt. Kolonien bestehend aus mehr als 50 Zellen wurden mit einem Stereomikroskop gezählt. Klonogenes Überleben wurde durch den Quotienten aus der Anzahl an Kolonien dividiert durch die Anzahl der ausgesäten Zellen quantifiziert und auf die sog. *plating efficiency* der nicht bestrahlten Kontrolle normalisiert.

2.2.13 Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in Zellen mittels HPLC

Hydroxyprolin ist eine nichtproteinogene Aminosäure die durch posttranslationale Modifikation mittels des Enzyms Prolyl-4-Hydroxylase gebildet wird. Neben Glycin und Prolin ist es ein Hauptbestandteil von Kollagen, wo es die Funktion hat die Tripelhelix zu stabilisieren. Hydroxyprolin kommt fast ausschließlich in Kollagen vor und kann deswegen in Gewebe- und Zellhydrolysaten gemessen werden, um deren Kollagengehalt zu bestimmen. Zur Messung von Hydroxyprolin in hydrolysierten Fibroblastenkulturen mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) wurde ein modifiziertes Protokoll von Campa, McAnulty and Laurent, 1990, verwendet.

Fibroblasten wurden wie in Abschnitt 2.2.1.6 bzw. 2.2.1.7 beschrieben mit TGF- β 1 bzw. Strahlung behandelt und mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden in 500 μ l 6 M HCl-Lösung lysiert, in 4 ml Chromatographie-Glasgefäße überführt und eine saure Hydrolyse für 16 Std. bei 110 °C im Hitzeschrank gestartet. Die Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit offenem Deckel bei 60 °C vollständig getrocknet. Getrocknetes Hydroxyprolin wurde im Anschluss in 500 μ l H₂O-Tridest. gelöst. Um eine direkte Quantifizierung von Hydroxyprolin in den Proben vorzunehmen, wurde vor Messung der Proben eine Standardverdünnungsreihe von Hydroxyprolin vermessen (**Tabelle 52** und **Tabelle 52**).

Tabelle 51: Standardverdünnungen von Hydroxyprolin

| Lösung | Hydroxyprolinkonz. [mg/ml] |
|--------------------------|----------------------------|
| A Konz. Standard | 1 |
| B 1:10 verdünnt | 0,1 |
| C 1:100 verdünnt | 0,01 |
| D 1:1000 verdünnt | 0,001 |

Tabelle 52: Verdünnungsreihe für die Standardkurve

| Lösung | Hydroxyprolingehalt [µg] nach Derivatisierung | Herstellung |
|----------|--|---|
| a | 1,5 | 37,5 µl von A in 500 µl H ₂ O |
| b | 0,7 | 18,75 µl von A in 500 µl H ₂ O |
| c | 0,3 | 75 µl von B in 500 µl H ₂ O |
| d | 0,15 | 37,5 µl von B in 500 µl H ₂ O |
| e | 0,03 | 75 µl von C in 500 µl H ₂ O |
| f | 0,015 | 37,5 µl von C in 500 µl H ₂ O |
| g | 0,003 | 75 µl von D in 500 µl H ₂ O |

Zur Detektion wurden alle Proben in Triplets mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4-Chlor-7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-Diazol (NBD-Cl) derivatisiert. Zu 100 µl Probe bzw. Standard wurden 100 µl 12 mM NBD-Cl in Methanol sowie 100 µl 0,1 M Natriumtetraboratlösung in H₂O (pH 9.5) hinzugegeben und die Proben bei 37 °C unter Lichtausschluss für 20 min im Thermomixer inkubiert. Die Derivatisierungsreaktion wurde über die Zugabe von 50 µl 1,5 M HCl gestoppt und mit 150 µl 167 mM NaOAc in 26 % Acetonitril gepuffert.

Aus den derivatisierten Proben wurden 150 µl in HPLC-Messgefäße überführt und die Säule der HPLC-Anlage mit 100 µl beladen. Als stationäre Phase wurde eine Octyl-Silica-Matrix mit 5 µm Partikelgröße verwendet. Die mobile Phase bestand aus Lösung A (8 % Acetonitril in 50 mM NaOAc) und B (75 % Acetonitril, 25 % H₂O) mit einer Verschiebung der Lösungen während der Trennprozesse nach 100 % A / 0 % B (7 Min.) → 20 % A / 80 % B (5 Min.) → 100 % A / 0 % (12 Min.) bei einer Flussrate von 0,7 ml/Min. Derivatisiertes Hydroxyprolin wurde mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) bei 495 nm und einer Retentionszeit von ca. 3,3 Min. detektiert.

2.2.14 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Messung

Die intramolekulare Interaktion des N- und C-Terminus des TRPC6-Kanals während der Aktivierung mit dem DAG-Analogon OAG (1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol) und dem synthetischen TRPC3/6 Agonisten GSK-1702934A (GSK-170) wurde durch FRET untersucht. FRET ist definiert als ein physikalischer Prozess bei der Energie von einem angeregten Chromophor, dem Donor, strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf ein anderes Chromophor, dem Akzeptor, übertragen wird. Ein effektiver Energietransfer setzt dabei einen Abstand der beiden Chromophore von 10 – 100 Å voraus, damit sich das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen und die Quantenausbeute des Donors und der Absorptionskoeffizient des Akzeptors ausreichend hoch sind (zusammengefasst in Clegg, 1995).

Das in Abschnitt 2.2.3 generierte TRPC6-FRET-Konstrukt, mit tetra-cystein (TC)-tag im N-Terminus und dem Cerulean-Fluoreszenzprotein im C-Terminus wurde wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben in HEK293-Zellen transfiziert. 16 Std. vor Beginn der FRET-Messungen wurden die transfizierten Zellen in Kanal- μ -slides VI 0,4 von Ibidi umgesetzt, sodass Sie am Tag der Messung eine Konfluenz von 80 % aufwiesen. Vor Beginn der FRET-Messung wurden die transfizierten Zellen mit dem grün-fluoreszierenden FIAsh-EDT₂ (*fluorescein arsenical helix binder, 1,2-Ethandithiol*) markiert, welches nach Bindung an das TC-Motiv einen Fluorophor bildet (**Abbildung 15**)

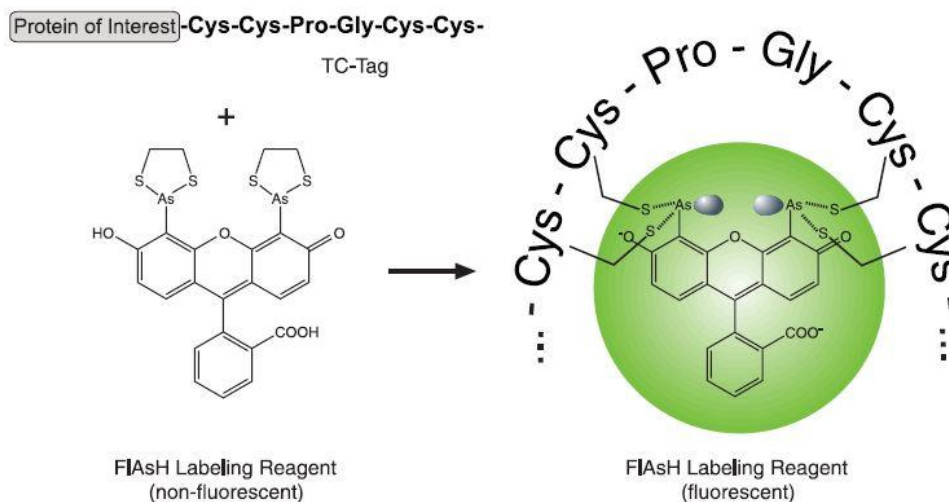


Abbildung 15: FIAsh-EDT₂ (fluorescein arsenical helix binder 1,2-Ethandithiol) Markierung des TC (tetra-cystein)-Motivs. Durch Bindung der beiden Arsengruppen des FIAsh-EDT₂ an jeweils zwei Thiolgruppen der Cysteine aus dem TC-tag wird die chemische Verbindung zum Fluorophor (Quelle: ThermoFisher Scientific).

Die transfizierten Zellen in den μ -slides wurden zweimal mit je 100 μ l Phenolrot-freiem HBSS gewaschen und nach Zugabe von 100 μ l 1 μ M FIAsh-EDT₂ in HBSS 1 Std. im CO₂-Inkubator inkubiert. Um unspezifische Hintergrundsignale zu reduzieren, wurden die Zellen für 10 Min. im CO₂-Inkubator mit 0,25 mM EDT₂ in HBSS inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS wurden den Zellen 100 μ l HEPES-gepufferte-DMEM-Lösung hinzugefügt.

Die FRET-Messungen wurden an einem Olympus IX70-Mikroskop mit UPlanSAPO 100x/1.4-Ölobjektiv durchgeführt. Die Zellen wurden bei einer Wellenlänge von 430 nm durch einen Polychrom-V-Monochromator angeregt und die Emissionsspektren für Cerulean bei 480 ± 20 und für FIAsh bei 535 ± 15 nm mit einem Dual-Emissions-Photometriesystem unter Nutzung eines Strahlenteilers DCLP (*dichroic longpass*) bei einer Wellenlänge von 505 nm detektiert. Die Emission wurde als Strom des Transimpedanz-Verstärkers der Photodioden mit einer Frequenz von 5 kHz gemessen und mit einem EPC10-Verstärker der PATCHMASTER Software quantifiziert. Die Zellen wurden während der Messung konstant mit Phenolrot-freiem-HBSS perfundiert. Nach Erreichen stabiler Emissionswerte der Fluorophore wurden die Zellen für ca. eine Minute mit der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO, 0,1 % BSA in HBSS) perfundiert. Im Anschluss wurden 100 μ M OAG oder 10 μ M GSK-170 in Lösungsmittel für ca. drei Minuten appliziert, welches im Anschluss mit Phenolrot-freiem-HBSS ausgewaschen wurde.

Die Emissionswerte von FIAsh und Cerulean wurden bei der anschließenden Auswertung auf die Ausgangsmesswerte normalisiert. Als Ausgangsmesswert wurde der Mittelwert der ersten fünf Messpunkte der FIAsh- bzw. der Cerulean-Emission definiert ($=F_0$).

FRET wurde als Verhältnis der gemessenen normalisierten Emissionswerte der Fluorophore von FIAsh zu Cerulean vor und nach Aktivierung des TRPC6-Kanals mit OAG oder GSK-170 bestimmt.

2.2.15 Bestimmung der FRET-Effizienz

Die FRET-Effizienz wird definiert als der Anteil an Donor-Molekülen, die Anregungsenergie auf Akzeptor-Moleküle übertragen haben. Die Effizienz wird errechnet durch die Formel: $E = 1 - (\tau_{DA}/\tau_D)$, wobei τ_{DA} die Fluoreszenz des Donors in Anwesenheit des Akzeptors ist und τ_D die Fluoreszenz des Donors in Abwesenheit des Akzeptors ist. Das Donor-Molekül FIAsh wurde durch Applikation

des Dithiols BAL (von engl. British Anti-Lewisite = 2,3-Dimercapto-1-propanol), einem Arsen-Chelator, der die Bindung an den Arsen-haltigen Fluorophor sukzessive zerstört, entfernt.

HEK293-Zellen wurden in 6-Kavitäten-Platten auf 30 mm Deckgläser ausgesät und wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben mit dem TRPC6-FRET-Konstrukt transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.14 beschrieben mit FIAsH markiert, wobei in den 6-Kavitäten-Platten ein Arbeitsvolumen von 1 ml verwendet wurde.

Die Messungen wurden an derselben Apparatur wie in Abschnitt 2.2.14 beschrieben durchgeführt. Die Deckgläser mit den Zellen wurden nach der Markierung mit FIAsH in eine Attofluor-Kammer mit 1 ml HBSS gegeben. Nach Erreichen stabiler Emissionswerte beider Fluorophore wurden 2 µl BAL hinzupipettiert um eine Endkonzentration von 2 mM zu erreichen.

Die Emissionswerte von FIAsH und Cerulean wurden bei der anschließenden Auswertung auf die Ausgangsmesswerte normalisiert. Als Ausgangsmesswert wurde der Mittelwert der ersten fünf Messpunkte der FIAsH- bzw. der Cerulean-Emission definiert ($=F_0$).

2.2.16 Elektrophysiologische Messung von Zellen

Elektrophysiologische Messungen von HEK293-Zellen transfiziert mit den FRET-Konstrukten TC-TRPC6-Cerulean-WT, -G108S, -N109A, -M131T sowie mit unmarkierten TRPC6-WT und -M131T im bicistronischen Expressionsvektor pIRES2-EGFP wurden mittels der *Patch-Clamp*-Methodik durchgeführt. Die Methode wurde 1976 von Neher und Sakmann entwickelt und ermöglicht das Messen von Membranströmen mittels Ansaugen der Zellmembran durch eine Glaspipette mit Messelektrode (Neher and Sakmann, 1976). Alle elektrophysiologischen Messungen in dieser Arbeit wurden von Dr. Ursula Storch im Ganzzell-Modus, wie in der nachfolgenden Veröffentlichung beschrieben, durchgeführt (Fiedler *et al.*, 2019)

2.2.17 Statistik

Alle gesammelten Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt, sofern es in den Abbildungslegenden nicht anders gekennzeichnet ist. Die statistische Auswertung wurde mit der Software GraphPad Prism durchgeführt. Nach Test auf Gaußsche Normalverteilung mittels D'Agostino- und Shapiro-Wilk Test wurden mittels ROUT-Test Ausreißerwerte

identifiziert. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden bei Normalverteilung durch Verwendung von parametrischen (Welch's Test, Two-Way-ANOVA) oder bei nicht normalverteilten Werten durch nicht-parametrischen Tests (Mann-Whitney-Test, Bonferroni Verteilung) bestimmt. Eine Signifikanz wurde bei p-Werten von $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) festgestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung zur Interaktion der Amino (N)- und Carboxy (C)-Termini des TRPC6 Kanals während der Aktivierung mit 1-Oleoyl-1-Acetyl-sn-Glycerol (OAG) und GSK-1702934A (GSK-170)

Zur Untersuchung der N- und C-terminalen Interaktion des murinen TRPC6-Kanals durch Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) wurde das Kanalprotein an den zytoplasmatischen Termini markiert. Vor dem Stop-Codon wurde in die cDNA-Sequenz des TRPC6-Kanals die codierende Sequenz für das Cyan-Fluoreszenzprotein Cerulean und hinter dem Start-Codon ein Tetra-Cystein (TC)-Motiv eingefügt, das für die Aminosäuren Cystein-Cystein-Prolin-Glycin-Cystein-Cystein (CCPGCC) kodiert. Nach Transfektion dieser TRPC6-cDNA in HEK293-Zellen wurde der N-Terminus des Kanals mit dem sog. *Fluorescein Arsenical Helix binder 1,2-Ethandithiol* (FIAsH-EDT₂) markiert, das an das TC-Motiv bindet. In den markierten WT- und mutanten-TRPC6-Kanälen konnte so die Interaktion ihrer Termini durch FRET-Messungen während der Aktivierung des Kanals mit den TRPC6-Aktivatoren OAG oder GSK-170 untersucht werden. Cerulean fungiert dabei als Donor-Fluorophor für das Akzeptor-Fluorophor FIAsH.

3.1.1 Generierung von N- und C-terminal markierten WT- und mutanten-TRPC6-Kanälen

Zur Generierung des Fluorophor-markierten TRPC6-Kanals, wurde die cDNA für den murinen TRPC6-Kanal in den pcDNA3.1-Cerulean-Vektor inseriert. In die TRPC6-cDNA wurden in einer PCR die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *BamHI* eingefügt. Die TRPC6-cDNA wurde dann durch Verdau mit *KpnI* und *BamHI* aus dem Vektor freigesetzt und der pcDNA3.1-Cerulean-Vektor durch den gleichen Restriktionsverdau linearisiert. Mittels Ligase wurde die TRPC6-cDNA in den Vektor vor die cDNA des Cerulean-Proteins ligiert, was zu einer C-terminaler Fusion des Kanalproteins mit Cerulean führt. Die korrekte Insertion wurde durch Verdau des Plasmids mit *KpnI* und *BamHI* überprüft. Ein mit dem DNA-Farbstoff *Midori-Green* gefärbtes Agarosegel zeigt die DNA-Fragmente fünf verschiedener Klone nach dem Verdau (**Abbildung 16**). Nach korrekter Insertion der TRPC6-cDNA sollten zwei DNA-Fragmente mit einer Größe von 6,078 kb und 2,815 kb durch den Verdau mit den zwei Restriktionsenzymen entstehen. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel (**Abbildung 16**)

zeigte der Klon 4 eine Insertion der TRPC6-cDNA und wurde nach Überprüfung der DNA-Sequenz für weitere Versuche verwendet. Klon 1 – 3 und Klon 5 zeigten ein DNA-Fragment von 6,1 kb ohne inserierte TRPC6-cDNA und wurden verworfen.

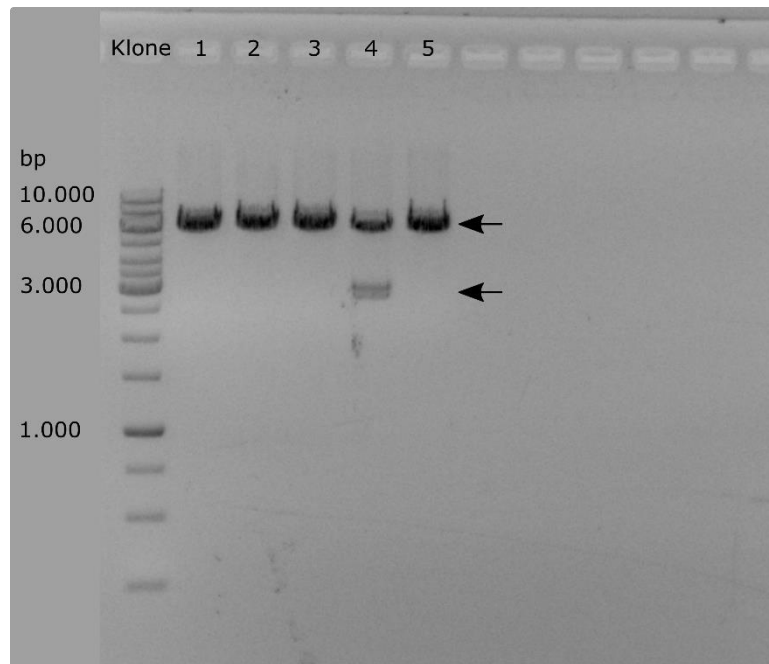


Abbildung 16: Agarosegel mit aufgetrennten DNA-Fragmenten nach Verdau der Plasmid-DNA durch spezifische Restriktionsenzyme zum Nachweis der korrekten Insertion der TRPC6-cDNA in den pcDNA3.1-Cerulean-Vektor. Plasmid-DNA sechs verschiedene Klone wurde nach Insertion von TRPC6-cDNA durch die Restriktionsenzyme *KpnI* und *BamHI* verdaut und 0,25 µg je Probe, sowie 3 µg 1 kb DNA-Größenmarker in einem 1 % Agarosegel bei konst. 120 V für 1 Std aufgetrennt. Die Pfeile markieren die beiden entstandenen Fragmente von 6,1 kb und 2,8 kb nach Insertion der TRPC6-cDNA in den pcDNA3.1-Cerulean-Vektor aus Klon4.

Durch gezielte Mutagenese wurde ein Tetracystein-Motiv mit einer *SmaI* Restriktionsstelle in den N-Terminus des TRPC6-Kanals inseriert. Ein mit dem DNA-Farbstoff *Midori-Green* gefärbtes Agarosegel zeigt die DNA-Fragmente nach *SmaI*-Verdau von Vektoren aus zehn verschiedenen Klonen (**Abbildung 17**). Alle Klone zeigten die Insertion der kodierenden DNA für das Tetracystein-Motiv mit DNA-Fragmenten von 4,2 kbp, 3,6 kbp und 1,1 kbp.

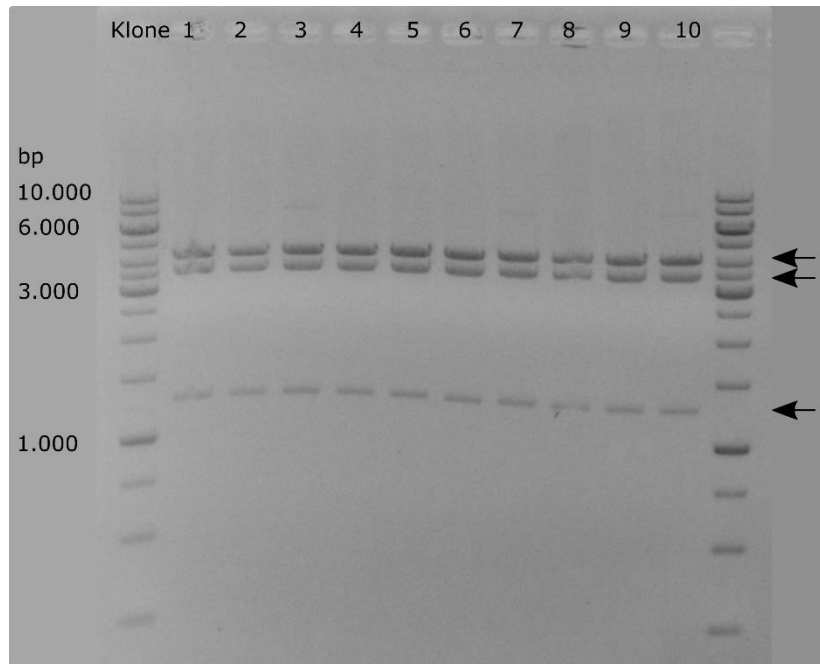


Abbildung 17: Agarosegel mit aufgetrennten DNA-Fragmenten nach Verdau der Plasmid-DNA durch spezifische Restriktionsenzyme zum Nachweis der korrekten Insertion der kodierenden Sequenz des TC-Motivs in pcDNA3.1-TRPC6-Cerulean. PcDNA3.1-TRPC6-Cerulean-Plasmide zehn verschiedener Klone wurden nach Insertion der kodierenden Region des Tetracystein-Motivs (TC) durch das Restriktionsenzym *SmaI* verdaut und 0,25 µg je Probe, sowie 3 µg 1 kb DNA-Größenmarker in einem 1 % Agarosegel bei konst. 120 V für 1 Std aufgetrennt. Die Pfeile markieren die drei entstandenen Fragmente von 4,2 kb, 3,6kb und 1,1 kb nach Insertion des TC-Motivs in pcDNA3.1-TRPC6-Cerulean-Vektor nach Verdau aus den Klone 1 - 10.

In das so generierte TRPC6-Plasmid mit der mTRPC6^{TC}-Cerulean-cDNA (**Abbildung 18**) wurde durch zielgerichtete Mutagenesen die kodierenden DNA-Sequenzen für die Mutationen G(Glycin)108S(Serin), N(Asparagin)109A(Alanin) und M(Methionin)131T(Threonin) im TRPC6-Kanal eingefügt.

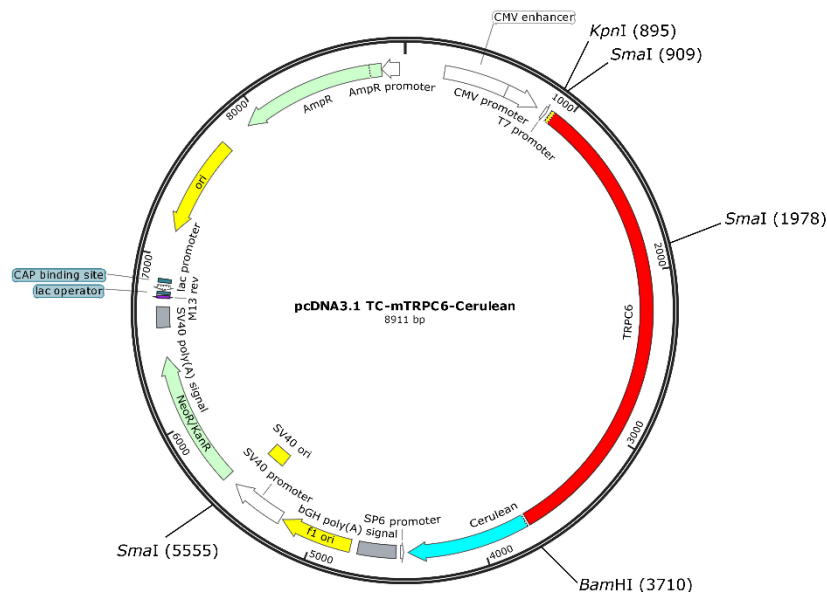


Abbildung 18: Vektor pcDNA3.1 mit mTRPC6^{TC}-Cerulean-cDNA. Die Expression des TRPC6^{TC}-Cerulean-Fusionsprotein steht unter Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV)-Promotors. Der Vektor besitzt eine Neomycin-

und eine Ampicillin-Resistenz (NeoR, AmpR), sowie einen f1 und SV40 ORI (*origin of replication*, Replikationsursprung).

In **Abbildung 19 A** ist - soweit bekannt - die kürzlich publizierte Proteinstruktur des N- und C-Terminus des murinen TRPC6-Kanals dargestellt. Neben dem WT-TRPC6 wurden zwei bereits beschriebene, im N-Terminus lokalisierte, TRPC6-Mutanten untersucht. TRPC6-M131T, entspricht der humanen M132T aktivierenden sog. *gain-of-function*-Mutation, die in der zweiten *Ankyrin-Repeat*-Domäne im N-Terminus lokalisiert ist und auf der vom C-Terminus abgewandten Seite liegt (**Abbildung 19 B**). Die TRPC6-G108S-Mutation liegt in der ersten Ankyrin-Repeat-Domäne im N-Terminus in unmittelbarer Nähe der horizontalen Helix des C-Terminus. Die Aminosäure Asparagin 109 (N109) kann eine schwache Wasserstoffbrückenbindung mit dem Tyrosin 895 (Y895) des C-Terminus ausbilden (Azumaya *et al.*, 2018), die in der N109A-Mutante durch den Austausch mit der Aminosäure Alanin verloren geht.

