

---

AUS DEM  
WALTHER-STRAUB-INSTITUT  
FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE  
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. THOMAS GUDERMANN



---

---

# INTERAKTION ALKYLIERENDER SUBSTANZEN MIT TRPV4-KANÄLEN

---

---

DISSERTATION  
ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN  
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER  
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON  
LORENZ THUMANN

AUS  
REGENSBURG

2023

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erstes Gutachten:	Professor Dr. med. Dirk Steinritz
Zweites Gutachten:	Professor Dr. rer. nat. Christian Ries
Drittes Gutachten:	Professor Dr. rer. nat. Alexander Dietrich
Dekan:	Professor Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. September 2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>II</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 TRP-Kanalproteine . . . . .	1
1.1.1 Nomenklatur, Aufbau und Eigenschaften . . . . .	1
1.2 TRPV4 . . . . .	2
1.2.1 Aufbau . . . . .	2
1.2.2 Funktion und Expression . . . . .	3
1.2.3 Stimuli . . . . .	4
1.2.4 Pathologien und therapeutische Konzepte . . . . .	6
1.3 S-Lost . . . . .	7
1.3.1 Pathologien und Behandlungsansätze . . . . .	7
1.3.2 Geschichte . . . . .	8
1.3.3 Chemische Struktur, Alkylierung und andere Mechanismen der Schä- digung . . . . .	9
1.4 Fragestellung . . . . .	11
1.4.1 Hypothese . . . . .	11
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1 Material . . . . .	12
2.1.1 Geräte und Utensilien . . . . .	12
2.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen . . . . .	14
2.2 Software . . . . .	18
2.3 Zellkultur . . . . .	18
2.3.1 Zellkulturpassage . . . . .	18
2.3.2 Zellzählung . . . . .	19
2.3.3 Kryokonservierung . . . . .	19
2.3.4 Aussaat von Zellen . . . . .	19
2.4 Etablierung einer TRPV4-überexprimierenden Zelllinie . . . . .	20
2.4.1 Expressionsvektor . . . . .	20
2.4.2 Herstellung von LB-Agar-Platten . . . . .	21
2.4.3 Bakterielle Transformation . . . . .	21
2.4.4 Bakterienkultur zur Plasmidaufbereitung . . . . .	22
2.4.5 Aufreinigung der Plasmid-DNA . . . . .	22
2.4.6 Bestimmung des LC <sub>100</sub> -Wertes von G418 für HEK293-wt-Zellen . . . . .	23
2.4.7 Transfektion von HEK293-wt-Zellen mit TRPV4-Plasmid . . . . .	23
2.5 Molekularbiologische Methoden . . . . .	24
2.5.1 Nachweis von TRPV4-mRNA . . . . .	24
2.5.2 Nachweis von TRPV4-Kanalprotein . . . . .	30

2.6	Funktionelle Nachweismethoden . . . . .	34
2.6.1	Nachweis relativer zytosolischer $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung im Aequorin-Assay . . . . .	34
2.6.2	Patch-Clamp-Technik . . . . .	40
2.7	Zellviabilitätsuntersuchung . . . . .	43
2.7.1	WST-1-Assay . . . . .	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1	Bestimmung des $\text{LC}_{100}$ -Wertes von G418 für HEK293-wt-Zellen . . . . .	46
3.2	Nachweis von TRPV4-mRNA . . . . .	47
3.3	Nachweis von TRPV4-Kanalprotein . . . . .	49
3.4	Lumineszenz-Assay . . . . .	50
3.4.1	Vergleich verschiedener HEK293-V4 Zellpools . . . . .	50
3.4.2	Finale Bestimmung der $\text{EC}_{50}$ -Werte von GSK1016790A für die Zelllinie HEK293-V4 . . . . .	77
3.4.3	Vergleich der Zelllinien HEK293-V4 und HEK293-wt . . . . .	79
3.4.4	Bestimmung des $\text{IC}_{50}$ -Wertes von GSK2193874 für die Zelllinie HEK293-V4 . . . . .	80
3.4.5	Untersuchungen der Zelllinie HEK293-V4 im Zusammenhang mit CEES	83
3.5	Patch-Clamp-Technik im endogenen System . . . . .	87
3.6	Zellviabilität . . . . .	89
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>91</b>
4.1	Etablierung der Zelllinie HEK293-V4 . . . . .	91
4.2	Inhibierender Effekt von CEES für TRPV4-vermitteltes $\text{Ca}^{2+}$ -Signal . . . . .	92
4.3	Einfluss von CEES und GSK1016790A in Bezug auf Zellviabilität . . . . .	92
4.4	Kontext und Forschungsperspektiven . . . . .	93
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>95</b>
	<b>Anhang</b>	<b>109</b>
	Code der Datenauswertung mit R . . . . .	109
	Alignment verschiedener Sequenzieransätze mit der Originalsequenz von TRPV4 .	113
	<b>Danksagung</b>	<b>124</b>
	<b>Affidavit</b>	<b>126</b>
	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>127</b>

## Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit untersucht die Interaktion zwischen dem Alkylierungsmittel 1-Chlor-2-ethylsulfanylethan (CEES) und dem *transient receptor potential cation channel subfamily V member 4* (TRPV4)-Kanalsystem. Obwohl Hautkampfstoffe wie CEES international verboten sind, stellen sie immer noch eine große Bedrohung in der modernen Kriegsführung dar. Die zellulären Signalwege, welche der toxischen Wirkung von CEES zugrunde liegen, sind jedoch immer noch unklar und bedürfen tiefergehender Untersuchungen in diesem Bereich. Vorausgehende Untersuchungen und Recherchen deuteten auf eine Bedeutung des Kationenkanals TRPV4 in der Lungentoxikologie hin.

Mithilfe eines Aequorin-basierten Lumineszenz-Assays konnte eine inhibierende Wirkung von CEES auf  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable TRPV4-Kanäle der neu etablierten Zelllinie HEK293 mit Überexpression des Membrankanals TRPV4 (HEK293-V4) in Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit nachgewiesen werden. In Bezug auf Untersuchungen zur Zellviabilität zeigte sich, dass HEK293-V4-Zellen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber CEES im Vergleich zu Zellen der Zelllinie HEK293-Wildtyp (HEK293-wt) aufweisen. Dieser Effekt kann durch eine vorherige Inkubation der HEK293-V4-Zellen mit dem spezifischen TRPV4-Agonisten GSK1016790A abgeschwächt werden. Der protektive Effekt des Agonisten steigt mit seiner Dosis. Vor allem letztere Erkenntnis bietet einen vielversprechenden Ansatz für weitere Untersuchungen zur Behandlung von Vergiftungen durch CEES und TRPV4-vermittelten Pathologien.

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturformel von S-Lost . . . . .	10
1.2	Strukturformel von CEES . . . . .	10
2.1	Expressionsvektor für die Überexpression von TRPV4 . . . . .	21
2.2	Komplexbildung Bicinchoninsäure-Assay . . . . .	31
2.3	Planarer Patch-Clamp Aufbau . . . . .	40
2.4	Spaltung von WST-1 zu einer Formazan-Verbindung . . . . .	43
3.1	Lichtmikroskopische Darstellung von HEK293-wt-Zellen nach Inkubation mit G418 . . . . .	46
3.2	Detektierte TRPV4-mRNA in HEK293-V4-Zellen . . . . .	47
3.3	UV-Bild eines RT-PCR-Amplikons der cDNA von <i>TRPV4</i> in HEK293-V4-Zellen . . . . .	47
3.4	Sequenzierte TRPV4-mRNA in HEK293-V4-Zellen . . . . .	48
3.5	Nahinfrarot-Bild eines Immunoblots mit markiertem TRPV4-Kanalprotein . . . . .	49
3.6	HEK293-V4 Zellpool 1: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	53
3.7	HEK293-V4 Zellpool 1: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	54
3.8	HEK293-V4 Zellpool 1: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	54
3.9	HEK293-V4 Zellpool 2: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	55
3.10	HEK293-V4 Zellpool 2: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	56
3.11	HEK293-V4 Zellpool 2: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	56
3.12	HEK293-V4 Zellpool 3: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	57
3.13	HEK293-V4 Zellpool 3: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	58
3.14	HEK293-V4 Zellpool 3: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	58
3.15	HEK293-V4 Zellpool 4: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	59
3.16	HEK293-V4 Zellpool 4: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	60
3.17	HEK293-V4 Zellpool 4: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	60
3.18	HEK293-V4 Zellpool 5: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	61
3.19	HEK293-V4 Zellpool 5: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	62
3.20	HEK293-V4 Zellpool 5: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	62

3.21 HEK293-V4 Zellpool 6: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	63
3.22 HEK293-V4 Zellpool 6: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	64
3.23 HEK293-V4 Zellpool 6: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	64
3.24 HEK293-V4 Zellpool 7: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	65
3.25 HEK293-V4 Zellpool 7: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	66
3.26 HEK293-V4 Zellpool 7: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	66
3.27 HEK293-V4 Zellpool 8: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	67
3.28 HEK293-V4 Zellpool 8: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	68
3.29 HEK293-V4 Zellpool 8: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	68
3.30 HEK293-V4 Zellpool 9: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	69
3.31 HEK293-V4 Zellpool 9: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	70
3.32 HEK293-V4 Zellpool 9: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	70
3.33 HEK293-V4 Zellpool 10: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	71
3.34 HEK293-V4 Zellpool 10: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	72
3.35 HEK293-V4 Zellpool 10: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	72
3.36 HEK293-V4 Zellpool 11: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	73
3.37 HEK293-V4 Zellpool 11: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	74
3.38 HEK293-V4 Zellpool 11: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	74
3.39 HEK293-V4 Zellpool 12: Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	75
3.40 HEK293-V4 Zellpool 12: AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	76
3.41 HEK293-V4 Zellpool 12: Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	76
3.42 Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	77
3.43 AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	78
3.44 Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	78
3.45 Vergleich der Zelllinien HEK293-V4 und HEK293-wt bezüglich der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A . . . . .	79
3.46 Relative Lumineszenz nach Injektion von GSK2193874 und GSK1016790A . . . . .	81
3.47 AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK2193874 . . . . .	82
3.48 Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK2193874 . . . . .	82
3.49 Relative Lumineszenz nach Injektion von CEES . . . . .	83

3.50 AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A nach Präinkubation mit CEES . . . . .	84
3.51 AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A nach Präinkubation mit CEES . . . . .	85
3.52 Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A nach Präinkubation mit CEES . . . . .	85
3.53 AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von GSK1016790A nach Präinkubation verschiedener Dauer mit CEES . . . . .	86
3.54 Relative Stromstärke nach Injektion von GSK1016790A für A549-Zellen . .	87
3.55 Maxima der relativen Stromstärke nach Injektion von GSK1016790A für A549-Zellen . . . . .	88
3.56 Relative Zellviabilität der Zelllinien HEK293-wt und HEK293-V4 nach Ex- position mit CEES . . . . .	89
3.57 Relative Zellviabilität der Zelllinien HEK293-wt und HEK293-V4 nach Ex- position mit CEES ± GSK1016790A-Präinkubation . . . . .	90

# Tabellenverzeichnis

1.1	Agonisten des TRPV4-Kanals . . . . .	4
1.2	Antagonisten des TRPV4-Kanals . . . . .	4
2.1	Geräte . . . . .	12
2.2	Utensilien . . . . .	13
2.3	Software . . . . .	18
2.4	Zellaussaat nach Zelllinie und Wachstumsfläche . . . . .	20
2.5	Volumen an Kulturmedium nach Wachstumsfläche des Kulturgefäßes . . . . .	20
2.6	Konditionen für die Transfektion von HEK293-wt-Zellen . . . . .	24
2.7	Kombinationen von TRPV4-Primern für eine RT-PCR . . . . .	25
2.8	Kombinationen von TRPV4-Primern für die Sequenzierung . . . . .	26
2.9	Pipettierplan für eine reverse Transkription . . . . .	28
2.10	Inkubationsplan für eine reverse Transkription . . . . .	28
2.11	Pipettierplan für eine PCR . . . . .	29
2.12	Inkubationsplan für eine PCR . . . . .	29
2.13	Pipettierplan für eine BSA-Verdünnungsreihe . . . . .	32
2.14	Verdünnungsverhältnisse der Primärantikörper . . . . .	33
2.15	Verdünnungsverhältnisse der Sekundärantikörper . . . . .	34
2.16	Versuchsbedingungen des Aequorin Lumineszenz-Assays . . . . .	36
2.17	Injektionskonzentrationen GSK1016790A im Aequorin-Assay zur Zellpool- selektion . . . . .	37
2.18	Injektionskonzentrationen GSK1016790A für EC <sub>50</sub> im Aequorin-Assay . . . . .	38
2.19	Injektionskonzentrationen GSK2193874 im Aequorin-Assay . . . . .	38
2.20	Injektionskonzentrationen CEES im Aequorin-Assay . . . . .	39
2.21	Konzentrationen von CEES für die Vorbehandlung im Aequorin-Assay . . . . .	39
2.22	Versuchsbedingungen des Patch-Clamp-Ansatzes . . . . .	42
2.23	Injektionskonzentrationen GSK1016790A im Patch-Clamp-Ansatz . . . . .	42
2.24	Versuchsbedingungen des WST-1-Assays . . . . .	44
2.25	Konzentrationen von CEES für die Vergiftung im WST-Assay: Kondition A . . . . .	44
2.26	Konzentrationen von GSK1016790A für die Vorbehandlung im WST-Assay: Kondition B . . . . .	45
2.27	Konzentrationen von CEES für die Vergiftung im WST-Assay: Kondition B . . . . .	45
3.1	Zellpools der Zelllinie HEK293-V4 . . . . .	51
3.2	Vergleich der EC <sub>50</sub> -Werte von GSK1016790A für die HEK293-V4 Zellpools . . . . .	52
3.3	Übersicht der in Abbildung 3.46 dargestellten Injektionen . . . . .	80

## Abkürzungsverzeichnis

- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. 2, 4–6, 11, 91
- A<sub>260</sub>** Absorption bei 260 nm. 26
- A<sub>340</sub>** Absorption bei 340 nm. 26
- n<sub>bio</sub>** Anzahl der biologischen Replikate. 53–90
- ALI** *Acute Lung Injury*. 7, 8, 11
- ARD** *ankyrin repeat domain*. 2
- ARDS** *Acute Respiratory Distress Syndrome*. 7, 8, 11, 93
- ATP** Adenosintriphosphat. 10
- AUC** *Area Under the Curve*. 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76–78, 81, 82, 84–86, 91
- BCA** disodium;2-(4-Carboxylatchinolin-2-yl)chinolin-4-carboxylat. 13, 31
- BSA** Bovines Serumalbumin. 31, 32, III
- cdNA** *complementary deoxyribonucleic acid*. 27, 28, 47, 48
- CEES** 1-Chlor-2-ethylsulfanylethan. 10, 11, 17, 36–40, 42–45, 50, 83–90, 92–94, I
- COPD** *chronic obstructive pulmonary disease*. 7, 11, 93
- DMEM** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. 14, 19, 23, 24, 36, 39, 42, 44
- DMSO** Dimethylsulfoxid. 19, 37, 38, 40, 42–45, 80, 87, 88
- DNA** *deoxyribonucleic acid*. 9, 10, 12–14, 18, 20–24, 27–30, 46, 47, 92
- dsDNA** *double-stranded deoxyribonucleic acid*. 26
- EC<sub>50</sub>** halbmaximal effektive Wirkstoffkonzentration. 18, 37, 38, 50, 52, 77, 91
- EDTA** 2,2',2'',2'''-(Ethan-1,2-diyl)dinitrilo)tetraessigsäure. 14, 15, 18, 19
- EGTA** Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure. 17
- FBS** Fetales Kälberserum. 14, 18, 19
- G418** Geneticin oder (2R,3S,4R,5R,6S)-5-Amino-6-[(1R,2S,3S,4R,6S)-4,6-diamino-3-[(2R,3R,4R,5R)-3,5-dihydroxy-5-methyl-4-methylaminoxan-2-yl]oxy-2-hydroxycyclohexyl]oxy-2-(1-hydroxyethyl)oxan-3,4-diol. 14, 18, 20, 23, 24, 46
- GAPDH** Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. 15, 33, 49

**gDNA** *genomic deoxyribonucleic acid*. 27

**GFP** green fluorescent protein. 35

**GSK1016790A** N-[(1S)-1-[[4-[(2S)-2-[[2,4-Dichlorophenyl)sulfonyl]amino]-3-hydroxy-1-oxopropyl]-1-piperazinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]benzo[b]thiophene-2-carboxamide. 4, 17, 36–40, 42–45, 50, 52–82, 84–88, 90–93, I, III

**GSK2193874** 7-bromo-N-(1-phenylcyclopropyl)-3-[(4-piperidin-1-yl)piperidin-1-yl)methyl]-2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]quinoline-4-carboxamide. 4, 17, 36–38, 40, 80–82, 91, III

**HBS** *HEPES-buffered saline*. 16, 36–39

**HEK293-V4** Zelllinie HEK293 mit Überexpression des Membrankanals TRPV4. 18, 20, 24, 27, 30, 31, 35–37, 40, 43, 44, 46–77, 79–81, 83, 84, 86, 87, 89–93, 124, I

**HEK293-wt** HEK293-Wildtyp. 5, 19–21, 23, 24, 38, 43, 44, 46, 47, 49, 50, 79, 80, 89–93, I

**HEPES** 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure. 16, 17

**hTRPV4** *human transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*. 20, 25, 33

**HUVEC** *human umbilical vein endothelial cell*. 38

**IC<sub>50</sub>** halbmaximal inhibierende Wirkstoffkonzentration. 18, 38, 81, 84, 91

**LB** *lysogeny broth*. 14, 21, 22

**LC<sub>100</sub>** absolut letale Wirkstoffkonzentration. 19, 23, 46

**LC<sub>50</sub>** mittlere letale Wirkstoffkonzentration. 10

**mRNA** *messenger ribonucleic acid*. 24, 25, 27, 28, 30, 47, 48, 50, 91

**NAD** Nicotinamidadenindinukleotid. 10

**PAGE** Polyacrylamid-Gelelektrophorese. 31–33, 49

**PARP** Poly(ADP-ribose)-Polymerase. 10

**PBS** *Phosphate-buffered saline*. 14, 18, 19, 41, 42

**PGE<sub>2</sub>** Prostaglandin E<sub>2</sub>. 3

**PLA<sub>2</sub>** Phospholipase A<sub>2</sub>. 3, 5, 6

**PVDF** Poly-1,1-difluoroethen. 13, 33, 34

**RIPA** *Radioimmunoprecipitation assay*. 14, 31, 32

**RLU** relative Lichteinheiten. 36

**RNA** *ribonucleic acid*. 13, 20, 22, 26–28

**RT-PCR** *Reverse transcription polymerase chain reaction*. 24, 25, 29, 47, III

**S-Lost** Bis(2-chlorethyl)sulfid, Schwefel-Lost oder 1-Chlor-2-[(2-chlorethyl)sulfanyl]ethan.  
7–11

**SDS** Natriumlaurylsulfat. 12, 15, 31–33, 49

**T<sub>m</sub>** Schmelztemperatur. 25, 26, 29

**TBE** TRIS-Borat-EDTA. 14, 29, 30

**TBS** *TRIS-buffered saline*. 15, 33, 34

**TBST** *TRIS-buffered saline* mit Tween20. 15, 33, 34

**TRIS** 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol. 14, 15, 23, 32, 33

**TRP** *transient receptor potential*. 1, 2, 5, 11, 91, 94

**TRPA1** *transient receptor potential cation channel subfamily A member 1*. 11

**TRPV4** *transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*. 2–7, 11, 15, 20–27,  
30, 31, 33, 35–37, 39–43, 46–51, 79, 80, 83, 87, 91–94, 124, I, III

# 1 Einleitung

## 1.1 TRP-Kanalproteine

Die *transient receptor potential* (TRP)-Kanäle bilden eine Gruppe von Membrankanälen, die im Menschen in 9 Familien unterteilt werden kann [1]. Die meisten dieser membrandurchspannenden Proteine tragen dazu bei, verschiedene Stimuli physikalischer oder chemischer Natur zu erkennen, indem sie mit Änderungen in der Konformation reagieren und oft nachgeschaltete Signalkaskaden in betreffenden Zellen anstoßen. TRP-Kanäle sind deshalb essenziell für mannigfaltige Sinneswahrnehmungen [2, 3].

So kommen TRP-Kanäle beispielsweise in den Photorezeptoren der schwarzbäuchigen Taufliege *Drosophila melanogaster* vor, wo sie 1969 erstmals beschrieben wurden [4]. In den Retinae der Fliegen sind sie nach kontinuierlichem Lichtreiz für ein transientes elektrisches Potential verantwortlich — so der Name *transient receptor potential* (TRP) — welches im Elektretinogramm gemessen wurde [4]. Das entsprechende *TRP*-Gen auf Chromosom 3 dieser Fliege wurde 1985 identifiziert [5, 6, 7] und 1989 sequenziert [8, 9]. Heute ist klar, dass dieses erstmals entdeckte *TRP*-Gen für den *Drosophila* TRP-Kanal codiert, welcher vermutlich indirekt über konformationelle Änderung des  $IP_3$ -Rezeptors im Rahmen der Phototransduktion durch einfallendes Licht aktiviert wird [10, 11]. Außerdem konnte durch die Patch-Clamp-Technik festgemacht werden, dass das Kanalprotein durchlässig für  $Ca^{2+}$ -Ionen ist [12].

### 1.1.1 Nomenklatur, Aufbau und Eigenschaften

Die meisten dieser TRP-Familien haben einen ähnlichen Bauplan gemein. Ein TRP-Kanal besteht dabei aus 4 identischen (Homotetramere) oder unterschiedlichen (Heterotetramere) Untereinheiten. Eine Untereinheit besteht wiederum aus 6 Transmembrandomänen, wobei jeweils Domäne 5 und 6 zentral lokalisiert sind und mit jeweiligen Domänen der anderen Untereinheiten die Pore des Kanals bilden [13]. Sowohl die im Zytosol gelegenen C- und N-Termini als auch die übrigen Transmembrandomänen vermitteln die vielfältigen Funktionen der einzelnen TRP-Kanäle [14].

Phylogenetisch können die 9 Familien der TRP-Superfamilie in 2 Gruppen unterteilt werden. Merkmale, welche die Zuordnung zu Gruppe 1 begründen, sind unter anderem C-terminale TRP-Domänen und N-terminale *ankyrin repeats* [15]. TRP-Domänen sind Sequenzen von 23–25 Aminosäuren, die in ähnlicher Art in vielen Mitgliedern von Gruppe 1 vorkommen [16]. Gruppe 1 besteht aus folgenden Familien [1]:

1. TRPA (*ankyrin*)
2. TRPV (*vanilloid*)
3. TRPVL (*vanilloid-like*)
4. TRPN (*no mechanoreceptor potential C*)
5. TRPC (*canonical*)
6. TRPM (*melastatin*)

## 7. TRPS (*soromelastatin*)

Gruppe 2 zeichnet sich durch lange extrazelluläre Schleifen zwischen Transmembrandomäne 1 und 2 aus. TRP-Domänen und *ankyrin repeats* fehlen [15]. Folgende Familien gehören zu Gruppe 2 [1]:

1. TRPP (*polycystin*)
2. TRPML (*mucoipin*)

Neben den Mitgliedern dieser 2 Gruppen wurde außerdem TRPY/TRPF beschrieben — eine Familie von TRP-Kanälen die ausschließlich intrazellulär in Pilzen exprimiert wird. TRP-Kanäle sind, bedingt durch die Struktur der Poren, als nicht-selektive Kationenkanäle beschrieben. Somit sind sie permeabel für  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  [14].