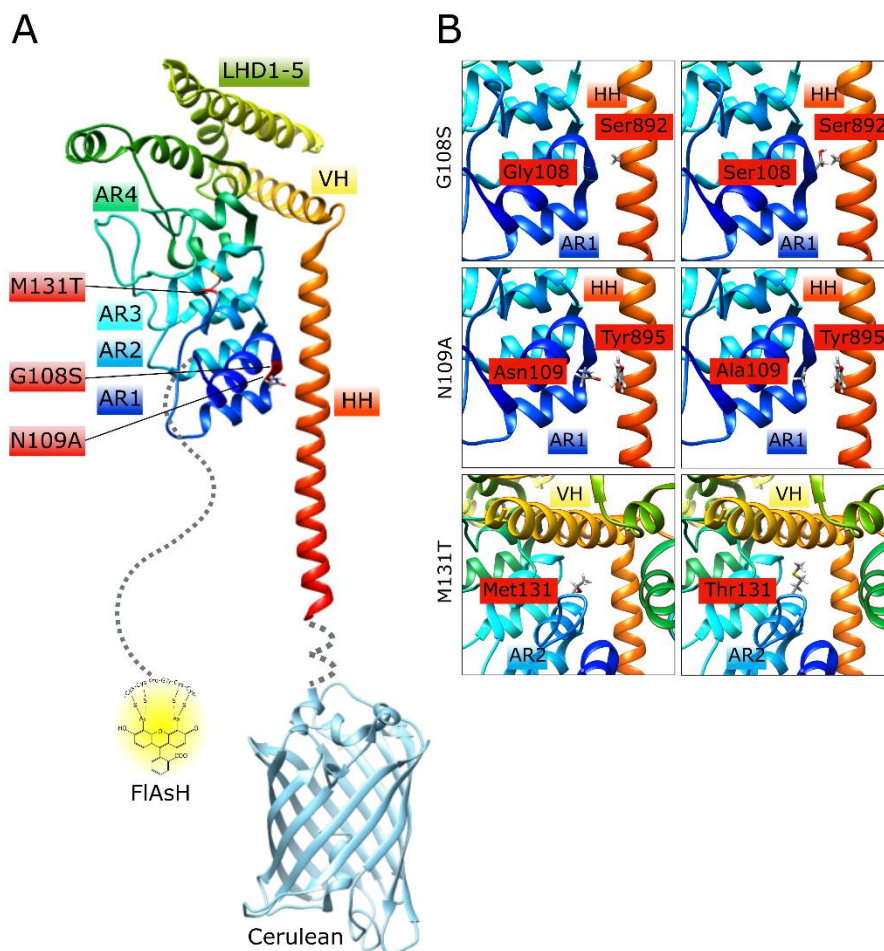


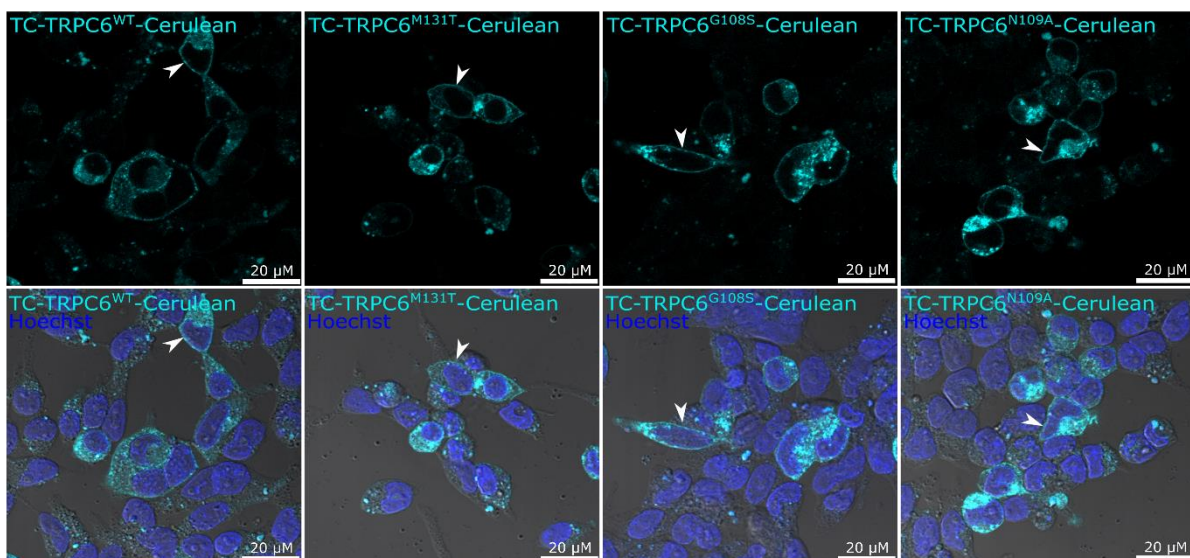
Abbildung 19: Struktur des N- und C-Terminus des TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteins. (A) Die Proteinstruktur des TRPC6-Kanals mit dem N-terminalen Akzeptor Fluorophor *Fluorescein Arsenical Helix binder* (FIAsh) und dem C-terminalen Donor-Fluorophor Cerulean ist dargestellt. Die einzelnen Domänen der Termini sind wie folgt abgekürzt: *Ankyrin repeats domain 1–4* (AR), *linker helical domain 1–5* (LHD), *vertical helix* (VH), *horizontal helix* (HH). Die gestrichelten Linien stellen Sequenzabschnitte mit nicht aufgelöster Proteinstruktur dar. **(B)** Die Lokalisation der TRPC6-Mutationen M131T, G108S, N109A und die potentiell interagierenden Aminosäuren S892

und Y895, sind gekennzeichnet. Die Struktur des TRPC6-Kanalproteins wurde mit der UCSF-Chimera-Software unter Verwendung der PDB (*protein data bank*)-ID 6CV9 visualisiert.

3.1.2 Expression der WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanäle und Translokation in die Plasmamembran von HEK293-Zellen

Um die Expression und Translokation der markierten TRPC6-Kanalproteine in die Plasmamembran der transfizierten HEK293-Zellen zu überprüfen, wurde die Emission des Cerulean-Fluorophors am C-Terminus durch konfokale Lasermikroskopie bestimmt. Die Aufnahmen zeigten eine identische zelluläre Verteilung von Fluoreszenz-markiertem WT-, M131T-, G108S- und N109A-TRPC6-Kanalprotein in den transfizierten HEK293-Zellen (**Abbildung 20 A**, obere Reihe). Die Überlagerung der Cerulean-Fluoreszenz mit der Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahme zeigte die korrekte Insertion der WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteine in die Plasmamembran (**Abbildung 20 A**, untere Reihe).

A



B

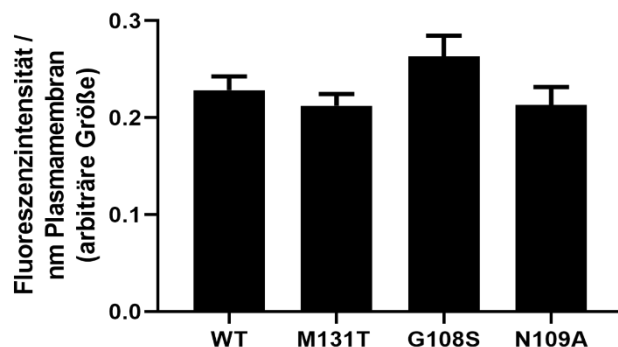


Abbildung 20: Subzelluläre Lokalisation der WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteine. HEK293-Zellen wurden mit je 2,5 µg WT-, M131T-, G108S- und N109A-TRPC6^{TC}-Cerulean kodierender cDNA transfiziert. 48 Std. nach Transfektion wurden die Zellen in 3,7 % Formaldehyd fixiert und die Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff markiert. Aufnahmen wurden an einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. (**A**) Repräsentative Aufnahmen von Cerulean-positiven-Zellen mit Expression von TRPC6^{TC}-Cerulean in der Plasmamembran (Pfeile, obere Reihe)

sowie Fluoreszenz von TRPC6^{TC}-Cerulean in einer Bildüberlagerung mit Hoechst-Farbstoff und einer Differential-Interferenz-Kontrast (DIK)-Aufnahme (untere Reihe) sind dargestellt. **(B)** Quantifizierung der Cerulean-Plasmamembranexpression. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von Cerulean pro nm Plasmamembran von mit WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-kodierender-cDNA transfizierten HEK293-Zellen. N = 13. Ein Kruskal-Wallis Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Zur statistischen Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität von Cerulean pro nm HEK293-Plasmamembran bestimmt. Zwischen WT- und M131T-, G108S- und N109A-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalprotein konnte kein signifikanter Unterschied in der Plasmamembranlokalisation festgestellt werden (**Abbildung 20 B**). Damit konnte nachgewiesen werden, dass 48 Std. nach Transfektion der HEK293-Zellen alle zu untersuchenden Konstrukte zu etwa gleichen Teilen in der Plasmamembran lokalisiert sind.

3.1.3 Messung der basalen- und OAG-induzierten-Stromdichte von WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanälen durch die Patch-Clamp-Technik

Die aktivierende sog. *gain-of-function*-M131T-TRPC6-Mutante zeigt die höchste Einwärts-Stromdichte aller bisher beschriebenen Kanal-Mutanten, die in Patienten mit fokaler segmentaler Glomerulosklerose identifiziert wurden (Heeringa *et al.*, 2009). Die Mutante G108S wurde erstmalig durch eine sog. *in-silico*-Analyse als inaktivierende sog. *loss-of-function*-Mutation beschrieben (Santin *et al.*, 2009). Später jedoch in *Calcium-Imaging*-Experimenten als *gain-of-function*-Mutation charakterisiert (Riehle *et al.*, 2016). Um die TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteine auf ihre Funktionalität zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Messungen der transient-transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt.

Die sog. *Patch-Clamp*-Messungen zeigten, dass alle TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteine einen durch den TRPC6-Aktivator 1-Oleoyl-1-Acetyl-sn-Glycerol (OAG)-induzierten Anstieg der Stromdichte erzeugten (**Abbildung 21 A-D**). Die Strom-Spannungskurven aller Konstrukte ähneln den bereits für TRPC6 in HEK293-Zellen publizierten Kurven (Dietrich *et al.*, 2003). Die basalen- und OAG-induzierten-Stromdichten bei ± 60 mV der M131T-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteine waren signifikant im Vergleich zu WT-TRPC6-Konstrukten erhöht (**Abbildung 21 E**). Damit konnte der bereits beschriebene *gain-of-function*-Phänotyp der M131T-Mutante bestätigt werden. Die basalen- und OAG-induzierten-Stromdichten der G108S-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteine bei ± 60 mV waren dagegen signifikant verringert im Vergleich zu WT-TRPC6-Konstrukten (**Abbildung 21 E**) und deuten also auf einen

inaktivierenden - wie ursprünglich durch Santin und Kollegen beschriebenen - *loss-of-function*-Phänotyp hin (Santin *et al.*, 2009). Messungen der basalen- und OAG-induzierten-Stromdichten der direkt benachbarten N109A-Mutante bei ± 60 mV zeigten ebenfalls signifikant verringerte Werte im Vergleich zu WT-TRPC6-Konstrukten (**Abbildung 21 E**). Die N109A-Mutante kann demnach durch elektrophysiologische Messungen also ebenfalls als sog. *loss-of-function*-Mutation charakterisiert werden. Alle diese Daten wurden in Kooperation mit Frau PD Dr. Ursula Storch generiert.

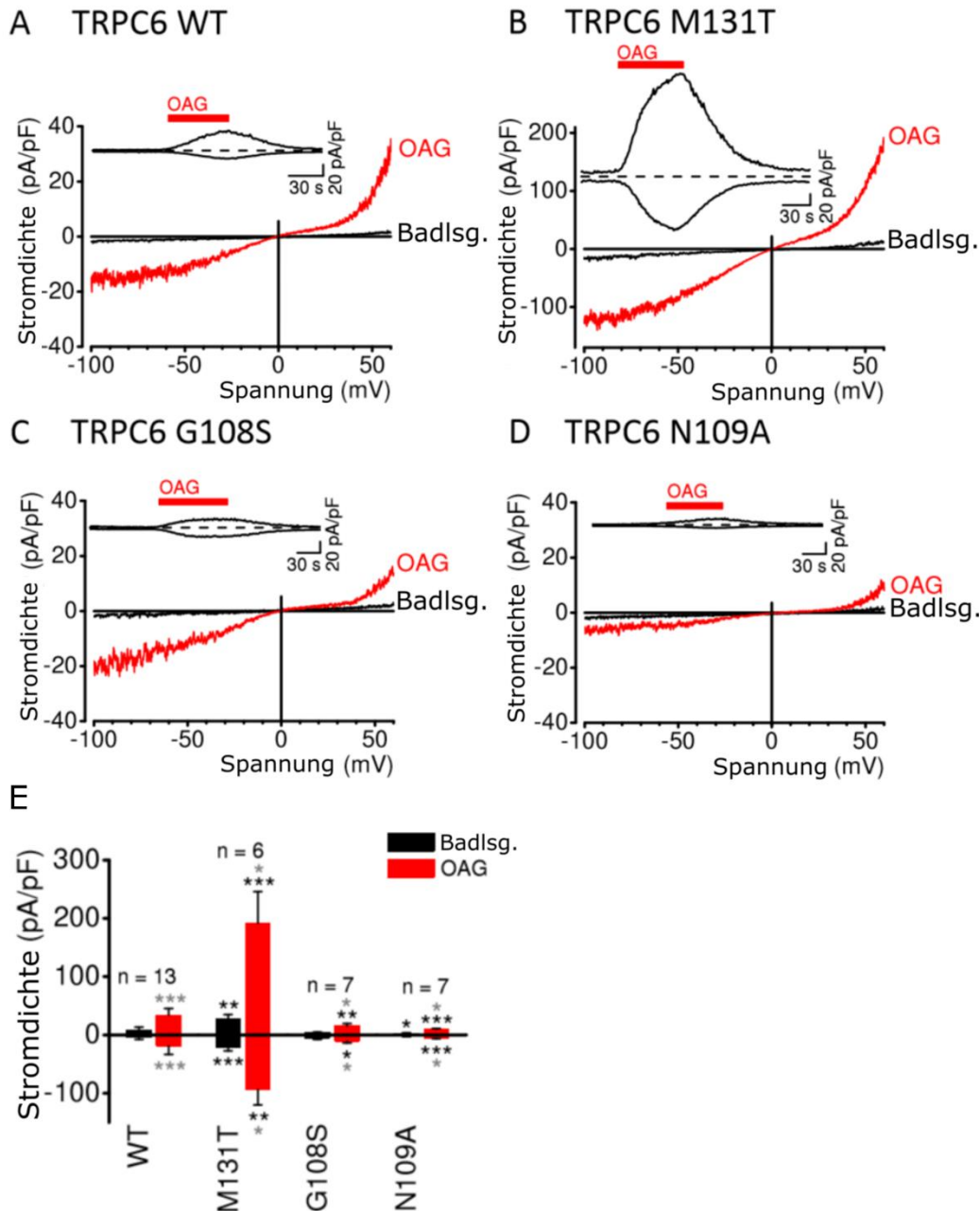


Abbildung 21: Patch-Clamp-Analyse der basalen- und 1-Oleoyl-1-Acetyl-sn-Glycerol (OAG)-induzierten-Stromdichten von WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen in HEK293-Zellen. (A-D) Repräsentative Aufnahmen von Strom-Spannung-Kurven von WT- (A) und der mutanten M131T- (B), G108S- (C) und N109A-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteine (D) vor (schwarze Linien) und nach Zugabe von 100 μ M OAG (rote Linien). Kleine Grafiken zeigen den Zeitverlauf der Stromdichte vor und ab Applikation von OAG bei einer Sollspannung von ± 60 mV. **(E)** Zusammenfassung der Stromdichte bei ± 60 mV vor (Badlösung) und nach

Applikation von OAG. N gibt die Anzahl von gemessenen Zellen in mindestens drei unabhängigen Experimenten an. Signifikanzen zwischen basaler Stromdichte und nach Applikation von OAG (graue Sterne) sowie zwischen Stromdichten der mutanten- zu WT-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen (schwarze Sterne) wurden getestet. *P<0.05, **P<0.01***P<0.001. Alle Daten wurden von PD Dr. Ursula Storch generiert.

Um zu überprüfen, ob die N- und C-terminalen Proteinmarker die Kanalaktivität des TRPC6-Kanals beeinflussen, wurde die cDNA der M131T-TRPC6-Mutante in den TRPC6-pIRES-EGFP-Vektor eingefügt und HEK293-Zellen transient mit dem WT- und M131T-TRPC6-Konstrukt transfiziert. Elektrophysiologische Messungen wurden wie bei den FRET-Konstrukten mittels *Patch-Clamp*-Methode durch Frau PD Dr. Ursula Storch generiert. Die Analyse der Stromdichten-Spannungskurven zeigte, dass die WT- und M131T-TRPC6-Kanalproteine funktionell in HEK293 exprimiert werden und einen OAG-induzierten Anstieg der Stromdichte erzeugen (**Abbildung 22 A, B**). Der Vergleich der basalen- und OAG-induzierten-Stromdichte bei ± 60 mV von M131T- zu WT-TRPC6-Kanalproteinen zeigte signifikant erhöhte Werte für die mutanten-M131T-TRPC6-Kanalproteine (**Abbildung 22 C**), ähnlich wie für die M131T-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalprotein-Mutante (**Abbildung 21 E**). Dadurch konnte bestätigt werden, dass der N- und C-terminale Marker die Kanalaktivität des TRPC6-Kanals nicht maßgeblich beeinflusst.

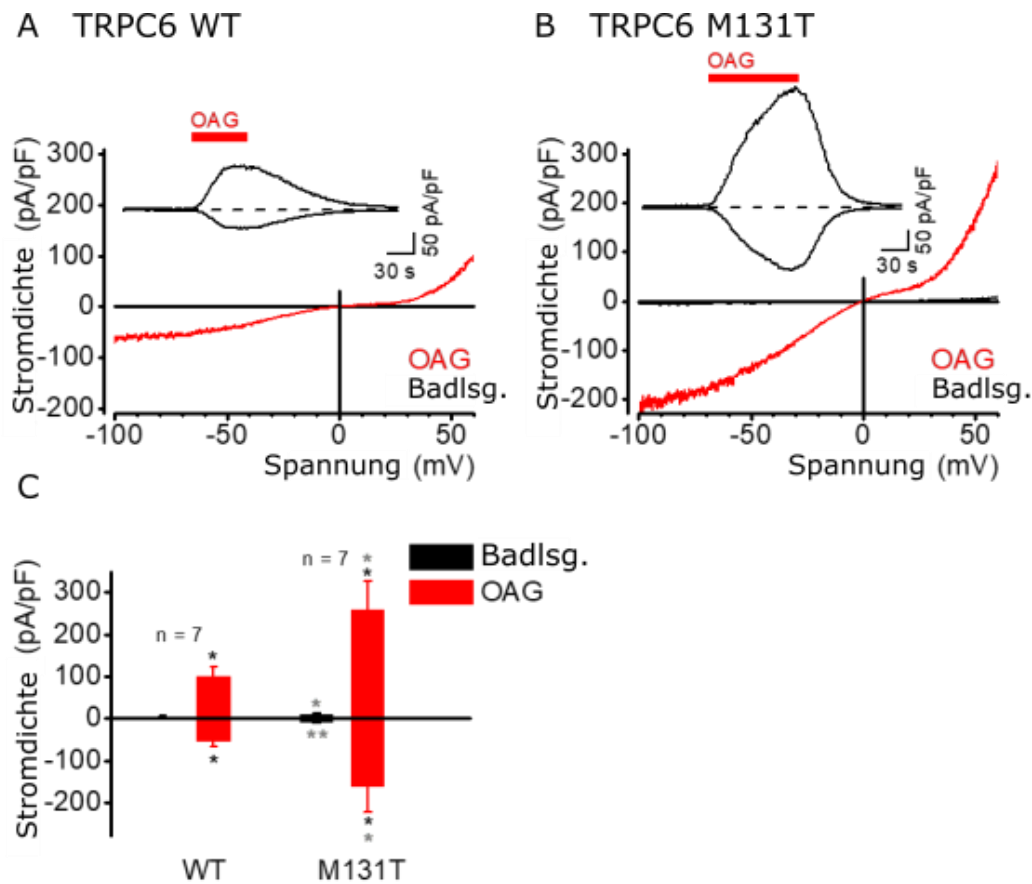


Abbildung 22: Patch-Clamp-Analyse der basalen- und 1-Oleoyl-1Acetyl-sn-Glycerol (OAG)-induzierten-Stromdichten von WT- und M131T-TRPC6-IRES-EGFP in HEK293-Zellen. (A-B) Repräsentative Aufnahmen von Stromdichten-Spannungs-Kurven von WT-TRPC6-IRES-EGFP (A) und M131T-TRPC6-IRES-EGFP (B) vor (schwarze Linien) und nach Zugabe von 100 µM OAG (rote Linien). Kleine Grafiken zeigen den Zeitverlauf der Stromdichte vor und ab Applikation von OAG bei einer Sollspannung von ±60 mV. (C) Zusammenfassung der Stromdichte bei ±60 mV vor (Badlösung) und nach Applikation von OAG. N gibt die Anzahl von gemessenen Zellen in mindestens drei unabhängigen Experimenten an. Signifikanz zwischen basaler Stromdichte und nach Applikation von OAG (graue Sterne) sowie zwischen Stromdichte von M131T- zu WT-TRPC6-IRES-EGFP (schwarze Sterne) wurde getestet. *P<0.05, **P<0.01. Alle Daten wurden von PD Dr. Ursula Storch generiert.

3.1.4 Bestimmung der FRET-Effizienz von WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen

Um die Qualität und Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde vor Durchführung der FRET-Messungen die FRET-Effizienz der mutanten- und WT-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteine bestimmt. In transient-transfizierten HEK293-Zellen wurde die FRET-Abnahme nach Zugabe des Arsen-Chelator-Moleküls *british anti lewisite* (BAL, Dimercaprol) untersucht. Dimercaprol löst durch seine hohe Affinität Arsen von der Tetracystein-Bindestelle. Alle TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteine zeigten nach Zugabe von BAL eine Abnahme der Fluoreszenz des Akzeptor-Fluorophors FIAsh bei gleichzeitiger Zunahme der Fluoreszenz des Donor-Fluorophors Cerulean und einer daraus resultierenden Abnahme der FRET-Ratios (**Abbildung 23 A - D**). Der Vergleich

der FRET-Effizienzen ist definiert als: $E = 1 - (\text{tauDA}/\text{tauD})$ - wobei tauDA die Emission von Cerulean in Anwesenheit von FIAsH und tauD die Emission von Cerulean in Abwesenheit von FIAsH ist. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der FRET-Effizienz zwischen den WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen (Abbildung 23 E).

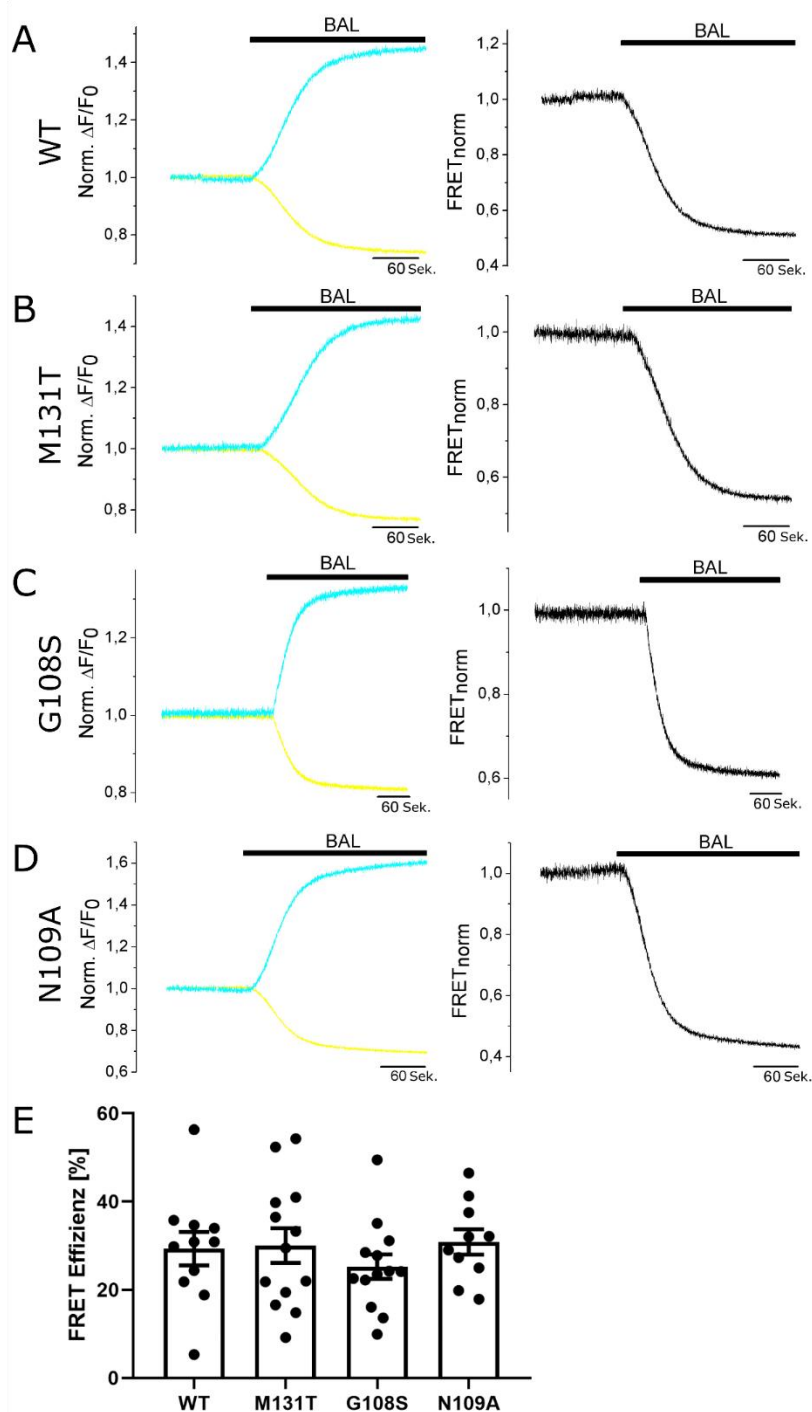


Abbildung 23 FRET-Effizienz von WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen in HEK293-Zellen. (A-D) Repräsentative, normalisierte Änderungen der Fluoreszenzemissionen des Cerulean- (türkise Linien) und TC-FIAsH- (gelbe Linien) Fluorophors (links) und normalisierten FRET-Quotienten (rechts) von WT- (A) und den

mutanten M131T- (B), G108S- (C) und N109A-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen (D) vor und ab Applikation von 2 mM *British anti-Lewisite* (BAL). Die Zellen wurden konstant mit Phenolrot-freiem HBSS perfundiert und nach Erreichen stabiler Emissionswerte beider Fluorophore wurde BAL appliziert. Die Emissionswerte von FIAsh und Cerulean wurden jeweils auf den Mittelwert der ersten fünf Messpunkte normalisiert. Die FRET-Werte wurden als das Verhältnis der normalisierten Emissionswerte von FIAsh zu Cerulean berechnet. (E) Zusammenfassung der FRET-Effizienzen, die nach Entfernen des Arsens aus dem TC-FIAsh durch BAL quantifiziert wurden. Ein *Oneway ANOVA*-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

3.1.5 Quantifizierung der Interaktion der N- und C-Termini des TRPC6-Kanals während der Aktivierung mit OAG und GSK-170 mittels Förster-Resonanz-Emissions-Transfer (FRET)

FRET-Messungen wurden mit WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen transient-transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Nach Zugabe des DAG-Analogons OAG konnte für alle Konstrukte eine Zunahme der normalisierten Donor (Cerulean)-Fluoreszenz bei simultaner Abnahme der normalisierten Akzeptor (FIAsh)-Fluoreszenz beobachtet werden. Es zeigte sich eine Abnahme des normalisierten FRET-Quotienten für die mutanten- und WT-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteine, während die vorherige Applikation des Lösungsmittels (0,1 % DMSO, 0,1 % BSA) keinen Einfluss auf die Fluorophor-Emission hatte. Durch Auswaschen des Aktivators mit der Pufferlösung HBSS konnte keine Veränderung des OAG-induzierten FRET-Signals beobachtet werden (**Abbildung 24 A – D**). Die prozentuale Abnahme des normalisierten FRET-Ratios nach Zugabe von OAG war in allen Mutanten (M131T, G108S, N109A) signifikant im Vergleich zum WT-TRPC6-Protein reduziert. Der Vergleich der *gain-of-function*-Mutante M131T mit den beiden *loss-of-function*-Mutanten G108S und N109A ergab keinen signifikanten Unterschied in der Abnahme der normalisierten FRET-Quotienten (**Abbildung 24 E**).

Die Aktivierung der WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteine mit dem synthetischen lipidfreien TRPC6-Aktivatormolekül GSK-1702934A (GSK-170) zeigte ähnliche Ergebnisse. Die Zugabe von GSK-170 führte bei allen Konstrukten zu einer Zunahme der Cerulean-Emission bei gleichzeitiger Abnahme der FIAsh-Emission und einer daraus resultierenden Abnahme des FRET-Quotienten. Während der vorausgehenden Applikation des Lösungsmittels (0,1 % DMSO) konnte, wie nach dem Auswaschen von GSK-170 mit HBSS, keine Veränderung der FRET-Quotienten detektiert werden (**Abbildung 25 A – D**). Die *gain-of-function* (M131T) und *loss-of-function* (G108S, N109A) TRPC6-Mutanten zeigten im direkten Vergleich keine signifikant veränderte Reduktion der FRET-Quotienten. Die prozentuale Abnahme der normalisierten FRET-Quotienten nach Zugabe von GSK-170 war jedoch in allen

Mutanten signifikant im Vergleich zum WT-TRPC6-Kanalprotein reduziert (**Abbildung 25 E**).

Die Analyse der Kinetik von OAG- und GSK-170-induzierten maximalen FRET-Abnahmen in transient-transfizierten HEK293-Zellen zeigte keinen Unterschied zwischen WT-, M131T-, G108S- und N109A-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalprotein (**Abbildung 26 A, B**). Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf bis zum Erreichen der maximalen OAG-induzierten Zunahme der Stromdichte zwischen WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen detektiert werden (**Abbildung 26 C**). Die Kinetik der OAG- und GSK-170-induzierten FRET-Signale war jedoch drei- bis viermal langsamer als die Kinetik der OAG-induzierten Stromdichten (**Abbildung 26**). Die Latenzzeit zwischen Applikation des Aktivators und einer Veränderung des FRET-Signals war jedoch vergleichbar mit der Latenzzeit der OAG-induzierten Änderung der Stromdichte, was darauf hindeutet, dass die mittels FRET-detektierte Dissoziation der N- und C-Termini im Verlauf der TRPC6-Aktivierung auftritt (**Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 26**).

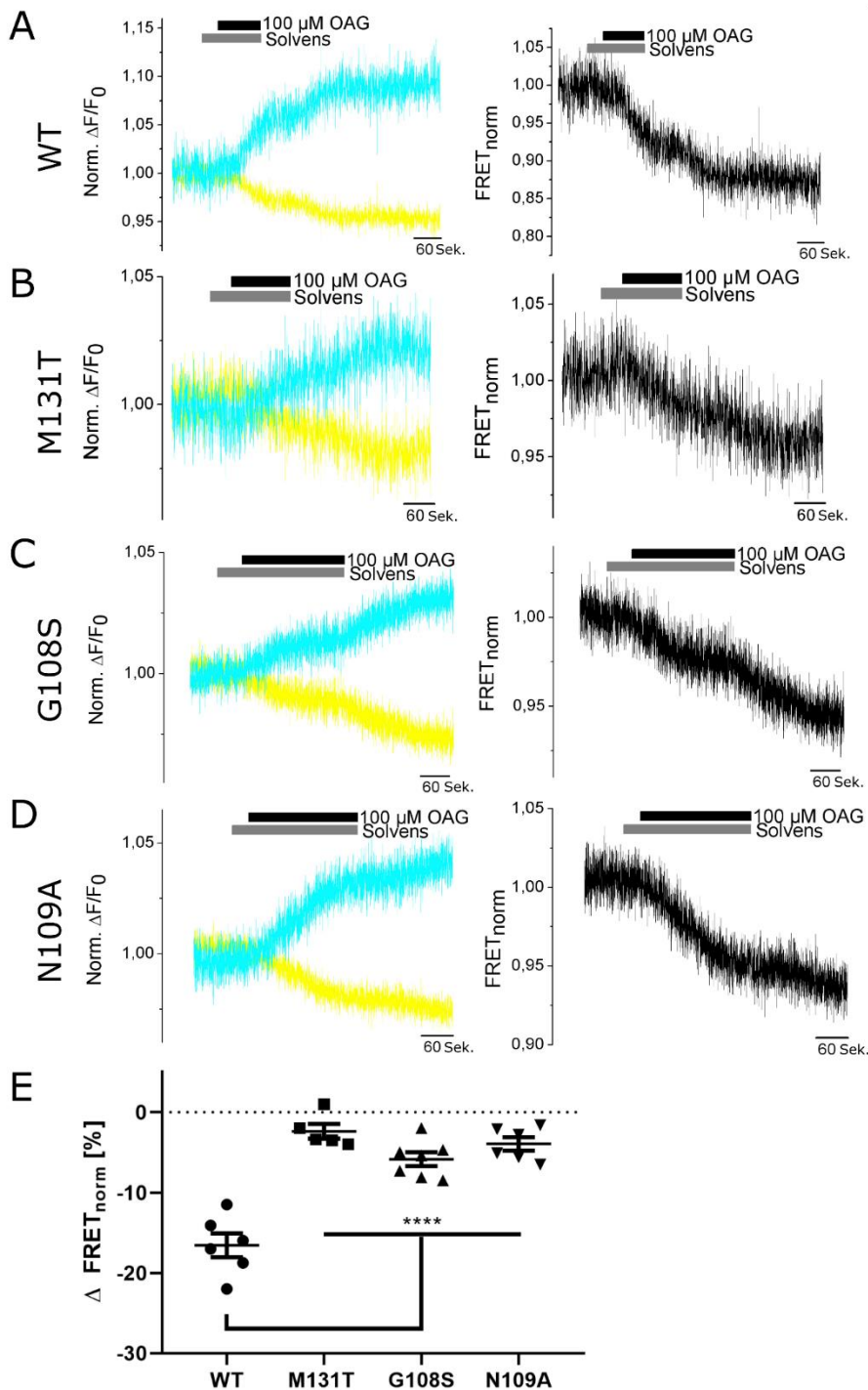


Abbildung 24: Messung OAG-induzierter FRET-Abnahmen von WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen in HEK293-Zellen. (A-D) Repräsentative, normalisierte Änderungen der Fluoreszenzemissionen. Aufnahmen des Zeitverlaufs der normalisierten Cerulean- (türkise Linien) und TC-FIAsH- (gelbe Linien) Fluorophor-Emission (links) und der normalisierten FRET-Quotienten (rechts) von WT- (A) und den mutanten M131T- (B), G108S- (C) und N109A-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen (D) vor und ab Applikation des Solvens (0,1 % DMSO, 0,1 % BSA) und von 100 μ M OAG. Die Zellen wurden konstant mit Phenolrot-freiem HBSS perfundiert und nach Erreichen stabiler Emissionswerte beider Fluorophore wurde das Solvens von OAG für ca. 1 Minute appliziert. Anschließend wurde in Solvens gelöstes OAG für ca. 3 Minuten appliziert. Der Aktivator wurde im Anschluss durch Phenolrot-freies HBSS ausgewaschen. Die Emissionswerte von FIAsH und Cerulean wurden jeweils auf den Mittelwert der ersten fünf Messpunkte normalisiert. Die FRET-Werte wurden als das Verhältnis der normalisierten Emissionswerte von FIAsH zu Cerulean berechnet (E) Zusammenfassung der Abnahme der normalisierten FRET-Quotienten. Der FRET-Quotient wurde aus dem Verhältnis der normalisierten Emissionswerte von FIAsH zu Cerulean vor und nach Aktivierung von TRPC6 mit OAG gebildet. Die Abnahme der FRET-Werte nach Aktivierung

mit OAG ist prozentual dargestellt. Die Signifikanz zwischen den FRET-Quotienten der mutanten- zu WT-TRPC6-Kanalproteinen wurde getestet. **** $P < 0.0001$.

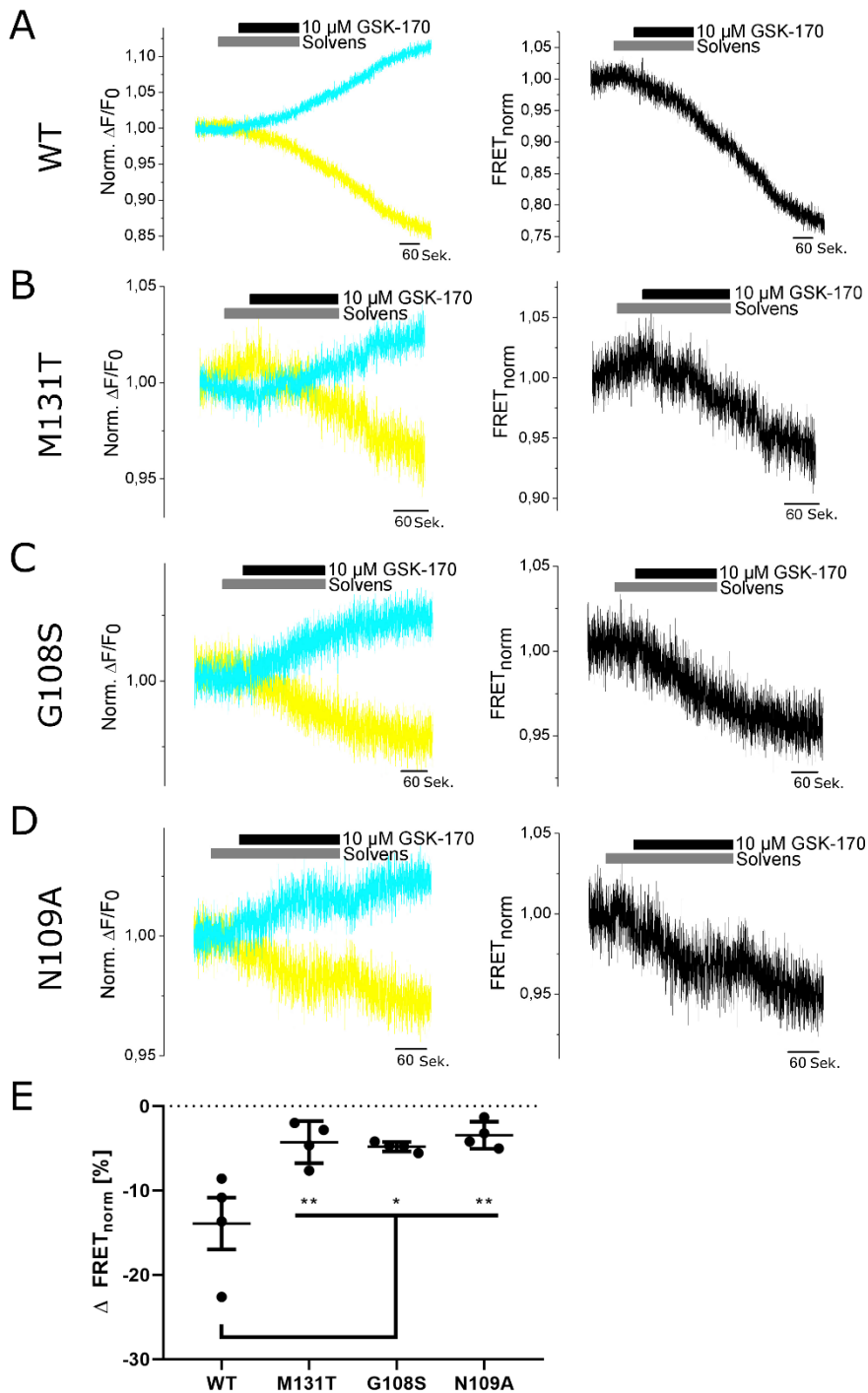


Abbildung 25: Messung GSK-170-induzierter FRET-Abnahmen von WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen in HEK293-Zellen. (A-D) Repräsentative, normalisierte Änderungen der Fluoreszenzemissionen. Aufnahmen des Zeitverlaufs der normalisierten Cerulean- (türkise Linien) und TC-FIAsH- (gelbe Linien) Fluorophoremission (links) und der normalisierten FRET-Quotienten (rechts) von WT- (A) und den mutanten M131T- (B), G108S- (C) und N109A-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen (D) vor und ab Applikation des Solvens (0,1 % DMSO, 0,1 % BSA) und von 10 μ M GSK-170. Die Zellen wurden konstant mit Phenolrot-freiem HBSS perfundiert und nach Erreichen stabiler Emissionswerte beider Fluorophore wurde das Solvens von GSK-170 für ca. 1 Minute appliziert. Anschließend wurde in Solvens gelöstes GSK-170 für ca. 3 Minuten appliziert. Der Aktivator wurde im Anschluss durch Phenolrot-freies HBSS ausgewaschen. Die Emissionswerte von FIAsH und Cerulean wurden jeweils auf den Mittelwert der ersten fünf Messpunkte normalisiert. Die FRET-Werte wurden als das Verhältnis der normalisierten Emissionswerte von FIAsH zu Cerulean berechnet (E) Zusammenfassung der Abnahme der normalisierten FRET-Quotienten. Der FRET-Quotient wurde aus dem Verhältnis der normalisierten Emissionswerte von FIAsH zu Cerulean vor und nach Aktivierung von TRPC6 mit GSK-170 gebildet. Die Abnahme der FRET-Werte

nach Aktivierung mit GSK-170 ist prozentual dargestellt. Die Signifikanz zwischen den FRET-Quotienten der mutanten- zu WT-TRPC6-Kanalproteinen wurde getestet. **** $P < 0.0001$.

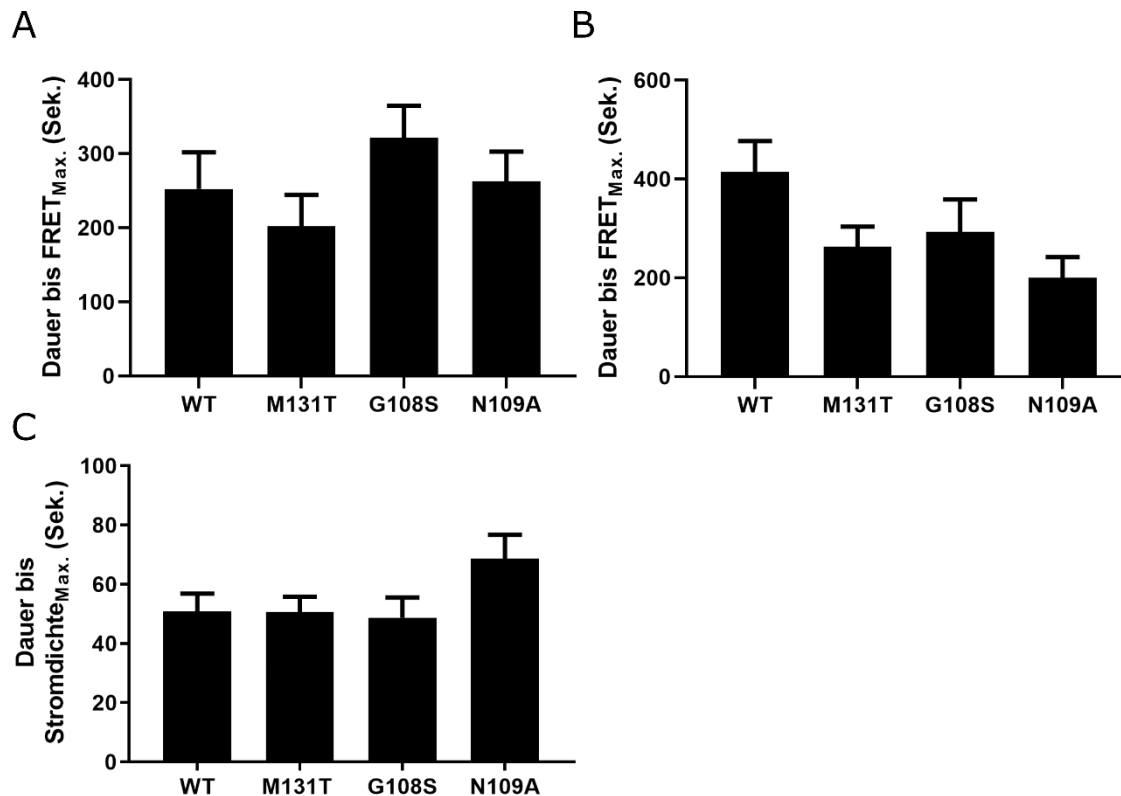


Abbildung 26: Quantifizierung der zeitlichen Kinetiken von OAG- und GSK-170-induzierten FRET-Signalen im Vergleich zu den Kinetiken OAG-induzierter Stromdichten von WT- und mutanten-TRPC6^{TC}-Cerulean-Kanalproteinen in HEK293-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert der Zeit bis zum Erreichen der maximalen FRET-Abnahme nach Zugabe von 100 μ M OAG (A) und 10 μ M GSK-170 (B), sowie der Mittelwert der Zeit bis zum Erreichen der maximalen OAG-induzierten Zunahme der Stromdichte (C). Ein *One-Way ANOVA*-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen in A, B und C. n (A) = 5 – 7, n (B) = 4, n (C) = 6 – 12 Zellen.

3.2 Charakterisierung einer globalen- und konditionalen-TRPC6-defizienten Maus

Neben der molekularen Charakterisierung, sollte nun auch die Rolle des TRPC6-Kanals im Gesamtorganismus untersucht werden. Dafür stand ein etabliertes Mausmodell zur Verfügung, in dem global der TRPC6-Kanal nicht mehr funktionell exprimiert wurde (Dietrich *et al.*, 2005). Für eine Zeit- und Gewebe-abhängige Deletion des TRPC6-Proteins wurde zusätzlich eine kommerziell erhältliche Mauslinie erworben, in der das Exon 2 des Gens von zwei sog. *loxP*-Erkennungsstellen flankiert ist (TRPC6^{fllox}-Maus). Diese Mauslinie wurde nach ihrer Ankunft in unserem Institut mit Mäusen, die die FLP1-Rekombinase ubiquitär exprimieren (Gt(ROSA)26Sor^{tm1(FLP1)}Dym

#009086 Jackson Laboratories), gepaart, um die von zwei FRT-Erkennungsstellen flankierte Neomycin-Resistenzkassette zu entfernen (**Abbildung 10**).

Zur genauen Genotypisierung der Mäuse wurde ein PCR-Protokoll etabliert, um aus genomischer DNA der Schwanzspitzen homozygoter ($TRPC6^{fl/fl}$) und heterozygoter ($TRPC6^{WT/fl}$) $TRPC6^{lox}$ -Mäuse die erste loxP-Stelle links des Exon 2 im $TRPC6$ -Gen zu detektieren. In der genomischen DNA von WT-Mäusen konnte ein PCR-Fragment von ca. 150 bp detektiert werden, während in homozygoten $TRPC6^{fl/fl}$ -Mäusen ein durch die Insertion der loxP-Stelle größeres PCR-Fragment von ca. 250 bp nachgewiesen werden konnte. Für die $TRPC6^{WT/fl}$ -Maus konnten wie erwartet zwei PCR-Fragmente mit einer Größe von ca. 150 und 250 bp detektiert werden (**Abbildung 27 A**).

Für eine initiale globale Exzision des Exons 2 des $TRPC6$ -Gens wurden homozygote $TRPC6^{fl/fl}$ -Mäuse mit einer Mauslinie gepaart, die die Cre-Rekombinase unter dem Promotor für den Sox2-Transkriptionsfaktor ubiquitär exprimieren (Hayashi, Tenzen and McMahon, 2003). In einer weiteren PCR wurde die Exzision des Exon 2 in $TRPC6^{fl/fl}$ -Sox2-Cre-Mäusen untersucht. **Abbildung 27 B** zeigt ein Agarosegel mit den erhaltenen PCR-Produkten. Ein DNA-Fragment von ca. 400 bp wurde in den heterozygoten $TRPC6^{fl/WT}$ und den homozygoten $TRPC6^{fl/fl}$ -Tieren nach Paarung mit dem sog. Sox2-*deleter*-Stamm detektiert und entsteht nur wenn das Exon 2 des $TRPC6$ -Gens entfernt wurde. Die Durchführung der PCR mit genomischer DNA aus WT-Tieren ergab kein PCR-Produkt, da durch das Vorhandensein des Exon 2 der zu amplifizierende DNA-Abschnitt zu groß war. Damit konnte die korrekte Exzision des Exons 2 in den aus der Paarung resultierenden sog. $TRPC6^{\Delta Exon2}$ -Mäusen nachgewiesen werden.

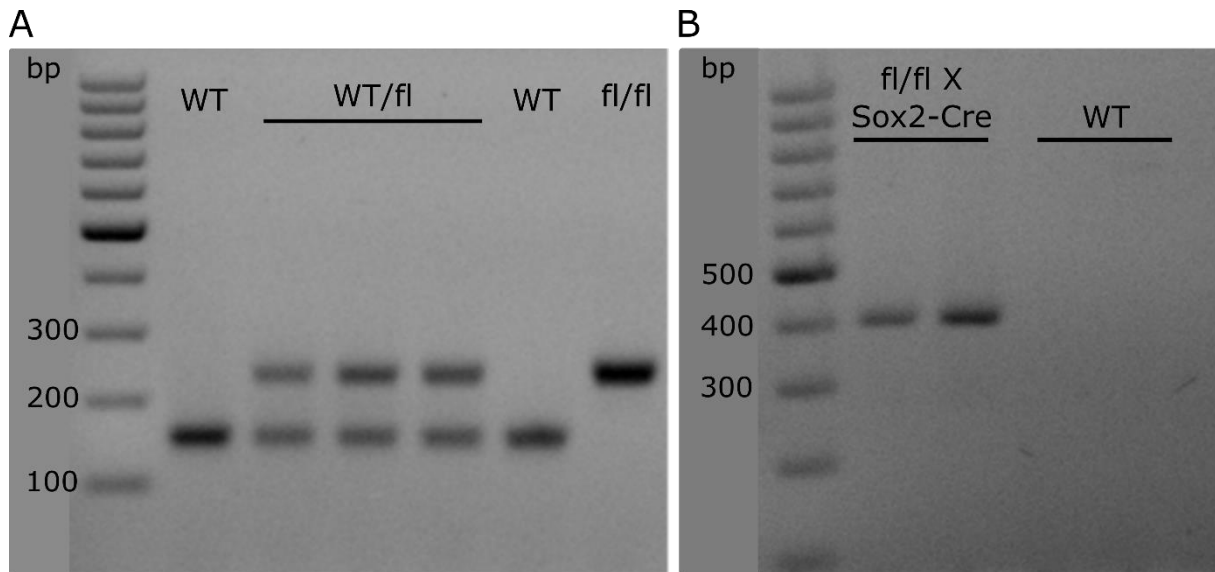


Abbildung 27: Agarosegel mit aufgetrennten PCR-Produkten aus genomischer DNA von WT-, WT/fl-, fl/fl- und fl/fl X Sox2-Cre-Mäusen. Genomische DNA aus Schwanzspitzen von (Wildtyp) WT, WT/floxed (WT/fl), floxed/floxed (fl/fl) Mäusen und aus Mäusen nach Paarung mit einem Sox2-Cre *deleter* Stamm (fl/fl X Sox2-Cre) wurde in einer PCR analysiert. **(A)** In einer PCR wurde mittels spezifischer Oligonukleotide die DNA-Sequenz mit der ersten loxP-Stelle des flankierten Exon 2 von TRPC6 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Die Existenz der loxP-Stelle in WT/fl- und fl/fl-Mäusen wird durch ein 250 bp großes PCR-Produkt nachgewiesen. Das WT-Allel erzeugt ein 150 bp großes PCR-Produkt. **(B)** In einer PCR wurde mittels spezifischer Oligonukleotide in genomischer DNA die Exzision des Exon 2 von TRPC6 in homozygoten fl/fl-Mäusen nach Paarung mit Sox2-Cre-*deleter*-Mäusen ein 400 bp großes DNA-Produkt detektiert. Für WT-Tiere mit intaktem Exon 2 konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Der molekulare Größenmarker ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

Da für nachfolgende Experimente Zellen aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen isoliert und kultiviert werden sollten, wurde zunächst Gewebe der TRPC6-defizienten Mauslinien im *Western Blot* analysiert. Mit der TRPC6^{fl/fl}-Mauslinie soll in Zukunft in *in-vivo*-Experimenten die gewebsspezifische Rolle von TRPC6-Kanälen untersucht werden. Dazu werden Mäuse, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors exprimieren (z.B. *Surfactant protein C* (SP-C)-Cre für ATII- und Cadherin 5 (*Cdh-5*) für Endothel-Zellen), kommerziell erworben. Durch Kreuzung mit SPC-Cre- und *Cdh5*-Cre-Mäusen sollen zukünftig ATII- und Endothelzell-spezifische TRPC6-defiziente-Mäuse generiert werden.

Proteinlysate von mit TRPC6-EGFP transfizierten HEK293-Zellen, sowie von TRPC6^{-/-} und WT-Lungen wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem *Western Blot* auf eine Expression des TRPC6-Proteins untersucht. Für das HEK293-TRPC6-EGFP Zelllysate konnten zwei Proteinbanden von ca. 110 kDa (natives TRPC6) und 140 kDa (TRPC6-EGFP) Größe mit dem TRPC6-spezifischen Antikörper detektiert werden. In dem TRPC6^{-/-}-Lungenlysate konnte kein und im WT-Lungenlysate ein TRPC6-Protein mit einer Größe von ca. 110 kDa nachgewiesen werden. Als

Ladekontrolle wurde in allen Lysaten die Expression von β -Aktin von ca. 42 kDa untersucht (**Abbildung 28 A**).

In gleicher Weise wurden TRPC6 ^{Δ Exon2}-Lungenlysate aus den TRPC6^{fl/fl}-Mäusen nach Paarung mit der Sox2-Cre-Maus in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem anschließenden *Western Blot* auf die Expression von TRPC6 untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl in den globalen TRPC6^{-/-}, als auch in den TRPC6 ^{Δ Exon2}-Lungen kein TRPC6-Protein mehr detektiert werden konnte. In WT-Lungen konnte hingegen TRPC6-Protein im Proteinlysat mit einer Proteingröße von ca. 110 kDa nachgewiesen werden (**Abbildung 28 B**). Das als Ladekontrolle dienende *housekeeping*-Gen β -Aktin mit einer Proteingröße von ca. 42 kDa konnte in allen drei Lungenlysaten detektiert werden.