## 1.2 TRPV4

Der *transient receptor potential cation channel subfamily V member 4* (TRPV4) wurde im Jahr 2000 erstmals als *Vanilloid Receptor-Related Osmotically Activated, cation-selective Channel* (VR-OAC) von Liedtke et al. identifiziert und kloniert [17]. Weniger geläufige Bezeichnungen für den Membrankanal sind TRP12, SSQTL1, BCYM3, CMT2C, VRL2, HMSN2C, OTRPC4, SMAL und SPSMA, VROAC [18].

### 1.2.1 Aufbau

Der Zugehörigkeit von TRPV4 zur Gruppe 1 entsprechend, besitzt der Kanal N-terminal eine *ankyrin repeat domain* (ARD) und C-terminal eine TRP Domäne. Ebenso C-terminal befindet sich eine Calmodulin Bindungsstelle und eine PSD95/SAP90-Discs-large-Zonula-occludens-1 Domäne (PDZ). Die ARD besteht — wie auch in TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV6 — aus 6 *repeats* [13, 19].

TRPV4 Proteine bilden bevorzugt Homomultimere aus 4 gleichen Untereinheiten (Homotetramere) [20, 21, 22]. Möglich scheint jedoch beispielsweise auch eine alternierende Heteromerisierung aus je 2 TRPV2 und TRPV4 Untereinheiten [23].

TRPV4 ist wie die meisten TRP-Kanäle ein nicht-selektiver Kationenkanal. Er besitzt nach Aktivierung mittels 1  $\mu$ M  $4\alpha$ PDD ein relatives  $Ca^{2+}$ -Permeabilitätsverhältnis ( $P_{Ca}/P_{Na}$ ) von 5,8 [24]. TRPV5 und TRPV6 sind im Vergleich selektiver für  $Ca^{2+}$  [25].

TRPV4 besitzt mit 871 aa eine Molekülmasse von 98 kDa [18].

**Funktionelle Bedeutung der strukturellen Merkmale** Innerhalb der ARD wurde eine Bindungsstelle beschrieben, um die intrazelluläres ATP und Calmodulin konkurrieren. Bindung einer der beiden Konkurrenten bewirkt eine Sensibilisierung des Kanals. Mutagenetische Veränderungen der Bindungsstelle resultierten in einer reduzierten Bindung von ATP oder Calmodulin. Die Verbindung zum zellulären Energiespeicher ATP legt einen Einfluss des Zellmetabolismus auf die Kanalaktivität nahe [26].

Die C-terminale Calmodulin-Bindungsstelle vermittelt eine Potenzierung der TRPV4-Aktivierung bei Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ . Bei anhaltendem  $Ca^{2+}$ -Einstrom folgt im Anschluss an die Potenzierung eine Inhibierung der Aktivität, welche über einen negativen Feedback-Mechanismus überschießende Werte von  $[Ca^{2+}]_i$  verhindert. Eine durch Mutagenese veränderte Calmodulin-Bindungsstelle verhindert die  $Ca^{2+}$ -abhängige Potenzierung [27].

Die PDZ stellt eine Proteininteraktionsdomäne dar.

Eine Region zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4 scheint essenziell für die Aktivierung von TRPV4 durch die beiden chemischen Agonisten Bisandrographolide A und  $4\alpha$ PDD (s. Kapitel 1.2.3) zu sein [28].

## 1.2.2 Funktion und Expression

Eine *Northern Blot* Analyse der Organe von Ratten zeigte, dass TRPV4 reichlich in den Nieren, der Lunge, der Milz, den Hoden und in Fettgewebe vertreten ist [17]. Im Innenohr wurde der Membrankanal in inneren und äußeren Haarzellen des Corti-Organs und in den Haarzellen des Vestibularorgans in *Cristae ampullares* und *Maculae staticae* gefunden [17]. Auch im Epithel der *Regio olfactoria* ist TRPV4 vertreten [29]. Bezogen auf das Nervensystem ist TRPV4 in terminalen parasymphatischen Ganglien und in Spinalganglien zu finden [17, 30]. Ebenso exprimieren das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVL) rostral des Hypothalamus, das *Organum subfornicale* (SFO) unterhalb des *Fornix cerebri*, der *Nucleus praeropticus medianus* (MnPO) des anterioren Hypothalamus und andere Teile des Gehirns den TRPV4-Kanal [17].

Der MnPO und das SFO gehören dabei zur Gruppe der zirkumventrikulären Organe (CVO) und sind beide an der Wahrnehmung von osmotischem Druck beteiligt. Außerdem projizieren Neurone beider Organe zu den *Nucli supraopticus* und *paraventricularis* des Hypothalamus, welche über die Neurohypophyse das Antidiuretische Hormon (ADH) freisetzen und somit an der Osmoregulation beteiligt sind [31, 32, 33, 34].

Ebenfalls im anterioren Hypothalamus lokalisiert befinden sich Neuronen mit, durch Wärme aktivierbaren, nicht-selektiven Kationenkanälen [35]. Entsprechend der Lokalisation von TRPV4-Kanälen im MnPO und im *Nucleus praeropticus medialis* (MPO), sowie deren Eigenschaft der Aktivierbarkeit durch Hitze (s. Kapitel 1.2.3), könnte es sich bei diesen nicht-selektiven Kationenkanälen um TRPV4-Kanäle handeln [17, 30].

**Gefäßtonus.** Bezüglich der Regulation des Tonus von Gefäßen wurde der TRPV4-bedingte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Verbindung mit Vasodilatation gebracht. So konnte gezeigt werden, dass TRPV4 an der Synthese des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) beteiligt ist [36]. Außerdem wird nach Aktivierung der  $\text{PLA}_2$ , welche auch essenziell für die Aktivierung von TRPV4 durch hypotone Zellschwellung ist (s. Kapitel 1.2.3), *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF) frei — ein weiterer Vasodilatator [37].

So ist TRPV4 nicht nur über eine mögliche zentrale Steuerung der Diurese (s. oben), sondern auch über die Steuerung der Gefäßweite an der Regulation des Blutdruckes beteiligt.

**Nozizeption.** TRPV4 spielt eine wichtige Rolle im Rahmen von Nozizeption und Hyperalgesie [38, 39, 40, 41]. So konnte gezeigt werden, dass afferente C-Fasern nach Erlanger und Gasser, welche an der Nozizeption beteiligt sind, durch hypotonen Reiz aktiviert werden. Diese Aktivität konnte durch TRPV4-Antagonisten unterbunden werden und scheint somit spezifisch für den Kanal zu sein. Des Weiteren hat man herausgefunden, dass die hypotone Aktivierung von TRPV4 durch Vorbehandlung mit Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) verstärkt werden kann. Diese Kombination von  $\text{PGE}_2$  und hypotonem Reiz führte in Hinterpfoten von Ratten auch zu verstärktem zurückschreckenden Verhalten, was mit verstärkter Nozizeption erklärbar ist. Dies konnte für Ratten mit *TRPV4-Knockdown* nur abgeschwächt gezeigt werden [40].

Die Verbindung von TRPV4 zur Nozizeption und Hyperalgesie konnte ebenso für Hitzereize gezeigt werden. Carrageen, ein proinflammatorisches Extrakt aus Rotalgen, bewirkte nach Injektion in Hinterpfoten von Ratten eine verminderte Latenz, sich dem Hitzereize zu entziehen. Was wiederum nicht in *TRPV4<sup>-/-</sup>* Ratten zu beobachten war [38].

Zuletzt konnte ein ähnlicher Effekt auch für mechanische Reize nachgewiesen werden. *TRPV4<sup>-/-</sup>* Mäuse zeigten im Vergleich zum Wildtyp ein weniger deutlich ausgeprägteres Vermeidungsverhalten gegenüber mechanischer Applikation von Druck auf den Schwanz. Diese Beobachtung konnte, im Unterschied zu beiden zuvor erwähnten nozizeptiven Reizen, auch ohne vorherige Injektion einer sensibilisierenden Substanz gemacht werden. [41].

### 1.2.3 Stimuli

#### Chemische Stimuli und Inhibitoren

##### Agonisten

Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht über endogene und exogene Agonisten des TRPV4-Kanals.

Tabelle 1.1: Agonisten des TRPV4-Kanals.

	Substanz	Quelle
<b>Endogene Agonisten</b>	5,6-Epoxyeicosatriensäure	[42]
	Dimethylallylpyrophosphat	[43]
	Citronensäure	[41]
<b>Exogene Agonisten</b>	GSK1016790A	[44]
	Bisandrographolide A	[45]
	Apigenin	[46]
	4 $\alpha$ PDD	[47]
	RN-1747	[48]
	Phorbol-12-myristat-13-acetat	[49]

##### Antagonisten

Zur Vollständigkeit werden an dieser Stelle in Tabelle 1.2 endogene und exogene Antagonisten des TRPV4-Kanals aufgelistet.

Tabelle 1.2: Antagonisten des TRPV4-Kanals.

	Substanz	Quelle
<b>Endogener Antagonist</b>	Resolvin D1	[50]
	GSK2193874	[51, 52]
<b>Exogene Antagonisten</b>	HC-067047	[53]
	RN-1734	[48]
	Rutheniumrot	[24]
	RN-9893	[54]
	Capsazepin	[48]
	GSK205	[55]
Citral	[56]	

#### Physikalische Stimuli und Inhibitoren

Neben den eben aufgeführten chemischen Stimuli und Inhibitoren werden TRPV4-Kanäle auch durch physikalische Phänomene aktiviert beziehungsweise inhibiert.

**Scherkräfte.** So kann TRPV4 beispielsweise durch mechanische Reize aktiviert werden. Es wurde gezeigt, dass eine gesteigerte Scherspannung ( $\tau$ ) durch luminalen Fluss in Sammelrohren und Verbindungstubuli von Mäusen zu einer anhaltenden Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  führt, welche nach Reduktion des Flüssigkeitsstroms auf das Ausgangsniveau zurückging.

Eine erneute gleichartige Stimulation führte Sekunden nach der ersten Stimulation zu Signalen, die mit einer leichten Desensibilisierung des Kanals erklärbar wären. In *TRPV4*<sup>-/-</sup> Mäusen konnte im Vergleich kein Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  registriert werden [57].

Bezüglich muriner Blutgefäße konnte gezeigt werden, dass auch hier eine erhöhte Scherspannung, durch Perfusion mit Flüssigkeit größerer Viskosität [58] oder Erhöhung der Flussgeschwindigkeit [59], zu TRPV4-Aktivierung in Endothelzellen führt [60, 61, 62]. Diese hat, wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, eine Vasodilatation zur Folge, welche in *TRPV4*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht zu verzeichnen war [58, 59]. Bezüglich der Untersuchungen mit Flüssigkeiten unterschiedlicher Viskosität führte eine erhöhte Scherspannung sogar zu einer geringfügigen Vasokonstriktion [58].

Die Erhöhung der Scherspannung durch ein visköseres Perfusionsmedium führt zu einer Aktivierung der PLA<sub>2</sub> und zu einer Aktivierung des TRPV4-Kanals [36]. Bei Inhibierung der PLA<sub>2</sub> bleibt eine Vasodilatation aus [36, 58]. Die Erkenntnis, dass TRPV4 im Rahmen hypotoner Zellschwellung durch 5,6-Epoxyeicosatriensäure nach PLA<sub>2</sub>-Aktivierung stimuliert wird (s. unten), legt nahe, dass für die Aktivierung durch Scherspannung ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt.

**Osmotischer Druck und Zellvolumen.** Für den Mechanismus, welcher die osmotische Aktivierung von TRPV4 erklärt, wurden 2 Studien mit widersprüchlicher Evidenz veröffentlicht [63, 64]. Eine Möglichkeit wäre dabei eine Phosphorylierung von TRPV4 durch die Tyrosinkinase Lyn [63]. Demgegenüber steht der Nachweis einer durch Zellschwellung bedingten Freisetzung von 5,6-Epoxyeicosatriensäure. Das Schwellen der Zelle führt zur Aktivierung der PLA<sub>2</sub>, welche Arachidonylethanolamid zu Arachidonsäure hydrolysiert. Diese wird im Anschluss mit molekularem Sauerstoff durch Cytochrom P450 zu 5,6-Epoxyeicosatriensäure und H<sub>2</sub>O gespalten [64]. 5,6-Epoxyeicosatriensäure stellt dabei einen endogenen Agonisten des TRPV4-Kanals dar (s. [42], Tabelle 1.1).

Die Erkenntnisse der Aktivierung von TRPV4 durch Phosphorylierung [63] konnten im Verlauf widerlegt werden [64].

Analog zur Aktivierung des Kanals durch mechanischen Druck von außen (s. unten) kommt die Aktivierung durch hypotone Zellschwellung gewissermaßen einem mechanischen Druck von innen gleich. Sowohl für Zellen mit Expression des TRPV4-Kanals als auch für Zellen ohne Expression kann eine vergleichbare Zunahme des Zellvolumens beobachtet werden [65].

**Mechanischer Druck.** Wie bereits in Kapitel 1.2.2 zur nozizeptiven Funktion von TRPV4 angeführt, scheint der Zellmembrankanal auch an der Wahrnehmung von Druck beteiligt zu sein. Von außen applizierter Druck mit einer Nadel auf unbehaarte Haut von Mäusen führte ab einem Schwellenwert von etwa 120 mmHg zu gemessenen Aktionspotentialen. In Mäusen ohne Expression des TRPV4 Kanals war dieser Schwellenwert mit etwa 350 mmHg signifikant höher zu verorten [41].

**Temperatur.** Im Kontext von Temperaturänderung konnte gezeigt werden, dass für HEK293-Zellen mit stabiler TRPV4 Expression ein wellenförmiger Hitzestimulus von 25–40 °C ab etwa 34 °C zu signifikant höherem  $[Ca^{2+}]_i$  führt, während der Hitzereiz in HEK293-wt-Zellen nur einen verhaltenen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  verursacht. Auch konnte das gemessene Signal durch Rutheniumrot, ein chemischer Antagonist des TRPV4-Kanals, weitestgehend unterdrückt werden. Dies legt nahe, dass der gemessene Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  weitestgehend auf die hitzebedingte Aktivierung des TRPV4-Kanals zurückzuführen ist [30]. Somit ist TRPV4 ab geringeren Temperaturen als TRPV1 (~43 °C) und TRPV2 (~52 °C) aktivierbar [66, 67, 68]. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Mutation der Aminosäure Ty-

rosin an Stelle 555 des TRPV4-Kanals, welche an der Ausbildung eines aromatischen Restes beteiligt ist, essenziell für die hitzebedingte Aktivierung ist [64].

**Wechselwirkungen.** Ebenso besteht Grund zur Annahme, dass verschiedene Arten der Aktivierung von TRPV4 koexistieren. Welche Modi sich dabei gegenseitig beeinflussen und welche nicht wurde bereits teilweise aufgeklärt.

So wurde gezeigt, dass TRPV4 in isotoner Lösung stärker durch einen Hitzereiz aktivierbar ist als in hypertoner [30].

Ergänzend wurde festgestellt, dass TRPV4 in wärmerer Umgebung (37 °C) stark durch hypoosmolaren Reiz, Scherspannung, 4 $\alpha$ PDD und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aktivierbar ist. Bei Raumtemperatur (~22 °C) jedoch war TRPV4 nur schwächer durch hypoosmolaren Reiz und 4 $\alpha$ PDD zu aktivieren. Eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Applikation von PMA oder nach Erhöhung der Scherspannung blieb jedoch aus.

Da PMA einen Proteinkinase C (PKC)-abhängigen Phorbol-ester darstellt, ist zu vermuten, dass über die Aktivierung der Kinase ein weiterer Mechanismus der Aktivierung existiert [17, 49].

Im Kontrast zu diesem synergistischen beziehungsweise antagonistischen Effekt der Aktivierung, steht die Erkenntnis, dass eine Inhibition von PLA<sub>2</sub> und Cytochrom P450 zwar zu einer Unterdrückung der TRPV4-Aktivierung durch hypotone Zellschwellung führt, nicht jedoch zur Unterdrückung der Aktivierung nach Hitzestimulus oder durch den exogenen Agonisten 4 $\alpha$ PDD [64]. Die letzteren beiden Modi der TRPV4-Aktivierung konnten durch eine N-terminale Mutation zweier Aminosäuren innerhalb der Transmembrandomäne 3 des Kanals unterbunden werden. Auch die basalen Werte von  $[Ca^{2+}]_i$  waren für diese Mutante auf dem Niveau von nicht mit TRPV4 transfizierten Zellen. Die Aktivierung durch hypoosmolare Lösung, Arachidonsäure oder 5,6-Epoxyeicosatriensäure blieb unberührt möglich, wobei die Steigerung von  $[Ca^{2+}]_i$  der Aktivierung der Zelllinie ohne Mutation entsprach [64].

#### 1.2.4 Pathologien und therapeutische Konzepte

Ionen und deren gesteuerter Fluss durch Membranen bilden die Grundlage für die physiologische Funktion von Zellen. Kleinste Änderungen der jeweiligen Konzentration der Ionen haben weitreichende Folgen.

Ca<sup>2+</sup>-Ionen ermöglichen als *second messenger* nach Aktivierung des TRPV4-Kanals die in Kapitel 1.2.2 beschriebenen Sinneswahrnehmungen. Ein anhaltender Einfluss von Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch TRPV4 kann jedoch auch zu abträglichen Prozessen wie programmiertem Zelltod führen. Dies wurde unter anderem für den Prozess der Pyroptose beschrieben [69]. Auch nekrotischer Zelltod kann durch TRPV4-Aktivierung evoziert werden [70].

Auch an inflammatorischen Prozessen ist TRPV4 beteiligt. So wurde gezeigt, dass nach Aktivierung pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 oder TNF- $\alpha$  freigesetzt werden [71, 72]. Für viele der im Folgenden beschriebenen Pathologien ist dies von großer Bedeutung.

**Pathologien.** Der fortgesetzte Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in das Innere von Endothelzellen durch nachhaltige Störung der Homöostase trägt über die Proliferation von Gefäßmuskulazellen der arteriellen Intima wesentlich zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wie der Arteriosklerose bei. Dafür unter anderem verantwortlich, ist die durch NO-Mangel bedingte chronisch endotheliale Dysfunktion [73]. Der Ca<sup>2+</sup>-Haushalt spielt dabei eine zentrale Rolle und trägt über die Proliferation glatter Gefäßmuskulatur zum Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen bei [74]. Die Entdeckung, dass die Aktivierung von TRPV4

in Endothelzellen zur Vasodilatation des betreffenden Gefäßes führt, legt nahe, dass der Kanal eine wichtige Stellschraube in diesem Gleichgewicht der Ionen darstellt (s. Kapitel 1.2.2).

Auch bezüglich der Pathogenese der *Acute Lung Injury* (ALI) ist TRPV4 beteiligt. Für die Alveolarmembranen in Lungen von Ratten und Mäusen konnte gezeigt werden, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach TRPV4-Aktivierung signifikant zur Entstehung von Bläschen und Rissen im Endothel, sowie zum Ablösen von Epithelzellen von der Basallamina führt [75].

Eng damit verbunden ist die Entstehung des ARDS [76]

Weitere TRPV4 assoziierte Krankheitsbilder sind durch fibrotische Prozesse gekennzeichnet. So wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Kanals eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Lungenfibrose, der Myokardfibrose, der Leberfibrose, der Pankreasfibrose und der zystischen Fibrose spielt [77]. In Fibroblasten, welche den Lungen von Patienten mit idiopathisch pulmonaler Fibrose entstammen, ist die TRPV4-Aktivität hochreguliert. Außerdem wurden TRPV4-Defizienz in Mäusen oder pharmakologische Inhibition des Kanals als protektive Faktoren gegenüber Lungenfibrose identifiziert [78].

Auch für entzündliche Lungenerkrankungen wie Asthma oder *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) ist TRPV4 von Bedeutung. So kann die bronchiale Hyperreagibilität, als pathologisches Korrelat des Asthma bronchiale, durch Inhibition von TRPV4 abgeschwächt werden. Analog zu dieser Erkenntnis steigt die Expression von TRPV4 im Bronchialsystem nach Induktion der Hyperreagibilität an [79]. Auch für das Krankheitsbild der COPD wurde eine im Rahmen der Inflammation gesteigerte Expression von TRPV4 im Lungengewebe nachgewiesen. Diese kann durch Blockade des Kanals abgeschwächt werden [80].

### 1.3 S-Lost

Bis(2-chlorethyl)sulfid, Schwefel-Lost oder 1-Chlor-2-[(2-chlorethyl)sulfanyl]ethan (S-Lost) wurde früher auch als Senfgas bezeichnet. Im Englischen sind die Bezeichnungen *sulfur mustard* und *mustard gas* üblich. Die Assoziation des Namens zur Senfpflanze ist hierbei etwas irreführend, denn S-Lost ist in Reinform eine geruchslose, farblose Flüssigkeit [81]. Verunreinigungen können jedoch einen typischen Geruch nach Knoblauch beziehungsweise Senf verursachen [82]. Auch die Bezeichnung als Gas ist trügerisch, liegt die Substanz mit einem Siedepunkt von 217 °C bei Raumtemperatur doch als Flüssigkeit vor [81, 82].

#### 1.3.1 Pathologien und Behandlungsansätze

**Pathologien.** S-Lost gehört in die Gruppe der Hautkampfstoffe und verursacht bei Exposition somit hauptsächlich dermale, aber auch okuläre Pathologien. Als *blister agent* evoziert S-Lost entzündliche Veränderungen der Haut, welche sich als erythematös und später vesikulär oder bullös beschreiben lassen und eine subepidermale Flüssigkeitsansammlung mit sich bringen [83]. Subjektiv geht die anfängliche Inflammation mit starkem Juckreiz und Brennen einher [82]. Die Blasenbildung kann in Verbindung mit der Erkenntnis gebracht werden, dass Kollagen durch S-Lost zerstört wird und Kollagenasen nicht vermögen diese veränderten Kollagenstrukturen abzubauen [84]. Die Primäreffloreszenzen heilen relativ schnell, jedoch kommt es häufig zu Wundheilungsstörungen und es bleiben oft dauerhafte Veränderungen wie Atrophien, Angiome und Farbveränderungen (Hypo- oder Hyperpigmentationen) zurück [85].

An den Augen kann sich der Kontakt mit Konjunktividen und periorbitalem und cornealem Ödem oder cornealen Erosionen äußern. Die okulären Verletzungen führen teils zu Neovaskularisation [86, 87].

Seltener, jedoch umso gefährlicher, sind inhalative Expositionen [88]. Ähnlich der Bläs-

chenbildung der Haut, entstehen nach Inhalation des Giftes Pseudomembranen an exponierten Stellen des Respirationstraktes [89]. Diese Membranen können zur Obstruktion der Atemwege führen und konsekutiv zum Erliegen der Herz-Kreislauf-Funktion [87].

Durch Schädigung der Alveolarmembran mit epithelialer und endothelialer Dysfunktion entsteht nach Exposition teils auch das Bild der ALI mit alveolärer beziehungsweise interstitieller Ansammlung von Flüssigkeit [90, 91]. Dieses nicht-kardiale Lungenödem kann als erste Phase in der Pathophysiologie des *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) gesehen werden [92].

In weniger fatalen Fällen entstehen teils ausgeprägte Pneumonien [86]. Als Langzeitfolge ist die sogenannte *mustard lung* beschrieben — eine Form der Bronchiolitis obliterans mit teils ausgeprägter Fibrosierung [93].

Systemische Vergiftungen führen unter anderem zu einer Knochenmarksdepression in Form einer Anämie und Leukopenie, aber auch zu Übelkeit und Erbrechen [94, 95]. Die Verteilung über den Blutkreislauf führt auch zur Schädigung vieler Organe wie der Leber, den Nieren, der Milz oder des Gehirns [96, 97].

Akut letale Verläufe werden nur in etwa 3 % der Fälle beschrieben [98], resultieren aber meist aus fulminanten systemischen Infektionen, welche unter anderem durch die S-Lost-induzierte Neutropenie befeuert werden [95, 99].

Wie regelhaft in der Toxikologie, hängt das Ausmaß der Schädigung erheblich von der Konzentration der Substanz und der Dauer der Exposition ab [82].

**Behandlungsansätze.** Obwohl S-Lost seit seiner ersten Synthese extensiv beforscht wurde, existiert bis heute kein spezifisches Antidot für Vergiftungsfälle. Betroffenen Patienten können nur symptomatisch behandelt werden [87, 100, 101].

Pulmonale Symptomatiken begegnet man gegebenenfalls mit Sauerstoffapplikation zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffsättigung des Blutes und präventiver systemischer Antibiose [95]. Makrolide scheinen hierbei die beste Wahl darzustellen, denn neben der bakterio-statischen Wirkung ist ein antiinflammatorischer Effekt mit verminderter Freisetzung von IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  [101]. Eine intensivmedizinische Überdruckbeatmung (PEEP) kann in schweren Fällen notwendig werden [102].

Cutane Entzündungsreaktionen sollten wie Verbrennungen behandelt werden [103]. Der Heilungsprozess von durch S-Lost bedingten Blasen nimmt jedoch mit mindestens 12 Wochen einen längeren Zeitraum in Anspruch als klassische Brandblasen. Diese Beobachtung der verzögerten Wundheilung wird mit dem alkylierenden Effekt der Substanz in Verbindung gebracht [104]. Vor diesem Hintergrund ist auch nicht verwunderlich, dass Antioxidantien wie AEOL-10150 (Aeolus) bei der Rekonvaleszenz der Verletzungen dienlich sind [100]. Es wurde gezeigt, dass eine frühe Dermabrasio und eine Wundbehandlung mit Sulfadiazin silber zur schnelleren Heilung beitragen [104].

Pathologien der Augen weisen meist einen eher milden Verlauf auf. Wiederholtes vorsichtiges Spülen und topisch antibiotische Behandlung verhindern Infektionen und Synechien [95]. Ein Konzept zur Analgesie der Patienten darf dabei nicht vernachlässigt werden [105].

Außerdem muss im Rahmen der Therapie von Vergiftungsopfern auf eine ausreichende Analgesie geachtet werden [82].

### 1.3.2 Geschichte

Der erste Einsatz von S-Lost als chemischer Kampfstoff wurde im 1. Weltkrieg verzeichnet. Das Akronym Lost geht dabei auf die beiden deutschen Chemiker Lommel und Steinkopf zurück, welche vorschlugen, die Substanz zur Kriegsführung des Deutschen Heeres einzu-

setzen. Zusammen entwickelten sie ein Verfahren zur massenhaften Herstellung des Giftes [106].

Eine weitere, weniger geläufige Bezeichnung des Kampfstoffes ist assoziiert mit dem Ort des ersten Einsatzes zu Kampfzwecken Ypern. Im Spätsommer 1917 wurden die englischen Gegner des Deutschen Heeres nahe Ypern in Belgien angegriffen, weshalb die Substanz auch als Yperit bezeichnet wird [82].

Auch in Konflikten nach dem 1. Weltkrieg wurde S-Lost wiederholt eingesetzt. Bei einigen der aufgeführten Punkte ist der Einsatz umstritten:

1. 1919 durch Großbritannien in Afghanistan [82]
2. 1925 durch Frankreich und Spanien gegen Marokko [82]
3. 1935 durch Italien gegen Äthiopien [82]
4. 1934–1944 durch Japan gegen China [82]
5. 1963–1967 durch Ägypten im Yemen [82]
6. 1983–1988 durch Irak gegen Iran und gegen die eigene kurdische Bevölkerung [82, 107]
7. 2015 im Rahmen des Bürgerkriegs in Syrien [108]

Seit 1997 ist die Produktion, die Vorratsbildung und der Gebrauch von S-Lost durch die Chemiewaffenkonvention der *Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons* (OPCW) verboten. Auch wurde ursprünglich die Vernichtung der Vorräte chemischer Waffen der unterzeichnenden Staaten innerhalb von 10 Jahren vereinbart [109]. Dies konnte mit großen Verzögerungen mittlerweile zumindest zu 99 % erreicht und die Lagerbestände auf etwa 450 Tonnen reduziert werden. Vor allem vor dem Hintergrund, dass etwa 98 % der Weltbevölkerung unter dem Schutz der Konvention stehen, ist dies als großer Erfolg anzusehen [110].

Die vergleichsweise unkomplizierte Produktion unterstreicht jedoch einmal mehr, dass S-Lost auch in Zukunft eine große Gefahr darstellen kann und die strikte Einhaltung der Konvention unabdingbar ist [88, 111].

### **1.3.3 Chemische Struktur, Alkylierung und andere Mechanismen der Schädigung**

S-Lost ( $C_4H_8Cl_2S$ ) ist eine symmetrische Verbindung mit zentralem Schwefelatom und beidseits endständigem Chloratom (s. Abbildung 1.1). Es wurde als sehr reaktive Substanz beschrieben, welche mit den meisten zellulären Bestandteilen eine Verbindung eingeht oder oxidiert und in Ihrer Funktion stört — darunter Proteine, Lipide und Nukleinsäuren [95, 112, 113]. Auch Glutathion, ein Tripeptid welches vor allem zum Schutz vor oxidativem Stress durch freie Radikale in allen menschlichen Zellen vorliegt, wird gern zum Reaktionspartner und es entstehen Glutathion-Addukte [114, 115, 116]. Auch entgiftende Enzyme, wie Superoxiddismutasen oder die Katalase können durch S-Lost beeinträchtigt werden [117]. Diese Prozesse führen zum Erliegen elementarer Zellfunktionen, wie der Proteinbiosynthese, und in Folge meist zu programmiertem Zelltod [113]. Sind akute Zellschädigungen nicht gravierend genug, um zu unmittelbarem Untergang der Zelle zu führen, so gewinnen die Schädigungen der DNA an Bedeutung. Diese wurden in Verbindung mit der Entstehung von Krebs gebracht [113].

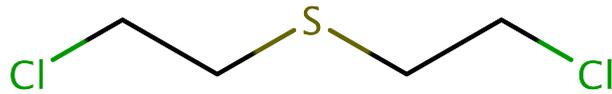


Abbildung 1.1: Strukturformel von S-Lost.

**Alkylierung.** Die Reaktion von S-Lost mit zellulären Bestandteilen und vor allem der DNA folgt dabei dem Mechanismus der Alkylierung. Zunächst entsteht in wässriger Umgebung, also beispielsweise im Zytoplasma, durch Abspaltung von  $\text{Cl}^-$  ein einfach positiv geladenes Episulfonium-Ion [118]. Im Falle der Alkylierung von DNA geht das Episulfonium-Ion durch elektrophilen Angriff eine Bindung mit Aminogruppen der Nukleotide ein und es entstehen S-Lost-Addukte [119]. Nachdem S-Lost 2 dieser sehr reaktiven funktionellen Gruppen besitzt, ist dieser Vorgang für beide Seiten möglich, was zur Quervernetzung von DNA führen kann [120].

**DNA-Schädigung.** Die geschädigten Nukleotide werden im Idealfall mittels Basen- oder Nukleotidexzisionsreparatur durch neue ersetzt [121]. Führt die Schädigung der DNA jedoch zu einem Doppelstrangbruch, kann nur eine homologe Rekombination zweier Schwesterchromatiden eine fehlerfreie Reparatur gewährleisten. Eine nicht-homologe Endverknüpfung jedoch führt zu einer fehlerbehafteten Reparatur des Doppelstrangbruchs, was kanzerogene Effekte mit sich bringt.

Die Schädigung der DNA führt unter anderem auch zur Aktivierung der Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP), welche an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen beteiligt ist [122, 123]. Eine übersteigerte Aktivierung der PARP führt jedoch zur Erschöpfung der NAD- und ATP-Speicher. Der Prozess der Apoptose, welcher durch PARP-Aktivierung initiiert wird, ist jedoch energieintensiv und so endet der angestoßene Prozess teils in der Nekrose [123, 124].

**Oxidativer Stress.** Der große Energieverlust, der mit einer erhöhten PARP-Aktivierung einhergeht, ist außerdem Grund für eine verminderte Regeneration zellulärer Antioxidantien, wie beispielsweise Glutathion [125]. Dieser Effekt sowie eine gesteigerte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch neutrophile Granulozyten (*oxidative burst*) im Rahmen der akuten Inflammation führen zu oxidativem Stress, welcher wiederum in der Schädigung von Proteinen, der Zellmembran, oder der DNA mündet [126].

1-Chlor-2-ethylsulfanylethan (CEES), eine weitere alkylierende Verbindung, unterscheidet sich von S-Lost nur durch ein Chloratom (vgl. Abbildungen 1.1 und 1.2) und wird deshalb auch als *half mustard* bezeichnet. Auch CEES kann Sulfonium-Ionen bilden und reagiert somit chemisch vergleichbar mit S-Lost [127]. Die mittlere letale Wirkstoffkonzentration ( $\text{LC}_{50}$ ) von CEES für die orale Verabreichung in Ratten liegt bei 252 mg/kg. CEES ist somit um einiges harmloser im Vergleich zu S-Lost mit einem  $\text{LC}_{50}$ -Wert von 2,4 mg/kg [128]. Im Unterschied zu S-Lost ist CEES auch in zivilen Laboren einsetzbar.



Abbildung 1.2: Strukturformel von CEES.

## 1.4 Fragestellung

Alkylierungsmittel wie S-Lost oder CEES wurden als Aktivatoren des menschlichen chemosensorischen TRPA1-Kationenkanals beschrieben. Die Aktivierung von TRPA1 durch S-Lost oder CEES führte zu einem dosisabhängigen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Insbesondere in A549-Lungenepithelzellen, die TRPA1 endogen exprimieren, konnte der induzierte Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  jedoch nicht vollständig durch spezifische TRPA1-Antagonisten gehemmt werden [129]. Daher scheinen andere Kanäle in diesem Zusammenhang eine Rolle zu spielen.

Eine strukturierte Überprüfung der verfügbaren Literatur wies auf eine bedeutende Rolle der Vanilloid-Rezeptor-verwandten Unterfamilie der TRP-Kanäle in der Toxikologie hin [130]. Der Membrankanal wird, neben verschiedenen anderen Geweben, vor allem auch in der Lunge exprimiert [17]. Ebenso wurde festgestellt, dass dieser die Sekretion von Zytokinen vermittelt [71, 72], welche an der Entstehung oder der Exacerbation der ALI [75], wie auch des ARDS [76], der Lungenfibrose [77, 78] und entzündlicher Lungenerkrankungen wie Asthma [79] oder COPD [80] beteiligt sind.

Schwere Lungenverletzungen können auch nach S-Lost-Exposition beobachtet werden [90, 91, 92, 127], und darüber hinaus induziert S-Lost die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 [127, 131, 132] oder TNF- $\alpha$  [126, 127, 132, 133], die alle nachweislich auch nach TRPV4-Aktivierung freigesetzt werden [71, 72].

Daher untersuchten wir im vorliegenden Projekt die Wechselwirkung zwischen CEES als Alkylierungsmittel und TRPV4.

### 1.4.1 Hypothese

Das Alkylierungsmittel 1-Chlor-2-ethylsulfanylethan (CEES) trägt zur Aktivierung des *transient receptor potential cation channel subfamily V member 4* (TRPV4) bei.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Utensilien

Gerät	Erklärung	Hersteller
T100™ Thermal Cycler	Thermozykler	Bio-Rad Laboratories
Mini-Sub Cell GT Cell	DNA-Gelelektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories
Gel Doc™ EZ System	DNA-Gel Kamera	Bio-Rad Laboratories
Mini-PROTEAN Tetra Cell	SDS-Gelelektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Semi-dry western blotting system	Bio-Rad Laboratories
Odyssey® Fc	Westernblot Abbildungssystem	LI-COR Biosciences
Chemi-Smart 5000	Westernblot Lumineszenzkamera	Peqlab Biotechnologie
FLUOstar® Omega	multi-mode Microplate Reader	BMG LABTECH
Port-a-Patch®	Planares Patch-Clamp System	Nanion Technologies
TC20™ Automated Cell Counter	Automatisierte Zellzählung	Bio-Rad Laboratories
Heracell™ 240i CO <sub>2</sub> Incubator	CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific

<b>Utensil</b>	<b>Erklärung</b>	<b>Hersteller</b>
Immobilon®-E PVDF Membrane	Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran)	Merck
Transfer stacks	Western Blot Filterpapiere	Bio-Rad Laboratories
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels	Polyacrylamid-Gele	Bio-Rad Laboratories
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Proteinquantifizierung	Thermo Fisher Scientific
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	DNA-Aufreinigung	Promega
NucleoSpin® RNA Plus	RNA-Isolation	MACHEREY-NAGEL
NucleoBond® Xtra Maxi Plus	Plasmid-DNA Aufreinigung	MACHEREY-NAGEL
Zellkulturgefäße		Sarstedt
Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte, schwarz	96-well Mikrotiterplatte	Thermo Fisher Scientific
CellCamper® Mini	Einfrierbox für Kryoröhrchen	neoLab Migge

## 2.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Zellkultur	Inhalt	Hersteller
<i>lysogeny broth</i> (LB)-Medium	Pepton 1 % Hefe 0,5 % NaCl 0,5 % ddH <sub>2</sub> O ad 1 L	
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	low glucose, GlutaMAX™ Supplement	Gibco
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)		Gibco
Penicillin-Streptomycin		Sigma-Aldrich
Kulturmedium	DMEM + FBS 10 % + Penicillin-Streptomycin 1 %	
<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Ohne Calcium und Magnesium	Gibco
Trypsin-EDTA (0,05 %), Phenolrot		Gibco
TrypLE Express Enzym (1X), Phenolrot		Gibco
G418-disulfat (Salz)-Lösung		Sigma-Aldrich
<hr/>		
PCR	Inhalt	Hersteller
GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT)		Promega
GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix		Promega
TRIS-Borat-EDTA (TBE)	TRIS 1 M Borsäure 1 M EDTA 0,02 M ddH <sub>2</sub> O ad 1 L	
DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder		Sigma-Aldrich
Nancy-520 DNA Gel Stain		Sigma-Aldrich
<hr/>		
Western Blot	Inhalt	Hersteller
<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> (RIPA-Puffer)	NaCl 150 mM	

Western Blot	Inhalt	Hersteller
	EDTA 5 mM, pH 8,0 TRIS 50 mM, pH 8,0 NP-40 1,0 % Natriumdesoxycholat 0,5 % SDS 0,1% ddH <sub>2</sub> O ad 100 mL	
Protease Inhibitor Cocktail (50X)		Promega
Lämmli-Probenpuffer (4X)	TRIS/HCl 62,5 mM pH 6,8 Glycerin 20 % SDS 4 % β-Mercaptoethanol 5 % Bromphenolblau 0,1 % ddH <sub>2</sub> O ad 100 mL	
Lämmli-Laufpuffer (10X) (TRIS-Glycin-SDS-Puffer)	TRIS 0,25 M Glycin 1,92 M SDS 1 %	
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards		Bio-Rad Laboratories
Trans-Blot Turbo Transfer Buffer		Bio-Rad Laboratories
TRIS-buffered saline (TBS) (10X)	TRIS 0,2 M NaCl 1,37 M ddH <sub>2</sub> O ad 1 L pH 7,6	
TRIS-buffered saline mit Tween20 (TBST)	TRIS 20 mM NaCl 137 mM Tween20 0,05 % ddH <sub>2</sub> O ad 1 L pH 7,5	
Intercept® (TBS) Blocking Buffer		LI-COR Biosciences
TRPV4 Antikörper (SAB2104243)		Sigma-Aldrich
TRPV4 Antikörper (PA5-41066)		Thermo Fisher Scientific
TRPV4 Antikörper (OST00035W)		Thermo Fisher Scientific
TRPV4 Antikörper (MABS466)		Merck
GAPDH Antikörper (PA1-988)		Thermo Fisher Scientific

<b>Western Blot</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Hersteller</b>
Goat anti-Rabbit IgG HRP-Konjugat (A0545)		Sigma-Aldrich
Donkey anti-Sheep IgG HRP-Konjugat (A16041)		Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Mouse IgG HRP-Konjugat (170-6516)		Bio-Rad Laboratories
IRDye® 680RD Donkey anti-Mouse IgG		LI-COR Biosciences
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG		LI-COR Biosciences
Chemiluminescent Peroxidase Substrate		Sigma-Aldrich
<hr/>		
<b>Aequorin-Assay</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Hersteller</b>
HEPES-buffered saline (HBS)	NaCl 145 mM KCl 5 mM CaCl <sub>2</sub> (Dihydrat) 1 mM MgCl <sub>2</sub> (wasserfrei) 1 mM HEPES 10 mM D-Glucose 10 mM ddH <sub>2</sub> O ad 1 L	
Benzyl-Coelenterazine High Pure		PJK

<b>Patch-Clamp</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Hersteller</b>
Internal CsF 110	CsCl 50 mM NaCl 10 mM CsF 60 mM EGTA 20 mM HEPES/CsOH 10 mM pH 7,2	Nanion Technologies
External Standard	NaCl 140 mM KCl 4 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM CaCl <sub>2</sub> 2 mM HEPES/NaOH 10 mM D-Glucose (Monohydrat) 5 mM pH 7,4	Nanion Technologies
Seal Enhancer	NaCl 80 mM KCl 3 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 35 mM HEPES (Na <sup>+</sup> -Salz)/HCl 10 mM pH 7,4	Nanion Technologies
<hr/>		
<b>WST-1-Assay</b>	<b>Hersteller</b>	
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche	
<hr/>		
<b>Agonisten, Antagonisten</b>	<b>Hersteller</b>	
GSK1016790A	Sigma-Aldrich	
GSK2193874	Sigma-Aldrich	
CEES	Sigma-Aldrich	

## 2.2 Software

Software	Erklärung	Hersteller
Image Lab™	Bildverarbeitung DNA-Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories
Image Studio™	Bildverarbeitung Immunoblot	LI-COR Biosciences
SnapGene®	Gentechnik Software	GSL Biotech
OMEGA	Steuersoftware multi-mode Microplate Reader	BMG LABTECH
MARS	Datenanalyse Software multi-mode Microplate Reader	BMG LABTECH
PatchContol	Steuersoftware Patch-Clamp-Aufbau	Nanion Technologies
RStudio	Benutzeroberfläche Programmiersprache R	RStudio
Texmaker	LaTeX Editor	Pascal Brachet
TeX Live	TeX-Distribution	TeX User Groups
JabRef	Literaturverwaltung	JabRef e.V.

Zur Auswertung und Visualisierung der Daten wurde die Programmiersprache R verwendet. Die beiden *libraries* ggplot2 [134] und drc [135] wurden für die Darstellung der Graphen und die Schätzungen der EC<sub>50</sub>- beziehungsweise IC<sub>50</sub>-Werte verwendet. Für den *fit* der Kurven wurde die Logistische Regression mit 4 Parametern angewandt. Die Formel für die Berechnung lautet [136, 137]:

$$y = \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

Dabei stellt  $a$  die obere Asymptote,  $d$  die untere Asymptote,  $c$  den Umschlagspunkt (EC<sub>50</sub> oder IC<sub>50</sub>), und  $b$  die Hill'sche Steigung (*Hill's slope*) dar.

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Zellkulturpassage

Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das Kulturmedium in der Zellkulturflasche abgenommen. Daraufhin wurden die Zellen mit dem doppelten Volumen des verwendeten Kulturmediums an 37 °C warmem PBS gewaschen und der Zellrasen mit 1–2 mL Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei 37 °C vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde ein Teil der Zellen (s. Kapitel 2.3.4) im gewünschten Volumen an Kulturmedium (37 °C) wieder aufgenommen und in eine neue Zellkulturflasche transferiert. Das im Kulturmedium befindliche FBS enthält unter anderem das Enzym  $\alpha$ -1-Antitrypsin, welches die weitere Aktivität von Trypsin unterbindet. Im Falle der etablierten HEK293-V4 Zelllinie wurden bei jeder Passage zusätzlich 600 µg/mL G418 eingesetzt, um die Prädominanz erfolgreich transfizierter Zellen aufrecht zu erhalten (s. Kapitel 2.4.1). Diese Konzentration des Selektionsmarkers entspricht der ermittelten absolut letalen Wirkstoffkon-

zentration ( $LC_{100}$ ) von HEK293-Wildtyp (HEK293-wt) (s. Kapitel 3.1). Im  $CO_2$ -Inkubator waren bei 37 °C und einer  $CO_2$ -Konzentration von 5 % optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen gewährleistet.

### 2.3.2 Zellzählung

Gezählt wurden die Zellen entweder mit einer Neubauer-Zählkammer oder mit dem „TC20™ Automated Cell Counter“.

Auf der Neubauer-Zählkammer wurde durch Adhäsionskraft von kondensiertem Wasserdampf ein Deckglas befestigt. Zwischen Deckglas und Zählkammer wurden 10 µL einer Zellsuspension injiziert, für welche die Zellkonzentration bestimmt werden sollte. Durch Kapillarkräfte füllte sich der Zwischenraum vollständig mit der Flüssigkeit. Um die Zahl der Zellen pro mL zu errechnen, wurde unter dem Lichtmikroskop  $\frac{1}{4}$  der Zellen gezählt und mit dem Faktor 10.000 multipliziert. Morphologisch wurde zwischen lebendigen Zellen und Zelldebris unterschieden und nur erstere gezählt.

Die Variante der automatisierten Zellzählung beruhte auf optischer Bildanalyse. Dazu wurden 10 µL einer Zellsuspension auf einen Träger gegeben und mit einer Kamera in verschiedenen Fokusebenen untersucht. Dabei wurde automatisch die Form jeder Zelle bestimmt und aufgrund dieser Information ebenfalls nur als lebend deklarierte Zellen gezählt.

### 2.3.3 Kryokonservierung

Das Einfrieren von Zellen verlief zunächst analog zum Passagieren. Der Zellrasen in einer Kulturflasche wurde durch Abnahme des Mediums freigelegt, mit PBS-Puffer gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Zur Neutralisierung von Trypsin wurde die Lösung in 20 mL Kulturmedium aufgenommen. Nun wurde die Zellkonzentration bestimmt (s. Kapitel 2.3.2) und je 1 Million Zellen bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,6 mL FBS gelöst und mit 10 % DMSO in ein Kryoröhrchen gegeben. Das DMSO verhindert eine Kristallbildung der Lösung beim Einfrieren, was eine Beschädigung der Zellmembranen vermeiden kann. In einem speziellen Isolationsgefäß („CellCamper® Mini“), welches eine kontinuierliche Temperaturabnahme von 1 °C pro Minute gewährleistet, wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren. Für die Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Um Zellen wieder aufzutauen, wurde ein Kryoröhrchen 1 Minute unter etwa 37 °C warmes Wasser gehalten und von außen für die Arbeit unter der Sterilbank desinfiziert. Die nun flüssige Zellsuspension wurde mit DMEM auf 10 mL aufgefüllt und bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte das Pellet im gewünschten Volumen an Kulturmedium resuspendiert und gegebenenfalls Selektionsantibiotikum hinzugegeben werden.

Es bietet sich an, die Zellen vor dem Einfrieren zu zählen, um für den erneuten Beginn der Zellkultur nach Ende der Konservierung zu wissen, welches Kulturgefäß geeignet ist.

### 2.3.4 Aussaat von Zellen

Die Zahl der ausgesäten Zellen war bestimmt durch das Wachstumsverhalten der kultivierten Zelllinie und die Größe des gewünschten Kulturgefäßes. Ebenso war die Dauer bis zur nächsten Passage bestimmend. Hier wird mit 48 bis 72 Stunden jedoch nur der gebräuchlichste Fall dargestellt.