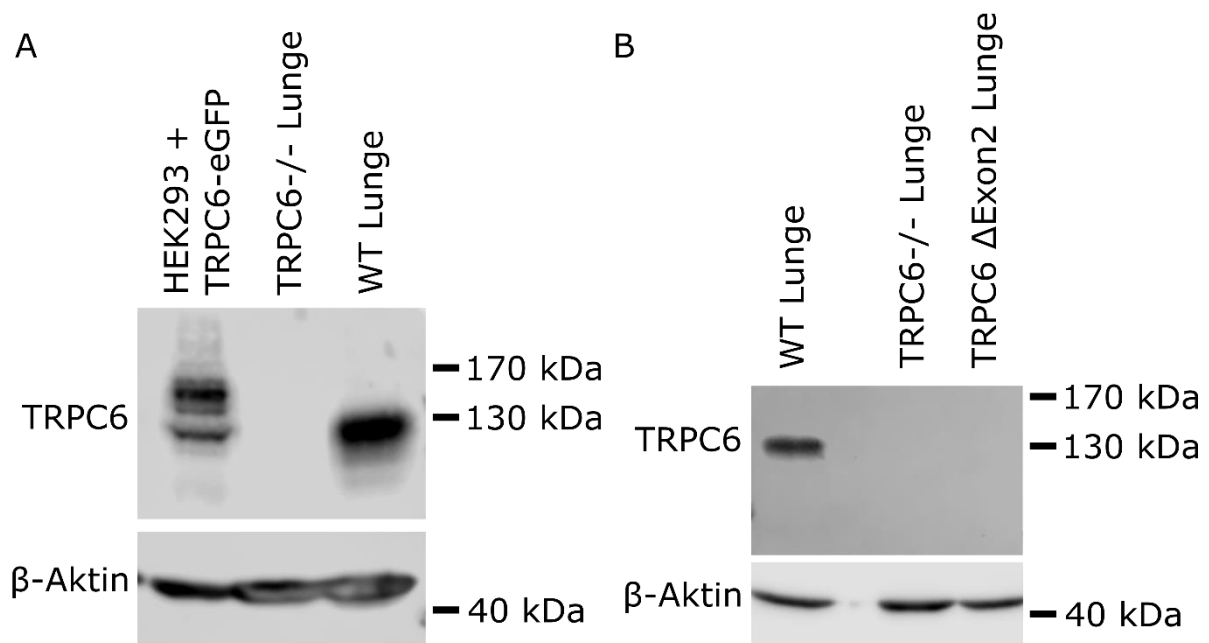


Abbildung 28: Nachweis der TRPC6-Protein-Expression in murinen Lungenlysaten mittels *Western Blot*-Analyse. (A) Proteinlysat aus WT- und TRPC6^{-/-}-Mäuselungen, sowie aus HEK293-Zellen, die mit murinem TRPC6-EGFP transfiziert wurden, wurde in einem *Western Blot* mit anti-TRPC6- und anti- β -Aktin-Antikörpern (als Ladekontrolle) analysiert. (B) Lungenlysat aus WT-, TRPC6^{-/-} und TRPC6 ^{Δ Exon2}- Mäusen wurden in einem *Western Blot* mit anti-TRPC6 und anti- β -Aktin-Antikörpern (als Ladekontrolle) analysiert. Der molekulare Größenmarker ist in Kilodalton angegeben (kDa).

3.3 Rolle von TRPC6-Kanälen in ATII-Zellen und für die Migration von primären Lungenfibroblasten

Während der Ausbildung einer Lungenfibrose kommt es durch Differenzierung verschiedenster Zelltypen zu Myofibroblasten, zur Akkumulation von extrazellulären

Matrixproteinen, die den Gasaustausch durch die alveolokapilläre Membran behindern und die Lungenarchitektur zerstören können (s. 1.4.1). Die Beteiligung von TRPC6 an der Fibroblasten-zur-Myofibroblasten-Differenzierung konnte durch unsere Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen werden (Hofmann *et al.*, 2017). Ziel war es nun zu untersuchen, ob der TRPC6-Kanal auch einen Einfluss auf die Generierung von Epithelzellen mit mesenchymalen Phänotyp, durch die epithelial-mesenchymale-Transition von ATII-Zellen und auf die Migration alveolärer Epithelzellen und pulmonaler Fibroblasten hat.

3.3.1 Charakterisierung und TRPC-Genexpressionsanalyse von primären murinen ATII-Zellen

Murine ATII-Zellen aus WT-Mäusen wurden 72 Std. nach Isolation fixiert und mittels Immunfluoreszenz auf die Expression spezifischer Marker hin untersucht. Die isolierten ATII-Zellen wuchsen in typischen Zellverbänden (**Abbildung 29** Pfeile) und konnten durch die Expression des Vorläuferproteins für *Surfactant protein-C* (SP-C), *Prosurfactant protein-C* (pro SP-C) nachgewiesen werden (**Abbildung 29**). SP-C und dessen Vorläuferprotein werden ausschließlich von ATII-Zellen neben dem Epithelzell-Marker E-Cadherin exprimiert (**Abbildung 29**). Auf diese Weise konnten alveoläre Epithelzellen des Typ II eindeutig identifiziert werden.

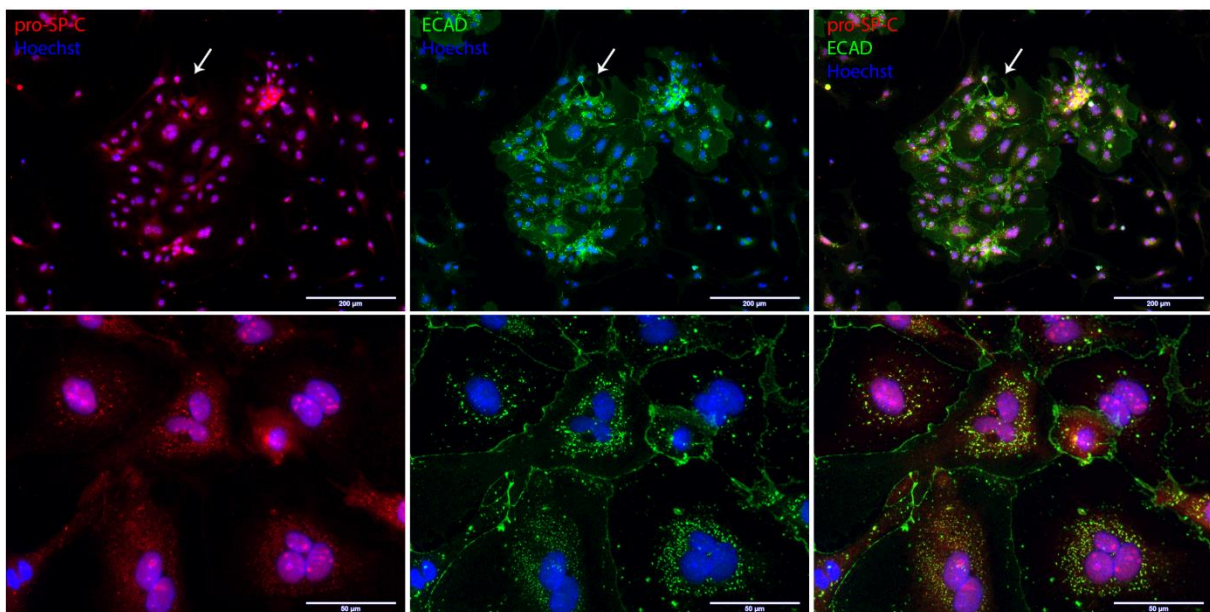


Abbildung 29: Charakterisierung von murinen ATII-Zellen mittels Immunfluoreszenz. Primäre murine ATII-Zellen wurden drei Tage nach Isolation in 3,7 % Formaldehyd fixiert und mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen den Epithelzellmarker E-Cadherin (anti-ECAD, anti-Maus:FITC, grün) und den ATII-Zell-Marker Prosurfactant protein-C (anti-pro-SP-C, anti-Kaninchen:Dylight549, rot) angefärbt. Die Zellkerne wurden durch

Hoechst-Farbstoff identifiziert (blau). ATII-Zellen wachsen in charakteristischen Zellverbänden (s.Pfeile) und sind positiv für ECAD und pro-SP-C. Der Maßstab entspricht 50 μm .

Aus den murinen ATII-Zellen wurde zur Untersuchung der Gen-Expression von TRPC-Kanälen RNA isoliert und eine *quantitative reverse-transcription (qRT)-PCR* durchgeführt. Die Analyse des Expressionsprofils ergab für TRPC1- und TRPC6-mRNA die stärkste Expression innerhalb der TRPC-Familie (**Abbildung 30**). Wobei die auf β -Aktin-mRNA normalisierte TRPC1-mRNA-Expression ca. 4 – 5 Mal höher als die normalisierte Expression von TRPC6-mRNA ist.

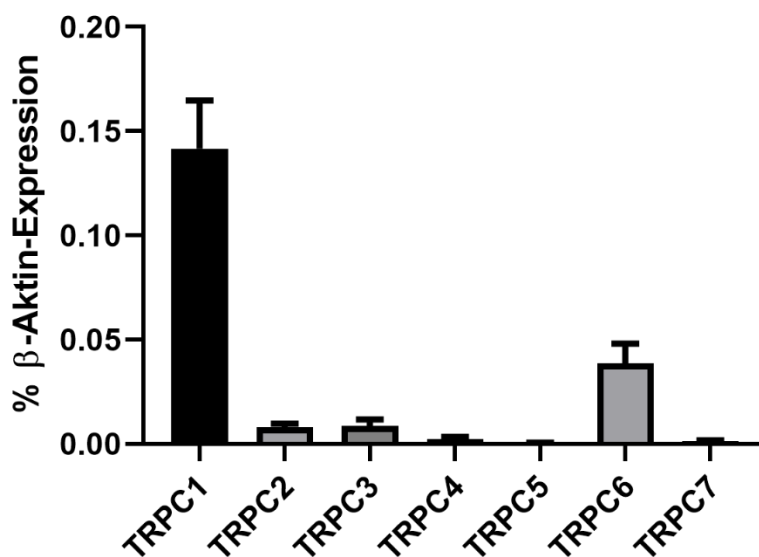


Abbildung 30 TRPC-mRNA-Expressionsanalyse in murinen ATII-Zellen. CDNA aus WT-ATII-Zellen wurde mittels spezifischer Oligonukleotide in einer *quantitative reverse-transcription (qRT)-PCR* auf die Expression von TRPC1 – TRPC7 mRNA analysiert. Die Expressionsraten wurden auf die Expression der mRNA für das Haushaltsgen β -Aktin normalisiert. TRPC1- und TRPC6-mRNA werden vorwiegend in primären ATII-Zellen exprimiert. N = 3 Zellisolationen aus insgesamt 15 Mäusen.

3.3.2 Genexpressionsanalyse von WT- und TRPC6-defizienten-ATII-Zellen nach TGF β -induzierter Epithelial-mesenchymaler-Transition

WT- und TRPC6^{-/-}-ATII Zellen wurden für 24 Std. mit dem profibrotischen Mediator TGF- β 1 behandelt, um eine durch TRPC6 regulierte Epithelial-mesenchymale-Transition zu untersuchen. Eine Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR zeigte eine signifikante Hochregulation von α -SMA in mit TGF- β 1-behandelten WT-ATII-Zellen im Vergleich zu mit Solvens-behandelten WT-ATII-Zellen (**Abbildung 31 A**). Die Untersuchung der α -SMA-mRNA-Expression in TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen, ergab ebenfalls eine signifikante Hochregulation von α -SMA in den mit TGF- β 1-behandelten TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen im Vergleich zu mit Lösungsmittel-behandelten TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen. Zwischen den WT- und TRPC6^{-/-}-TGF- β 1-stimulierten ATII-Zellen konnte kein

signifikanter Unterschied festgestellt werden (**Abbildung 31 A**). Die mRNA-Expression von TRPC6 wurde ebenfalls analysiert, um eine TGF- β 1-induzierte Hochregulation des Kanals in den ATII-Zellen zu untersuchen. Der Vergleich von WT-ATII-Zellen, die 24 Std. mit Solvens behandelt wurden, mit WT-ATII-Zellen die im gleichen Zeitrahmen mit TGF- β 1 behandelt wurden, zeigte keinen signifikanten Unterschied der TRPC6-mRNA-Expression. Ebenso konnte keine signifikante Änderung der TRPC6-mRNA-Expression zwischen Solvens- und TGF- β 1-behandelten TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen detektiert werden (**Abbildung 31 B**).

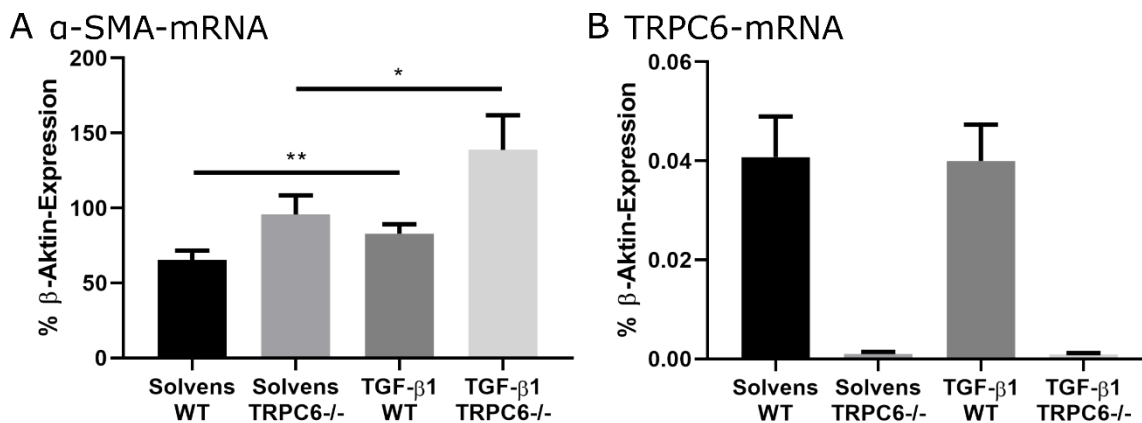


Abbildung 31: MRNA-Expressionsanalyse nach TGF- β 1-induzierter epithelialer-mesenchymaler-Transition (EMT) in ATII-Zellen. (A,B) WT- und TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen wurden 24 Std. mit 2 μ g/ml TGF- β 1 oder 0,1 % BSA (Solvens) behandelt und mittels spezifischer Oligonukleotide in einer qRT-PCR auf die Expression von α -SMA- (A) und TRPC6-mRNA (B) analysiert. Die mRNA-Expressionsraten wurden auf die Expression der mRNA für das Haushalts-Gen β -Aktin normalisiert. N = 6 Zellpräparationen aus insgesamt 30 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit * für P<0.05 und ** für P<0.01 gekennzeichnet.

3.3.3 Analyse der Proteinexpression in WT- und TRPC6-defizienten-ATII-Zellen nach TGF- β 1-induzierter epithelial-mesenchymaler-Transition

Um den Einfluss von TRPC6 während der TGF- β 1-induzierten Differenzierung von ATII-Zellen in Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp zu untersuchen, wurde eine Hochregulation von TRPC6-Kanalprotein und α -SMA (für *α smooth muscle actin* = Muskelaktin der glatten Muskelzellen) auf Proteinebene untersucht.

Proteinlysate von mit Kontrollpuffer- und TGF- β 1-behandelten WT-ATII-Zellen, wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot auf die Expression von TRPC6, α -SMA und des Vinkulins als Haushaltsprotein analysiert. TRPC6 konnte mittels spezifischer Antikörper in den mit Solvens- und TGF- β 1-behandelten ATII-Zellen mit einer Proteingröße von ca. 110 kDa nachgewiesen werden (**Abbildung 32**). Die qualitative Auswertung ergab jedoch keinen Unterschied in der Expressionsrate

von TRPC6-Protein in den mit Solvens- und TGF- β 1-behandelten Zellen. α -SMA-Protein mit einer Größe von ca. 42 kDa wurden in mit Kontrollpuffer-behandelten WT-ATII-Zellen deutlich schwächer exprimiert, als in TGF- β 1-stimulierten WT-ATII-Zellen. Als Ladekontrolle diente das durch spezifische Antikörper erkannte Haushaltsprotein Vinkulin mit einer Größe von ca. 116 kDa (**Abbildung 32**).

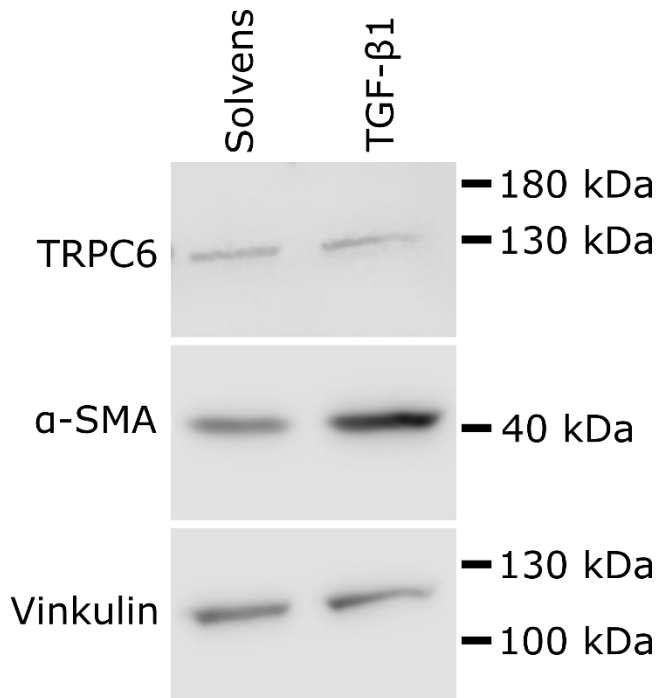
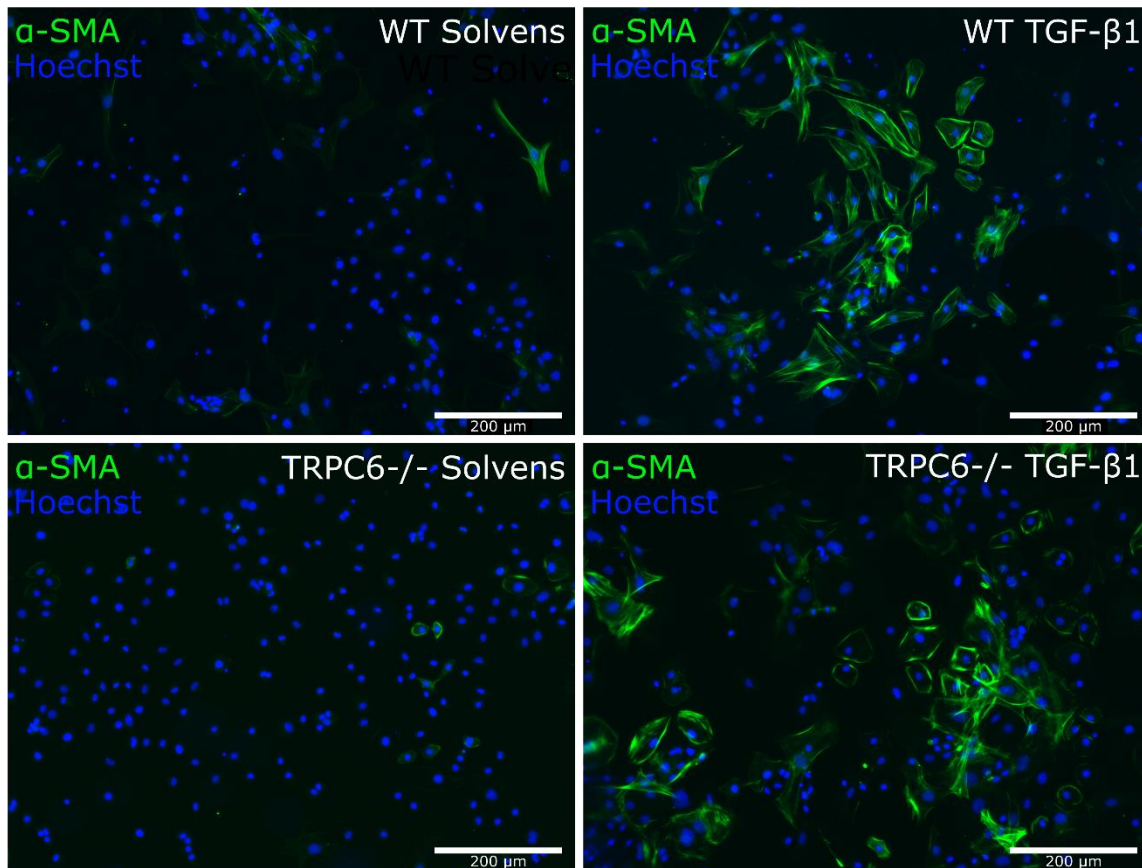


Abbildung 32: Analyse der Proteinexpression in ATII-Zellen nach TGF- β 1-induzierter epithelialer mesenchymaler Transition (EM) mittels Western Blot. WT-ATII-Zellen wurden 24 Std. mit 2 μ g/ml TGF- β 1 oder 0,1 % BSA (Solvens) stimuliert. Proteinlysate aus den Zellen wurden in einem Western Blot mit anti-TRPC6-, anti- α -SMA- und anti-Vinkulin-Antikörpern analysiert. TRPC6 zeigt eine Proteingröße von 110 kDa, α -SMA 42 kDa und das als Ladekontrolle detektierte Vinkulin 116 kDa in allen Proteinlysaten. Der molekulare Größenmarker ist in Kilodalton angegeben (kDa).

Um die α -SMA-Expression immunzytochemisch in WT- und TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen nach Behandlung mit TGF- β 1 zu analysieren, wurden Zellen nach der Behandlung fixiert und mit einem spezifischem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gegen α -SMA angefärbt. Der Anteil an α -SMA-positiven-Zellen an der Gesamtheit der Zellen (Hochst-positiven) wurde im Anschluss quantifiziert. In **Abbildung 33 A** sind repräsentative Aufnahmen von mit Solvens- und TGF- β 1-behandelten WT- und TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen dargestellt. Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Anstieg der α -SMA-positiven Zellen nach Behandlung mit TGF- β 1 in WT-, sowie in TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen. (**Abbildung 33 B**). Aus diesem Grund ist es eher unwahrscheinlich, dass TRPC6-Kanäle in ATII-Zellen eine wichtige Rolle für die α -SMA-Expression während der EMT haben.

A



B

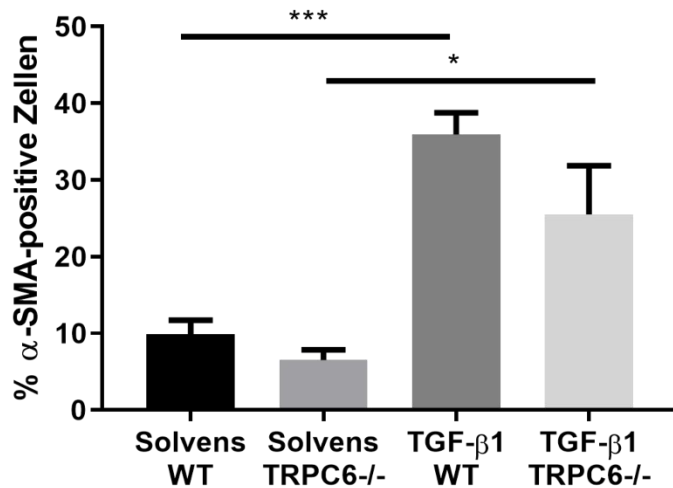


Abbildung 33: Proteinanalyse nach TGF- β -1-induzierter EMT in ATII-Zellen mittels Immunofluoreszenz. Primäre murine WT- und TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen wurden 24 Std. mit 2 μ g/ml TGF- β 1 oder 0,1 % BSA (Solvens) stimuliert und in 3,7 % Formaldehyd fixiert. **(A)** WT- und TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen wurden gegen α -SMA (anti- α -SMA, anti-mouse:FITC, grün) angefärbt. Die Zellkerne wurden durch Hoechst gegengefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 200 μ m. **(B)** Der Anteil an α -SMA-positiven-Zellen von der Gesamtanzahl der Zellen (Hoechst-positiv) wurde bestimmt und auf Signifikanz zwischen Solvens- und TGF- β 1-behandelten Zellen innerhalb von WT- und TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen, sowie zwischen TGF- β 1-behandelten WT- und TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen getestet. N (WT) = 4 (20 Mäuse), n (TRPC6^{-/-}) = 5 (25 Mäuse) *P<0.05, **P<0.01.

3.3.4 Analyse der Migration von WT- und TRPC6-defizienten-ATII → ATI-Zellen

ATII-Zellen können *in-vitro* nach sechstägiger Kultur in Plastikschaalen in ATI-Zellen differenzieren (ATII → ATI) und beschädigte Zellen ersetzen (Mutze *et al.*, 2015). Um einen möglichen Effekt von TRPC6-Kanälen auf die Migration der ATII → ATI-Zellen zu untersuchen, wurden diese alveolaren Epithelzellen in spezielle Silikoneinsätze, die in der Mitte eine Trennfläche enthalten, ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Silikoneinsätze mit Trennfläche entfernt und die Migration der Zellen in die entstandene freie Fläche durch Aufnahmen an einem Phasenkontrastmikroskop dokumentiert. Repräsentative Aufnahmen für WT- und TRPC6^{-/-}-ATII → ATI-Zellen sind für die Zeitpunkte 0, 12 und 24 Std. nach Entfernung der Einsätze in **Abbildung 34 A** dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die prozentuale freie Fläche der Ausgangsfläche zum Zeitpunkt 0, 1, 3, 5, 8, 12 und 24 Std. nach Ablösen der Einsätze bestimmt. Es wurde auf Signifikanz zwischen WT- und TRPC6^{-/-}-ATII → ATI-Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten getestet, jedoch keine Signifikanz festgestellt (**Abbildung 34 B**).