In Tabelle 2.4 wird beschrieben, wie viele Zellen im Mittel, jeweils abhängig von Zelllinie und Wachstumsfläche, ausgesät wurden. Das Volumen an Kulturmedium nach Wachstumsfläche des Kulturgefäßes wird in Tabelle 2.5 beschrieben.

**Tabelle 2.4:** Zellaussaat nach Zelllinie und Wachstumsfläche.

	Anzahl pro cm <sup>2</sup>	Faktor
HEK293-wt	2.000	1:4
HEK293-V4	100.000	1:2
A549	30.000	1:2

**Tabelle 2.5:** Volumen an Kulturmedium nach Wachstumsfläche des Kulturgefäßes.

	Wachstumsfläche [cm <sup>2</sup> ]	Volumen [mL]
6-well	9,6	5
T25	25	5
T75	75	10
T175	175	20

## 2.4 Etablierung einer TRPV4-überexprimierenden Zelllinie

### 2.4.1 Expressionsvektor

Um eine Zelllinie mit Überexpression eines Kanalproteins herzustellen, wird eine *deoxyribonucleic acid* (DNA)-Vorlage benötigt. In unserem Fall war diese Vorlage ein zirkuläres Plasmid — auch (Expressions-)Vektor genannt.

Auf diesem ist neben dem sog. *vector backbone* „pCI-neo Mammalian Expression Vector“ auch die kodierende Sequenz von hTRPV4 verortet. Das *backbone* stellt dabei die Überexpression und die Stabilität der *ribonucleic acid* (RNA) nach Transkription sicher. Der Promotor des humanen Zytomegalievirus [138] und ein chimäres Intron [139, 140] vermitteln die erhöhte Expression des Kanalproteins durch vermehrte Transkription des *TRPV4*-Gens. Das *SV40 late polyadenylation signal*, welches dem hTRPV4-Gen nachgeschaltet ist, bewirkt eine Polyadenylierung des Transkripts. Es wurde gezeigt, dass die Addition von Adenosin-Resten am 3'-Ende des Transkripts sowohl die folgende Translation als auch die Stabilität der RNA verbessert [141, 142]. Ebenfalls auf dem *backbone* befindet sich das Neomycin-Phosphotransferase-Gen mit eigenem Polyadenylierungssignal. Das exprimierte Enzym vermittelt die Resistenz gegenüber einem Aminoglykosid-Antibiotikum (G418). Durch Phosphorylierung von G418 [143] kann die Neomycin-Phosphotransferase eine stabile Expression der genetischen Information des Vektors (s. Kapitel 2.4.7) erreichen und als Basis für eine Selektion genutzt werden. Ein weiterer relevanter Bestandteil auf dem *backbone* ist das Gen für eine  $\beta$ -Lactamase, welche die bakterielle Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt. Dieses Aminopenicillin kann als Selektionsmarker für die bakterielle Transformation (s. Kapitel 2.4.3) verwendet werden.

Im Folgenden wird der Expressionsvektor auch TRPV4-Plasmid genannt.

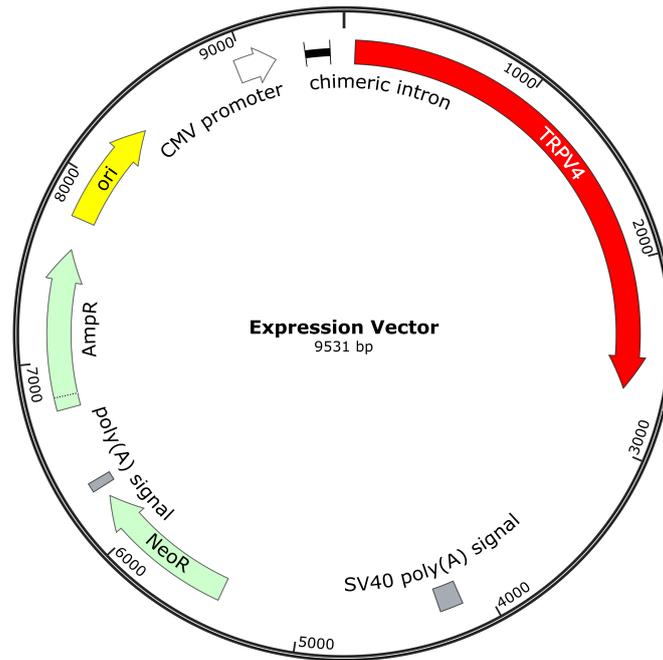


Abbildung 2.1: Expressionsvektor für die Überexpression von TRPV4.

#### 2.4.2 Herstellung von LB-Agar-Platten

Als Wachstumsmedium für Bakterienklone im Rahmen des Klonierens wurden Agarplatten verwendet. Das Ausstreichen von Bakterien auf der Oberfläche einer *lysogeny broth* (LB)-Agar-Platte bietet den Vorteil, dass einzelne Klone räumlich getrennt wachsen können und dabei jedes Bakterium eines Klons gänzlich identisches Genmaterial besitzt. Durch die Verwendung eines Selektionsmarkers kann sichergestellt werden, dass sich auf einer Agarplatte nur Bakterien vermehren, welche eine Resistenz gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum aufweisen; bei denen also eine bakterielle Transformation (s. Kapitel 2.4.3) erfolgreich war. Dabei kann man von folgendem Grundsatz ausgehen: Je mehr Vektor-DNA inklusive bakterieller Resistenz im Bakterium vorhanden ist, desto ungehinderter das Wachstum eines Klons auf der Agarplatte.

Dem Protokoll von Oswald [144] folgend wurden 300 mL LB-Medium mit 3 g Agarose verrührt und autoklaviert. Dieses Volumen genügt zur Herstellung von 10 Agar-Platten mit einem Durchmesser von 9 cm. In einem Wasserbad wurde die Lösung auf 55 °C abgekühlt, um ein vorzeitiges Erstarren ab 50 °C zu verhindern. Um eine Zielkonzentration des Selektionsmarkers Ampicillin von 100 µg/mL in der Flüssigkeit zu erreichen wurden 30 mg des Antibiotikums eingewogen und untergerührt. Daraufhin wurden 30 mL der Lösung in je eine Petrischale gegossen und geschlossen für etwa 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde die Flüssigkeit fest. Zur Lagerung wurden die LB-Agar-Platten mit Paraffin-Wachs versiegelt und auf 4 °C gekühlt.

#### 2.4.3 Bakterielle Transformation

Für die Klonierung des Expressionsvektors, der für die Transfektion der HEK293-wt-Zellen verwendet wurde, kamen kompetente „DH5α®“-Bakterien zum Einsatz. Dieser *Escherichia coli*-Stamm besitzt die Fähigkeit fremde DNA aufzunehmen und zu amplifizieren [145, 146]. Für die Transformation wurden die „DH5α®“-Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. 50 µL der Zellsuspension wurden danach mit 100 ng der Vektor-DNA versehen und vor-

sichtig invertiert. Anschließend wurde die Lösung für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 30 Sekunden auf 42 °C erhitzt. Dieser sog. *heat shock* verbessert die Effizienz der Transformation [147]. Nun wurden die Bakterien erneut 2 Minuten auf Eis gekühlt, bevor sie mit 250 µL vorgewärmtem und autoklaviertem LB-Medium bei 37 °C eine Stunde geschüttelt wurden. Die Suspensionen wurden sodann mit einem abgeflamten Drigalski-spatel auf einer LB-Agar-Platte (s. Kapitel 2.4.2) ausgestrichen und danach über die Nacht bei 37 °C invertiert inkubiert. Das in den Platten enthaltene Ampicillin erhält während des Wachstums der Bakterien einen Selektionsdruck, ohne den die transformierte Vektor-DNA wieder verloren ginge. Es liegt nahe, dass bei Klonen, welche besonders gut gedeihen, die Transformation effektiver war und mehr TRPV4-Plasmid vorlag.

#### **2.4.4 Bakterienkultur zur Plasmidaufbereitung**

Um nun die Vermehrung der DH5 $\alpha$ ®-Bakterien, und somit des TRPV4-Plasmids, zu ermöglichen, wurde eine Bakterienkultur angelegt.

Zunächst wurden je 4 mL autoklaviertes LB-Medium in ein Röhrchen mit 15 mL Fassungs-volumen gegeben und 400 µg Ampicillin hinzugefügt, sodass sich eine Konzentration von 100 µg/mL ergab. Die Übergröße des Gefäßes stellt während des Wachstums der Kultur eine ausreichende O<sub>2</sub>-Sättigung sicher. Nun wurden mehrere Klone auf einer beimpften Agarplatte (s. Kapitel 2.4.3) ausgewählt (*colony picking*) und jeweils in ein Röhrchen über-führt. Diese Vorkulturen wurde bei 37 °C für etwa 8 Stunden bei 300 rpm geschüttelt. Dabei waren die Röhrchen abgedeckt, wobei jedoch die nötige Luftzufuhr sichergestellt war. Nach Inkubation wurde eine Vorkultur mit besonders gutem Wachstum ausgewählt und die anderen, weniger trüben Kulturen verworfen.

Währenddessen wurde für die Hauptkultur ein Erlenmeyer-Kolben mit einem Fassungs-volumen von 1 L mit 400 mL LB-Medium befüllt, abgedichtet und autoklaviert. Danach wurden 40 mg Ampicillin hinzugegeben (Zielkonzentration 100 µg/mL) und die gewählte Vorkultur in den Erlenmeyer-Kolben überführt. Anschließend wurde dieser bei 300 rpm und 37 °C für 12 Stunden geschüttelt. Auch hier wurde trotz Abdeckung des Gefäßes eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Bakterien gewährleistet.

#### **2.4.5 Aufreinigung der Plasmid-DNA**

Die im folgenden verwendeten Lösungen und Utensilien stammen aus dem Aufreinigungs-set „NucleoBond® Xtra Maxi Plus“.

Zu Beginn der Aufreinigung wurde die Bakterienkultur aus 2.4.4 bei 4 °C und einer Be-schleunigung von 6000 g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 12 mL Resuspensionspuffer aufgenommen. Dieser Puffer enthielt auch eine RNase zum Verdau von RNA-Kontaminationen. Um die Zellwand der Bakterien zu durch-brechen wurden 12 mL Lysepuffer hinzugegeben. Nach fünfmaligem Invertieren und fünf-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension mit 12 mL Neutralisati-onspuffer versetzt und invertiert. Das durch die Lyse entstandene Präzipitat wurde dadurch wieder zu einer homogenen Lösung, welche dann auf einen equilibrierten Filter aufgetra-gen wurde. Das Filtrat durchfloss daraufhin eine Säule, die Plasmid-DNA auffing, indem ne-gativ geladene Phosphat-Reste des Rückgrats der Plasmid-DNA an positiv geladene Methyl-Hydroxyethyl-Amino-Gruppen der Säulen-Matrix banden. Anschließend wurde zunächst der Filter mit 15 mL Equilibrationspuffer und danach nur die Säule mit 25 mL eines Wasch-puffers gewaschen, um die Reinheit der später eluierten Plasmidlösung weiter zu erhöhen. Mithilfe eines Elutionspuffers (15 mL) wurde die Vektor-DNA aus der Säule gelöst und auf-gefangen.

Für das Aufkonzentrieren wurde die DNA aus dem Eluat mit 10,5 mL Isopropanol für 2 Mi-nuten ausgefällt und danach an eine Kieselgel-Membran adsorbiert. Dabei wurde die Flüs-

sigkeit langsam durch eine Spritze gepresst, an deren Ende besagte Filter-Membran befestigt war. Die Membran wurde anschließend mit 4 mL 70 %-igem Ethanol gewaschen und mit Luftdruck getrocknet. Herausgelöst wurde die Plasmid-DNA mit 1 mL TRIS-Puffer. Nach beendeter Aufreinigung des Plasmids, wurde die Konzentration auf 1 µg/µL mit TRIS-Puffer nivelliert.

#### **2.4.6 Bestimmung des LC<sub>100</sub>-Wertes von G418 für HEK293-wt-Zellen**

Um eine stabile Expression von TRPV4 nach Transfektion (s. Kapitel 2.4.7) sicherzustellen war es nötig, die transfizierten Zellen stets mit dem Selektionsmarker G418 zu behandeln. Dies bewirkt, dass nur Zellen überleben, welche eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum aufweisen. Gewöhnlich wird für die Aufrechterhaltung der Transfektion eine Konzentration von 200–600 µg/mL G418 eingesetzt [148, 149, 150]. Für die individuelle Anwendung muss jedoch immer eine gesonderte absolut letale Wirkstoffkonzentration (LC<sub>100</sub>) der Wildtyp-Zellen festgestellt werden.

Hierfür wurden je 11.000 HEK293-wt-Zellen in eine Vertiefung einer 24-well Platte gesät und in 1 mL Kulturmedium mit 0–1000 µg/mL G418 inkubiert. Dabei wurde nicht wie üblich passagiert, sondern jeden 2.–3. Tag nur die Zielkonzentration des Selektionsmarkers erneuert. Nach 7 Tagen wurde der Effekt fotografisch dokumentiert und subjektiv der LC<sub>100</sub>-Wert bestimmt. Eine Zelle wurde nur dann als lebendig gewertet, wenn sie noch am Boden des Kulturgefäßes adhärent war. Der LC<sub>100</sub>-Wert wurde bei 600 µg/mL G418 festgestellt (s. Kapitel 3.1)

#### **2.4.7 Transfektion von HEK293-wt-Zellen mit TRPV4-Plasmid**

Für die Erstellung einer Zelllinie mit stabiler TRPV4-Expression wurden neben dem TRPV4-Plasmid Zellen der Linie HEK293 verwendet [151]. Diese erweisen sich seit 1998 als sehr geeignet für eine spätere transiente Transfektion mit Aequorin-Plasmid [152] (s. Kapitel 2.6.1).

Die Transfektion wurde mithilfe des Reagenzes „PromoFectin“ durchgeführt. Enthalten sind darin kationische Polymere, welche im Komplex mit der Plasmid-DNA an negativ geladene Bestandteile der Zelloberfläche binden. Per Endozytose wird das Plasmid in das Innere der Zelle überführt. Durch Pufferung eines alkalischen pH-Werts werden endosomale Nukleasen inaktiviert. Dies führt über einen kontinuierlichen Zustrom von Protonen zur Ruptur der Endosomen. Somit liegt die Vektor-DNA frei im Zytoplasma vor, was nach Migration in den Zellkern die gewünschte Integration in das Genom der Zelle ermöglicht. Hierbei wurde der Ansatz verfolgt, die Wahrscheinlichkeit der Integration in das Genom der HEK293-wt-Zellen zu erhöhen, indem man die Menge an Plasmid-DNA erhöht. Die Wahrscheinlichkeit der konsekutiv erwünschten stabilen Expression der eingebrachten genetischen Information ist hiervon natürlich nicht maßgeblich beeinflusst. Im Folgenden wird in Kürze das Protokoll zur Transfektion der HEK293-wt-Zellen dargestellt.

Für drei verschiedene Transfektionskonditionen wurden zunächst Lösungen vorbereitet, welche aus dem TRPV4-Plasmid und „PromoFectin“ bestanden (s. Tabelle 2.6). Das jeweilige Volumen TRPV4-Plasmid (1 µg/µL) wurde in 60 µL DMEM gelöst und im Vortex-Mischer gerührt. Dem entsprechend wurde das doppelte Volumen an Transfektionsreagenz in 60 µL DMEM gelöst und vermischt. Beide Lösungen wurden danach zusammen vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandene Lösung mit einem Volumen von 129–156 µL war jeweils ausreichend für einen Transfektionsansatz in einer Vertiefung einer 6-well Platte.

**Tabelle 2.6:** Konditionen für die Transfektion von HEK293-wt-Zellen.

Kondition	TRPV4-Plasmid [ $\mu\text{g}$ ]	PromoFectin [ $\mu\text{L}$ ]
1	3	6
2	6	12
3	12	24

In je ein *well* der Platte wurden 20.000 HEK293-wt-Zellen in 200  $\mu\text{L}$  Kulturmedium ausgesät (s. Kapitel 2.3.4). Daraufhin wurde je ein Ansatz der vorbereiteten Lösung (Plasmid-DNA plus „PromoFectin“ in DMEM) tropfenweise auf der Zellsuspension verteilt und der Ansatz bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nun wurde jedes *well* auf ein Volumen von 2 mL mit Kulturmedium angefüllt. Um die Konzentration der Transfektionsreagenz hochzuhalten, wurde hier nicht das übliche Volumen von 5 mL für die Zellkultur verwendet (s. Tabelle 2.5). Zuletzt wurde die Suspension mit 12  $\mu\text{L}$  G418 (100 mg/mL) versetzt, um eine ungefähre Zielkonzentration von 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 zu erhalten. Mit dem Ziel der Selektion erfolgreich transfizierter Zellen, wurde diese Konzentration nun fortwährend nach jeder Passage eingesetzt. Da die Plasmid-DNA in eukaryontischen Zellen nicht mehr vervielfältigt, sondern mit jeder Zellteilung numerisch halbiert wird, konnte man nach einigen Passagen bei lebendigen Zellen davon ausgehen, dass die Sequenz des Plasmids zumindest teilweise in das Genom der Zelle integriert wurde. Die Resistenz erfolgreich transfizierter Zellen gegenüber G418 rührt von der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Expression des Enzyms Neomycin-Phosphotransferase.

Die generierte Zelllinie wird im folgenden HEK293-V4 genannt. Die entstandenen Zellpools finden sich in 3.1 aufgelistet.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

Der Erfolg der Transfektion wurde auf unterschiedlichen Ebenen nachgewiesen. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den Methoden des molekularbiologischen Nachweises. Wie in 2.4.7 beschrieben, war zum Zeitpunkt der Untersuchungen von einer stabilen Expression von TRPV4 auszugehen.

### 2.5.1 Nachweis von TRPV4-mRNA

Zuerst wurde überprüft, ob die durch Transfektion eingebrachte Geninformation erfolgreich in *messenger ribonucleic acid* (mRNA) umgeschrieben wurde.

#### Primerdesign

Für den Nachweis von TRPV4-mRNA mittels *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) und die Sequenzierung der kodierenden Sequenz für TRPV4 — beide Methoden sind gesondert beschrieben — wurden verschiedene Primerpaare entwickelt, die bestimmten Qualitätskriterien entsprachen [153]:

1. Ein Primer sollte aus 18–30 bp bestehen
2. Für eine PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese sollte die Länge des Amplikons etwa 500 bp entsprechen
3. Der GC-Gehalt eines Primers sollte zwischen 40 und 60 % liegen

4. Das 3'-Ende eines Primers sollte nicht mehr als zwei Guanin- oder Cytosin-Basen enthalten, um unspezifische Primeranlagerungen zu vermeiden
5. Primer-Dimere sollten verhindert werden, indem die 3'-Enden des Paares auf Komplementarität geprüft werden
6. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der beiden Primer sollte nicht um mehr als 4 °C differieren

Für beide Verfahren, also der mRNA-Nachweis über RT-PCR und eine Sequenzierung des transfizierten *TRPV4*-Gens, wurden verschiedene Primerpaare mit ihren resultierenden Amplikons entwickelt.

Für den zunächst durchgeführten PCR-Nachweis wurden mehrere Amplikons gewählt die über das ganze hTRPV4-Gen verteilt waren (s. Tabelle 2.7).

**Tabelle 2.7:** Kombinationen von TRPV4-Primern für eine RT-PCR. Je in 5'-3'-Richtung dargestellt. Angaben zu den Primern: GC-Gehalt;  $T_m$ ; Länge des Primers.

	Forward	Reverse	Amplikon
1	GCACACCGCCGTACCCTTA 63 %; 59 °C; 19 bp	AGACCAGGGCTGAAGCGTAG 60 %; 61 °C; 20 bp	414 bp
2	CATGATCCAGAAGATTCTCTTCAAGG 42 %; 58 °C; 26 bp	CTCATCCACCCTGAAGCACCAC 59 %; 61 °C; 22 bp	535 bp
3	CAAGATTGAGAACCGCCACG 55 %; 58 °C; 20 bp	CTTGAAGAGAATCTTCTGGATCA 39 %; 54 °C; 23 bp	514 bp
4	GTGCTCAACAACGACGGCCT 60 %; 62 °C; 20 bp	CAAGTCTTTGATGTTGGTGAAGAAG 40 %; 56 °C; 25 bp	504 bp
5	GAGTTTCGAGAGCCATCTACG 52 %; 56 °C; 21 bp	GAAGAGGCGGGCACACTTGA 60 %; 60 °C; 20 bp	522 bp

Für die später im Laufe des Projekts durchgeführte Sequenzierung wurden ebenfalls Amplikons gewählt, die über die ganze Sequenz des Membrankanals verteilt waren. Zusätzlich mussten sich diese auch überlappen und das jeweilige Ende des Gens überragen, um ein ganzheitliches Bild der Sequenz zu erhalten (s. Tabelle 2.8).

**Tabelle 2.8:** Kombinationen von TRPV4-Primern für die Sequenzierung. Je in 5'-3'-Richtung dargestellt. Angaben zu den Primern: GC-Gehalt; T<sub>m</sub>; Länge des Primers.

	Forward	Reverse	Amplikon
1	GAGCTCGGATCCACTAGTCCAGT 57 %; 61 °C; 23 bp	GTAGATGTCACGGAAGGGCGAGTT 54 %; 62 °C; 24 bp	748 bp
2	GAGTTTCGAGAGCCATCTACG 52 %; 56 °C; 21 bp	CTTGAAGAGAATCTTCTGGATCA 39 %; 54 °C; 23 bp	1287 bp
3	GAGTTTCGAGAGCCATCTACG 52 %; 56 °C; 21 bp	CAAGTCTTTGATGTTGGTGAAGAAG 40 %; 56 °C; 25 bp	1047 bp
4	GTGCTCAACAACGACGGCCT 60 %; 62 °C; 20 bp	CTTGAAGAGAATCTTCTGGATCA 39 %; 54 °C; 23 bp	744 bp
5	GTGCTCAACAACGACGGCCT 60 %; 62 °C; 20 bp	AGACCAGGGCTGAAGCGTAG 60 %; 61 °C; 20 bp	808 bp
6	GCACACCGCCGTACCCTTA 63 %; 59 °C; 19 bp	CTCATCCACCCTGAAGCACCAC 59 %; 61 °C; 22 bp	860 bp
7	CATGATCCAGAAGATTCTTCAAGG 42 %; 58 °C; 26 bp	CGTCATCAGTCCTCCACTTGC 57 %; 59 °C; 21 bp	794 bp
8	GTGGTGCTTCAGGGTGGATGAG 59 %; 61 °C; 22 bp	TCTGCAGAATTGTCTTGACCCT 45 %; 59 °C; 22 bp	351 bp
9	CTGGAACCAGAACTTGGGCATC 55 %; 59 °C; 22 bp	GGCCAGGACCTCTCTGAATG 60 %; 58 °C; 20 bp	287 bp

### Konzentrationsbestimmung von RNA- und DNA-Proben

Nach Isolation oder Aufreinigung von Nukleinsäuren war es teils nötig, deren Konzentration in einer Lösung zu bestimmen. Dies erfolgte durch Bestimmung der Absorption im Mikrotiterplatten-Lesegerät „FLUOstar® Omega“ mit der zugehörigen „LVis“-Platte. Zunächst wurde auf alle Mikrotropfen-Näpfe je 2 µL bidestilliertes Wasser für die Ermittlung des Blindwerts gegeben und damit das Messgerät kalibriert. Nun wurden ebenfalls 2 µL der jeweiligen Messprobe auf je ein *well* pipettiert und die Platte im Messgerät platziert. Die Messung der Nukleinsäuren-Konzentration der betreffenden Lösung erfolgte durch Photometrie, wobei die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) gemessen wurde. Davon wurde der Wert für die Hintergrundabsorption bei 340 nm ( $A_{340}$ ) subtrahiert und mit einem Kehrwert des Absorptionskoeffizienten  $\epsilon$  multipliziert. Für *double-stranded deoxyribonucleic acid* (dsDNA) ( $\epsilon = \frac{1}{50}$ ) ist ein anderer Absorptionskoeffizient definiert als für RNA ( $\epsilon = \frac{1}{40}$ ).