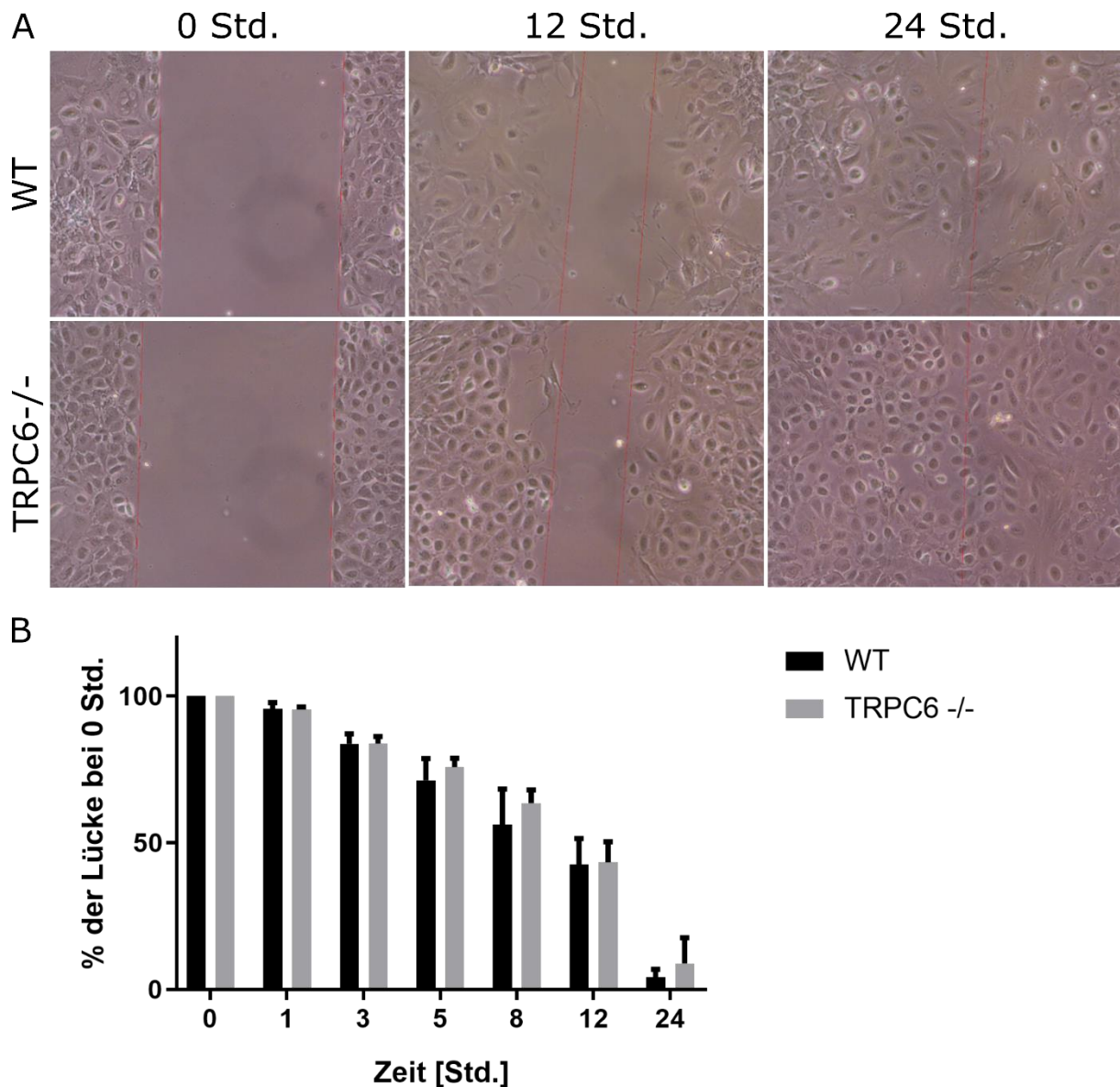


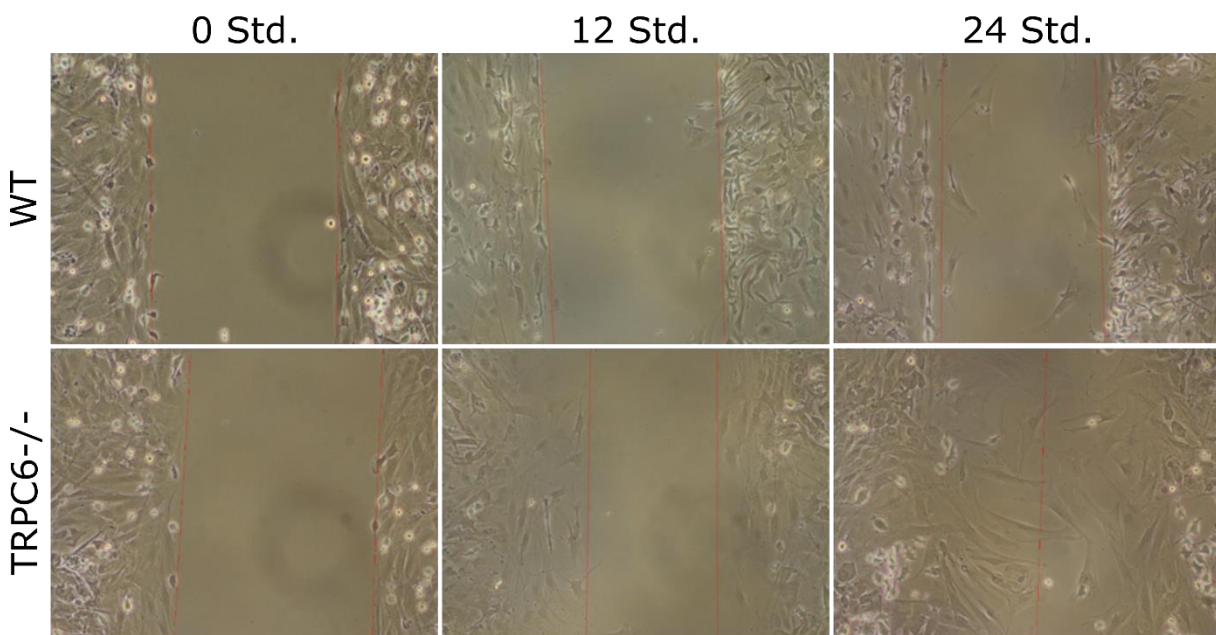
Abbildung 34: Quantifizierung der Zellmigration in WT- und TRPC6^{-/-}-ATI → ATI-Zellen. Repräsentative Aufnahmen zeigen WT- und TRPC6^{-/-}-ATI → ATI-Zellen 0, 12 und 24 Std. nach dem Entfernen der Silikoneinsätze und der Freigabe einer Lücke im Zellrasen. Für die Auswertung wurde die verbleibende Lücke prozentual zur Anfangsgröße bei 0 Std. gemessen. N=3 Zellpräparationen aus insgesamt 15 Mäusen

3.4 Analyse der Migration von WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten

Während der Ausbildung einer Lungenfibrose differenzieren Fibroblasten zu Myofibroblasten und migrieren in entzündete Bereiche der Lunge. Um einen möglichen Einfluss von TRPC6 bei der Migration von Lungenfibroblasten zu untersuchen, wurden WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten wie in **Absatz 3.3.4** beschrieben, in Silikoneinsätze ausgesät und nach 0, 5, 8, 12 und 24 Std. mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Repräsentative Aufnahmen für WT- und

TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten sind für die Zeitpunkte 0, 12 und 24 Std. nach Entfernung der Einsätze in **Abbildung 35 A** dargestellt. Zwischen WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten konnte keine Signifikanz zum Zeitpunkt 5, 8 und 12. Std. nach Ablösen der Silikoneinsätze detektiert werden. Zum Zeitpunkt 24 Std. nach Entfernen der Einsätze konnte eine signifikant schnellere Migration der TRPC6^{-/-} im Vergleich zu den WT-Lungenfibroblasten festgestellt werden (**Abbildung 35 B**). Die Migration von WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten wurde ebenso nach Stimulation mit TGF- β 1 untersucht. Es konnte jedoch keine TGF- β 1-induzierte Veränderung der Migration beobachtet werden (**Abbildung 35 B**).

A Solvens



B

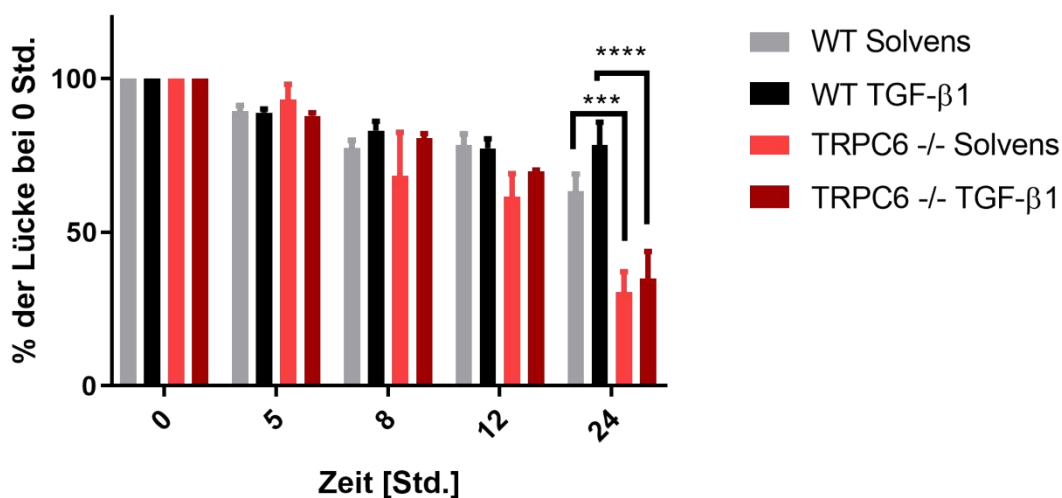


Abbildung 35: Quantifizierung der Zellmigration in WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten. Repräsentative Aufnahmen zeigen mit Solvens-behandelte WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten 0, 12 und 24 Std. nach dem Entfernen der Silikoneinsätze und der Freigabe einer Lücke im Zellrasen. Für die Auswertung wurde die verbleibende Lücke in mit TGF- β 1- oder Kontrollpuffer-behandelten Zellen prozentual zur Anfangsgröße bei 0 Std. gemessen. N=3 Zellpräparationen aus insgesamt 15 Mäusen. Es wurde auf Signifikanz zwischen WT- und TRPC6^{-/-}

^{-/-}-pmLF zu den verschiedenen Zeitpunkten getestet und ein signifikanter Unterschied nach 24 Std. festgestellt. Ebenso wurde auf Signifikanz zwischen Solvens- und TGF- β 1-behandelten pmLF getestet und kein signifikanter Unterschied festgestellt. ***P<0.001.

3.5 Rolle von TRPC6-Kanälen während der Ausbildung einer Strahlen-induzierten Lungenfibrose

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass der TRPC6-Kanal eine wichtige Rolle für die Ausbildung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose im Mausmodell spielt, da TRPC6-defiziente Mäuse teilweise vor der Fibrose geschützt sind (Hofmann *et al.*, 2017). Dieses gut etablierte Mausmodell hat jedoch den Nachteil, dass Nagetiere nur eine reversible Form der Lungenfibrose ausbilden (zusammengefasst in Moore and Hogaboam, 2008), im Menschen nach Zytostatika-Behandlung mit Bleomycin aber die irreversible Form auftritt.

Aus diesem Grund sollte nun die Funktion von TRPC6 in einem klinisch relevanten Modell der Lungenfibrose analysiert werden. Zur Standardtherapie von Patienten mit Bronchialkarzinom (Haffty *et al.*, 1988) gehört derzeit eine Bestrahlung der Tumore, aber auch bei der Strahlentherapie von Mamma- oder Ösophaguskarzinomen liegt die Lunge, eines der strahlungsempfindlichsten Organe, im Strahlenfeld. Zu den durch Strahlung induzierten Nebenwirkungen zählt insbesondere die strahlungsinduzierte Pneumonitis (Tucker *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2007), die im weiteren Verlauf zu einer Fibrosierung des Lungengewebes führen kann. Die Pneumonitis, sowie die daraus resultierende Fibrose sind Dosis-limitierende Nebenwirkungen und schränken die Heilungsaussichten sowie das Wohlergehen der Patienten nach Thorax-Bestrahlung massiv ein, da die zur effektiven Tumorkontrolle erforderliche Dosis nicht vollständig appliziert werden kann und die Lungenfunktion signifikant kompromittiert ist (Seppenwoolde *et al.*, 2004).

Im Mausmodell sind C57Bl/6-Mäuse besonders strahlenempfindlich (zusammengefasst in Moore and Hogaboam, 2008) und eignen sich für eine translationale Analyse der Rolle von TRPC6-Kanälen für die Strahlen-induzierte Lungenfibrose. Für die Erstellung eines Tierversuchsantrags sollten deswegen im Rahmen meiner Doktorarbeit, Vorarbeiten mit primären pulmonalen Fibroblasten aus WT- und TRPC6^{-/-}-Mäusen durchgeführt werden, um Hinweise auf eine ähnliche Rolle von TRPC6-Kanälen für die strahleninduzierte Lungenfibrose in beiden Zelltypen zu erhalten. Die primären murinen Lungenfibroblasten wurden mit unterschiedlich starken

Strahlendosen behandelt und 4 Tage danach mittels Genexpressions-, Proteinanalyse und in funktionellen Tests untersucht.

3.5.1 TRPC-Genexpressionsanalyse von bestrahlten WT-Lungenfibroblasten

Zur Quantifizierung spezifischer mRNAs während einer strahlungsinduzierten Differenzierung von Lungenfibroblasten in Myofibroblasten wurden primäre Lungenfibroblasten aus WT-Mäusen mit 0, 4 und 10 Gy bestrahlt und 4 Tage danach RNA aus den Zellen zur mRNA-Expressionsanalyse isoliert. Da vor allem TRPC1- und TRPC6-mRNA in primären murinen Lungenfibroblasten exprimiert werden (Hofmann *et al.*, 2017), wurden diese mRNAs mit Hilfe der Nanostring®-Technologie analysiert. Für die auf mRNAs für vier Haushaltsgene normalisierten *counts* der TRPC1-mRNA konnte kein signifikanter Unterschied in mit 0 und 4 Gy und 10 Gy bestrahlten Lungenfibroblasten festgestellt werden (**Abbildung 36 A**). Für die TRPC6-mRNA-Expression konnte hingegen ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression nach einer Bestrahlung mit 4 und 10 Gy im Vergleich zur Kontrolle mit 0 Gy detektiert werden (**Abbildung 36 B**). Hiermit konnte nachgewiesen werden, dass TRPC6 auf RNA-Ebene durch ionisierende Strahlung hochreguliert wird.

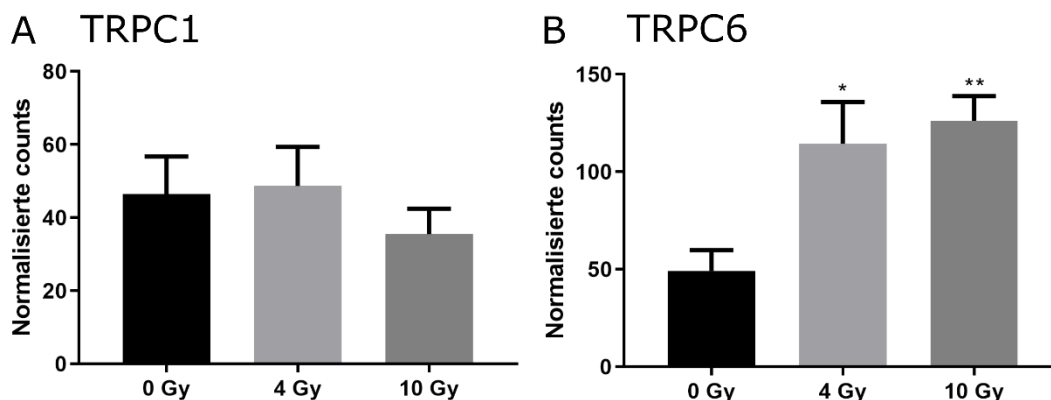


Abbildung 36: Direkte mRNA-Expressionsanalyse von mit ionisierender Strahlung behandelten primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) mittels Nanostring®-nCounter-Technologie. WT-pmLF wurden mit einer Strahlendosis von 0, 4 und 10 Gy behandelt. Vier Tage nach Bestrahlung wurde RNA aus den Zellen isoliert und mittels der Nanostring®-nCounter-Technologie auf die mRNA Expression von TRPC1- und TRPC6-Kanälen untersucht. **(A)** Expression von TRPC1-mRNA in mit 0, 4 und 10 Gy bestrahlten pmLF. **(B)** Expression von TRPC6-mRNA in mit 0, 4 und 10 Gy bestrahlten pmLF. Die ermittelten *counts* wurden auf die mRNA-Expression der Haushaltsgene β -Aktin, β 2-Mikroglobulin, GAPDH und SDHA normalisiert. Signifikante Unterschiede sind mit * für $P<0.05$ und ** für $P<0.01$ gekennzeichnet. $N = 3$ Zellpräparation aus 3 Mäusen.

3.5.2 Genexpressionsanalyse von Myofibroblasten-Markern in WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten nach Bestrahlung

Um eine Beteiligung von TRPC6-Kanälen während der strahlungsinduzierten Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten zu untersuchen, wurde 4 Tage nach Bestrahlung von WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten RNA aus den Zellen isoliert und in einer *qRT-PCR* die mRNA-Expression von den Myofibroblastenmarkern α -SMA und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), sowie die von TRPC6 untersucht. Der Vergleich der mRNA-Expression von α -SMA in mit 4 und 10 Gy bestrahlten Lungenfibroblasten mit den unbehandelten (0 Gy) Zellen zeigte eine signifikante Hochregulation nach Bestrahlung mit 4 und 10 Gy in WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten (**Abbildung 37 A**). Dabei war die mRNA-Expression von α -SMA nach der Behandlung mit 4 Gy signifikant geringer in TRPC6^{-/-} als in WT-Lungenfibroblasten (**Abbildung 37 A**). Die Gegenüberstellung des mRNA-Expressionslevel von PAI-1 der mit 4 und 10 Gy bestrahlten Lungenfibroblasten mit der von mit 0 Gy behandelten Zellen zeigte eine signifikante Hochregulation nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 und 10 Gy in WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten (**Abbildung 37 B**). Zwischen den WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten konnte kein signifikanter Unterschied der PAI-1-mRNA-Expression nach Bestrahlung mit 4 und 10 Gy festgestellt werden (**Abbildung 37 B**). TRPC6^{-/-}-Fibroblasten zeigten aber eine verminderte, jedoch nicht signifikant geringere Expression von PAI-1 nach Bestrahlung mit 4 Gy. TRPC6 mRNA wurde dosisabhängig nach Bestrahlung in den Fibroblasten vermehrt exprimiert (**Abbildung 37 C**), was die mit der Nanostring® *nCounter* Technologie ermittelten Daten bestätigt (**Abbildung 36 B**).

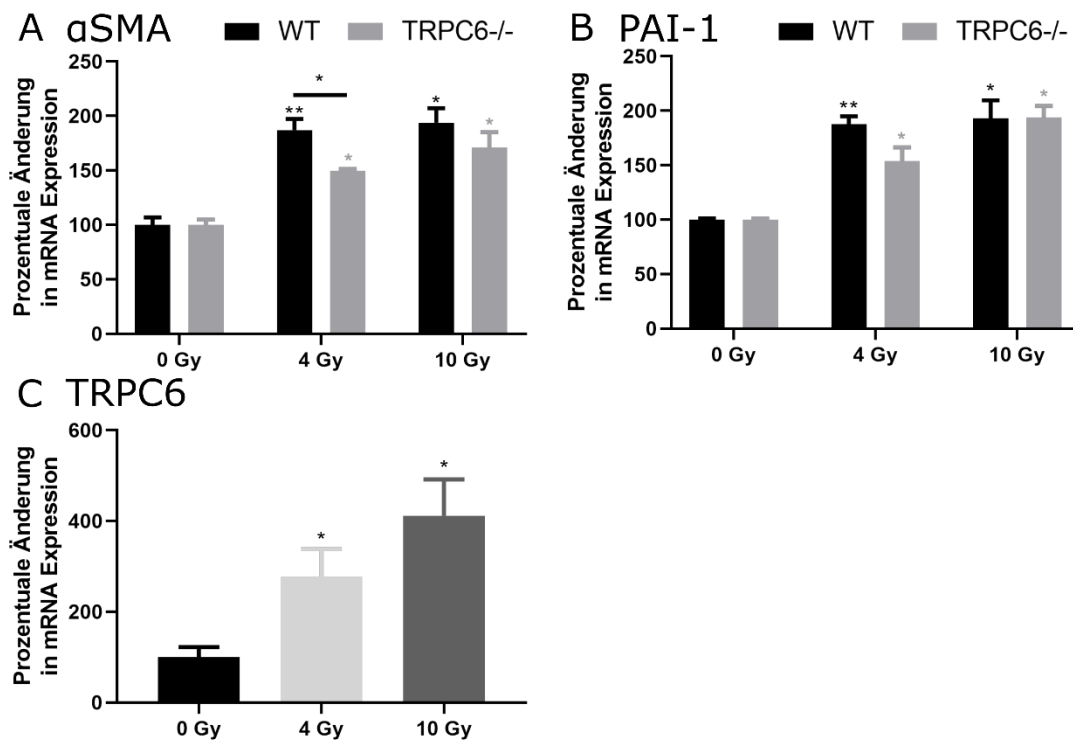


Abbildung 37 : mRNA-Expressionsanalyse von mit ionisierender Strahlung behandelten primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) mittels qRT-PCR. WT- und TRPC6^{-/-}-pmLF wurden mit einer Dosis von 0, 4 und 10 Gy bestrahlt. Vier Tage nach Bestrahlung wurde RNA aus den Zellen isoliert und mittels spezifischer Oligonukleotide in einer qRT-PCR auf die Expression von mRNA der Fibrose-Marker-Proteine und TRPC6 untersucht. **(A)** Expression von α -SMA-mRNA in mit 0, 4 und 10 Gy bestrahlten WT- und TRPC6^{-/-}-pmLF. **(B)** Expression von PAI-1 in mit 0, 4 und 10 Gy bestrahlten WT- und TRPC6^{-/-}-pmLF. **(C)** Expression von TRPC6-mRNA in mit 0, 4 und 10 Gy bestrahlten WT-pmLF. Die Expressionsraten wurden auf die Expression der mRNA des Haushaltsproteins β -Aktin normalisiert. Signifikante Unterschiede sind mit * für $P < 0,05$ und ** für $P < 0,01$ gekennzeichnet. N = 3 Zellpräparationen aus 3 Mäusen.

3.5.3 Quantifizierung des Hydroxyprolinegehalts in WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten nach Bestrahlung

Zur Bestimmung des Kollagengehalts in Zelllysaten von Lungenfibroblasten, die mit Dosen von 0, 4 und 10 Gy bestrahlt wurden, wurde der Hydroxyprolinegehalt 4 Tage nach Behandlung mittels *High performance liquid chromatography (HPLC)* bestimmt. In WT-Fibroblasten wurde ein signifikanter dosisabhängiger Anstieg des normalisierten Hydroxyprolinegehaltes bei Bestrahlung mit 4 und 10 Gy im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachgewiesen (**Abbildung 38**). In TRPC6^{-/-}-Fibroblasten konnte nach Bestrahlung mit 4 Gy kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (0 Gy) detektiert werden, während eine Strahlendosis von 10 Gy einen signifikanten Anstieg des Hydroxyprolinegehaltes induzierte (**Abbildung 38**).

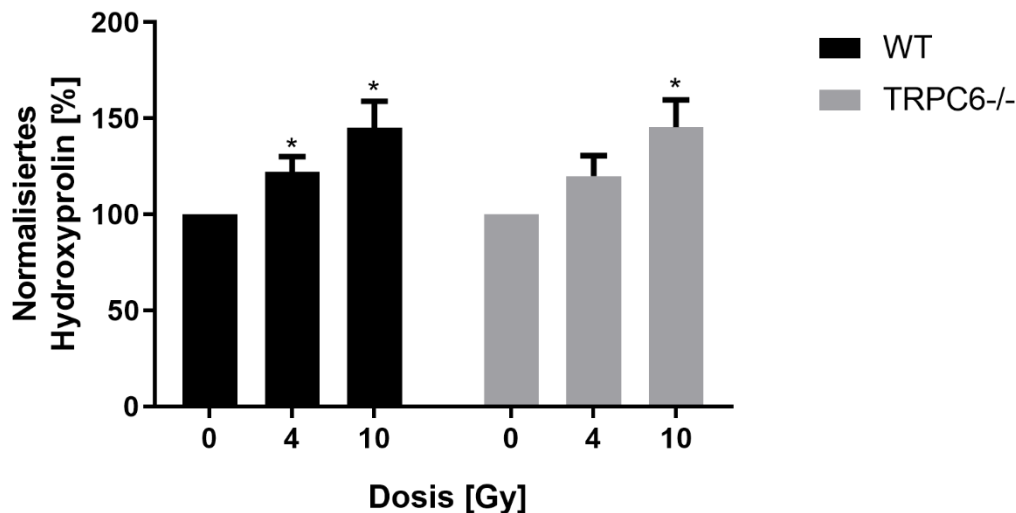


Abbildung 38: Quantifizierung von Hydroxyprolin in mit ionisierender Strahlung behandelten primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) mittels *High performance liquid chromatography (HPLC)*. WT- und TRPC6^{-/-}-pmLF wurden mit einer Dosis von 0, 4 und 10 Gy bestrahlt. Vier Tage nach Bestrahlung wurde eine saure Hydolyse der Zellen durchgeführt, das Hydroxyprolin chemisch derivatisiert und mittels HPLC gemessen. Signifikante Unterschiede sind mit * für $P < 0.05$ gekennzeichnet. $N = 3$ Zellpräparationen aus 3 Mäusen.

3.5.3.1 Quantifizierung der Proliferationsrate von WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten

Um eine evtl. veränderte Proliferationsrate der TRPC6-defizienten Lungenfibroblasten zu identifizieren, wurde der Anteil an proliferierenden Zellen mittels Einbau des Thymidinanalogons EdU in die replizierte DNA und anschließender Markierung mit einem Fluorophor (Alexa Fluor 488) durch eine sog. *Click-iT*-Reaktion bestimmt. Durch den Einbau von EdU in die DNA während der Synthesephase werden die Zellkerne proliferierender Zellen markiert. Durch Anfärbung aller Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst kann dann der Anteil an proliferierenden, EdU-positiven Zellen bestimmt werden. In **Abbildung 39 A** werden repräsentative Aufnahmen der EdU-Alexa 488-markierten, der Hoechst-markierten Zellkerne und deren Überlagerung für WT- und TRPC6^{-/-}-Fibroblasten gezeigt. Die Ermittlung des prozentualen Anteils an EdU-positiven Zellen an der Gesamtanzahl aller Hoechst-positiven Zellen 24 Std. nach Zugabe von EdU ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten (**Abbildung 39 B**). Die Proliferationsraten der WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten sind also nicht signifikant unterschiedlich.

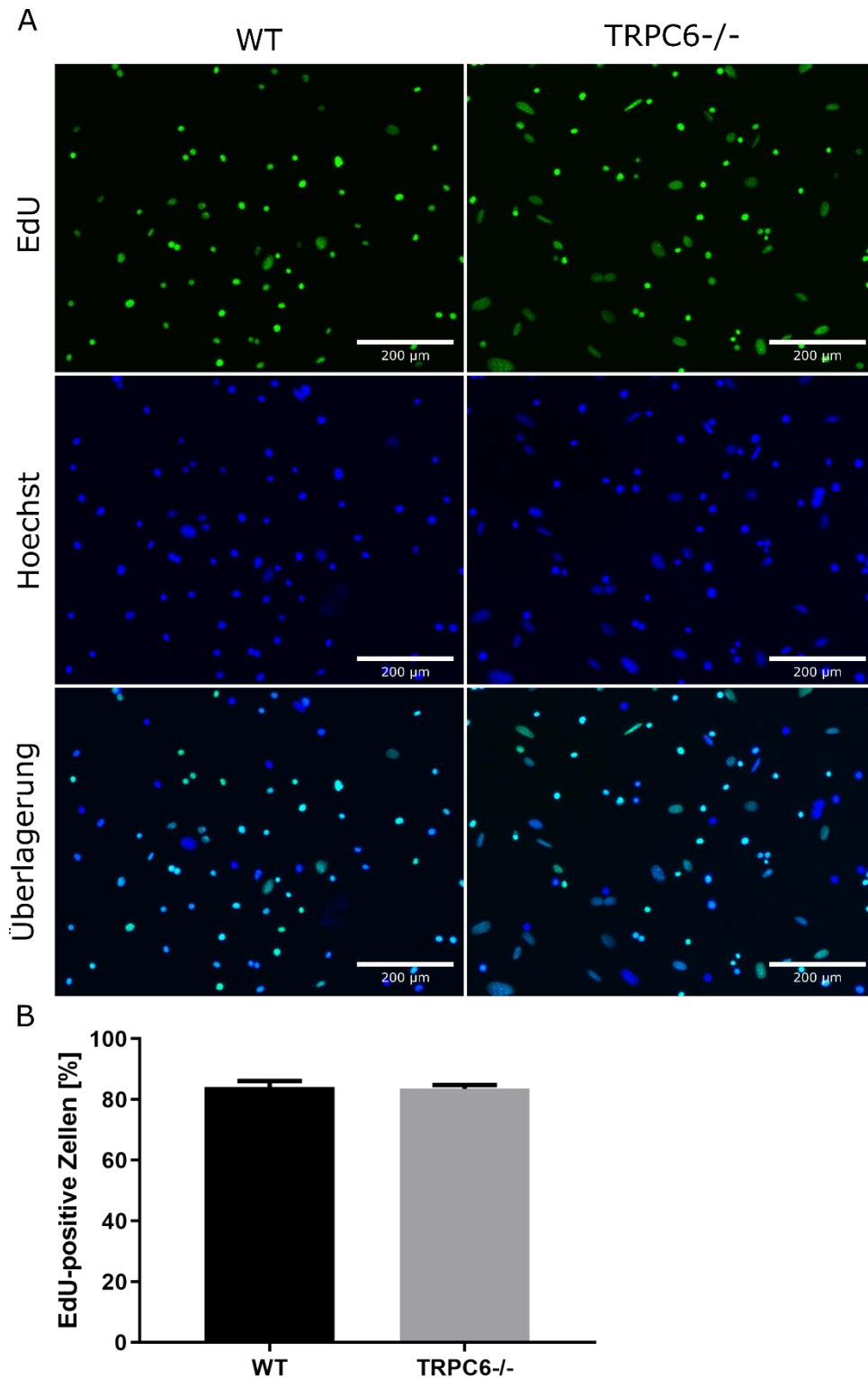


Abbildung 39: Analyse der DNA-Syntheserate von WT- und TRPC6^{-/-}-primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF). Die Zellen wurden 24 Std. mit EdU behandelt und in Formaldehyd fixiert. **(A)** In einer *Click-iT*-Reaktion wurden EdU-positive Zellen durch Kopplung des Alexa Fluor 488-Fluoreszenzmarkers markiert (EdU, grün). Die Zellkerne wurden durch Hoechst-Farbstoff identifiziert (Hoechst, blau). Eine Überlagerung der Bilder von EdU- und Hoechst-positiven pmLF ist ebenfalls dargestellt (Überlagerung, cyan). Der Maßstab entspricht 200 μm . **(B)** Der Anteil an EdU-positiven Zellen an der Gesamtanzahl der Zellen (Hoechst-positiv) wurde bestimmt und die erhaltenen Werte waren nicht signifikant unterschiedlich. N (WT) = 3 Zellisolationen aus 3 Mäusen, n (TRPC6^{-/-}) = 4 Zellisolationen aus 4 Mäusen.