Die Konzentration [ng/µL] von dsDNA wurde also nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wie folgt errechnet:

$$c = 50 \cdot (A_{260} - A_{340})$$

Die Konzentration [ng/µL] von RNA wurde mit folgender Formel errechnet:

$$c = 40 \cdot (A_{260} - A_{340})$$

Die Absorptionswerte  $A_{260}$  und  $A_{340}$  sind dabei durch Subtraktion des Blindwertes korrigiert.

## RNA-Isolation

Um untersuchen zu können, ob in der stabil transfizierten Zelllinie HEK293-V4 die kodierende Sequenz in mRNA transkribiert wurde, musste zunächst RNA aus den Zellen isoliert werden. Hierbei wurden Materialien aus dem Isolationskit „NucleoSpin® RNA Plus“ verwendet.

Analog zum Procedere des Passagierens (s. Kapitel 2.3.1) wurden  $10^7$  Zellen geerntet und die Suspension für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 350  $\mu$ L Lysepuffer aufgenommen und im Vortex-Mischer homogen gerührt. Eine Komponente des Lysepuffers waren chaotrope Ionen der Hofmeister-Reihe, welche eine sofortige Denaturierung von RNasen bewirken. Eine Beschädigung der RNA durch Verdau wurde dadurch ausgeschlossen. Um die überflüssige *genomic deoxyribonucleic acid* (gDNA) aus dem Lysat zu entfernen, wurde die Lösung auf eine Säule gegeben und für 30 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert. Zum nun von DNA befreiten Filtrat wurden 100  $\mu$ L einer Lösung gegeben, welche den pH-Wert und die Salzkonzentrationen der Lösung so adaptierte, dass eine nachfolgende Bindung der RNA an eine Matrix aus Kieselgel möglich war. Entstandene Präzipitate wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aufgelöst und die gesamte Lösung auf besagte Membran gegeben. Das Filtrat wurde nach 15-sekündiger Zentrifugation bei 11.000 g verworfen. Anschließend wurde die Membran mit der adsorbierten RNA zunächst mit 200  $\mu$ L eines ersten Waschpuffers versetzt und für 15 Sekunden bei 11.000 g zentrifugiert, dann mit 600  $\mu$ L eines zweiten Waschpuffers durch analoge Zentrifugation gewaschen und zuletzt mit 250  $\mu$ L des zweiten Waschpuffers bei 11.000 g für 2 Minuten gewaschen und getrocknet. Um nun eine möglichst große Menge an isolierter RNA aufzufangen, wurden auf die Kieselgel-Membran zweimal konsekutiv 30  $\mu$ L Nuklease-freies Wasser gegeben, bei 11.000 g zentrifugiert und dadurch aus der Membran gelöst. Die Probe wurde dann für eine längerfristige Lagerung bei  $-80$  °C eingefroren.

## Reverse Transkription

Für den nachfolgenden PCR-Nachweis der kodierenden Sequenz für TRPV4 war *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) als Ausgangsmaterial nötig. Dafür wurde eine reverse Transkription der RNA-Vorlage mit den Lösungen des Produkts „GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT)“ durchgeführt. Im Folgenden wird in Kürze das verwendete Protokoll dargestellt.

Alle Komponenten, die für die reverse Transkription nötig waren, wurden auf Eis aufgetaut. Neben der RNA-Vorlage wurde ein Reaktionspuffer und eine Enzym-Mischung verwendet. In letzterem befand sich neben der reversen Transkriptase auch ein RNase-Inhibitor, der zusätzlich absichern sollte, dass keine Degradierung der Vorlage stattfand. Im Reaktionspuffer befanden sich sowohl Magnesium<sup>2+</sup>-Ionen ( $MgCl_2$ ), die als Cofaktor der reversen Transkriptase dienen, als auch Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) für die Synthese des komplementären Stranges, und Oligo(dT)-Primer, welche den Startpunkt der Reaktion am Poly-A-Schwanz der mRNA festlegten.

Die Bestandteile wurden nach dem Auftauen kurz im Vortex-Mischer gerührt und miteinander vermengt (s. Tabelle 2.9). Dabei wurde nach jeder Addition vorsichtig auf- und abpipettiert. Die Masse der eingesetzten RNA sollte dabei 5  $\mu$ g nicht übersteigen.

**Tabelle 2.9:** Pipettierplan für eine reverse Transkription.

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
GoScript™ Reaction Buffer, Oligo(dT)	4
GoScript™ Enzyme Mix	2
RNA-Vorlage (<5 $\mu\text{g}$ )	10
ddH <sub>2</sub> O	4
<b>Gesamt</b>	<b>20</b>

Die fertig pipettierten Proben wurden daraufhin bei 25 °C für 5 Minuten inkubiert, um die Anlagerung der Oligo(dT)-Primer zu ermöglichen. Danach wurde die Elongation des Synthese-Stranges durch die reverse Transkriptase für eine Stunde bei 42 °C begünstigt und sodann für 15 Minuten bei 70 °C durch thermische Inaktivierung des Enzyms beendet. Im Gegensatz zur kurzfristigen Lagerung bei 4 °C, ist eine längerfristige bei –20°C empfohlen.

**Tabelle 2.10:** Inkubationsplan für eine reverse Transkription.

Phase	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Primerhybridisierung	25	5
Elongation	42	60
Inaktivierung	70	15
Lagerung	4	

## PCR

Um nachzuweisen, dass die Transfektion mit dem Expressionsvektor auf Ebene der Transkription (mRNA) erfolgreich war, wurde eine konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt.

Alle für die PCR nötigen Bestandteile wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Der verwendete „GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix“ enthielt eine DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) zur Vervielfältigung eines Amplikons. Diese benötigt für die Synthese des jeweiligen Komplementärstrangs weitere Komponenten des *master mix*. Dies sind unter anderem Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Magnesium<sup>2+</sup>-Ionen (MgCl<sub>2</sub>) als Cofaktor und ein Reaktionspuffer zur Optimierung des pH-Wertes. Zu 25  $\mu\text{L}$  des zweifach konzentrierten *master mix* wurden je 2  $\mu\text{L}$  Forward und Reverse primer (10  $\mu\text{M}$ ) gegeben. Diese definieren in Kombination die Länge des Amplikons. Ebenso markieren sie mit ihrem 3'-Ende den Angriffspunkt der DNA-Polymerase, welche dort ihre Synthese beginnt. Außerdem wurde 1  $\mu\text{L}$  der cDNA-Vorlage verwendet, welche das Produkt der vorangegangenen reversen Transkription war. Weil eine Masse von 250 ng dabei nicht überschritten werden sollte, wurden 200 ng DNA-Vorlage hinzugegeben und zuletzt mit 20  $\mu\text{L}$  Nuklease-freiem Wasser zu 50  $\mu\text{L}$  Endvolumen aufgefüllt.

**Tabelle 2.11:** Pipettierplan für eine PCR.

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Endkonzentration
GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (2X)	25	1X
Forward primer (10 $\mu\text{M}$ )	2	0,4 $\mu\text{M}$
Reverse primer (10 $\mu\text{M}$ )	2	0,4 $\mu\text{M}$
DNA-Vorlage (<250 ng)	1	4 ng/ $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	20	
<b>Gesamt</b>	<b>50</b>	

Im Thermozykler wurden die Proben daraufhin bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Eine initiale Denaturierung für ein Intervall von 2 Minuten bei 94 °C bewirkt die Dissoziation eines an die Polymerase gebundenen Antikörpers, welcher einen vorzeitigen Start der Reaktion verhindert [154]. Die exponentielle Vervielfältigung des Amplikons wurde durch die Wiederholung der Schritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation in 30 Zyklen erreicht. Die Denaturierung, also das Trennen der Doppelstränge, erfolgte bei 94 °C für je 15 Sekunden. In Abhängigkeit der Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der einzelnen Primerpaare, wurde für die 15-sekündige Anlagerung der Primer an einen Einzelstrang des Amplikons (Primerhybridisierung) eine Temperatur von 55–68 °C gewählt. Jeweils die niedrigere Schmelztemperatur der beiden eingesetzten Primer war dabei ausschlaggebend. Für die Elongation durch die *Taq*-Polymerase wurden die Proben auf 72 °C erhitzt. Die Dauer dieser Phase bestimmt sich dabei aus der Länge des Amplikons und sollte 1 Minute pro Kilobase betragen. Das Enzym weist dabei auch eine Aktivität als Exonuklease auf, was einen Austausch bisher falsch verbauter Basen ermöglicht und Fehler in der Amplifikation minimiert. Eine abschließende Elongation für 5 Minuten bei 72 °C stellte sicher, dass unvollständige Doppelstränge zu Ende synthetisiert wurden.

**Tabelle 2.12:** Inkubationsplan für eine PCR.

	Phase	Temperatur [°C]	Dauer
30 Zyklen	Initiale Denaturierung	94	2 min
	Denaturierung	94	15 s
	Primerhybridisierung	55–68	15 s
	Elongation	72	1 min/kb
	Finale Elongation	72	5 min
	Lagerung	4	

### Agarose-Gelelektrophorese

Im Rahmen einer Agarose-Gelelektrophorese wurden die Produkte einer RT-PCR ihrer Größe nach aufgetrennt und im Nachgang mittels Ultraviolettphotografie dokumentiert.

In Vorbereitung zur späteren Elektrophorese wurden für das Gel 0,5 g Agarose mit 50 mL TBE-Puffer vermischt und im Mikrowellenherd bei einer Leistung von 600 W abwechselnd für 10–30 Sekunden erhitzt und geschwenkt. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis sich eine klare Flüssigkeit ergab und alle Kristalle des Agarosepulvers gelöst waren. Nachdem die Lösung beim Abkühlen nicht mehr als handwarm war, wurden 10  $\mu\text{L}$  des Fluoreszenzfarbstoffs „Nancy-520 DNA Gel Stain“ hinzugegeben. Dieser sendet nach Anregung durch eine UV-Lampe gelbgrünes Licht der Wellenlänge 560 nm aus und ermöglicht so eine Detektion einzelner DNA-Banden. Anschließend wurde die Lösung in die Elektrophoresekammer

eingefüllt und ein Kamm als Platzhalter nahe der Kathode für die Probestaschen des Gels eingesetzt. Nach Erkalten und Erhärten des Gels, wurde die Kammer bündig zur Oberkante des Gels mit TBE-Puffer aufgefüllt, wobei auch die Taschen des Gels gefüllt wurden. Neben den einzelnen DNA-Proben als Produkte einer PCR wurde auch 5 µL eines Komigrationsstandards („DirectLoad™ PCR 100 bp Low Ladder“) eingesetzt. Nun wurde eine Spannung von 100 V angelegt und so ein elektrisches Feld erzeugt, in dem die, durch ihre Phosphatreste negativ geladenen, Amplikons zur Anode wanderten. Je kleiner dabei das Amplikon, desto schneller die Bewegung durch das Gel. Nach 30 Minuten wurde die Elektrophorese beendet und das Gel mit der UV-Kamera „Gel Doc™ EZ System“ fotografiert.

### **DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gelen**

Für eine Sequenzierung war nach der Agarose-Gelelektrophorese die Aufreinigung der DNA notwendig. Hierfür wurde das Kit „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System“ verwendet. Zunächst wurde die betreffende DNA-Bande auf einem UV-Transluminator dargestellt und so ausgeschnitten, dass möglichst wenig überflüssiges Gel in den nachgeschalteten Extraktionsprozess mitgenommen wurde. Der gewogene Ausschnitt wurde danach in einem Verhältnis von 1 µL auf 1 µg mit einer Lösung versetzt, die Guanidiniumthiocyanat enthält. Dieser Bestandteil vermittelt als chaotropes Agens die spätere Bindung der DNA an eine Kieselgel-Membran. Der noch solide Gel-Würfel wurde in einem Wasserbad bei 60 °C und durch wiederholtes kurzes Rühren im Vortex-Mischer aufgelöst. Die Lösung wurde daraufhin auf die beschriebene Membran transferiert und nach einminütiger Inkubation bei 16.000 g für 60 Sekunden zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und auf die Säule wurden 700 µL eines Waschpuffers gegeben. Danach wurde der Aufbau abermals für 1 Minute bei 16.000 g zentrifugiert und nun mit 500 µL des Waschpuffers beladen. Die Lösung wurde bei 16.000 g für 5 Minuten zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Nun wurde die leere Säule, um das verbleibende Ethanol verdunsten zu lassen, bei 16.000 g für 1 Minute zentrifugiert. Nun wurden auf die Membran 50 µL Nuklease-freies Wasser pipettiert, um die gebundene DNA nach 1-minütiger Inkubation bei 16.000 g für 60 Sekunden zu eluieren. Eine gewonnene Probe wurde entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt zur Sequenzierung eingesandt.

### **Sequenzierung**

Um sicher zu gehen, dass die gesamte kodierende Sequenz für das TRPV4-Kanalprotein in der transfizierten Zelllinie HEK293-V4 vorlag, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Nachdem der Prozess der Sequenzierung an den Enden der PCR-Amplikons am fehleranfälligsten ist und es des öfteren zu Punktmutationen kommt, wurden sich überlappende Sequenzen gewählt. Tatsächliche Mutationen können dadurch von Fehlern der Polymerase unterschieden werden.

Die aufgereinigten PCR-Amplikons und die entsprechenden Primer wurden bei „Eurofins Genomics“ eingesandt. Für die Reaktion wurden je 20 µL eines Primers mit einer Stoffmengenkonzentration von 10 µM verwendet. Die jeweilige DNA-Vorlage hatte eine Konzentration von 10–50 ng/µL.

### **2.5.2 Nachweis von TRPV4-Kanalprotein**

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die durch stabile Transfektion eingebrachte Sequenz nach Transkription in mRNA auch in TRPV4-Kanalprotein translatiert wurde.

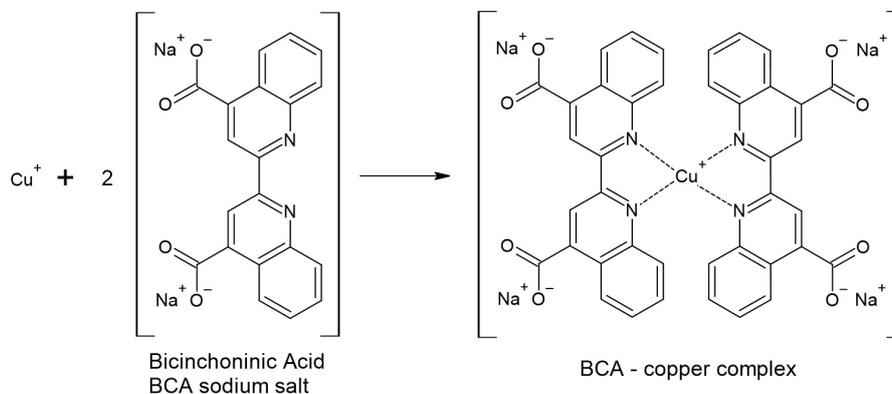
## Protein-Isolation

Für den Nachweis des TRPV4-Kanals mittels Western Blot wurde das Gesamtprotein von HEK293-V4-Zellen isoliert. Hierfür wurden 5 Millionen Zellen aus der Kultur entnommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dem Herstellerprotokoll entsprechend, wurden für die Lyse 98 µL RIPA-Lysepuffer und 2 µL eines 50-fach konzentrierten Protease-Inhibitors auf das Zellpellet pipettiert. Die entstandene Suspension wurde zur Lyse für einen Zeitraum von 30 Minuten abwechselnd je 5 Minuten im Vortex-Mischer gerührt und auf Eis gekühlt. Abschließend wurde die Lösung für 10 Minuten bei 4 °C und einer Beschleunigung von 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand mit gelöstem Protein wurde bei -20 °C eingefroren.

## Konzentrationsbestimmung von Protein-Proben

Um für die nachfolgende SDS-PAGE die Konzentration des isolierten Proteins einstellen zu können, wurde eine kolorimetrische Bestimmung des Gesamtproteins mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien stammten dabei aus dem „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“.

Die Methodik des Assays beruht auf einer Reduktion von zweiwertigen zu einwertigen Kupferionen in Anwesenheit von Proteinen — im Speziellen deren Peptidbindungen. Dabei ist die Menge an gebildeten  $\text{Cu}^+$ -Ionen proportional zur vorhandenen Menge an Protein. Je zwei Moleküle der farblosen BCA bilden mit einem  $\text{Cu}^+$ -Ion einen Chelatkomplex, wobei die Bicinchoninsäure als Elektronendonator fungiert. Der entstandene Komplex zeigt durch sein aromatisches Elektronensystem eine violette Farbe und besitzt bei 562 nm sein Absorptionsmaximum [155]. Diese Wellenlänge wurde auch für die Auswertung des Assays im *microplate reader* verwendet.



**Abbildung 2.2:** Komplexbildung Bicinchoninsäure-Assay. Adaptiert nach Smith *u. a.* [155].

Zunächst wurde eine Arbeitsreagenz aus zwei Lösungen des Kits hergestellt. Die erste enthält Chemikalien für ein Puffersystem bei einem alkalischen pH-Wert von 11,25 und Bicinchoninsäure, während die zweite Kupfersulfat als Quelle der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen enthält. Für jede Probe wurden 200 µL der Arbeitsreagenz angesetzt, wobei 50 Teile des ersten Reagenzes mit einem Teil der zweiten vermischt wurden.

Als zweiter Teil der Vorbereitung wurde eine Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) angefertigt. Diese diente in der Auswertung der Ergebnisse als Standard mit bekannten Proteinkonzentrationen. Dem Protokoll folgend, wurde mithilfe einer vom Hersteller bereitgestellten BSA-Stammlösung der Konzentration 2 mg/mL folgende Verdünnung mit RIPA-Puffer als Lösungsmittel pipettiert (s. Tabelle 2.13):

**Tabelle 2.13:** Pipettierplan für eine BSA-Verdünnungsreihe.

Gefäß	Volumen [ $\mu\text{L}$ ] Lösungsmittel	Volumen [ $\mu\text{L}$ ] BSA	Finale Konzentration BSA [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
1	0	300 der Stammlösung	2000
2	125	375 der Stammlösung	1500
3	325	325 der Stammlösung	1000
4	175	175 aus Gefäß 2	750
5	325	325 aus Gefäß 3	500
6	325	375 aus Gefäß 5	250
7	325	325 aus Gefäß 6	125
8	400	100 aus Gefäß 7	25
9	400	0	0

In die Nüpfle einer durchsichtigen 96-well Platte wurden sodann je 25  $\mu\text{L}$  des Standards oder einer Protein-Probe unbekannter Konzentration gegeben und 200  $\mu\text{L}$  der Arbeitsreagenz hinzugefügt. Sowohl die Standard-Verdünnungsreihe als auch die Proben wurden als zweifaches Replikat pipettiert, um später einen Mittelwert bilden zu können, der die Reliabilität der Daten erhöht. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nach fünfminütigem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Platte im Mikrotiterplatten-Lesegerät untersucht, indem die Absorption der Lösungen bei 562 nm gemessen wurde. Mit den Werten der BSA-Verdünnungsreihe wurde eine lineare Standard-Kurve durch die Datenanalyse Software „MARS“ errechnet. Ausgehend von der ermittelten Standard-Kurve wurden die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben bestimmt. Um später möglichst identische Mengen an Gesamtprotein für die SDS-PAGE einzusetzen, wurden die Konzentrationen auf 2.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mit RIPA-Puffer nivelliert.

### SDS-PAGE

Für eine Auftrennung der Proteine einer Zelle nach ihrem Molekulargewicht wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Im Folgenden wird in Kürze das Protokoll zur Durchführung dieser Methode dargestellt.

Zunächst wurden auf Eis die Proteinproben, Lämmli Probenpuffer (Ladepuffer) und „Precision Plus Protein™ Dual Color Standards“ als Komigrationsstandard aufgetaut. Zu 30  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein wurden 5  $\mu\text{L}$  des 4-fach konzentrierten Lämmli Probenpuffers gegeben. Im Probenpuffer befindet sich unter anderem Natriumlaurylsulfat (SDS), was als Detergens bei 5-minütigem Erhitzen der Proben auf 95 °C Wasserstoffbrückenbindungen löst und die Proteine in ihre Primärstruktur verwandelt. Außerdem werden durch das im Ladepuffer befindliche  $\beta$ -Mercaptoethanol Disulfidbrücken aufgespalten, die normalerweise zur Ausbildung der Tertiärstruktur von Proteinen beitragen. Daraufhin wurde die Elektrophoresekammer mit etwa 600 mL, und die darin befestigte Vorrichtung mit zwei montierten „Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels“ mit 150 mL einfach konzentriertem TRIS-Glycin-SDS-Puffer (Lämmli Laufpuffer) befüllt. Die Taschen der Gele wurden mit Laufpuffer gespült und nacheinander mit Proteinproben bzw. Komigrationsstandard beladen.

Schließlich wurde in der Kammer zwischen beiden Elektroden eine Spannung von 100 V angelegt, wodurch sich kleinere Proteine schneller durch das Gel hin zur Anode bewegten als größere. Eine gleichmäßig negative Ladung der Proteine wird dabei durch das gebundene SDS vermittelt. Nachdem die Laufmittelfront eine gegebene Migrationslinie erreicht hat, wurde die PAGE beendet und die Gele vorsichtig aus der Vorrichtung befreit.

## Immunoblot

Der erste Abschnitt des Immunoblottings ist der Western Blot selbst. Bei diesem Verfahren werden die aufgeschlüsselten Proteine aus dem Gel der PAGE durch abermalige Elektrophorese auf eine Membran transferiert.

Im Rahmen eines *semi-dry* Blots wurde auf der Anode zunächst ein in „Trans-Blot Turbo Transfer Buffer“ getränkter Filterpapier-Stapel (*transfer stack*) platziert. Im Transferpuffer vermittelt TRIS die Leitfähigkeit und die Pufferung eines pH-Wertes von 8,9. Eine „Immobilon®-E“ PVDF-Membran in zum Gel passender Größe wurde für 30 Sekunden in Ethanol eingelegt, auf dem Stapel platziert und Luftbläschen, welche zwischen Membran und *transfer stack* entstanden sind, vorsichtig mit einer Walze entfernt. Darauf wurde ein Gel gelegt, welches in vorheriger SDS-PAGE vorbereitet wurde. Als Abschluss des Aufbaus wurde ein zweiter in Transferpuffer getränkter Filterpapier-Stapel auf dem Gel platziert und die Kathode obenauf befestigt, nachdem letzte Luftbläschen ausgestrichen wurden. Mit einem auf die Größe des Gels abgestimmten Protokoll wurde zwischen den Elektroden für 3 Minuten eine Spannung von bis zu 25 V und eine Stromstärke von 2,5 A angelegt. Dabei wurden die Proteine aus dem Gel gelöst und dem Elektronenstrom folgend auf die Membran übertragen.