3.5.3.2 Analyse der Zellviabilität von WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten nach Bestrahlung

Zur Untersuchung der Strahlensensitivität von WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten wurden diese mit Dosen von 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und 4 Tage danach die Zellviabilität mit Hilfe des WST-1-Reagenzes in einem kolorimetrischen Test untersucht. Durch die höchste eingesetzte Strahlendosis von 10 Gy konnte keine komplette Letalität der Zellen erzielt werden. WT-Fibroblasten weisen bei 10 Gy eine Viabilität von 48% auf und TRPC6^{-/-}-Fibroblasten eine Viabilität von 56%. Eine LD50 kann dadurch nicht bestimmt werden. Der Wendepunkt der Viabilitätskurve von WT-Fibroblasten liegt bei einer Dosis von 1,84 Gy. Die Zellen weisen bei dieser Dosis eine Viabilität von 72% auf. Für TRPC6^{-/-}-Fibroblasten liegt der Wendepunkt bei einer Dosis von 2,77 Gy mit einer Viabilität von 72% (**Abbildung 40**). Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wendepunkten der Viabilitätskurve von WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten.

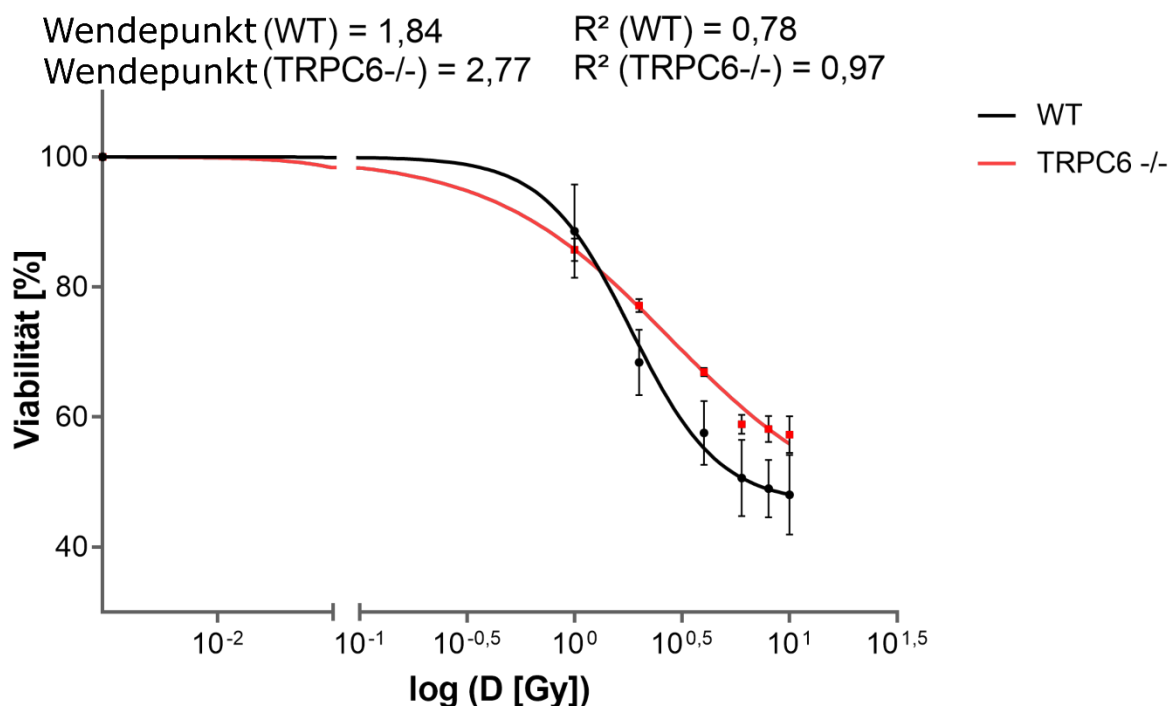


Abbildung 40: Analyse der Zellviabilität von bestrahlten WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten (pmLF) mittels WST-1-Assay. PmLF wurden mit 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und 4 Tage nach Bestrahlung wurde ein WST-1-Assay nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wendepunkt von WT-pmLF (1,84 Gy: 72% Viabilität) im Vergleich zum Wendepunkt der TRPC6^{-/-}-pmLF (2,77 Gy: 72% Viabilität) ermittelt werden. N = 6 Zellisolationen aus 6 Mäusen je Genotyp.

3.5.3.3 Analyse des klonogenen Überlebens von WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten nach Bestrahlung

Um die Überlebensrate von WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen von 0 – 10 Gy zu bestimmen, wurde ein Koloniebildungstest durchgeführt. 14 Tage nach Bestrahlung der Lungenfibroblasten wurde die Anzahl an gebildeten Kolonien mittels Methyleneblau-Färbung bestimmt. Der Vergleich des klonogenen Überlebens von WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten nach einer Bestrahlung von 0, 1, 2, 4, 6 und 8 Gy ergab keinen signifikanten Unterschied (**Abbildung 41**).

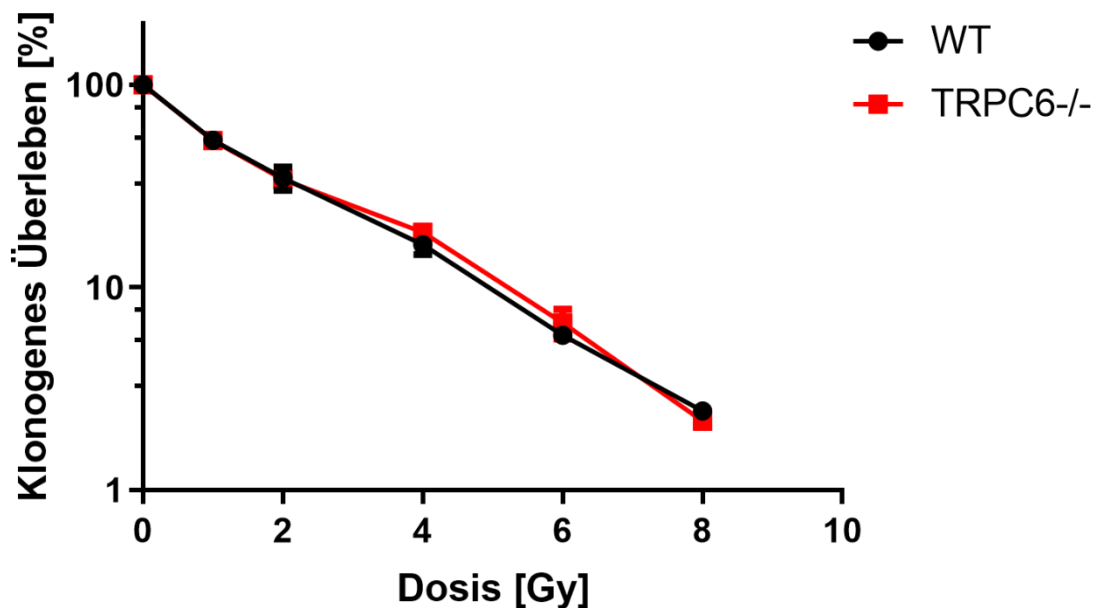


Abbildung 41: Analyse des klonogenen Überlebens von bestrahlten WT- und TRPC6^{-/-}-primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) mittels Koloniebildungstest. Zellen wurden mit 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt und nach 14 Tagen in Paraformaldehyd fixiert. Kolonien wurden mit Methyleneblau angefärbt und ausgezählt. Die erhaltenen Werte waren nicht signifikant unterschiedlich. Der Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean (SEM) ist dargestellt. N = 3 Zellisolation von 3 Mäusen je Genotyp.

4 Diskussion

Der TRPC6-Kanal wird als Rezeptor-aktivierter Kanal hauptsächlich über G-Proteingekoppelte Rezeptoren wie z.B. den Angiotensin 1 (AT₁)-Rezeptor aktiviert. Durch Abspaltung von DAG aus dem Plasmamembran-gebundenen PIP₂ wird TRPC6 direkt aktiviert und es kommt zum Ca²⁺-Einstrom in die Zelle (Ilatovskaya *et al.*, 2014). Der molekulare Aktivierungsmechanismus des Kanals ist jedoch bisher ungeklärt. Insbesondere die Entdeckung von aktivierenden *gain-of-function*- und inaktivierenden *loss-of-function*-TRPC6-Mutationen in Patienten mit einer autosomal-dominant vererbten Form der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS), lässt auf Grund der Lokalisation aller bisher bekannten Mutationen in den langen zytoplasmatischen Carboxyl- und Amino-Termini des Kanals, auf einen Zusammenhang zwischen Kanalaktivität und einer möglichen Interaktion der Termini schließen. Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Interaktion der zytoplasmatisch lokalisierten amino- und carboxy-terminalen Regionen des TRPC6-Kanals durch Messung des intramolekularen Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) während dessen Aktivierung zu untersuchen.

Die Aufschlüsselung des molekularen Aktivierungsmechanismus soll helfen, den TRPC6-Kanal im pathophysiologischen Geschehen genauer untersuchen zu können. TRPC6 nimmt beispielsweise eine bedeutende Rolle beim fibrotischen Gewebeumbau verschiedener Organe, wie der Lunge, ein. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass TRPC6-defiziente-Mäuse in einem Bleomycin-induzierten Lungenfibrose-Modell resistenter gegen die Ausbildung einer Fibrose sind. Ferner konnten wir *in-vitro* eine Beteiligung von TRPC6 während der TGF-β1-induzierten Fibroblasten-zur-Myofibroblasten-Differenzierung nachweisen (Hofmann *et al.*, 2017). Da neben den Fibroblasten auch ATII-Zellen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Lungenfibrose einnehmen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Funktion des TRPC6-Kanals für die TGF-β1-induzierten Epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT) untersucht. Ferner wurde eine Beteiligung des Kanals bei der strahlungsinduzierten Myofibroblasten-Differenzierung analysiert, um erste Hinweise auf eine mögliche Funktion von TRPC6 während der Entwicklung einer strahlungsinduzierten Lungenfibrose in Tumorpatienten nach Bestrahlung zu gewinnen. Die erste Charakterisierung einer TRPC6^{flox}-Maus soll es in Zukunft

ermöglichen, die strahlungsinduzierte Lungenfibrose *in-vivo* in gewebsspezifischen TRPC6-defizienten-Mäusen zu untersuchen.

4.1 Untersuchung der N- und C-terminalen Interaktion des TRPC6-Kanals während der Kanalaktivierung

Die molekulare Analyse der Proteinstruktur von Ionenkanälen ist von größter Bedeutung, um Veränderungen der Kanal-Konformation zu untersuchen und Regionen zu identifizieren, die für die Öffnung des Kanals maßgeblich sind. Die Kristallographie eines kompletten TRP-Proteins ist bisher nur für den TRPV6-Kanal erfolgreich gewesen (Saitome *et al.*, 2016). Eine Weiterentwicklung der Kryoelektronenmikroskopie ermöglichte jedoch die Proteinstruktur vieler TRP-Proteine darunter TRPV1, TRPA1, TRPM2, TRPM7, TRPC3, sowie den humanen und murinen TRPC6-Kanal (Liao *et al.*, 2013; Paulsen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018; Duan *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2018; Azumaya *et al.*, 2018) zu analysieren. In den kürzlich veröffentlichten Proteinstrukturen des humanen und murinen TRPC6-Kanals konnte die Proteinstruktur des kompletten Amino-Terminus nicht ermittelt werden. Eine mögliche Konformationsänderung des Kanals nach Aktivierung mit OAG oder durch den lipidfreien Aktivator GSK-170 konnte ebenfalls bisher nicht untersucht werden. Außerdem ist bisher nicht bekannt, wie die in FSGS-Patienten identifizierten *gain-of-function*- und *loss-of-function*-Mutationen des TRPC6-Kanals die Proteinstruktur während der Kanalaktivierung beeinflussen. Alle bisher veröffentlichten Mutationen sind im zytoplasmatischen N- und C-Terminus des Kanals lokalisiert, was vermuten lässt, dass die Mutationen durch eine veränderte Interaktion der beiden Termini die Kanalaktivität beeinflussen könnten. Darüber hinaus sind viele der N-terminalen Mutationen in den Ankyrin-Domänen des Kanals lokalisiert, die Liganden binden, Protein-Protein-Interaktionen steuern und mechanosensitive Eigenschaften besitzen (Gaudet, 2008; Li, Mahajan and Tsai, 2006; Zhang *et al.*, 2015). Aus allen diesen Gründen wurde das Projekt zur Quantifizierung der N- und C-terminalen Interaktion während der Aktivierung von WT- und Mutanten-TRPC6-Kanälen mit OAG und GSK-170 durch intramolekulares FRET gestartet. Amino-terminal wurde der Kanal durch das sog. *small fluorescein arsenical hairpin (FIAsH)*-Molekül markiert, das durch seine geringe Größe mögliche Strukturveränderungen im Kanalprotein nicht behindern sollte. Der Carboxy-Terminus des Kanals wurde mit dem Fluoreszenzprotein Cerulean fusioniert (**Abbildung 19**). Das FIAsH-Cerulean-System wurde bereits mehrfach

erfolgreich zur Detektion von Konformationsänderungen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren verwendet (Hoffmann *et al.*, 2005). Die Fluoreszenz-markierten TRPC6-Kanäle mit und ohne FSGS-Mutationen wurden nach Transfektion mit der kodierenden cDNA erfolgreich zur Plasmamembran der HEK293-Zellen transloziert (**Abbildung 20**) und verhielten sich in elektrophysiologischen Messungen ähnlich wie die nicht-markierten Kanalproteine (**Abbildung 21**, **Abbildung 22**). Alle markierten Kanalproteine zeigten darüber hinaus ähnliche FRET-Effizienzen (**Abbildung 23**). Nach Applikation von OAG oder GSK-170 wurde eine Abnahme der FRET-Quotienten gemessen, die jedoch in den Mutanten-TRPC6-Kanälen signifikant geringer war als in den WT-TRPC6-Kanälen (**Abbildung 24**, **Abbildung 25**). Damit konnte zum ersten Mal mittels FRET eine konformationelle Änderung der N- und C-terminalen Interaktion des homotetrameren TRPC6-Kanals während der Kanalaktivierung gemessen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für den TRPV4-Kanal veröffentlicht (Hellwig *et al.*, 2005; Strotmann *et al.*, 2010). Die Applikation eines hypotonen Mediums oder des Rezeptoragonisten Carbachol bedingte eine transiente FRET-Abnahme der markierten TRPV4-Kanäle (Strotmann *et al.*, 2010). Auch reduzierten Mutationen im N-Terminus des TRPV4-Kanals die Interaktion mit dem C-Terminus und führten zu einer erhöhten Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Potenzierung des Kanals. Wohingegen eine Änderung der Aminosäuresequenz in der Calmodulin-Bindedomäne die Bindung von Calmodulin inhibierte und die Kanalaktivität reduzierte (Strotmann *et al.*, 2010). Die Reduktion der N- und C-terminalen Interaktion während der Aktivierung scheint in beiden Kanäle konserviert zu sein, auch wenn die TRPC6-Kanalaktivität durch Ca^{2+} /Calmodulin, ähnlich wie für TRPC3, inhibiert und nicht potenziert wird (Zhang *et al.*, 2001). In der kürzlich veröffentlichten Analyse der Proteinstruktur des TRPM2-Kanals wurde gezeigt, dass die C-terminal lokalisierte sog. *nucleoside-diphosphate linked moiety X like motif 9* (NUDT9)-Homologie-Domäne intra- und intermolekular mit dem N-Terminus des Proteins interagiert (Wang *et al.*, 2018). In dieser Veröffentlichung ist ein Modell beschrieben, in welcher sich die N-terminale NUDT9-Homologie-Region nach Bindung des Aktivators ADP-Ribose durch Rotation vom C-Terminus entfernt. Auch wenn TRPC6 keine NUDT9 Homologie-Domäne besitzt und nicht durch ADP-Ribose aktiviert wird, deuten die gewonnenen Daten auf eine ähnliche Konformationsänderung des N-Terminus hin. Im WT-TRPC6-Kanal könnte sich der N-Terminus durch eine Konformationsänderung während der Kanalaktivierung vom C-Terminus entfernen, weswegen die Kanalöffnung zu einer

FRET-Abnahme führt. Die *gain-of-function*-Mutationen, wie M131T-TRPC6, könnten einen voraktivierten Kanal mit erhöhter Basalaktivität induzieren (**Abbildung 42**), in welchem der N-Terminus bereits weiter entfernt vom C-Terminus ist. Dadurch würde eine Kanalaktivierung eine signifikant geringere FRET-Abnahme auslösen, der Kanal aber wie beschrieben, eine erhöhte Kanalaktivität besitzen. Die *loss-of-function*-Mutationen, wie G108S- und N109A-TRPC6, haben möglicherweise die Fähigkeit zur kompletten Konformationsänderung nach Kanalaktivierung verloren. Dementsprechend würde eine Aktivierung durch OAG oder GSK-170 eine verminderte Konformationsänderung mit einer nur partiellen Drehung weg vom N-Terminus induzieren. Dadurch würde sich ähnlich, wie bei den *gain-of-function*-Mutationen, eine reduzierte FRET-Abnahme ergeben, jedoch mit einer signifikant geringeren Kanalaktivität. Dieses Modell würde erklären, warum *gain-of-function* und *loss-of-function*-Mutationen ähnliche Abnahmen des FRET-Signals zeigen, da sich der N-Terminus in ähnlicher Weise vom C-Terminus entfernt (**Abbildung 42**).

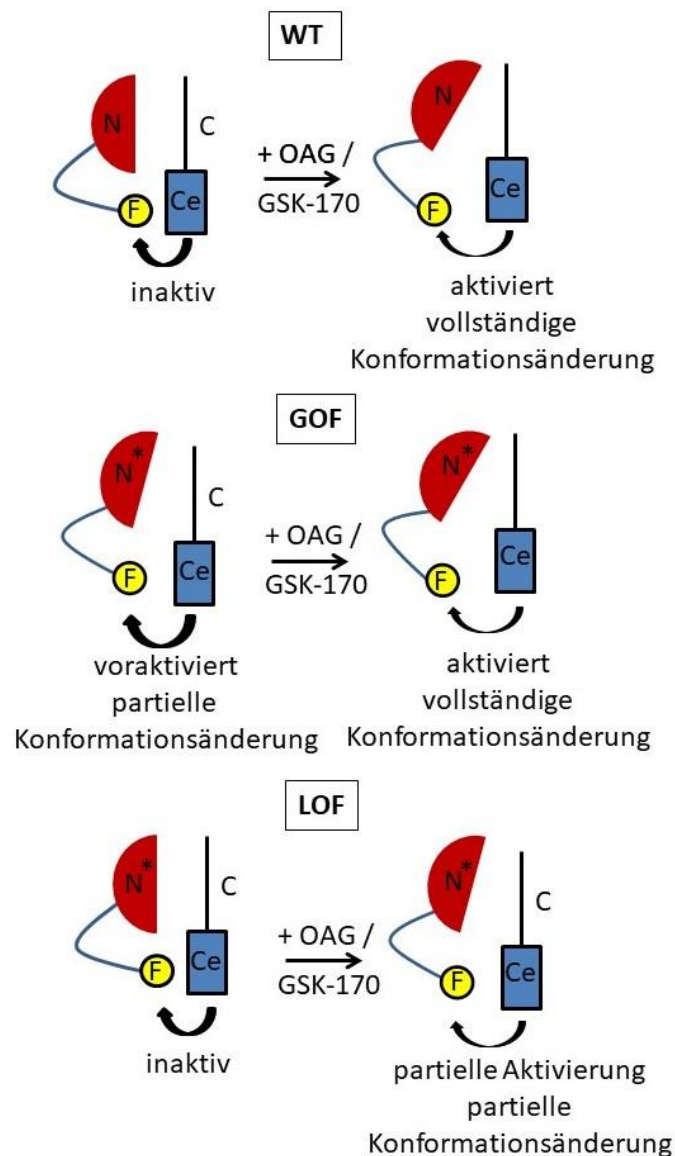


Abbildung 42: Vereinfachtes hypothetisches Modell zur Interaktion der Amino (N)- und Carboxyl (C)-Termini des TRPC6-Kanals vor und während der Aktivierung mit OAG oder GSK-170. Nach Aktivierung des WT-TRPC6-Kanals ergibt sich eine vollständige Konformationsänderung. Auch für die *gain-of-function* (GOF)-Mutationen ergibt sich eine vollständige Konformationsänderung, der TRPC6-Kanal liegt jedoch in einer voraktivierten Konformation vor. Die *loss-of-function* (LOF)-Mutationen sind nur partiell aktivierbar und die Aktivierung führt zu einer partiellen Konformationsänderung. Cerulean (Ce), FIAsH-Molekül (F), N-terminale *loss-of-function*- und *gain-of-function*-Mutationen (N*).

4.2 Charakterisierung der konditionalen TRPC6-defizienten-Maus

Um die Beteiligung eines Proteins an physiologischen Funktionen sowie an Erkrankungen wie der Lungenfibrose zu untersuchen, eignet sich besonders die vergleichende Untersuchung von WT- und entsprechenden Gen-defizienten-Mäusen unter normalen Bedingungen und im Krankheitsmodell. Von Vorteil sind in diesen Untersuchungen konditionale Gen-defiziente Mäuse, da sie nur in bestimmten Geweben und/oder zu bestimmten Zeitpunkten das Protein nicht mehr exprimieren.

Sog. globale TRPC6^{-/-}-Mäuse, die in allen Geweben schon während der Embryogenese TRPC6 nicht mehr exprimieren, sind nicht embryonal letal. Allerdings kommt es über einen längeren Zeitraum zu einer kompensatorischen erhöhten Expression anderer TRPC-Kanäle (z.B. TRPC3) in einzelnen Geweben der TRPC6^{-/-}-Mäuse (Dietrich *et al.*, 2005; Sel *et al.*, 2008). Um die akuten Effekte einer TRPC6-Defizienz besser analysieren zu können, ist eine durch Tamoxifen ausgelöste Zeit-spezifische Ausschaltung des TRPC6-Proteins hilfreich. Darüber hinaus kann in Gewebs-spezifischen TRPC6-defizienten-Mauslinien die Funktion von TRPC6 in einzelnen Zelltypen besser untersucht werden.

Aus diesen Gründen hat unsere Arbeitsgruppe ein kommerziell erhältliches Mausmodell, in dem das Exon 2 des TRPC6-Gens von den sog. loxP-Erkennungsstellen flankiert wird (TRPC6^{fl/fl}), erworben. Nach Entfernen des Selektionsmarkers (G418-Resistenz durch Neomycin-Genkassette), konnte ich die linke vom Exon 2 gelegene loxP-Erkennungsstelle mit einer neu etablierten PCR-Reaktion identifizieren (**Abbildung 27**). Um die korrekte Exzision des Exons 2 zu überprüfen, wurden die Mäusen mit einem Mausmodell (TRPC6^{fl/fl} X Sox2-Cre-Mäuse) homozygot gezüchtet, welches das Enzym Cre-Rekombinase ubiquitär in allen Geweben exprimiert. Die aus diesen Paarungen resultierenden Nachkommen (TRPC6^{ΔExon2}-Mäuse) zeigten, wie das globale TRPC6^{-/-}-Mausmodell, keine Expression von TRPC6-Protein in Lungenlysaten (**Abbildung 28**). In Zukunft können diese TRPC6^{fl/fl}-Mäuse mit anderen Mausmodellen gepaart werden, welche die Cre-Rekombinase Tamoxifen-induzierbar in bestimmten Geweben exprimieren, um die oben genannten Fragestellungen zu beantworten.

4.3 Analyse der Funktion von TRPC6 während der TGF-β1-induzierten epithelial-mesenchymalen-Transition

Neben den Lungenfibroblasten spielen auch alveolare-Epithelzellen des Typ II (ATII) eine wichtige Rolle während der Entwicklung einer Lungenfibrose, da sie durch die sog. Epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT) in der Lage sind in Epithelzellen mit einem mesenchymalen Phänotyp zu differenzieren. ATII-Zellen wurden aus WT- und globalen TRPC6-defizienten-Mäusen nach einem Protokoll des Kooperationspartners vom CPC München isoliert (Mutze *et al.*, 2015). Die isolierten Zellen wurden auf Grund ihrer charakteristischen Anordnung in Zellverbänden und durch die Expression des Epithelzell-spezifischen E-Cadherins sowie des ATII-Zell-spezifischen *Prosurfactant*

protein-C (pro SP-C) eindeutig als ATII-Zellen charakterisiert (**Abbildung 29**). Eine Untersuchung der Genexpression für TRPC-spezifische mRNAs ergab eine starke Expression von TRPC1-mRNA gefolgt von TRPC6-mRNA, während die andere TRPC-mRNAs sehr gering exprimiert wurden (**Abbildung 30**). ATII-Zellen sind auch fakultative Vorläuferzellen, die in der Lage sind, in ATI-Zellen zu differenzieren, um bei einer auftretenden Verletzung das alveolare Epithel zu regenerieren (Barkauskas *et al.*, 2013). Im Verlauf der idiopathischen Lungenfibrose untergehen ATII-Zellen jedoch den pathophysiologischen Prozess der epithelial-mesenchymalen-Transition, charakterisiert durch einen Verlust epithelialer Marker (z.B. E-Cadherin, Cytokeratine), bei gleichzeitiger Zunahme der Expression mesenchymaler Marker (z.B. α -SMA, Fibronectin) (zusammengefasst in Pain *et al.*, 2014). Der während der Lungenfibrose hoch-exprimierte Wachstumsfaktor TGF- β 1 ist in der Lage die EMT von ATII-Zellen zu induzieren. Sowohl in der immortalisierten Adenokarzinom Zelllinie A549, als auch in primären murinen ATII-Zellen konnte eine TGF- β 1-induzierte EMT, gekennzeichnet durch eine erhöhte α -SMA-Expression für gebildete (Myo)Fibroblasten, nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2007; Jayachandran *et al.*, 2009). Ferner konnte *in-vivo* gezeigt werden, dass die Epithelzell-spezifische Deletion des TGF- β -II-Rezeptors im Respirationstrakt vor einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose in Mäusen schützt (Li *et al.*, 2011). Eine TGF- β 1-induzierte EMT konnte auch in dieser Arbeit in den primären murinen WT-ATII-Zellen durch eine Hochregulation der α -SMA-mRNA nachgewiesen werden. TRPC6-defiziente-ATII-Zellen zeigten jedoch ebenso, eine im gleichen Maße erhöhte, α -SMA-Expression nach Induktion mit TGF- β 1. Eine - wie für primäre murine Lungenfibroblasten beobachtete - Hochregulation für TRPC6-mRNA (Hofmann *et al.* 2017) konnte in den WT-ATII-Zellen nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 31**). Diese Ergebnisse zeigen, dass TRPC6 eher nicht an der TGF- β 1-induzierten EMT beteiligt ist. Um dies zu bestätigen, wurde auch eine mögliche Hochregulation von TRPC6 und α -SMA auf Proteinebene untersucht. Mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem *Western Blot* konnte eine Hochregulation von α -SMA in WT-ATII- und TRPC6-defizienten-Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 32**). Die Zunahme α -SMA-positiver Zellen nach der Behandlung mit TGF- β 1 war nicht signifikant unterschiedlich für WT- und TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen (**Abbildung 33**). Dadurch konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass TRPC6-Kanäle zumindest bei der TGF- β 1-induzierten EMT keine essentielle Rolle spielen. Da in der initialen Phase der Wundheilung von geschädigten Alveolarepithel ATII- und aus ihnen differenzierte ATI-Zellen in die

betroffenen Bereiche migrieren und der Ca^{2+} -Einstrom die Zell-Migration beeinflusst (zusammengefasst in Tsai *et al.*, 2015), wurde untersucht, ob TRPC6-defiziente-ATII-Zellen ein verändertes Migrationsverhalten aufweisen. Zwischen WT- und TRPC6^{-/-}-ATII-Zellen konnte jedoch kein Unterschied für das Zuwachsen einer Zelloücke durch Zellmigration beobachtet werden (**Abbildung 34**). Untersuchte TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten zeigten 24 Std. nach Entfernen der Silikoneinsätze interessanterweise eine signifikant schnellere Migration der Zellen in die freie Fläche (**Abbildung 35**). Für den TRPC6-*knockdown* mittels shRNA ist jedoch eine verminderte Migration von Zellen einer Brustkrebszelllinie beschrieben (Jardin *et al.*, 2018). Eine mögliche Erklärung wäre eine kompensatorische Hochregulation eines anderen Ca^{2+} -permeablen Ionenkanals in der globalen TRPC6-defizienten Maus. Weitere Versuche mit Fibroblasten aus dem TRPC6^{fl/fl}-Mausmodell, in denen *in-vitro* nach Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren eine akute TRPC6-Defizienz erzeugt werden kann, könnten hier in Zukunft Aufklärung bringen.

4.4 Analyse der Funktion von TRPC6 während der strahlungsinduzierten Myofibroblasten-Differenzierung von Lungenfibroblasten

Der TRPC6-Kanal spielt eine wichtige Rolle für die TGF- β 1-induzierten Myofibroblasten-Differenzierung von kardialen, dermalen und pulmonalen Fibroblasten sowie für die Ausbildung einer Lungenfibrose im Bleomycin-Mausmodell (Davis *et al.*, 2013; Hofmann *et al.*, 2017). Die Beteiligung des Kanals bei einer strahlungsinduzierten-Lungenfibrose wurde jedoch noch nicht erforscht. In TRPM2-defizienten-Mäusen konnte nach Bestrahlung der Speicheldrüsen eine transiente Funktionsstörung der Drüsen, im Gegensatz zu einer irreversiblen Schädigung in WT-Mäusen, beobachtet werden. Ferner konnte *in-vitro* ein verminderter Ca^{2+} -Einstrom nach der Applikation von Hydrogenperoxid (H_2O_2), dass auch bei der Bestrahlung von Gewebe generiert wird, in den TRPM2-defizienten Speicheldrüsenzellen im Vergleich zu den WT-Zellen nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2013). Da TRPC6 auch indirekt über H_2O_2 aktiviert werden kann (Weissmann *et al.*, 2012), wurde die Viabilität von TRPC6-defizienten Lungenfibroblasten nach Strahlenbehandlung mit untersucht. Dabei konnte für WT-Lungenfibroblasten durch den kolorimetrischen WST-1-Viabilitätstest ein etwas geringerer, jedoch nicht signifikant geringerer, Wendepunkt (1,84 Gy) als für TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten (2,77 Gy) detektiert werden (**Abbildung 40**). Anschließend wurde ein Test auf Ausbildung von Zellkolonien durchgeführt, der

als Methode der Wahl gilt, um den durch ionisierende Strahlung ausgelösten reproduktiven Zelltod zu analysieren. Dieser wird definiert als Verlust der Fähigkeit einer einzelnen Zelle durch mehrere Zellteilungen eine Kolonie von mehr als 50 Zellen zu bilden (Puck, Marcus and Cieciora, 1956). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und TRPC6^{-/-}-Lungenfibroblasten für das klonogene Überleben nach Bestrahlung festgestellt werden (**Abbildung 41**).

Die Exposition des besonders strahlensensitiven Lungen- und Brustgewebes mit ionisierender Strahlung, führt nachweislich zur dauerhaften Veränderung der Expression mehrerer Gene. RNA aus Brustdrüsengewebe von mit 2 Gy bestrahlten Mäusen wurde in einem Microarray-Hybridisierungsassay auf eine veränderte RNA-Expression untersucht und zeigte unter anderem eine Hochregulation von Genen des ERK/MAPK-Signalweges (Datta *et al.*, 2012). Um eine mögliche Hochregulation von TRPC-Proteinen in bestrahlten Lungenfibroblasten der Maus zu untersuchen, wurde zunächst die mRNA-Expression der TRPC-Kanäle in den unbehandelten Zellen bestimmt. Exprimiert werden vor allem mRNAs für den TRPC1- und den TRPC6-Kanal. Aber nur für die mRNAs des TRPC6-Kanals konnte im Anschluss eine signifikante Hochregulation in den mit 4 und 10 Gy bestrahlten Fibroblasten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen detektiert werden (**Abbildung 36**). Aus diesem Grund wurde eine mögliche Beteiligung des TRP6-Kanals bei der strahlungsinduzierten Myofibroblasten-Differenzierung genauer untersucht. Exposition des Thorax mit ionisierender Strahlung führt zu einer erhöhten Kollagenexpression und kann wie bereits beschrieben zu einer Lungenfibrose führen (s. 1.5). Bisher gibt es aber wenige Studien, welche die zellulären Mechanismen der strahlungsinduzierten Myofibroblasten-Differenzierung untersuchen. In primären humanen Lungenfibroblasten konnte aber z.B. nachgewiesen werden, dass die ionisierende Strahlung die Expression des Enzyms Lactatdehydrogenase-A (LDHA) stimuliert und über eine gesteigerte Lactat-Produktion den profibrotischen Mediator TGF- β 1 verstärkt aktiviert (Judge *et al.*, 2015). Ferner konnte in immortalisierten Fibroblasten-Zelllinien eine durch ROS-induzierte Differenzierung der Fibroblasten zu stark migrierenden Myofibroblasten gezeigt werden (Toullec *et al.*, 2010; Shimura *et al.*, 2018). In dieser Arbeit konnte nun auf zellulärer Ebene ein Strahlungs-induzierter Anstieg der mRNAs des Myofibroblastenmarker α -SMA und PAI-1 in Lungenfibroblasten aus WT-Mäusen gezeigt werden. Dieser Anstieg für α -SMA-mRNA war in mit 4 Gy behandelten Fibroblasten aus TRPC6^{-/-}-Mäusen signifikant niedriger als in den WT-Kontrollzellen

(**Abbildung 37**). Auch die Quantifizierung der Aminosäure Hydroxyprolin als Hauptbestandteil des Kollagens in Fibroblasten nach Bestrahlung war mit zunehmender Strahlendosis signifikant erhöht in Lungenfibroblasten aus WT-Mäusen. In Fibroblasten aus TRPC6^{-/-}-Mäusen war der Hydroxyprolingehalt erst bei einer Strahlendosis von 10 Gy, aber nicht von 4 Gy, signifikant erhöht (**Abbildung 38**). Um eine veränderte Proliferationsrate in den TRPC6-defizienten-Fibroblasten zu erkennen wurde der Anteil an - in der DNA-Synthesephase befindlichen – Zellen mittels Inkorporation des Thymidinanalogs EdU bestimmt. Dabei konnte kein Unterschied der Proliferationsrate von WT- und TRPC6-defizienten-Lungenfibroblasten festgestellt werden (**Abbildung 39**). In diesem Teil der Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass TRPC6 auch eine mögliche Funktion während der strahlungsinduzierten-Myofibroblasten-Differenzierung von murinen Lungenfibroblasten einnimmt. In einem zukünftigen Projekt unserer Arbeitsgruppe sollen funktionelle und histologische Untersuchungen im vollständigen Organismus von WT- und TRPC6-defizienten-Mäusen in einem Strahlungs-induzierten-Lungenfibrose-Modell untersucht werden. Im Bleomycin-Modell der induzierten Lungenfibrose, in dem das Zytostatikum Bleomycin einmalig intratracheal appliziert wird, was zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, profibrotischer Wachstumsfaktoren und zur Einwanderung von Fibroblasten und Myofibroblasten in das betreffende Lungengewebe führt (Degryse and Lawson, 2011), hatte unsere Arbeitsgruppe bereits eine wichtige Rolle für den TRPC6-Kanal während der Myofibroblastendifferenzierung gezeigt (Hofmann *et al.*, 2017). Ein Kritikpunkt dieses Modells ist jedoch dessen Reversibilität. So klingt die induzierte-Lungenfibrose in der Maus im Gegensatz zur Lungenfibrose des Menschen nach 3 Woche wieder ab (Chaudhary, Schnapp and Park, 2006). Klinisch relevanter ist deswegen das Tiermodell der strahlungsinduzierten-Lungenfibrose, in dem durch Kombination präziser Bestrahlungssysteme mit für Kleintieren optimierten Imaging-Geräten (z.B. *Computed tomography*, CT; *Positron emission tomography*, PET) spezifische Bereiche der Lunge einer definierten Strahlendosis ausgesetzt werden können (Verhaegen *et al.*, 2018). Das Modell wird von mehreren Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt und zeigt die typischen pathologischen Veränderungen einer Pneumonitis und Fibrose, darunter verdickte Alveolarwände, peribronchiale Entzündungen und Ausbildung von Myofibroblasten-Foci (Flehsig *et al.*, 2012; Heinzelmann *et al.*, 2006). Die Ausbildung der Strahlungs-induzierten Lungenfibrose dauert jedoch bis zu 30 Wochen, hat aber

den Vorteil, dass die gezielte Bestrahlung einer Lungenseite möglich ist und der Krankheitsverlauf wie im Menschen irreversibel ist (zusammengefasst in Wirsdörfer and Jendrossek, 2017). Darüber hinaus ist die Strahlungs-induzierte Lungenfibrose eine klinisch relevante Nebenwirkung nach Bestrahlung von Patienten mit Lungen- oder Brusttumoren. Im Gesamtorganismus der Maus kann auch die komplexe Interaktion der alveolaren Epithelzellen, des Kapillarendothels, der Fibroblasten und der aktivierten Immunzellen bei der Entstehung einer Lungenfibrose besser berücksichtigt werden.

5 Fazit und Ausblick

Patienten mit einer idiopathischen Lungenfibrose (IPF) steht bisher nur eine Pharmakotherapie mit dem Tyrosin-Kinase-Hemmer Nintedanib und dem Antifibrotikum Pirfenidon zur Verfügung, die jedoch beide nur in der Lage sind, das Voranschreiten der IPF zu verlangsamen. Da eine kausale Therapiemöglichkeit durch Lungentransplantation durch die geringe Verfügbarkeit von Spenderlungen für viele Patienten nicht zur Verfügung steht, werden alternative Behandlungsmöglichkeiten dringend gesucht. Darüber hinaus ist die Lungenfibrose auch eine der häufigsten Nebenwirkung nach Bestrahlung des Thorax und schränkt die Bestrahlungsintensität deutlich ein, was wiederum den Therapieerfolg beeinträchtigt. Die Entschlüsselung der wichtigsten Proteine für die Entstehung einer Lungenfibrose ist daher von höchster Priorität um den Pathomechanismus molekular vollständig aufzuschlüsseln und neue Therapien entwickeln zu können. Für Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle wie TRPV4 und TRPC6 konnte bereits eine wichtige Rolle für die Entwicklung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose im Mausmodell nachgewiesen werden (Rahaman *et al.*, 2014; Hofmann *et al.*, 2017). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRPC6 neben der TGF- β 1-induzierten- auch für die Strahlungs-induzierte-Myofibroblasten-Differenzierung von Lungenfibroblasten eine Rolle spielt, während für die TGF- β 1-induzierte EMT von ATII-Zellen TRPC6-Kanäle nicht essentiell sind. In einem zukünftigen Projekt unserer Arbeitsgruppe soll die Beteiligung von TRPC6 *in-vivo* in gewebsspezifischen TRPC6-defizienten Mäusen im strahlungsinduzierten-Lungenfibrose-Modell untersucht werden.

Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit während der Aktivierung des TRPC6-Kanals mit zwei unterschiedlichen spezifischen Aktivatoren eine Interaktion des Amino- und Carboxy-Terminus nachgewiesen werden. Mit der intramolekularen FRET-Analyse von Ionenkanälen mittels FIAsh-Markierung wurde eine vielversprechende Methode entwickelt, um konformationelle Änderungen von Ionenkanälen zu untersuchen. Dadurch sollte die Analyse der Aktivierung von Ionenkanälen und ihrer mit Krankheiten assoziierten Mutationen in Zukunft erleichtert werden.

Literaturverzeichnis

- Albo, D. *et al.* (1994) 'Thrombospondin (TSP) and Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β) Promote Human A549 Lung Carcinoma Cell Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (Pal-1) Production and Stimulate Tumor Cell Attachment in Vitro', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 203(2), pp. 857–865. doi: 10.1006/BBRC.1994.2262.
- Alessandri-Haber, N. *et al.* (2009) 'TRPC1 and TRPC6 channels cooperate with TRPV4 to mediate mechanical hyperalgesia and nociceptor sensitization.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. NIH Public Access, 29(19), pp. 6217–28. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0893-09.2009.
- Azumaya, C. M. *et al.* (2018) 'Cryo-EM structure of the cytoplasmic domain of murine transient receptor potential cation channel subfamily C member 6 (TRPC6)', *Journal of Biological Chemistry*, 293(26), pp. 10381–10391. doi: 10.1074/jbc.RA118.003183.
- Barkauskas, C. E. *et al.* (2013) 'Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung', 123(7), pp. 3025–3036. doi: 10.1172/JCI68782DS1.
- Beech, D. J. (2005) 'Emerging functions of 10 types of TRP cationic channel in vascular smooth muscle.', *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. Europe PMC Funders, 32(8), pp. 597–603. doi: 10.1111/j.1440-1681.2005.04251.x.
- Behr, J. *et al.* (2017) 'S2k-Leitlinie Idiopathische Lungenfibrose – Update zur medikamentösen Therapie 2017 [German Guideline for Idiopathic Pulmonary Fibrosis - Update on Pharmacological Therapies 2017]', *Pneumologie*, 71(07), pp. 460–474. doi: 10.1055/s-0043-106160.
- Beis, D., Schwarting, R. K. W. and Dietrich, A. (2011) 'Evidence for a supportive role of classical transient receptor potential 6 (TRPC6) in the exploration behavior of mice', *Physiology & Behavior*, 102(2), pp. 245–250. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.11.002.
- Borchardt, J. (2013) 'S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der idiopathischen Lungenfibrose. Leserbrief. [S2K guideline on diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis].', *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*, 67(6), p. 356. doi: 10.1055/s-0033-1344177.
- Boulay, G. *et al.* (1997) 'Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of

- receptors coupled by the Gq class of G protein.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 272(47), pp. 29672–80. doi: 10.1074/JBC.272.47.29672.
- Buck, S. B. *et al.* (2008) 'Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies', *BioTechniques*, 44(7), pp. 927–929. doi: 10.2144/000112812.
- Bungeroth, U. (2010) *Bascis Pneumologie*. 2. Auflage. Urban & Fischer München.
- Calveley, V. L. *et al.* (2005) 'Partial volume rat lung irradiation: Temporal fluctuations of in-field and out-of-field DNA damage and inflammatory cytokines following irradiation', *International Journal of Radiation Biology*. Taylor & Francis, 81(12), pp. 887–899. doi: 10.1080/09553000600568002.
- Campa, J. S., McAnulty, R. J. and Laurent, G. J. (1990) 'Application of high-pressure liquid chromatography to studies of collagen production by isolated cells in culture.', *Analytical biochemistry*, 186(2), pp. 257–63. doi: 10.1016/0003-2697(90)90076-L.
- Chaudhary, N. I., Schnapp, A. and Park, J. E. (2006) 'Pharmacologic Differentiation of Inflammation and Fibrosis in the Rat Bleomycin Model', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(7), pp. 769–776. doi: 10.1164/rccm.200505-717OC.
- Chen, X. *et al.* (2008) 'Role of Reactive Oxygen Species in Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Endothelial Dysfunction.', *Current hypertension reviews*. NIH Public Access, 4(4), pp. 245–255. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559453> (Accessed: 17 July 2019).
- Chubanov, V. and Gudermann, T. (2014) 'TRPM6', in: Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 503–520. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2_20.
- Clarson, L. H. *et al.* (2003) 'Store-operated Ca²⁺ entry in first trimester and term human placenta', *The Journal of Physiology*, 550(2), pp. 515–528. doi: 10.1113/jphysiol.2003.044149.
- Clegg, R. M. (1995) 'Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)', *Current Opinion in Biotechnology*, pp. 103–110. doi: 10.1081/E-EMGP-120023536.
- Clementi, E. and Meldolesi, J. (1996) 'Pharmacological and functional properties of voltage-independent Ca²⁺ channels.', *Cell calcium*, 19(4), pp. 269–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8983848> (Accessed: 27 August 2019).
- Cosens, D. J. and Manning, A. (1969) 'Abnormal electroretinogram from a *Drosophila*

- mutant.', *Nature*, 224(5216), pp. 285–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5344615> (Accessed: 9 January 2019).
- Cottin, V. *et al.* (2019) 'Fibrosing interstitial lung diseases: knowns and unknowns', *European Respiratory Review*, 28(151), p. 180100. doi: 10.1183/16000617.0100-2018.
- D'Esposito, M. *et al.* (1998) 'Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21→q22', *Cytogenetic and Genome Research*, 83(1–2), pp. 46–47. doi: 10.1159/000015165.
- Datta, K. *et al.* (2012) 'Exposure to ionizing radiation induced persistent gene expression changes in mouse mammary gland.', *Radiation oncology (London, England)*. BioMed Central, 7, p. 205. doi: 10.1186/1748-717X-7-205.
- Davis, J. *et al.* (2013) 'NIH Public Access', 23(4), pp. 705–715. doi: 10.1016/j.devcel.2012.08.017.A.
- Degryse, A. L. and Lawson, W. E. (2011) 'Progress Toward Improving Animal Models for Idiopathic Pulmonary Fibrosis', *The American Journal of the Medical Sciences*, 341(6), pp. 444–449. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31821aa000.
- Dietrich, A. *et al.* (2003) 'N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(48), pp. 47842–52. doi: 10.1074/jbc.M302983200.
- Dietrich, A., Mederos Y Schnitzler, M., *et al.* (2005) 'Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology Journals, 25(16), pp. 6980–9. doi: 10.1128/MCB.25.16.6980-6989.2005.
- Dietrich, A., Kalwa, Æ. H., *et al.* (2005) 'The diacylglycerol-sensitive TRPC3 / 6 / 7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance', pp. 72–80. doi: 10.1007/s00424-005-1460-0.
- Dietrich, A., Fahlbusch, M. and Gudermann, T. (2014) 'Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator?', *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 3(4), pp. 939–62. doi: 10.3390/cells3040939.
- Dietrich, A. and Gudermann, T. (2014a) 'TRPC6: physiological function and pathophysiological relevance.', *Handbook of experimental pharmacology*, 222, pp. 157–88. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2_7.
- Dietrich, A. and Gudermann, T. (2014b) 'TRPC6: Physiological function and pathophysiological relevance', *Handbook of Experimental Pharmacology*, 222, pp. 157–188. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2_7.

- Ding, N.-H., Li, J. J. and Sun, L.-Q. (2013) 'Molecular mechanisms and treatment of radiation-induced lung fibrosis.', *Current drug targets*. NIH Public Access, 14(11), pp. 1347–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23909719> (Accessed: 8 January 2019).
- Duan, J. *et al.* (2018) 'Structure of the mammalian TRPM7, a magnesium channel required during embryonic development', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(35), pp. E8201–E8210. doi: 10.1073/pnas.1810719115.
- van der Eerden, B. C. J. *et al.* (2005) 'The epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(48), pp. 17507–12. doi: 10.1073/pnas.0505789102.
- Ehmke, H. (2010) 'Atmung', in *Duale Reihe Physiologie*. Georg Thieme Verlag KG.
- EULER, U. S. v. and LILJESTRAND, G. (1946) 'Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat', *Acta Physiologica Scandinavica*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 12(4), pp. 301–320. doi: 10.1111/j.1748-1716.1946.tb00389.x.
- Evans, M. J. *et al.* (1973) 'Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂.', *The American journal of pathology*, 70(2), pp. 175–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4566990><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1903972>.
- Fiedler, S. *et al.* (2019) 'Small Fluorescein Arsenical Hairpin-Based Förster Resonance Energy Transfer Analysis Reveals Changes in Amino- to Carboxyl-Terminal Interactions upon OAG Activation of Classical Transient Receptor Potential 6.', *Molecular pharmacology*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 96(1), pp. 90–98. doi: 10.1124/mol.119.115949.
- Finkelstein, J. N. *et al.* (1997) 'Particulate-cell interactions and pulmonary cytokine expression.', *Environmental Health Perspectives*. National Institute of Environmental Health Science, 105(Suppl 5), p. 1179. doi: 10.1289/EHP.97105S51179.
- Flechsig, P. *et al.* (2012) 'LY2109761 attenuates radiation-induced pulmonary murine fibrosis via reversal of TGF- β and BMP-associated proinflammatory and proangiogenic signals.', *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 18(13), pp. 3616–27. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2855.
- Fleig, A. and Chubanov, V. (2014) 'TRPM7', in. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 521–546. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2_21.

- Freichel, M. *et al.* (2005) 'Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies.', *The Journal of physiology*. Wiley-Blackwell, 567(Pt 1), pp. 59–66. doi: 10.1113/jphysiol.2005.092999.
- Fuchs, B. *et al.* (2011) 'Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6', *Respiratory Research*. BioMed Central, 12(1), p. 20. doi: 10.1186/1465-9921-12-20.
- Gaudet, R. (2008) 'A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond', *Molecular BioSystems*, 4(5), p. 372. doi: 10.1039/b801481g.
- Ghosh, A. K. and Vaughan, D. E. (2012) 'PAI-1 in tissue fibrosis', *Journal of Cellular Physiology*, 227(2), pp. 493–507. doi: 10.1002/jcp.22783.
- Giridhar, P. *et al.* (2015) 'Radiation induced lung injury: prediction, assessment and management.', *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 16(7), pp. 2613–7. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.7.2613.
- Haffty, B. G. *et al.* (1988) 'Results of radical radiation therapy in clinical stage I, technically operable non-small cell lung cancer', *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*. Elsevier, 15(1), pp. 69–73. doi: 10.1016/0360-3016(88)90348-3.
- Häfner, S. *et al.* (2018) 'A (+)-Larixol Congener with High Affinity and Subtype Selectivity toward TRPC6', *ChemMedChem*, 13(10), pp. 1028–1035. doi: 10.1002/cmdc.201800021.
- Häfner, S., Urban, N. and Schaefer, M. (2019) 'Discovery and characterization of a positive allosteric modulator of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) channels', *Cell Calcium*, 78, pp. 26–34. doi: 10.1016/j.ceca.2018.12.009.
- Harteneck, C., Klose, C. and Krautwurst, D. (2011) 'Synthetic Modulators of TRP Channel Activity', in, pp. 87–106. doi: 10.1007/978-94-007-0265-3_4.
- Haston, C. K. *et al.* (2007) 'Distinct Loci Influence Radiation-Induced Alveolitis from Fibrosing Alveolitis in the Mouse', *Cancer Research*, 67(22), pp. 10796–10803. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2733.
- Hayashi, S., Tenzen, T. and McMahon, A. P. (2003) 'Maternal inheritance of Cre activity in a Sox2Cre deleter strain', *genesis*, 37(2), pp. 51–53. doi: 10.1002/gene.10225.
- Heeringa, S. F. *et al.* (2009) 'A Novel TRPC6 Mutation That Causes Childhood FSGS', *PLoS ONE*. Edited by A. Schwartz, 4(11), p. e7771. doi: 10.1371/journal.pone.0007771.
- Heinzelmann, F. *et al.* (2006) 'Irradiation-Induced Pneumonitis Mediated by the CD95/CD95-Ligand System', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 98(17), pp. 1248–1251.

doi: 10.1093/jnci/djj335.