Nun folgte die sog. Immunodetektion, welche das Färben gebundener Proteine unter Zuhilfenahme verschiedener Antikörper und deren finale visuelle Darstellung beschreibt. Zunächst wurde die PVDF-Membran für 5 Minuten in 20 mL TBS-Puffer auf einem Horizontalschüttler bei 30 rpm gewaschen. Daraufhin wurde der TBS-Puffer entfernt und 20 mL des Blockierungspuffers „Intercept®“ hinzugegeben. Dieser Puffer blockierte Stellen der Membran, die bis dahin nicht mit Proteinen besetzt waren, wobei im Puffer befindliche, nicht aus Säugetieren stammende Proteine an die freien Stellen gebunden wurden. Damit sollte erreicht werden, dass im Verlauf keine weiteren Proteine an die Membran banden, welche das später aufgenommene Bild hätten stören können. Die eingesetzten, nicht humanen Proteine verhinderten auch eine Kreuzreaktivität der Antikörper. In diesem Blockierungspuffer wurde die Membran für 1 Stunde leicht geschüttelt (30 rpm) und anschließend zweimal für 10 Minuten in 20 mL TBST-Puffer bei 30 rpm gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Membran so beschnitten, dass nur noch der Bereich von Interesse verblieb. Dieser war in der Höhe durch den Komigrationsstandard und in der Breite durch die übertragenen Proteinproben definiert. Danach wurde die Membran in 15 mL eines Puffers gelegt, welcher die Primärantikörper und „Intercept®“-Blockierungspuffer enthielt. Das Verhältnis der beiden Komponenten (s. Tabelle 2.14) wurde durch den jeweils verwendeten Antikörper festgelegt. Neben Antikörpern gegen Epitope des hTRPV4-Membrankanals wurden zur Ladekontrolle teils Antikörper gegen das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt. Das Molekulargewicht der eingesetzten GAPDH betrug 36 kDa.

**Tabelle 2.14:** Verdünnungsverhältnisse der Primärantikörper.

Antikörper	Quelle	Ausgangskonzentration [mg/mL]	Verdünnungsverhältnis
TRPV4 (SAB2104243)	Kaninchen	0,5–1	1:1.000
TRPV4 (PA5-41066)	Kaninchen	0,5	1:1.000
TRPV4 (OST00035W)	Schaf	-	1:1.000
TRPV4 (MABS466)	Maus	1	1:10.000
GAPDH (PA1-988)	Kaninchen	1	1:2.000

In der Lösung mit Primärantikörpern wurde die Membran bei 30 rpm und 6 °C über Nacht inkubiert und danach dreimal je 5 Minuten bei 50 rpm in 25 mL TBST-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Für die nachgeschaltete Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Detektion wurde die Membran nun mit Sekundärantikörpern für eine Stunde bei 30 rpm inkubiert. Die nun eingesetzten Antikörper waren an deren Fc-Abschnitt mit Fluoreszenzmarkern beziehungsweise Peroxidasen versehen (Immunkonjugate). Mit einem der je zwei Fab-Fragmente sollten die in 15 mL TBST-Puffer gelösten Sekundärantikörper an die Primärantikörper binden. Eine Membran, die mittels Fluoreszenz-Detektion untersucht werden sollte, wurde ab dem Zeitpunkt der Inkubation mit Sekundärantikörpern vor Lichteinstrahlung geschützt.

**Tabelle 2.15:** Verdünnungsverhältnisse der Sekundärantikörper.

Antikörper	Ausgangskonzentration [mg/mL]	Verdünnungsverhältnis	Detektion
Goat anti-Rabbit IgG (A0545)	4–11	1:100.000	Chemilumineszenz
Donkey anti-Sheep IgG (A16041)	-	1:10.000	Chemilumineszenz
Goat anti-Mouse IgG (170-6516)	-	1:5.000	Chemilumineszenz
IRDye® 680RD Donkey anti-Mouse IgG	1	1:15.000	Fluoreszenz
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG	1	1:15.000	Fluoreszenz

Nun wurde die PVDF-Membran dreimal in 20 mL TBST-Puffer für 5 Minuten bei 50 rpm gewaschen und zuletzt zweimal in TBS-Puffer (20 mL) für ebenfalls 5 Minuten bei 50 rpm. Im Falle einer Detektion mittels Chemilumineszenz wurde die Membran gleichmäßig mit dem Substrat der Peroxidase für die Chemilumineszenz (0,1 mL pro cm<sup>2</sup>) beträufelt und für 5 Minuten inkubiert. Der Blot wurde dabei vor Lichteinstrahlung geschützt. Im Anschluss wurde die Membran mit der Lumineszenzkamera „Chemi-Smart 5000“ fotografiert. Für eine Fluoreszenz-Detektion wurde der fertig bearbeitete Blot zuletzt mit der Nahinfrarotkamera „Odyssey® Fc“ bei einer Wellenlänge von 700 nm fotografiert.

## 2.6 Funktionelle Nachweismethoden

### 2.6.1 Nachweis relativer zytosolischer Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsänderung im Aequorin-Assay

Die Luciferase Aequorin ist ein Enzym, welches ursprünglich in Quallen der Gattung *Aequorea* gefunden wurde [156]. Zusammen mit ihrem Luciferin Coelenterazin vermittelt sie die Eigenschaft, in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen blaues Licht ( $\lambda_{\max} = 496$  nm) zu emittieren [157]. Dies verleiht den Nesseltieren die Fähigkeit zur Biolumineszenz. Die Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen an 3 EF-Hand-Motive des Proteins bewirkt über eine Konformationsänderung die Oxidation der prosthetischen Gruppe Coelenterazin zu Coelenteramid [158, 159, 160]. Beim Übergang von angeregtem Coelenteramid zu dessen Grundzustand wird Energie in Form von Licht frei [157, 160].

Für die Molekularbiologie wurde das Enzym interessant, als 1990 zum ersten Mal die Klonierung des Aequorin-Gens gelang [161]. Seither konnte die Sequenz des Photoproteins in andere Organismen eingebracht und das exprimierte Enzym als Vehikel des Kalzium-Imagings verwendet werden.

Die Quallenart *Aequorea victoria* innerhalb der Gattung *Aequorea* exprimiert neben Aequorin auch das GFP [156]. Durch den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) wird ein Teil des emittierten Lichtes durch das GFP absorbiert [162]. Beim Übergang vom angeregten Zustand des GFP zu dessen Grundzustand wird Energie in Form von grünem Licht ( $\lambda_{\max} = 509 \text{ nm}$ ) frei [163]. Nachdem die beiden Proteine in *Aequorea victoria* nicht kovalent gebunden vorliegen, wird sowohl Licht der Wellenlänge 496 nm (blau) als auch der Wellenlänge 509 nm (grün) emittiert, wodurch die Qualle in blau-grünem Licht erscheint [164].

Im Lumineszenz-Assay wurde das Hybridprotein pSG5A verwendet, in welchem das GFP durch einen 50 Aminosäuren langen *Linker* mit Apoaequorin verbunden ist [159]. Die Entwicklung des Fusionsproteins diente vor allem der Erhöhung der Quantenausbeute ( $\Phi_{\text{CL}}$ ) und der Erhöhung der Effizienz des Energietransfers zwischen beiden Proteinen [159]. Die Quantenausbeute ist eine Zahl, welche beschreibt, wie viele Photonen von einem  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Protein emittiert werden. Sie liegt für Aequorin bei 0,12–0,20 und für GFP bei 0,72–0,85 [159, 162]. Nachdem über intramolekularen *chemiluminescence resonance energy transfer* (CRET) ein großer Teil der Energie von angeregtem Coelenteramid auf das GFP übertragen wird, ist logisch nachvollziehbar, dass das Emissionsmaximum des Fusionsproteins, ähnlich dem von GFP, bei etwa 510 nm liegt [159].

Der TRPV4-Kanal ist als nicht selektiver Kationenkanal für eine Analyse im Lumineszenz-Assay gut geeignet, denn auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können nach Aktivierung des Kanals in das Innere einer Zelle gelangen. Nachdem die Kulturbedingungen für die Zellen im Lumineszenz-Assay konstant blieben, wurde auch für die Menge der Co-Faktoren der Prozesse, welche die Chemilumineszenz beeinflussen, angenommen, dass diese konstant blieben. In diesem Zusammenhang wurden die im Lumineszenz-Assay gemessenen relativen Lichteinheiten auch als relative zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung angesehen. Dies ist eine in der Literatur übliche Interpretation der Signale [30, 57].

### **Plasmid-Amplifizierung**

Analog zu den Kapiteln 2.4.2 bis 2.4.5 musste zunächst das Plasmid vervielfältigt und aufgereinigt werden, auf dem die Sequenz von Aequorin verortet war. Die einzige Abweichung vom beschriebenen Protokoll stellte die Verwendung des Selektionsmarkers Kanamycin dar. Hier wurde ebenfalls eine Zielkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eingesetzt. Nach beendeter Aufreinigung des Plasmids, wurde die Konzentration auf 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  nivelliert. Im folgenden wird der Expressionsvektor auch Aequorin-Plasmid genannt.

### **Transfektion von HEK293-V4-Zellen zur transienten Expression von Aequorin**

Mithilfe einer sekundären Transfektion wurde nun das Aequorin-Plasmid in Zellen der Linie HEK293-V4 eingeschleust. Hierfür wurde analog zu Kapitel 2.4.7 „PromoFectin“ als Reagenz für die Transfektion verwendet. Ziel war eine transiente Expression von Aequorin, um die Zellen anschließend im Lumineszenz-Assay untersuchen zu können.

Zunächst wurden in einer Kulturflasche mit 25  $\text{cm}^2$  Wachstumsfläche 1,5–3 Millionen HEK293-V4-Zellen ausgesät (s. Kapitel 2.3.2). Die Zahl der Zellen war dabei vom aktuellen Wachstum in der Kultur abhängig. Nach 24 Stunden sollte eine Konfluenz von etwa 60 % erreicht sein, um für den dritten Tag eine optimale Transfektionseffizienz bei einer 80 % konfluenten Kulturflasche zu erreichen. Am zweiten Tag wurden die Zellen mit einer Lösung behandelt, welche das Aequorin-Plasmid und „PromoFectin“ enthielt. Zur Vorbereitung dieser Lösung wurden 13  $\mu\text{g}$  Aequorin-Plasmid (13  $\mu\text{L}$  einer Vorlage der Konzentration

1 µg/µL) in 50 µL DMEM gelöst und im Vortex-Mischer gerührt. Dem entsprechend wurden 13 µL der Transfektionsreagenz in 50 µL DMEM gelöst und vermischt. Beide Lösungen wurden danach zusammen vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mischung tröpfchenweise auf die Zellen in der Kulturflasche gegeben. Weitere 24 Stunden danach waren die Zellen bereit für den Lumineszenz-Assay.

### Lumineszenz-Assay

Zunächst wurde die Transfektionseffizienz mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt, indem die Anzahl der transfizierten Zellen durch die Anzahl aller Zellen in der Kulturflasche geteilt wurde. Sobald sich eine Transfektionseffizienz von mehr als 40 % ergab, konnte mit dem Assay in abgedunkelter Umgebung begonnen werden.

Dafür wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, gewaschen, vom Boden der Kulturflasche gelöst und in 4 mL Kulturmedium resuspendiert. Dazu wurde in einem Verhältnis von 1:1.000 (4 µL) das Luciferin Coelenterazin gegeben und das Gefäß zusätzlich vor Licht einstrahlung geschützt. Nach vorsichtigem Invertieren wurde die Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 mL HBS-Puffer gelöst. Von dieser Zellsuspension wurden für die Untersuchung im *microplate reader* je 190 µL in eine Vertiefung einer schwarzen 96-well Platte „Nunc™ F96 MicroWell™“ gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend in das Lesegerät „FLUOstar® Omega“ überführt und dort bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert.

Im Lumineszenz-Assay wurden verschiedene Versuchsbedingungen untersucht, indem je 10 µL unterschiedlicher Substanzen im Inneren des *microplate reader* mit einer Geschwindigkeit von 300 µL/s an den Rand einer *well* injiziert wurden. Währenddessen wurde in Intervallen von 0,5 Sekunden die Lumineszenz in relativen Lichteinheiten (RLU) dokumentiert. Über eine Integrationszeit von ebenfalls jeweils 0,5 Sekunden wurde dabei im Spektrum von 240–740 nM die einfallende Lichtmenge ( $Q_v$ ) oberhalb des jeweiligen *well* gemessen [165]. Auch während der Messung war die Umgebungstemperatur im *microplate reader* auf 37 °C eingestellt. Zur Bestimmung eines gemittelten Bezugswerts (*baseline*) wurden vor der ersten Injektion 20 Messpunkte (10 Sekunden) erhoben. Der zeitliche Abstand zwischen erster und möglicher zweiter Injektion variierte abhängig vom zu untersuchenden Effekt. Nach der zweiten Injektion wurden noch 120–240 Messpunkte (1–2 Minuten) ermittelt. Dies war abhängig davon, wie schnell sich am Ende Werte nahe der *baseline* einstellten. Mit der Kontroll-Software des Lesegeräts „OMEGA“ wurden die Parameter der Messungen festgelegt und die Daten erhoben.

[159]

**Tabelle 2.16:** Versuchsbedingungen des Aequorin Lumineszenz-Assays.

Kondition	1. Injektion/Vorbehandlung	2. Injektion
A	GSK1016790A (Agonist)	-
B	GSK2193874 (Antagonist)	GSK1016790A (Agonist)
C	CEES	-
D	CEES	GSK1016790A (Agonist)

Die ersten Versuchsbedingungen dienen im Rahmen des *Proof of Concept* der Analyse der Funktionalität des TRPV4-Kanals in den HEK293-V4-Zellen:

- A Ein spezifischer TRPV4-Agonist (GSK1016790A) wurde auf die Zellsuspension im Lesegerät gegeben.

**B** Zuerst wurde ein spezifischer TRPV4-Antagonist (GSK2193874) injiziert und nach bestimmter Zeit der TRPV4-Agonist (GSK1016790A).

Im Anschluss wurde die Substanz von Interesse (CEES) auf ihren Effekt am TRPV4-Kanal untersucht.

**C** Zunächst wurde nur CEES auf die Zellen gegeben.

**D** Hier wurde zunächst eine Vorbehandlung mit CEES durchgeführt und nach bestimmter Zeit der TRPV4-Agonist (GSK1016790A) injiziert.

Innerhalb der einzelnen Versuchsbedingungen wurden unterschiedliche Konzentrationen der Substanzen injiziert. Die niedrigste Konzentration einer Messreihe wurde gefolgt von der jeweils höheren untersucht.

Ausgehend von einem in der Literatur gefundenen Wert für die halbmaximal effektive Wirkstoffkonzentration ( $EC_{50}$ ) für GSK1016790A von 5 nM in einer HEK293 Zelllinie mit TRPV4-Überexpression, wurde für Versuchsbedingung **A** eine Verdünnungsreihe von GSK1016790A angefertigt [166]. So wurden verschiedene Konzentrationen um den, für die Zelllinie HEK293-V4 erwarteten,  $EC_{50}$ -Wert gewählt, im Verlauf angepasst und für die Injektion verwendet. Aus einer 10 mM Stammlösung GSK1016790A in DMSO, wurden Arbeitskonzentrationen in HBS-Puffer angefertigt. Durch die Injektion der Lösung in die jeweils vorgelegte Zellsuspension (190  $\mu$ L) wurde die gewünschte Endkonzentration erreicht.

Versuchsbedingung **A<sub>1</sub>** beschreibt die Selektion eines der generierten HEK293-V4 Pools (s. Kapitel 2.4.7) mit einer kleinen Bandbreite an Injektionskonzentrationen GSK1016790A (s. Tabelle 2.17).

**Tabelle 2.17:** Injektionskonzentrationen GSK1016790A im Aequorin-Assay für die Selektion eines der generierten HEK293-V4 Zellpools. %-Angaben auf zwei Dezimalen gerundet. Lösemittel: DMSO.

Kondition	Arbeitskonzentration [ $\mu$ M]	Endkonzentration [nM]	Anteil [%] Lösemittel
<b>A<sub>1</sub></b>	0,1	5	0,00
	0,2	10	0,00
	1	50	0,01
	2	100	0,01
	10	500	0,10
	15	750	0,30
	20	1.000	0,10

In Versuchsbedingung **A<sub>2</sub>** wurde eine größere Bandbreite an Konzentrationen GSK1016790A für die Injektion verwendet (s. Tabelle 2.18). Mit dem in **A<sub>1</sub>** selektierten Zellpool konnte so ein  $EC_{50}$ -Wert errechnet werden.

**Tabelle 2.18:** Injektionskonzentrationen GSK1016790A im Aequorin-Assay für die Bestimmung der EC<sub>50</sub>. ‰-Angaben auf zwei Dezimalen gerundet. Lösemittel: DMSO.

Kondition	Arbeitskonzentration [µM]	Endkonzentration [nM]	Anteil [‰] Lösemittel
A <sub>2</sub>	0,2	10	0,00
	1	50	0,01
	2	100	0,01
	5	250	0,03
	10	500	0,10
	15	750	0,30
	20	1.000	0,10
	40	2.000	0,20
	60	3.000	0,30
	100	5.000	0,51

Im Vergleich wurden HEK293-wt-Zellen untersucht. Hierfür wurde das Protokoll für Kondition **A** nur bezüglich der ausgesäten Zelllinie abgewandelt.

Für die 2. Injektion in Kondition **B** wurden je 10 µL einer 6 µM Lösung GSK1016790A verwendet, sodass eine Endkonzentration von 285,7 nM (0,03 ‰ DMSO) nach Injektion erreicht war.

Für die 1. Injektion wurden sieben Konzentrationen von GSK2193874 festgelegt. Die Auswahl dieser Werte basierte auf, in der Literatur beschriebenen Werten der jeweiligen halbmaximal inhibierende Wirkstoffkonzentration (IC<sub>50</sub>) im Bereich von 40–50 nM bei Aktivierung mit 10 nM GSK1016790A in Zellen der Zelllinie *human umbilical vein endothelial cell* (HUVEC) [52] und eigenen Versuchen. Aus einer 10 mM Stammlösung GSK2193874 in DMSO, wurden Arbeitskonzentrationen in HBS-Puffer angefertigt. Die jeweilige Endkonzentration wurde durch Injektion der Lösung in die vorgelegte Zellsuspension (190 µL) erreicht (s. Tabelle 2.19).

**Tabelle 2.19:** Injektionskonzentrationen GSK2193874 im Aequorin-Assay. ‰-Angaben auf zwei Dezimalen gerundet. Lösemittel: DMSO.

Kondition	Arbeitskonzentration [nM]	Endkonzentration [nM]	Anteil [‰] Lösemittel
B 1. Injektion	0,002	0,0001	0,00
	0,02	0,001	0,00
	20	1	0,00
	200	10	0,00
	2.000	100	0,01
	20.000	1.000	0,08
	40.000	2.000	0,20

Zur Vehikelkontrolle wurde für erste und zweite Injektion DMSO in HBS-Puffer verwendet. Die Konzentration des Lösemittels DMSO entsprach dabei für Kondition **B** 0,2 ‰.

In Versuchsbedingung **C** wurden unterschiedliche Konzentrationen von CEES über den Injektor im *microplate reader* auf die Zellsuspension (190 µL) im jeweiligen *well* gegeben.

Zur Vorbereitung wurden aus einer 20 M Stammlösung von CEES in Ethanol verschiedene Arbeitskonzentrationen in HBS-Puffer hergestellt. Für die erste Arbeitskonzentration (200 mM) wurde die 20 M Stammlösung im Verhältnis 1:99 in HBS-Puffer verdünnt. Durch diesen Verdünnungsschritt konnte die Konzentration des Lösungsmittels Ethanol im *well* geringgehalten werden. Auch die anderen Arbeitskonzentrationen wurden aus einer 2.000-fach konzentrierten Stammlösung hergestellt und durch Injektion auf die Zellsuspension zur jeweiligen Endkonzentration verdünnt.

**Tabelle 2.20:** Injektionskonzentrationen CEES im Aequorin-Assay. Lösemittel: Ethanol.

Kondition	Arbeitskonzentration [mM]	Endkonzentration [µM]	Anteil [%] Lösemittel
<b>C</b>	0,125	6,25	0,5
	0,25	12,5	0,5
	0,5	25	0,5
	2	100	0,5
	10	500	0,5
	40	2.000	0,5
	200	10.000	0,5

Für die letzte Kondition **D** wurden die Zellen vor der Ernte für mit verschiedenen Konzentrationen von CEES inkubiert. Für Versuchskondition **D<sub>1</sub>** betrug die Inkubationsdauer 30 Minuten. Dafür wurden Arbeitskonzentrationen in DMEM hergestellt, indem 10 µL der jeweiligen Stammlösung von CEES in Ethanol mit 990 µL DMEM vermischt wurden. Auf dem Zellrasen eines Kulturgefäßes befand sich zum Zeitpunkt der Zugabe der Lösung jeweiliger Arbeitskonzentration bereits 1 mL DMEM, wodurch sich eine finale Verdünnung um den Faktor 2 ergab. Die jeweilige Stammlösung von CEES musste also die 200-fache Endkonzentration aufweisen. Das Kulturgefäß wurde dann 15 Minuten unter dem Abzug der Sicherheitssterilbank belassen und dann weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Schließlich folgte die Ernte der Zellen nach dem zu Beginn in Kapitel 2.6.1 (Lumineszenz-Assay) beschriebenen Protokoll.

Im Messprotokoll wurde nach 10 Sekunden der TRPV4-Agonist GSK1016790A injiziert. Die gewählte Endkonzentration betrug 300 nM GSK1016790A.

**Tabelle 2.21:** Konzentrationen von CEES für die Vorbehandlung im Aequorin-Assay. Lösemittel: Ethanol.

Kondition	Arbeitskonzentration [µM]	Endkonzentration [µM]	Anteil [%] Lösemittel
<b>D<sub>1</sub></b>	250	125	0,5
	500	250	0,5
	1.000	500	0,5
	2.000	1.000	0,5
	4.000	2.000	0,5
	8.000	4.000	0,5

Für Versuchskondition **D<sub>2</sub>** wurden lediglich die Inkubationszeiten von CEES abgewandelt, um zu untersuchen ob die Dauer der Exposition eine Rolle spielt. Hierfür wurde eine Endkonzentration von 1.000 µM CEES gewählt. Als Expositionszeiten wurden 0 Minuten,

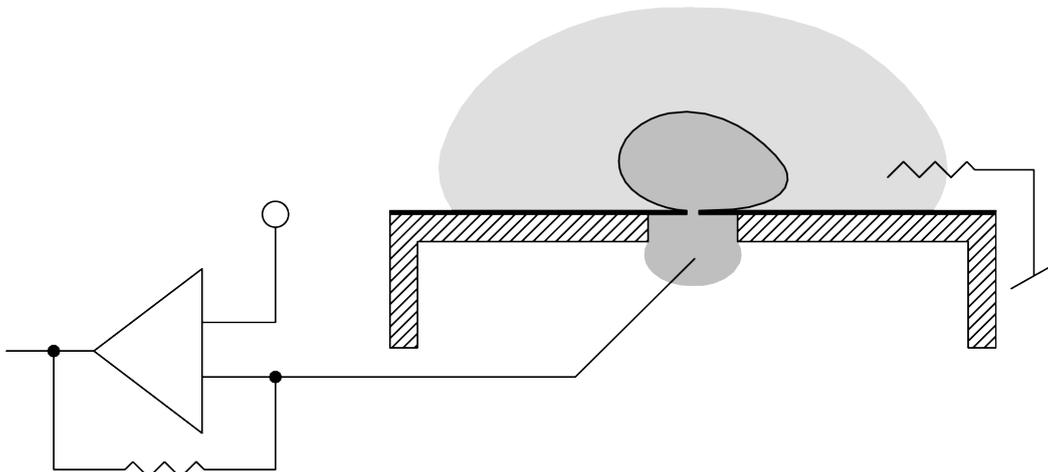
0,5 Minuten, 5 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten ausgewählt. Im Übrigen unterschied sich der Versuchsaufbau nicht von Kondition **D<sub>1</sub>**.

Nach Abschluss einer Messung wurden die Injektionsschläuche des Mikrotiterplatten-Lesegeräts je nach zuvor injizierter Substanz gereinigt. Wenn ein Schlauch für die Injektion einer CEES-Lösung verwendet wurde, folgte eine sequenzielle Spülung mit 10 mL NaOCl, 5 mL Ethanol und 5 mL ddH<sub>2</sub>O. Im Falle einer Injektion von Lösungen in DMSO (GSK1016790A, GSK2193874) wurde statt NaOCl in der ersten Spülung DMSO verwendet und anschließend ebenfalls mit Ethanol und ddH<sub>2</sub>O gespült.