- Hellwig, N. *et al.* (2005) 'Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits', *Journal of Cell Science*, 118(5), pp. 917–928. doi: 10.1242/jcs.01675.
- Hill, K., McNulty, S. and Randall, A. D. (2004) 'Inhibition of TRPM2 channels by the antifungal agents clotrimazole and econazole', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 370(4), pp. 227–237. doi: 10.1007/s00210-004-0981-y.
- Hoffmann, C. *et al.* (2005) 'A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells', *Nature Methods*, 2(3), pp. 171–176. doi: 10.1038/nmeth742.
- Hofmann, K. *et al.* (2017) 'Biochimica et Biophysica Acta Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myo fi broblast differentiation and development of experimental pulmonary fi brosis', 1863, pp. 560–568.
- Hofmann, T. *et al.* (1999) 'Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol', *Nature*. Nature Publishing Group, 397(6716), pp. 259–263. doi: 10.1038/16711.
- Hofmann, T. *et al.* (2000) 'Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry.', *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 78(1), pp. 14–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10759026> (Accessed: 9 January 2019).
- Hofmann, T. *et al.* (2002) 'Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 99(11), pp. 7461–6. doi: 10.1073/pnas.102596199.
- Hung, C. *et al.* (2013) 'Role of lung Pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(7), pp. 820–830. doi: 10.1164/rccm.201212-2297OC.
- Ilatovskaya, D. V *et al.* (2014) 'Angiotensin II has acute effects on TRPC6 channels in podocytes of freshly isolated glomeruli', *Kidney International*. Nature Publishing Group, 86(3), pp. 506–514. doi: 10.1038/ki.2014.71.
- Inoue, R. *et al.* (2001) 'The Transient Receptor Potential Protein Homologue TRP6 Is the Essential Component of Vascular α_1 -Adrenoceptor-Activated Ca^{2+} -Permeable Cation Channel', *Circulation Research*. Lippincott Williams & Wilkins, 88(3), pp. 325–332. doi: 10.1161/01.RES.88.3.325.
- Irvin, C. G. and Bates, J. H. T. (2003) 'Measuring the lung function in the mouse: The

- challenge of size', *Respiratory Research*, 4, pp. 1–9. doi: 10.1186/rr199.
- Jardin, I. *et al.* (2018) 'TRPC6 Channels Are Required for Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cell Lines by Modulation of Orai1 and Orai3 Surface Exposure.', *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 10(9). doi: 10.3390/cancers10090331.
- Jayachandran, A. *et al.* (2009) 'SNAI transcription factors mediate epithelial-mesenchymal transition in lung fibrosis', *Thorax*, 64(12), pp. 1053–1061. doi: 10.1136/thx.2009.121798.
- Judge, J. L. *et al.* (2015) 'Ionizing radiation induces myofibroblast differentiation via lactate dehydrogenase.', *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. American Physiological Society, 309(8), pp. L879-87. doi: 10.1152/ajplung.00153.2015.
- Jung, S. *et al.* (2002) 'TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(2), pp. C347–C359. doi: 10.1152/ajpcell.00283.2001.
- Jung, S. *et al.* (2003) 'Lanthanides Potentiate TRPC5 Currents by an Action at Extracellular Sites Close to the Pore Mouth', *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), pp. 3562–3571. doi: 10.1074/jbc.M211484200.
- Kasai, H. *et al.* (2005) 'Respiratory Research', *Respiratory Research*, 6(1)(56), pp. 1–15. doi: 10.1186/1465-9921-6-56.
- Khalil, N. *et al.* (2005) 'Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor- β 1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK', *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), pp. 43000–43009. doi: 10.1074/jbc.M510441200.
- Kim, J. H. *et al.* (2007) 'Transforming Growth Factor 1 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition of A549 Cells', pp. 898–904.
- Kim, K. K. *et al.* (2006) 'Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix', *PNAS*, 103(35), pp. 13180–13185.
- King Jr, T. E., Pardo, A. and Selman, M. (2011) 'Idiopathic pulmonary fibrosis', pp. 1949–1961. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60052-4.
- Klingberg, F., Hinz, B. and White, E. S. (2013) 'The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis', *The Journal of Pathology*, 229(2), pp. 298–309. doi: 10.1038/mp.2011.182.doi.

- Kobori, T. *et al.* (2009) 'The transient receptor potential channels TRPP2 and TRPC1 form a heterotetramer with a 2:2 stoichiometry and an alternating subunit arrangement.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 284(51), pp. 35507–13. doi: 10.1074/jbc.M109.060228.
- Kwon, Y., Hofmann, T. and Montell, C. (2007) 'Article Integration of Phosphoinositide- and Calmodulin- Mediated Regulation of TRPC6', pp. 491–503. doi: 10.1016/j.molcel.2007.01.021.
- Lange, I. *et al.* (2009) 'TRPM2 functions as a lysosomal Ca²⁺-release channel in beta cells.', *Science signaling*. NIH Public Access, 2(71), p. ra23. doi: 10.1126/scisignal.2000278.
- Leuner, K. *et al.* (2007) 'Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels', *The FASEB Journal*, 21(14), pp. 4101–4111. doi: 10.1096/fj.07-8110com.
- Li, J., Mahajan, A. and Tsai, M.-D. (2006) 'Ankyrin Repeat: A Unique Motif Mediating Protein–Protein Interactions †', *Biochemistry*, 45(51), pp. 15168–15178. doi: 10.1021/bi062188q.
- Li, M. *et al.* (2011) 'Epithelium-specific deletion of TGF- β receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis.', *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 121(1), pp. 277–87. doi: 10.1172/JCI42090.
- Liao, M. *et al.* (2013) 'Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy', *Nature*, 504(7478), pp. 107–112. doi: 10.1038/nature12822.
- Liman, E. R., Corey, D. P. and Dulac, C. (1999) 'TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 96(10), pp. 5791–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10318963> (Accessed: 9 January 2019).
- Lishko, P. V. *et al.* (2007) 'The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity', *Neuron*. Cell Press, 54(6), pp. 905–918. doi: 10.1016/J.NEURON.2007.05.027.
- Liu, X. *et al.* (2013) 'Loss of TRPM2 function protects against irradiation-induced salivary gland dysfunction', *Nature Communications*, 4(1), p. 1515. doi: 10.1038/ncomms2526.
- Luca Richeldi, Roland M. du Bois, Ganesh Raghu, A. A. *et al.* (2014) 'Efficacy and safety of nintedanib in advanced idiopathic pulmonary fibrosis', *New England Journal of Medicine*, 370(22), pp. 2071–2082. doi: 10.1186/s12931-018-0907-8.
- Martin, M., Lefaix, J. and Delanian, S. (2000) 'TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master

- switch and a specific therapeutic target?', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 47(2), pp. 277–90. doi: 10.1016/s0360-3016(00)00435-1.
- Martinez, F. J. *et al.* (2017) 'Idiopathic pulmonary fibrosis', *Nature reviews. Disease primers*. Macmillan Publishers Limited, 3, pp. 636–643. doi: 10.6314/JIMT.201810-29(5).02.
- Matthys, H. and Seeger, W. (2008) *Klinische Pneumologie*. 4. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Mcanulty, R. J. (2007) 'Fibroblasts and myofibroblasts : Their source , function and role in disease'. Elsevier Ltd, 39(4), pp. 666–671. doi: 10.1016/j.biocel.2006.11.005.
- McDonald, S. *et al.* (1995) 'Injury to the lung from cancer therapy: Clinical syndromes, measurable endpoints, and potential scoring systems', *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics*, 31(5), pp. 1187–1203. doi: 10.1016/0360-3016(94)00429-O.
- Meseguer, V. *et al.* (2008) 'Transient Receptor Potential Channels in Sensory Neurons Are Targets of the Antimycotic Agent Clotrimazole', *Journal of Neuroscience*, 28(3), pp. 576–586. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4772-07.2008.
- Miehe, S. *et al.* (2012) 'Inhibition of diacylglycerol-sensitive TRPC channels by synthetic and natural steroids.', *PLoS one*. Public Library of Science, 7(4), p. e35393. doi: 10.1371/journal.pone.0035393.
- Minke, B. and Cook, B. (2002) 'TRP Channel Proteins and Signal Transduction', *Physiological Reviews*. American Physiological Society Bethesda, MD , 82(2), pp. 429–472. doi: 10.1152/physrev.00001.2002.
- Mizuno, A. *et al.* (2003) 'Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 285(1), pp. C96–C101. doi: 10.1152/ajpcell.00559.2002.
- Montell, C. (2001) 'Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels.', *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. American Association for the Advancement of Science, 2001(90), p. re1. doi: 10.1126/stke.2001.90.re1.
- Montell, C. *et al.* (2002) 'A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels.', *Molecular cell*. Elsevier, 9(2), pp. 229–31. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00448-3.
- Montell, C. (2005) 'The TRP Superfamily of Cation Channels', *Sci. STKE*. American Association for the Advancement of Science, 2005(272), pp. re3–re3. doi: 10.1126/STKE.2722005RE3.
- Montell, C., Birnbaumer, L. and Flockerzi, V. (2002) 'The TRP channels, a remarkably

- functional family.', *Cell*. Elsevier, 108(5), pp. 595–8. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00670-0.
- Montell, C. and Rubin, G. M. (1989) 'Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction', *Neuron*. Cell Press, 2(4), pp. 1313–1323. doi: 10.1016/0896-6273(89)90069-X.
- Moore, B. B. and Hogaboam, C. M. (2008) 'Murine models of pulmonary fibrosis', *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(2), pp. L152–L160. doi: 10.1152/ajplung.00313.2007.
- Mottl, A. K. *et al.* (2013) 'A novel TRPC6 mutation in a family with podocytopathy and clinical variability'. doi: 10.1186/1471-2369-14-104.
- Mutze, K. *et al.* (2015) 'Enolase 1 (ENO1) and protein disulfide-isomerase associated 3 (PDIA3) regulate Wnt/ β -catenin-driven trans-differentiation of murine alveolar epithelial cells.', *Disease models & mechanisms*. Company of Biologists, 8(8), pp. 877–90. doi: 10.1242/dmm.019117.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1976) '© 1976 Nature Publishing Group', *Nature*, 260, pp. 799–802.
- Nikolić, M. Z., Sun, D. and Rawlins, E. L. (2018) 'Human lung development: recent progress and new challenges', *Development*, 145(16), p. dev163485. doi: 10.1242/dev.163485.
- Nilius, B. and Flockerzi, V. (2014) 'Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface.', *Handbook of experimental pharmacology*, 223, pp. v–vi. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25296415> (Accessed: 10 January 2019).
- Nilius, B. and Owsianik, G. (2011) 'The transient receptor potential family of ion channels.', *Genome biology*. BioMed Central, 12(3), p. 218. doi: 10.1186/gb-2011-12-3-218.
- Nilius, B. and Szallasi, A. (2014) 'Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets : From the Science of Basic Research to the Art of Medicine', (July), pp. 676–814.
- Oku, H. *et al.* (2008) 'Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: Different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis', *European Journal of Pharmacology*, 590(1–3), pp. 400–408. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.06.046.
- Owsianik, G. *et al.* (2006) 'PERMEATION AND SELECTIVITY OF TRP CHANNELS', *Annual Review of Physiology*, 68(1), pp. 685–717. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406.
- Paiman Ghafoori, M. L. B. M. M. Z. V. M. P. C. R. K. M. (2008) 'Radiation-Induced Lung Injury: Assessment, Management, and Prevention'. Available at:

- <https://www.cancernetwork.com/lung-cancer/radiation-induced-lung-injury-assessment-management-and-prevention/page/0/1> (Accessed: 12 July 2019).
- Pain, M. *et al.* (2014) 'Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype', *European Respiratory Review*, 23(131), pp. 118–130. doi: 10.1183/09059180.00004413.
- Paulsen, C. E. *et al.* (2015) 'Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms', *Nature*, 520(7548), pp. 511–517. doi: 10.1038/nature14367.
- Peier, A. M. *et al.* (2002) 'A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 296(5575), pp. 2046–9. doi: 10.1126/science.1073140.
- Pérez, C. A. *et al.* (2002) 'A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells', *Nature Neuroscience*, 5(11), pp. 1169–1176. doi: 10.1038/nn952.
- de Perrot, M. *et al.* (2003) 'Ischemia–Reperfusion–induced Lung Injury', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic Society, 167(4), pp. 490–511. doi: 10.1164/rccm.200207-670SO.
- Puck, T. T., MARCUS, P. I. and CIECIURA, S. J. (1956) 'CLONAL GROWTH OF MAMMALIAN CELLS IN VITRO: GROWTH CHARACTERISTICS OF COLONIES FROM SINGLE HELA CELLS WITH AND WITHOUT A "FEEDER" LAYER', *Journal of Experimental Medicine*, 103(2), pp. 273–284. doi: 10.1084/jem.103.2.273.
- Purves, W. K. *et al.* (2006) *Biologie*. 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- Qu, C. *et al.* (2017) 'Pyrazolopyrimidines as Potent Stimulators for Transient Receptor Potential Canonical 3/6/7 Channels', *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(11), pp. 4680–4692. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00304.
- Raghu, G. *et al.* (2011) 'An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management.', *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183(6), pp. 788–824. doi: 10.1164/rccm.2009-040GL.
- Rahaman, S. O. *et al.* (2014) 'TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 124(12), pp. 5225–5238. doi: 10.1172/JCI75331.
- Reiser, J. *et al.* (2005) 'TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function', 37(7), pp. 739–744. doi: 10.1038/ng1592.
- Riccio, A. *et al.* (2009) 'Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related

- behavior.', *Cell*. Howard Hughes Medical Institute, 137(4), pp. 761–72. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.039.
- Riehle, M. *et al.* (2016) 'TRPC6 G757D Loss-of-Function Mutation Associates with FSGS', *Journal of the American Society of Nephrology*, pp. 1–13. doi: 10.1681/ASN.2015030318.
- Rock, J. R. *et al.* (2011) 'Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(52), pp. E1475–E1483. doi: 10.1073/pnas.1117988108.
- Rodier, F. *et al.* (2011) 'DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion.', *Journal of cell science*. Company of Biologists, 124(Pt 1), pp. 68–81. doi: 10.1242/jcs.071340.
- Salton, F., Volpe, M. C. and Confalonieri, M. (2019) 'Epithelial–Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis', *Medicina*, 55(4), p. 83. doi: 10.3390/medicina55040083.
- Santin, S. *et al.* (2009) 'TRPC6 mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(10), pp. 3089–3096. doi: 10.1093/ndt/gfp229.
- Saotome, K. *et al.* (2016) 'Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6', *Nature*, 534(7608), pp. 506–511. doi: 10.1038/nature17975.
- Satoh, S. *et al.* (2007) 'Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca²⁺ channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis', *Molecular and Cellular Biochemistry*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 294(1–2), pp. 205–215. doi: 10.1007/s11010-006-9261-0.
- Schlöndorff, J. *et al.* (2013) 'TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcripti', (January 2009). doi: 10.1152/ajpcell.00077.2008.
- Schmitz, C. *et al.* (2003) 'Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7.', *Cell*. Elsevier, 114(2), pp. 191–200. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00556-7.
- Sel, S. *et al.* (2008) 'Loss of classical transient receptor potential 6 channel reduces allergic airway response', *Clinical & Experimental Allergy*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 38(9), pp. 1548–1558. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03043.x.
- Selman, M. and Pardo, A. (2014) 'Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms

- of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model.', *American journal of respiratory and critical care medicine*, 189(10), pp. 1161–72. doi: 10.1164/rccm.201312-2221PP.
- Seppenwoolde, Y. *et al.* (2004) 'Regional differences in lung radiosensitivity after radiotherapy for non–small-cell lung cancer', *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*. Elsevier, 60(3), pp. 748–758. doi: 10.1016/J.IJROBP.2004.04.037.
- Shimura, T. *et al.* (2018) 'Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGF β Signaling.', *Molecular cancer research : MCR*, 16(11), pp. 1676–1686. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0321.
- Smyth, J. T. *et al.* (2006) 'Emerging perspectives in store-operated Ca²⁺ entry: Roles of Orai, Stim and TRP', 1763, pp. 1147–1160. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.050.
- Storch, U. *et al.* (2012) 'Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 287(5), pp. 3530–40. doi: 10.1074/jbc.M111.283218.
- Storch, U. *et al.* (2017) 'Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 114(1), pp. E37–E46. doi: 10.1073/pnas.1612263114.
- Strotmann, R. *et al.* (2010) 'Interdomain interactions control Ca²⁺-dependent potentiation in the cation channel TRPV4', *PLoS ONE*, 5(5), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0010580.
- Strübing, C. *et al.* (2003) 'and Biogenesis : Formation of Novel TRPC Channels by Complex Subunit Interactions in Embryonic Brain Supplemental material : Formation of Novel TRPC Channels by Complex Subunit Interactions in Embryonic Brain * □'. doi: 10.1074/jbc.M306705200.
- Tang, Q. *et al.* (2018) 'Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels', *Cell Research*. Nature Publishing Group, 28(7), pp. 746–755. doi: 10.1038/s41422-018-0038-2.
- Tanjore, H. *et al.* (2009) 'Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180(7), pp. 657–665. doi: 10.1164/rccm.200903-0322OC.
- Thabut, G. *et al.* (2003) 'Survival benefit of lung transplantation for patients with idiopathic

- pulmonary fibrosis', *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 126(2), pp. 469–475. doi: 10.1016/S0022-5223(03)00600-7.
- Tomasek, J. J. *et al.* (2002) 'Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(5), pp. 349–363. doi: 10.1038/nrm809.
- Toullec, A. *et al.* (2010) 'Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading', *EMBO Molecular Medicine*, 2(6), pp. 211–230. doi: 10.1002/emmm.201000073.
- Trebak, M. *et al.* (2003) 'The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels', *Cell Calcium*. Churchill Livingstone, 33(5–6), pp. 451–461. doi: 10.1016/S0143-4160(03)00056-3.
- Tsai, F.-C. *et al.* (2015) 'Ca²⁺ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis.', *BioMed research international*. Hindawi, 2015, p. 409245. doi: 10.1155/2015/409245.
- Tu, P., Gibon, J. and Bouron, A. (2010) 'The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria', *Journal of Neurochemistry*, 112(1), pp. 204–213. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06446.x.
- Tucker, S. L. *et al.* (2010) 'Impact of Toxicity Grade and Scoring System on the Relationship Between Mean Lung Dose and Risk of Radiation Pneumonitis in a Large Cohort of Patients With Non–Small Cell Lung Cancer', *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. Elsevier, 77(3), pp. 691–698. doi: 10.1016/J.IJROBP.2009.05.055.
- Ulfig, N. (2010) 'Respirationssystem', in *Kurzlehrbuch Histologie*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag KG, pp. 103–112.
- Urban, N. *et al.* (2015) 'Identification and Validation of Larixyl Acetate as a Potent TRPC6 Inhibitor', *Molecular Pharmacology*, 89(1), pp. 197–213. doi: 10.1124/mol.115.100792.
- VALAVANIDIS, A., VLACHOGIANNI, T. and FIOTAKIS, C. (2009) '8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis', *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 27(2), pp. 120–139. doi: 10.1080/10590500902885684.
- Vazquez, G. *et al.* (2004) 'The mammalian TRPC cation channels', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1742(1–3), pp. 21–36. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2004.08.015.
- Venkatachalam, K. and Montell, C. (2007) 'TRP Channels'. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.

- Verhaegen, F. *et al.* (2018) 'ESTRO ACROP: Technology for precision small animal radiotherapy research: Optimal use and challenges', *Radiotherapy and Oncology*, 126(3), pp. 471–478. doi: 10.1016/j.radonc.2017.11.016.
- Waghray, M. *et al.* (2005) 'Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts', *The FASEB Journal*, 19(7), pp. 854–856. doi: 10.1096/fj.04-2882fje.
- Walker, R. G., Willingham, A. T. and Zuker, C. S. (2000) 'A Drosophila mechanosensory transduction channel.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 287(5461), pp. 2229–34. doi: 10.1126/SCIENCE.287.5461.2229.
- Wang, L. *et al.* (2018) 'Structures and gating mechanism of human TRPM2', *Science*, 362(6421), p. eaav4809. doi: 10.1126/science.aav4809.
- Wang, R. *et al.* (1999) 'Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides.', *The American journal of physiology*, 277(6), pp. L1158-64. doi: 10.1152/ajplung.1999.277.6.L1158.
- Weissmann, N. *et al.* (2006) 'Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 103(50), pp. 19093–8. doi: 10.1073/pnas.0606728103.
- Weissmann, N. *et al.* (2012) 'Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia–reperfusion induced oedema in mice', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 3(1), p. 649. doi: 10.1038/ncomms1660.
- Wes, P. D. *et al.* (1995) 'TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), pp. 9652–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7568191> (Accessed: 10 January 2019).
- West, J. B. (2009) 'Comparative physiology of the pulmonary blood-gas barrier: the unique avian solution', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(6), pp. R1625–R1634. doi: 10.1152/ajpregu.00459.2009.
- White, E. S. (2015) 'Lung extracellular matrix and fibroblast function', *Annals of the American Thoracic Society*, 12(March), pp. S30–S33. doi: 10.1513/AnnalsATS.201406-240MG.
- Williams, J. P., Johnston, C. J. and Finkelstein, J. N. (2010) 'Treatment for radiation-induced pulmonary late effects: spoiled for choice or looking in the wrong direction?', *Current*

- drug targets*. NIH Public Access, 11(11), pp. 1386–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20583979> (Accessed: 17 July 2019).
- Winn, M. P. *et al.* (2005) 'A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis', 308(June), pp. 2003–2006.
- Wirsdörfer, F. and Jendrossek, V. (2017) 'Modeling DNA damage-induced pneumopathy in mice: insight from danger signaling cascades', *Radiation Oncology*. BioMed Central, 12(1), p. 142. doi: 10.1186/s13014-017-0865-1.
- Wright, J. R. (2005) 'Immunoregulatory functions of surfactant proteins', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 5(1), pp. 58–68. doi: 10.1038/nri1528.
- Xia, Y. *et al.* (2014) 'Classical transient receptor potential 1 and 6 contribute to hypoxic pulmonary hypertension through differential regulation of pulmonary vascular functions.', *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. NIH Public Access, 63(1), pp. 173–80. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01902.
- Xu, X. *et al.* (2013) 'Characterization of Small Molecule TRPC3 and TRPC6 agonist and Antagonists', *Biophysical Journal*, 104(2), p. 454a. doi: 10.1016/j.bpj.2012.11.2513.
- Xu, Y. *et al.* (2016) 'Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis', *JCI Insight*, 1(20), pp. 1–18. doi: 10.1172/jci.insight.90558.
- Xu, Y. D. *et al.* (2003) 'Release of biologically active TGF- β 1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis', *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(3), pp. L527–L539. doi: 10.1152/ajplung.00298.2002.
- Yamaguchi, Y. *et al.* (2018) 'TRPC3 participates in angiotensin II type 1 receptor-dependent stress-induced slow increase in intracellular Ca²⁺ concentration in mouse cardiomyocytes', *The Journal of Physiological Sciences*. Springer Japan, 68(2), pp. 153–164. doi: 10.1007/s12576-016-0519-3.
- Yamashita, H. *et al.* (2007) 'Exceptionally high incidence of symptomatic grade 2–5 radiation pneumonitis after stereotactic radiation therapy for lung tumors', *Radiation Oncology*. BioMed Central, 2(1), p. 21. doi: 10.1186/1748-717X-2-21.
- Yildirim, E. and Birnbaumer, L. (2007) 'TRPC2: Molecular Biology and Functional Importance', in *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 53–75. doi: 10.1007/978-3-540-34891-7_3.
- Yu, Y. *et al.* (2003) 'PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. American Physiological Society Bethesda, MD , 284(2), pp. C316–C330. doi:

10.1152/ajpcell.00125.2002.

- Zechel, S., Werner, S. and von Bohlen und Halbach, O. (2007) 'Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain', *Cell and Tissue Research*, 328(3), pp. 651–656. doi: 10.1007/s00441-007-0388-4.
- Zhang, W. *et al.* (2015) 'Ankyrin Repeats Convey Force to Gate the NOMPC Mechanotransduction Channel', *Cell*, 162(6), pp. 1391–1403. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.024.
- Zhang, Z. *et al.* (2001) 'Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), pp. 3168–3173. doi: 10.1073/pnas.051632698.
- Zhou, J. *et al.* (2008) 'Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses', *Nature Neuroscience*, 11(7), pp. 741–743. doi: 10.1038/nn.2127.
- Zhu, X. *et al.* (1995) 'Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila trp* gene.', *FEBS letters*, 373(3), pp. 193–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7589464> (Accessed: 10 January 2019).

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Susanne Maria Fiedler, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Analyse des molekularen Aktivierungsmechanismus des TRPC6 Kanals und Entschlüsselung der Funktion von TRPC6 in Lungenzellen während der Entwicklung einer Lungenfibrose“

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, 25.11.2020

Ort, Datum

Susanne Fiedler

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Alexander Dietrich dafür bedanken, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, im Anschluss an meine Masterarbeit weiter im Bereich der TRP-Kanäle zu forschen und die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Ich möchte mich für die großartige Betreuung in den vergangenen viereinhalb Jahren und dafür, dass Du bei wissenschaftlichen Fragestellungen jederzeit ansprechbar warst und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden bist, herzlichst bedanken.

Ebenso gebührt mein Dank dem Institutsvorstand Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann, der es mir ermöglichte meine Doktorarbeit am Walther-Straub-Institut im Rahmen des TRR-CRC.152 durchführen zu können und an vielen interessanten Kongressen teilzunehmen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Ursula Storch und Herrn Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler für die Betreuung während der Arbeit an dem Projekt zur Untersuchung des molekularen Aktivierungsmechanismus des TRPC6-Kanals und der Hilfestellung bei der Versuchsdurchführung bedanken. Ohne Euch wäre die Publikation zu dem Thema nicht möglich gewesen. Mein herzlicher Dank gilt auch Serap und allen anderen Mitgliedern der AG Storch und AG Mederos, die mich während der Versuchsdurchführung unterstützt haben und so herzlich in ihrem Labor aufgenommen haben.

Ebenso möchte ich mich herzlichst bei Frau Prof. Dr. Kirsten Lauber und Herrn Dr. Michael Orth der AG Molekulare Onkologie des Klinikums Großhadern für die sehr gute Kooperation bedanken. Tausend Dank Michael, für die wirklich tatkräftige Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen.

Ich möchte all den wundervollen Kollegen der AG Dietrich, die ich während meiner Zeit am Walther-Straub-Institut kennenlernen durfte, meinen Dank aussprechen. Die tolle

Zusammenarbeit, die stete Hilfe und Unterstützung und die vielen schönen Momente werden mir immer in Erinnerung bleiben. Ich habe mich jeden Tag gefreut mit Euch arbeiten zu dürfen!

Vielen Dank Jana, du warst während meiner Masterarbeit eine tolle Betreuerin und hast einem die Arbeitszeit durch deine Backkünste im wahrsten Sinne des Wortes versüßt. Lieben Dank auch an Dich Kathi, dass ich dein Thema übernehmen durfte und Du mich so gut eingearbeitet hast. Die gemeinsamen Besuche mit Dir und Bettina im Yogastudio haben immer für die nötige Entspannung nach einer stressigen Woche gesorgt. Am längsten begleitet habt Ihr mich - Bettina, Jonas und Martina - und ich möchte mich für die phantastische Zeit mit Euch bedanken. Dafür, dass Ihr während der Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit für mich da wart, mir jederzeit geholfen habt und wir so viel Spaß miteinander hatten. Gerne denke ich an all die schönen Momente im Labor, während der Mittagspause, oder auch auf dem Weihnachtsmarkt und auf der Wiesn zurück und freue mich umso mehr, dass wir immer noch Freunde sind. Liebe Larissa, ich möchte mich auch bei Dir von ganzem Herzen für die tolle Zusammenarbeit, deine Hilfe, und dafür, dass Du den wunderbaren Doktorandentreff ins Leben gerufen hast, bedanken. Ebenso möchte ich Dir, Diana, für die gute Zusammenarbeit meinen Dank aussprechen. Liebe Suhi, liebe Astrid und lieber Christian, es war toll Euch noch kennenzulernen und ich habe immer gerne mit Euch zusammengearbeitet.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitgliedern der AG Nicke und der AG Schredelsecker für Ihre Hilfe und die stets interessanten und lustigen Gespräche während der Mittagspause.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Moni und Ralf und meinem Bruder Sebastian für die bedingungslose Unterstützung während der Anfertigung meiner Doktorarbeit und in jeder Lebenslage. Insbesondere meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen danken, ohne Euch wäre Dies nicht möglich gewesen und ich bin unendlich dankbar und froh Euch als Eltern zu haben!

Zuletzt möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei Dir, Dennis, dafür bedanken, dass du mir in der stressigen Endphase der Anfertigung meiner Doktorarbeit eine stetige Stütze warst und mir immer wieder motivierend bei Seite gestanden bist. Danke, dass du immer für mich da warst und bist!