## 2.6.2 Patch-Clamp-Technik

Die Messungen der HEK293-V4 Zelllinie im Aequorin-Assay lieferten Daten aus einem System mit Überexpression des TRPV4-Kanals. Um einen Vergleich mit Zellen anzustellen, die den Kanal endogen exprimieren, wurde die Zelllinie A549 verwendet [167]. Die Zelllinie basiert auf der Entnahme und Kultivierung von Zellen des Lungenkarzinoms eines 58-jährigen Mannes im Jahr 1972 [168]. In darauffolgenden Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass A549-Zellen typische Eigenschaften von Typ-2-Pneumozyten des Alveolarepithels besitzen [169]. Die Zellen stammen somit aus einem Adenokarzinom der Lunge. Neben TRPV4exprimiert die Zelllinie A549 auch viele andere Membrankanäle [170, 171, 172, 173], weshalb der Whole-Cell-Ansatz der Patch-Clamp-Technik nur als Methode zur Unterstützung der gefundenen Daten für die Zelllinie HEK293-V4 dienen konnte.

Im Verlauf wurde klar, dass eine Transfektion von A549-Zellen mit Aequorin-Plasmid nicht möglich war und die Zellen deshalb im Patch-Clamp-Ansatz untersucht werden mussten. Dafür wurde der planare Patch-Clamp Aufbau „Port-a-Patch“ und die Software „PatchControl“ der Firma Nanion Technologies eingesetzt. Auch die nötigen Lösungen stammten von diesem Hersteller.



**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung des planaren Patch-Clamp Aufbaus. In Anlehnung an Fertig u. a. [174].

Eine einzelne Zelle wird bei dieser Methode von oben an eine mikrometergroße Öffnung in einem Plättchen aus Borsilikatglas (*chip*) gesaugt. Wie bei der konventionellen Patch-Clamp-Technik mit einer Glaskapillare wird dann die kreisrunde Kontaktfläche zwischen *chip* und Zelle stark durch Unterdruck abgedichtet (*gigaseal*) und die Zellmembran über der Öffnung des Chips (*patch*) rupturiert. Über die entstandene Öffnung der Zelle ist der Kontakt eines chloridierten Silberdrahts (Ag/AgCl-Elektrode) zum Zytosol möglich. Diese

befindet sich an der Unterseite des Chips in einer Elektrolytlösung „Internal CsF 110“, die der Zusammensetzung des Zellplasmas ähnelt. Eine zweite Ag/AgCl-Elektrode kommt der Membran der Zelle von oben nahe und befindet sich wie die Zelle auch in einer Lösung, welche die Zusammensetzung extrazellulärer Matrix widerspiegelt („External Standard“). Mithilfe beider Elektroden lassen sich nun Ströme im Nanoampere-Bereich ableiten, die durch Ionen-Bewegungen durch aktivierte Membrankanäle der ganzen Zelle entstehen (Whole-Cell-Ansatz). Wie im Aequorin-Assay wird die Eigenschaft des TRPV4-Kanals genutzt, nach Aktivierung permeabel für Kationen zu sein.

In Vorbereitung auf die Messung wurden etwa 2,5 Millionen A549-Zellen aus der Kultur entnommen. Nach Protokoll der Firma Nanion Technologies wurde besonders auf eine schonende Ernte der Zellen geachtet. Der Zellrasen wurde zweimal mit 5 mL PBS-Puffer gewaschen und dann für 3,5 Minuten bei 37 °C mit 1 mL „TrypLE“ vom Boden der Kulturflasche gelöst, wobei nach 10-sekündiger Einwirkzeit der Überstand der Enzym-Lösung vorsichtig abgenommen wurde, sodass nur noch wenige Mikroliter den Zellrasen bedeckten. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL externem Standard resuspendiert und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Außerdem wurden die Elektroden mit destilliertem Wasser und 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend für 3 Minuten in Natriumhypochlorit gebadet. Die Chloridierung der Silberdrähte bewirkt eine Stabilisierung des Grenzflächenpotentials in den Elektrolytlösungen.

Während des Versuchs kamen Lösungen zum Einsatz, die zu Beginn von –20 °C Lagertemperatur auf Raumtemperatur erwärmt wurden. Neben dem bereits erwähnten externen und internen Standard wurde auch eine Lösung zur Verbesserung der Verbindung zwischen Zelle und Chip („Seal Enhancer“) eingesetzt.

Nun wurde ein Chip vom Typus „NPC-1“ mit einem Widerstand von 3–5 M $\Omega$  für die Applikation der Zellen vorbereitet. Dafür wurden 5  $\mu$ L des internen Standards auf die Öffnung des Chips an der Unterseite pipettiert. Der Chip wurde sodann auf die Vorrichtung des „Port-a-Patch“ geschraubt, wodurch sich ein luftdichter Raum unterhalb des Chips ergab und die erste Elektrode in Kontakt mit der injizierten Lösung kam. Anschließend wurden 15  $\mu$ L des externen Standards von oben auf die Öffnung des Chips gegeben und ein kleiner Faradaykäfig inklusive zweiter Elektrode auf dem Aufbau befestigt, wobei auch hier der Kontakt des chloridierten Silberdrahts zum externen Standard gewährleistet wurde. Mit der Software „PatchContol“ wurde nun das Versuchsprotokoll gestartet und 15  $\mu$ L der Zellsuspension in den Tropfen aus externer Standardlösung pipettiert.

Sobald eine Zelle an der Öffnung des Chips einen Kontakt aufgebaut hat, wurde die „Seal Enhancer“-Lösung eingewaschen, indem 15  $\mu$ L zur Suspension auf dem Chip hinzugefügt wurden, 15  $\mu$ L der Suspension wieder abgenommen wurden und wieder 15  $\mu$ L der „Seal Enhancer“-Lösung addiert wurden. Die höhere Konzentration an Ca<sup>2+</sup>-Ionen im „Seal Enhancer“ bewirkt eine stärkere Abdichtung der Kontaktfläche zwischen Chip und Zelle. Auch ein erneuter Verschluss der Zellöffnung nach Ruptur soll dadurch verhindert werden. Überschüssige Zellen werden bei diesem Schritt ebenfalls aus dem Tropfen entfernt.

Nachdem nun idealerweise eine Verbindung mit einem Widerstand von 1 G $\Omega$  (*gigaseal*), mindestens aber 600 M $\Omega$ , entstanden ist, wurde die elektrische Kapazität der Zellmembran (*C-slow*) und des Chips (*C-fast*) automatisch kompensiert. Nur wenn jetzt ein Serienwiderstand (*R-series*) von unter 10 M $\Omega$  ermittelt wurde, konnte die Zelle für die spätere Messung verwendet werden. Nun wurden 15  $\mu$ L externer Standard zur Lösung auf dem Chip hinzugefügt und 15  $\mu$ L des Tropfens entfernt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor 15  $\mu$ L externer Standard ohne folgende Abnahme hinzugefügt wurden. Das Gesamtvolumen der Lösung auf dem Chip betrug nun 45  $\mu$ L. Im Anschluss wurde das Messprotokoll gestartet. Hierbei wurde alle 500 Millisekunden ein rampenför-

miger (Spannungs-)Puls von  $-100$  bis  $+100$  mV generiert. Die Dauer des Pulses betrug dabei 361 ms. Für je einen Puls wurde die Stromstärke bei einer Spannung von  $-100$  und  $+100$  mV dokumentiert. Für eine spätere *baseline*-Normalisierung wurden mindestens 40 Paare von Messpunkten erhoben, bevor die Injektion von  $15 \mu\text{L}$  einer Lösung mit dem TRPV4-Agonisten GSK1016790A durchgeführt wurde. Diese Lösung wurde kurz vor der Injektion aus  $190 \mu\text{L}$  externem Standard und  $10 \mu\text{L}$  einer höher konzentrierten Lösung mit GSK1016790A (Arbeitskonzentration in Tabelle 2.23) vorbereitet und im Vortex-Mischer gerührt. Mit der Injektion in die Lösung auf dem Chip und der verbundenen 4-fachen Verdünnung, wurde die gewünschte Endkonzentration erreicht. Die Messung wurde beendet, nachdem sich am Ende Werte nahe der *baseline* einstellten.

**Tabelle 2.22:** Versuchsbedingungen des Patch-Clamp-Ansatzes.

Kondition	1. Injektion	2. Injektion
A	-	GSK1016790A (Agonist)
B	CEES	GSK1016790A (Agonist)

Im Patch-Clamp-Ansatz wurden analog zum Lumineszenz-Assay in Kapitel 2.6.1 mehrere Versuchsbedingungen untersucht:

- A** Zunächst wurde der spezifische TRPV4-Agonist GSK1016790A auf eine Zelle in Whole-Cell-Konfiguration pipettiert.
- B** Im zweiten Ansatz wurde eine Vorbehandlung mit CEES vor der Injektion des Agonisten (GSK1016790A) durchgeführt.

Ausgehend von den Ergebnissen des Aequorin-Assays (s. Kapitel 3.4) wurden verschiedene Konzentrationen der Substanzen zur Injektion bzw. Vorbehandlung gewählt.

In Kondition **A** wurde folgende Verdünnungsreihe aufgestellt und für die Injektion von GSK1016790A verwendet:

**Tabelle 2.23:** Injektionskonzentrationen GSK1016790A im Patch-Clamp-Ansatz. Lösemittel: DMSO.

Kondition	Arbeitskonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Endkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Anteil [%] Lösemittel
A	80	1	1,25
	800	10	1,25
	8.000	100	1,25

Für Versuchsbedingung **B** wurde für CEES eine Endkonzentration von 5 mM gewählt. 45 Minuten vor Messbeginn wurde mit der Vergiftung der A549-Zellen begonnen. Dafür wurde eine Lösung der Arbeitskonzentration 500 mM in Ethanol angefertigt. Nach zweimaligem Waschen des Zellrasens einer zu untersuchenden Passage mit PBS-Puffer (s. Kapitel 2.3.1) wurde vorsichtig eine Lösung aus  $4950 \mu\text{L}$  DMEM und  $50 \mu\text{L}$  der vorbereiteten CEES-Verdünnung (500 mM) auf den Zellrasen pipettiert. Hierdurch ergab sich die gewünschte Endkonzentration von CEES (5 mM). Die Konzentration des Lösemittels Ethanol betrug final 1 %. Die Zellkulturflasche wurde dann 15 Minuten unter dem Abzug der Sterilbank

belassen und dann weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Zellen 30 Minuten in Kontakt mit CEES waren, folgte die Ernte der Zellen nach zu Beginn in Kapitel 2.6.1 (Lumineszenz-Assay) beschriebenem Protokoll.

Im Messprotokoll wurde analog zu Kondition A der TRPV4-Agonist GSK1016790A injiziert. Die gewählte Endkonzentration der Substanz für Kondition B betrug 1 µM (s. Tabelle 2.23).

Als Negativkontrolle wurde DMSO in externem Standard zur Injektion verwendet. Der Anteil an DMSO betrug dabei, wie in Kondition A 1,25 %.

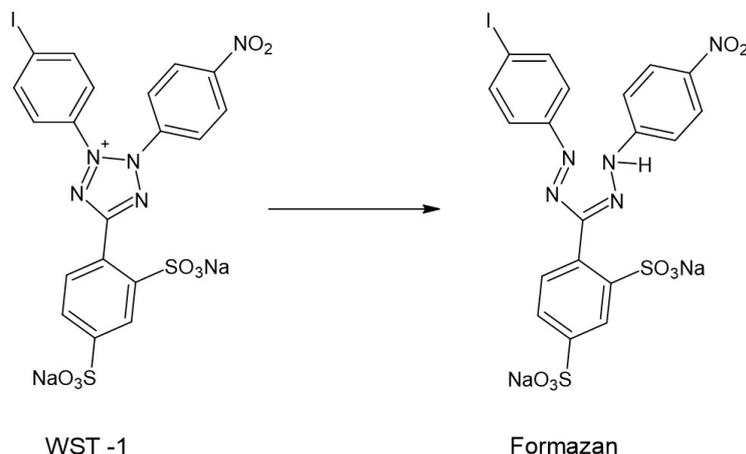
## 2.7 Zellviabilitätsuntersuchung

Ein weiterer Bestandteil der Untersuchungen war die Analyse der Zellviabilität im Zusammenhang mit CEES. Hierfür kam das Tetrazolium-Salz WST-1 zum Einsatz.

### 2.7.1 WST-1-Assay

Im WST-1-Assay wird die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen gemessen [175, 176]. Physiologisch reduzieren diese Enzyme das Tetrazolium-Salz WST-1 zu einer Formazan-Verbindung (s. Abbildung 2.4). Dabei entsteht durch das delokalisierte Elektronensystem ein Absorptionsmaximum bei etwa 450 nm. Die Absorption bei dieser Wellenlänge ist direkt proportional zur Aktivität reduzierender Enzyme und somit zur Zahl metabolisch aktiver Zellen.

Je höher also die Zytotoxizität einer Substanz, desto geringer die Zahl aktiver mitochondrialer Dehydrogenasen, desto geringer die Absorption bei 450 nm.



**Abbildung 2.4:** Spaltung von WST-1 zu einer Formazan-Verbindung. Adaptiert nach Ishiyama u. a. [175].

Für den Assay wurde das „Cell Proliferation Reagent WST-1“ verwendet. Dem Protokoll entsprechend wurden in die Näpfe einer durchsichtigen 96-well Mikrotiterplatte HEK293-V4-Zellen, sowie HEK293-wt als Kontrolle ausgesät. 24 Stunden später wurde die Vorbehandlung und die Vergiftung der Zellen durchgeführt und nach weiteren 24 Stunden die Detektion der Viabilität mittels WST-1 (s. Tabelle 2.24).

**Tabelle 2.24:** Versuchsbedingungen des WST-1-Assays.

Kondition	Vorbehandlung	Vergiftung
A	-	CEES
B	GSK1016790A (Agonist)	CEES

Für Versuchskondition **A** wurden in jedes *well* 75.000 Zellen in 75  $\mu$ L Kulturmedium ausgesät. Zur Vergiftung der Zellen am 2. Tag wurden aus einer 2 M Stammlösung von CEES in Ethanol verschiedene Arbeitskonzentrationen in DMEM hergestellt. Für die erste Arbeitskonzentration (20.000  $\mu$ M) wurde die 2 M Stammlösung im Verhältnis 1:99 in DMEM verdünnt. Dieser Schritt der Verdünnung in DMEM war nötig, um die Konzentration des Lösungsmittels Ethanol im *well* möglichst gering zu halten und eine Verschleierung des Ergebnisses durch konkurrierende Zytotoxizität zu vermeiden. Analog zur ersten Verdünnung wurden die weiteren Arbeitskonzentrationen hergestellt. Die 2 M Stammlösung wurde immer wieder im Verhältnis 1:2 mit Ethanol verdünnt und daraus wurde die jeweilige Arbeitskonzentration in DMEM angefertigt. Schließlich wurden je 75  $\mu$ L einer Arbeitskonzentration in eine Vertiefung der 96-*well* Platte gegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von 150  $\mu$ L im *well* ergab. Dadurch war die jeweilige Endkonzentration von CEES erreicht (s. Tabelle 2.25).

**Tabelle 2.25:** Konzentrationen von CEES für die Vergiftung im WST-Assay: Kondition A. Konzentrations-Angaben auf zwei Dezimalen gerundet. Lösemittel: Ethanol.

Kondition	Arbeitskonzentration [ $\mu$ M]	Endkonzentration [ $\mu$ M]	Anteil [%] Lösemittel
A	20.000,00	10.000,00	0,5
	6.666,66	3.333,33	0,5
	2.222,22	1.111,11	0,5
	740,74	370,37	0,5
	246,91	123,47	0,5
	82,30	41,15	0,5
	27,43	13,72	0,5
	9,14	4,57	0,5
	3,05	1,52	0,5
	1,02	0,51	0,5
	0,39	0,17	0,5

Als Kontrolle wurden die für Kondition **A** hergestellten Konzentrationen von CEES auf HEK293-wt-Zellen gegeben. Das Protokoll unterschied sich bis auf die Art der ausgesäten Zelllinie nicht von dem soeben beschriebenen.

Für Versuchskondition **B** wurden in jedes *well* 75.000 Zellen in 50  $\mu$ L Kulturmedium ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die HEK293-V4-Zellen zunächst mit verschiedenen Konzentrationen von GSK1016790A behandelt. Dafür wurde aus einer Stammlösung von GSK1016790A in DMSO zwei Verdünnungen in DMEM angefertigt (Arbeitskonzentrationen s. Tabelle 2.26). Davon wurden je 50  $\mu$ L in jeweilige Näpfe der 96-*well* Platte pipettiert. Vor der Vergiftung der Zellen, wurde die Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nun wurde analog zu Versuchskondition **A** eine Verdünnungsreihe mit CEES in DMEM angefertigt (s. Tabelle 2.27). Eine 3 M Stammlösung von CEES in Ethanol war da-

bei der Ausgangspunkt. Nun wurden erneut 50  $\mu\text{L}$  der Lösungen mit Arbeitskonzentration in jeweilige Nöpfe pipettiert, sodass sich ebenfalls ein Gesamtvolumen von 150  $\mu\text{L}$  ergab.

**Tabelle 2.26:** Konzentrationen von GSK1016790A für die Vorbehandlung im WST-Assay: Kondition B. %-Angaben auf zwei Dezimalen gerundet. Lösemittel: DMSO.

Kondition	Arbeitskonzentration [nM]	Endkonzentration [nM]	Anteil [%] Lösemittel
B	900	300	0,03
	2.250	750	0,30

**Tabelle 2.27:** Konzentrationen von CEES für die Vergiftung im WST-Assay: Kondition B. Alle Angaben auf zwei Dezimalen gerundet. Lösemittel: Ethanol.

Kondition	Arbeitskonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Endkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Anteil [%] Lösemittel
B	30.000,00	10.000,00	0,33
	10.000,00	3.333,33	0,33
	3.333,33	1.111,11	0,33
	1.111,11	370,37	0,33
	370,37	123,47	0,33
	123,47	41,15	0,33
	41,15	13,72	0,33
	13,72	4,57	0,33
	4,57	1,52	0,33
	1,52	0,51	0,33
	0,51	0,17	0,33

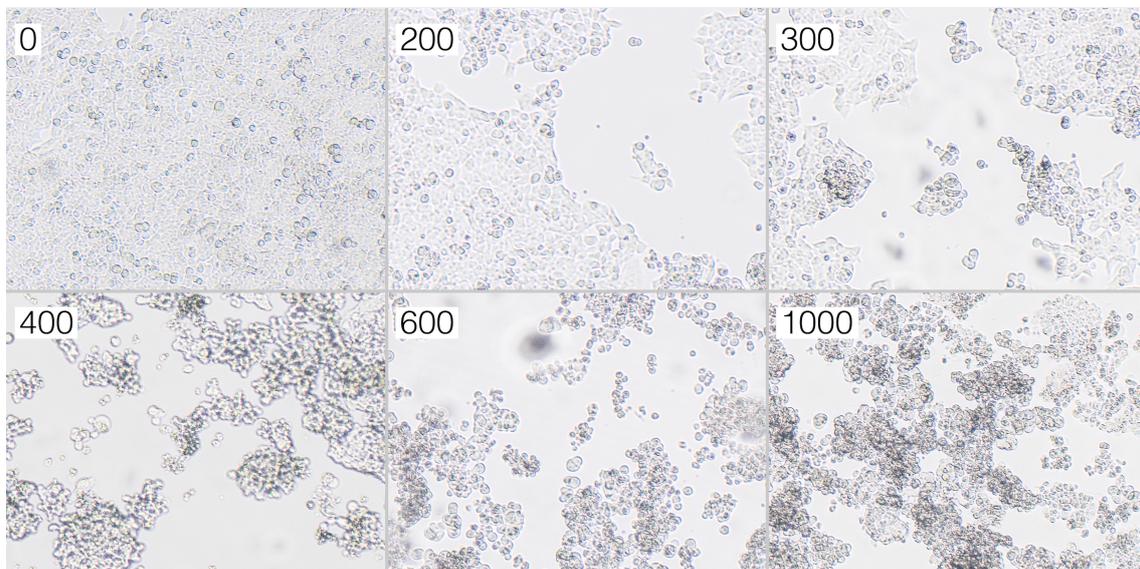
Nach Vergiftung der Zellen wurden die Mikrotiterplatten für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 15  $\mu\text{L}$  des WST-1 Reagenzes in jedes *well* pipettiert. Dies entsprach einem gewünschten Verhältnis von 1:10. Die Reaktion wurde nun 1–3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im *microplate reader* wurde nun die relative Zellviabilität bestimmt, indem bei 450 nm die Absorption der Suspension gemessen wurde. Von den ermittelten Werten wurde als Referenz die Hintergrundabsorption bei 650 nm subtrahiert. Die Ergebnisse wurden erst dokumentiert, sobald sich in der Photometrie eine optische Dichte (OD) von mehr als 1,5 einstellte.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bestimmung des LC<sub>100</sub>-Wertes von G418 für HEK293-wt-Zellen

Als erster Schritt des Projektes wurde die Etablierung der Zelllinie HEK293-V4 über die Einbringung von fremder extrachromosomaler Plasmid-DNA angestrebt. Nach Transfektion der Zelllinie HEK293 mit TRPV4-Plasmid musste hierfür die stabile Expression von TRPV4 über die ebenso auf dem Plasmid befindliche Resistenz gegenüber G418 gewährleistet werden. Eine Konzentration des Selektionsantibiotikums musste gefunden werden, welche alle Zellen ohne Transfektionserfolg abtötet — die absolut letale Wirkstoffkonzentration (LC<sub>100</sub>) von G418 für HEK293-wt-Zellen.

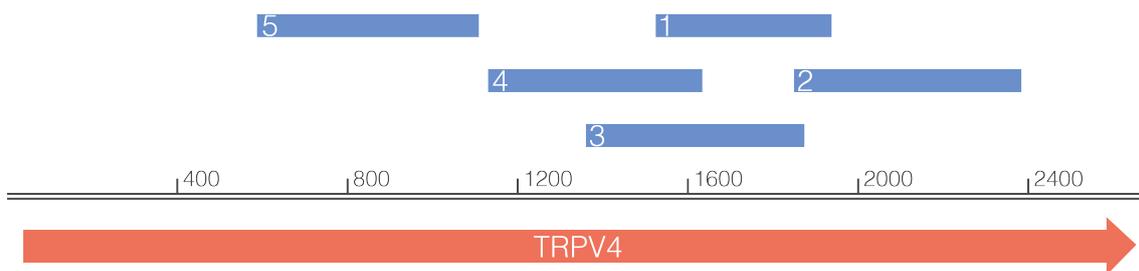
Wie in Kapitel 2.4.6 beschrieben, wurde nach 7 Tagen der Effekt von G418 auf HEK293-wt-Zellen dokumentiert. Das Absterben von Zellen wurde für die Bestimmung des LC<sub>100</sub>-Wertes mit dem Ablösen der Zellen vom Grund des Kulturgefäßes gleichgesetzt. Abbildung 3.1 zeigt, dass bei einer Konzentration von 300 µg/mL G418 noch Zellen am Grund des Kulturgefäßes zu sehen waren. Daher wurde ein LC<sub>100</sub>-Wert von 600 µg/mL G418 als Zielkonzentration für die Selektion von Zellen mit stabiler Expression festgelegt. Auch bei einer Konzentration von 400 µg/mL G418 waren bereits keine viablen Zellen mehr sichtbar. Um sicher zu gehen, wurde an dieser Stelle jedoch die noch höhere Konzentration gewählt.



**Abbildung 3.1:** Lichtmikroskopische Darstellung von HEK293-wt-Zellen nach Inkubation mit G418 [µg/mL] für 7 Tage.

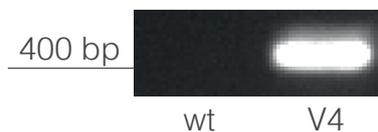
### 3.2 Nachweis von TRPV4-mRNA

Mithilfe einer RT-PCR und nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese wurden verschiedene Amplikons der kodierenden Sequenz des *TRPV4*-Gens nachgewiesen (s. Kapitel 2.5.1). Eine erfolgreiche Transkription des kodierenden Bereiches des Gens in mRNA konnte somit bestätigt werden. Als Qualitätskriterium wurde der mRNA-Nachweis an mehreren Stellen innerhalb der kodierenden Sequenz durchgeführt. Abbildung 3.2 zeigt 5 detektierte PCR-Amplikons aus Zellen der Zelllinie HEK293-V4 an den jeweiligen Stellen der in der Literatur bekannten Sequenz der cDNA von *TRPV4*. Wie in Kapitel 2.4.7 beschrieben, bezeichnet HEK293-V4 eine Zelllinie mit Überexpression des Membrankanals TRPV4. Der Nachweis dafür wird in Kapitel 3.2, 3.3 und 3.4.3 erbracht.



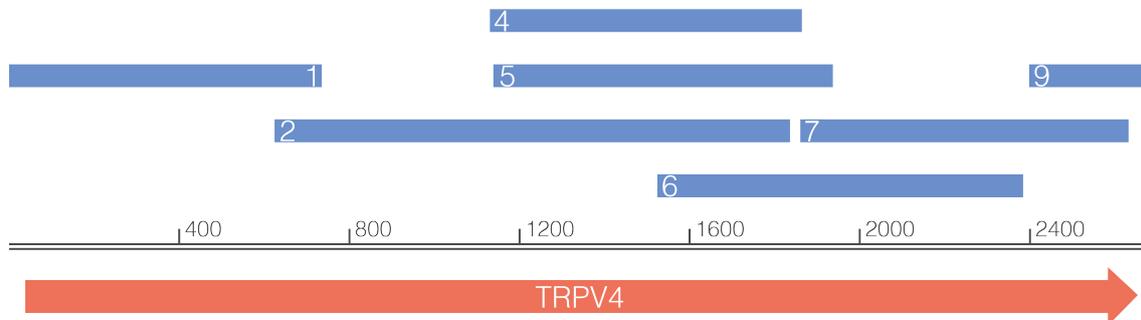
**Abbildung 3.2:** Detektierte TRPV4-mRNA in HEK293-V4-Zellen (schematisch).

In Abbildung 3.3 wird das UV-Bild einer DNA-Bande nach RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese gezeigt. Das dokumentierte Amplikon der mRNA aus HEK293-V4-Zellen des Zellpools 24 (s. Kapitel 2.4.7 und Tabelle 3.1) entspricht mit einer Länge von 414 bp dem PCR-Ansatz 1 in Tabelle 2.7 und in Abbildung 3.2. Zum Vergleich wurde mit mRNA aus HEK293-wt-Zellen und ebenfalls Primerpaar 1 eine RT-PCR und eine Elektrophorese durchgeführt. Hier war keine Bande sichtbar.



**Abbildung 3.3:** UV-Bild eines RT-PCR-Amplikons der cDNA von *TRPV4* in HEK293-V4-Zellen des Zellpools 24. Primerpaar 1. HEK293-V4 Bande bei 414 bp im Vergleich zu HEK293-wt.

Um die Ergebnisse des PCR-Nachweises zu vervollständigen und um sicher zu gehen, dass die gesamte kodierende Sequenz von *TRPV4* unverändert in der Zelllinie HEK293-V4 vorlag, wurde eine Sequenzierung der cDNA durchgeführt. Abbildung 3.4 zeigt 7 erfolgreich sequenzierte PCR-Amplikons an den jeweiligen Stellen der in der Literatur bekannten kodierenden Sequenz von *TRPV4*. Die Amplikons überlappen sich jeweils so, dass in Gänze die gesamte kodierende Sequenz von *TRPV4* nachgewiesen werden konnte (s. 2.5.1).



**Abbildung 3.4:** Sequenzierte TRPV4-mRNA in HEK293-V4-Zellen (schematisch).

Das Alignment der PCR-Amplikons mit der Originalsequenz von *TRPV4* findet sich im Anhang.

### 3.3 Nachweis von TRPV4-Kanalprotein

Um auch den Nachweis von translatiertem TRPV4-Protein in HEK293-V4-Zellen zu erbringen, wurde nach Isolation des Gesamtproteins der Zellen ein Immunoblot nach SDS-PAGE durchgeführt (s. Kapitel 2.5.2). Hierfür wurden Zellen des Zellpools 7 der Zelllinie HEK293-V4 verwendet (s. Kapitel 2.4.7 und Tabelle 3.1). Zum Vergleich der Expression wurde ebenso das Gesamtprotein aus HEK293-wt-Zellen untersucht. Abbildung 3.5 zeigt ein Nahinfrarot-Bild eines Immunoblots mit den Antikörpern MABS466 (s. Tabelle 2.14) und IRDye® 680RD Donkey anti-Mouse IgG (s. Tabelle 2.15) zum TRPV4-Nachweis. Zur Ladekontrolle wurde das Protein GAPDH mit den Antikörpern PA1-988 (s. Tabelle 2.14) und IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (s. Tabelle 2.15) markiert. Die rot gefärbte Bande mit markiertem TRPV4-Protein besaß ein Molekulargewicht von etwa 90 kDa. Dies entspricht dem Molekulargewicht von TRPV4 (98 kDa; s. Kapitel 1.2.1). Die grün gefärbte Bande mit markiertem GAPDH-Protein besaß ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa. Dies entspricht dem Molekulargewicht von GAPDH (36 kDa; s. Kapitel 2.5.2 (Immunoblot)). Ein Nachweis von TRPV4-Protein in HEK293-wt-Zellen gelang nicht.



**Abbildung 3.5:** Nahinfrarot-Bild eines Immunoblots mit markiertem TRPV4-Kanalprotein und markierter GAPDH aus Zellen des Zellpools 7. HEK293-V4 Bande bei 98 kDa im Vergleich zu HEK293-wt und GAPDH Bande bei 36 kDa.

## 3.4 Lumineszenz-Assay

### 3.4.1 Vergleich verschiedener HEK293-V4 Zellpools

Im Rahmen der Etablierung der Zelllinie HEK293-V4 wurden ursprünglich 24 verschiedene Zellpools mit unterschiedlichen Transfektionskonditionen generiert (s. Kapitel 2.4.7). Diese wurden im Anschluss molekularbiologisch mit Hinsicht auf die Expression von TRPV4-mRNA und TRPV4-Protein miteinander verglichen. Daraufhin wurden, wie in Tabelle 3.1 ersichtlich, 12 Zellpools mit hoher, stabiler Expression von TRPV4-Protein ausgewählt und der nachfolgenden funktionellen Untersuchung im Lumineszenz-Assay zugeführt. Die Abbildungen 3.6 bis 3.41 illustrieren die Ergebnisse dieses Assays graphisch. Es ergaben sich für die verschiedenen Zellpools unterschiedliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach Injektion von GSK1016790A. Ebenso aufgeführt sind die Auswertungen über die jeweilige *Area Under the Curve* (AUC) und das jeweilige Maximum im Kurvenverlauf des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals. Tabelle 3.2 fasst die für die jeweiligen Zellpools berechneten  $\text{EC}_{50}$ -Werte von GSK1016790A für HEK293-V4 und deren Standardabweichung ( $\delta$ ) zusammen. Für den *fit* der Kurven und die Berechnung der  $\text{EC}_{50}$ -Werte wurde die Logistische Regression mit 4 Parametern angewandt (s. Kapitel 2.2).

Für die weitere Charakterisierung der Zelllinie HEK293-V4 und die Analyse der Wirkung von CEES auf den TRPV4-Kanal musste ein einziger Zellpool ausgewählt werden. Hier erwies sich Zellpool 7 als der am besten geeignete. Bei der Auswahl wurde auf eine gute Diskriminierbarkeit der Kurvenverläufe für die jeweilige Injektionskonzentration GSK1016790A geachtet. Auch die jeweilig berechneten  $\text{EC}_{50}$ -Werte spielten eine Rolle für die Auswahl. Je kleiner dabei der Wert, so der Ansatz, desto besser die globale Antwort des Zellpools über das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal.

In Kapitel 3.4.3 wird das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach GSK1016790A-Injektion gesondert für HEK293-wt und HEK293-V4-Zellen verglichen.

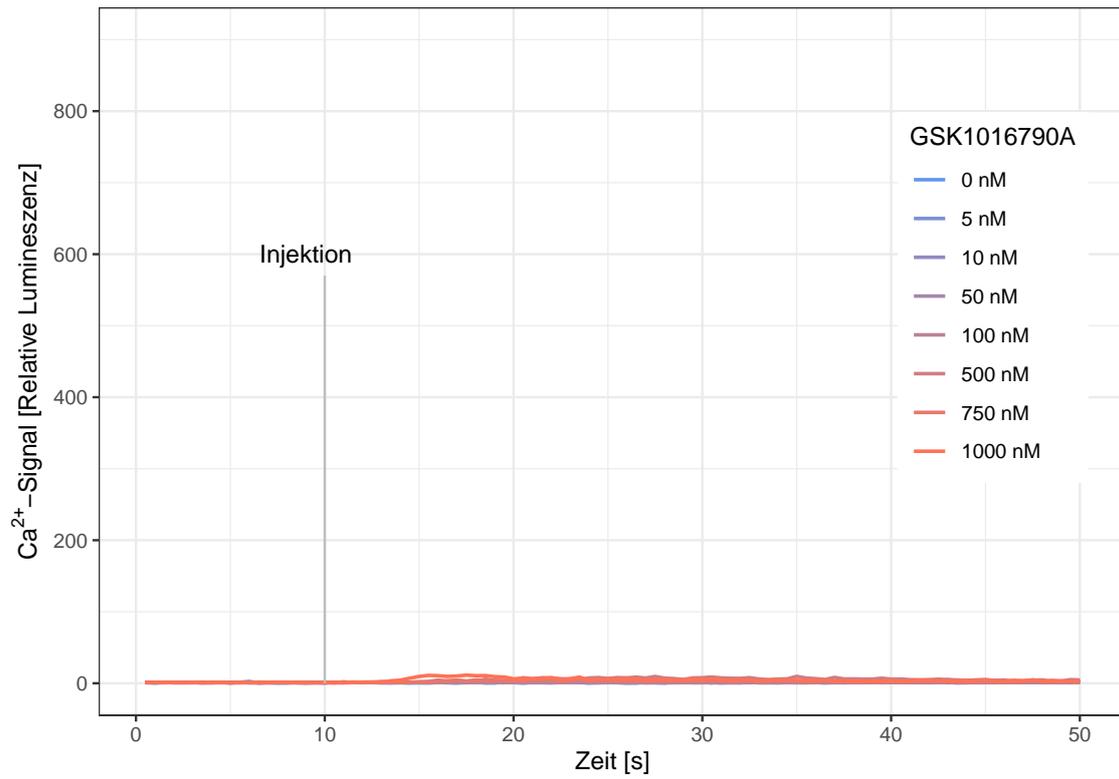
**Tabelle 3.1:** Auswahl der Zellpools der Zelllinie HEK293-V4 für die Untersuchung im Lumineszenz-Assay

Zellpool	Menge an TRPV4-Plasmid für die Transfektion [ $\mu\text{g}$ ]	Auswahl
1	3	✓
2	3	✓
3	3	✓
4	3	✓
5	3	✓
6	3	✓
7	3	✓
8	3	✓
9	6	✓
10	12	✓
11	12	✓
12	12	✓
13	3	✗
14	3	✗
15	3	✗
16	3	✗
17	6	✗
18	6	✗
19	6	✗
20	6	✗
21	6	✗
22	12	✗
23	12	✗
24	12	✗

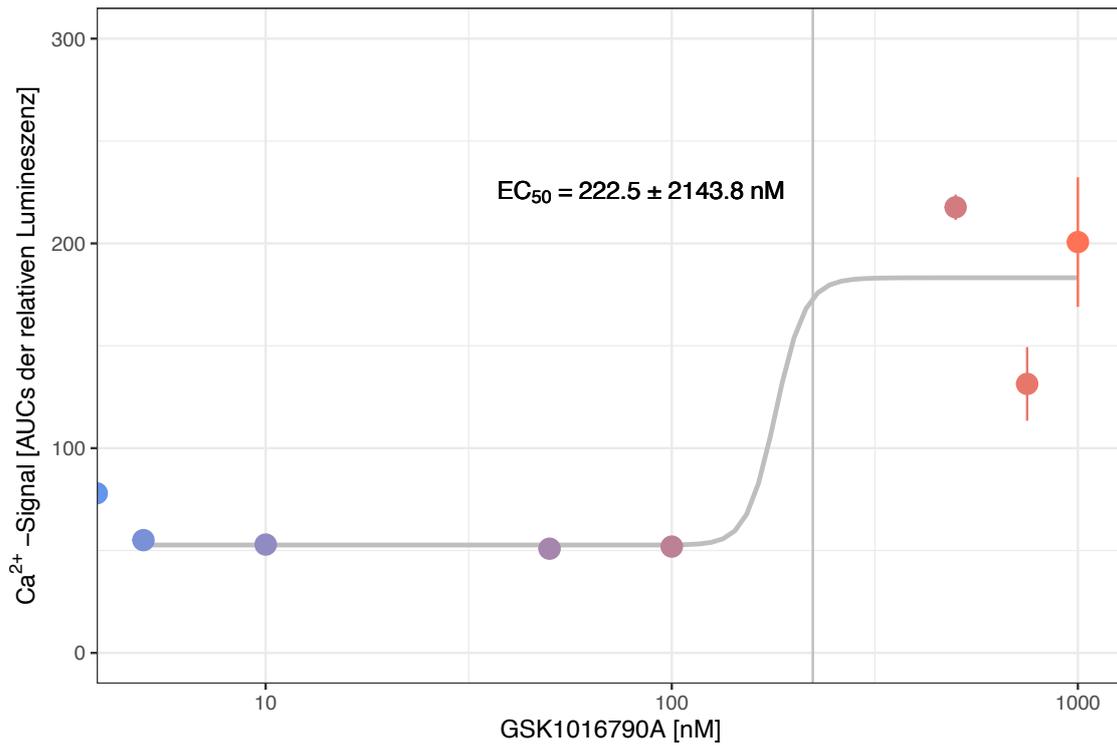
**Tabelle 3.2:** Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte von GSK1016790A für die verschiedenen HEK293-V4 Zellpools berechnet über die AUCs und die Maxima des Ca<sup>2+</sup>-Signals

Zellpool	AUCs		Maxima	
	EC <sub>50</sub> [nM]	δ [nM]	EC <sub>50</sub> [nM]	δ [nM]
1	222,5	2.143,8	226,2	2.074,0
2	–	22.965,4	–	15.292,8
3	–	1.203,4	–	481,8
4	494,2	51,8	576,4	59,4
5	108,7	29,3	491,5	235,0
6	–	12.263,5	–	5.692,2
7	49,0	19,1	–	79.363,9
8	–	872,3	–	10.472,9
9	587,8	1.220,7	502,6	21,2
10	18,4	8.766,2	119,1	227,9
11	–	5.504,8	–	26.102,8
12	121,2	37,3	–	47.126,8
Mittelwert	228,8	4.589,8	383,2	15.595,9

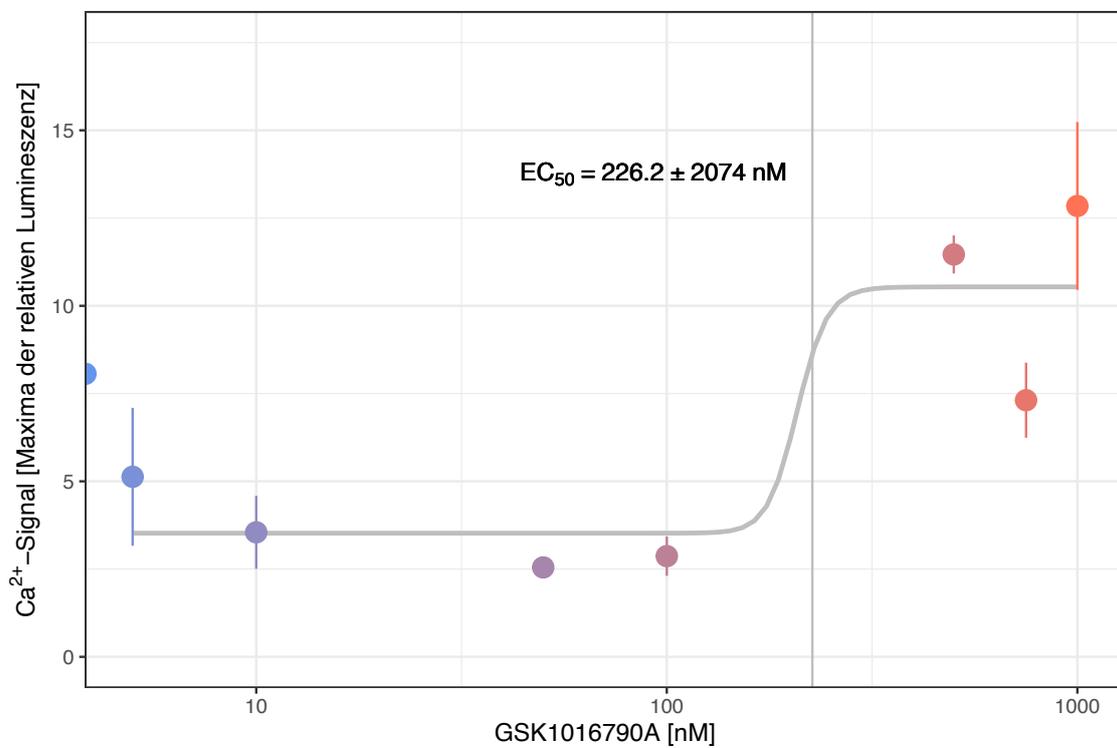
### HEK293-V4 Zellpool 1



**Abbildung 3.6:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 1.  $n_{bio} = 3$ .

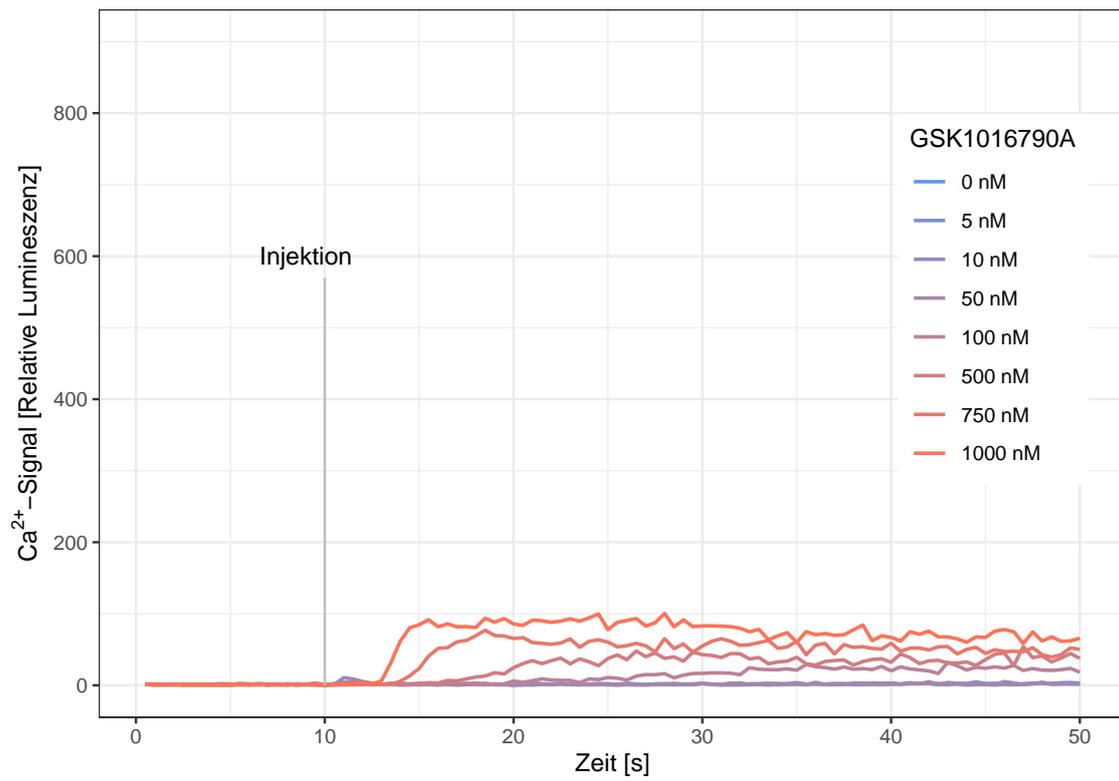


**Abbildung 3.7:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 1.  $n_{bio} = 3$ .

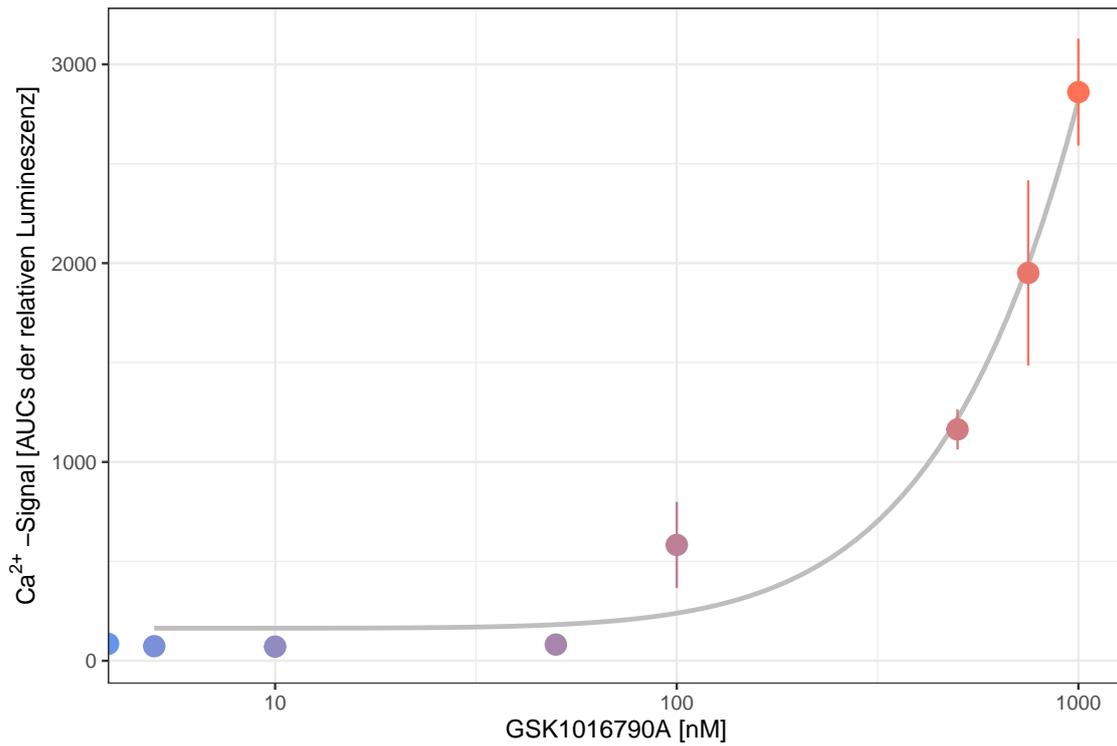


**Abbildung 3.8:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 1.  $n_{bio} = 3$ .

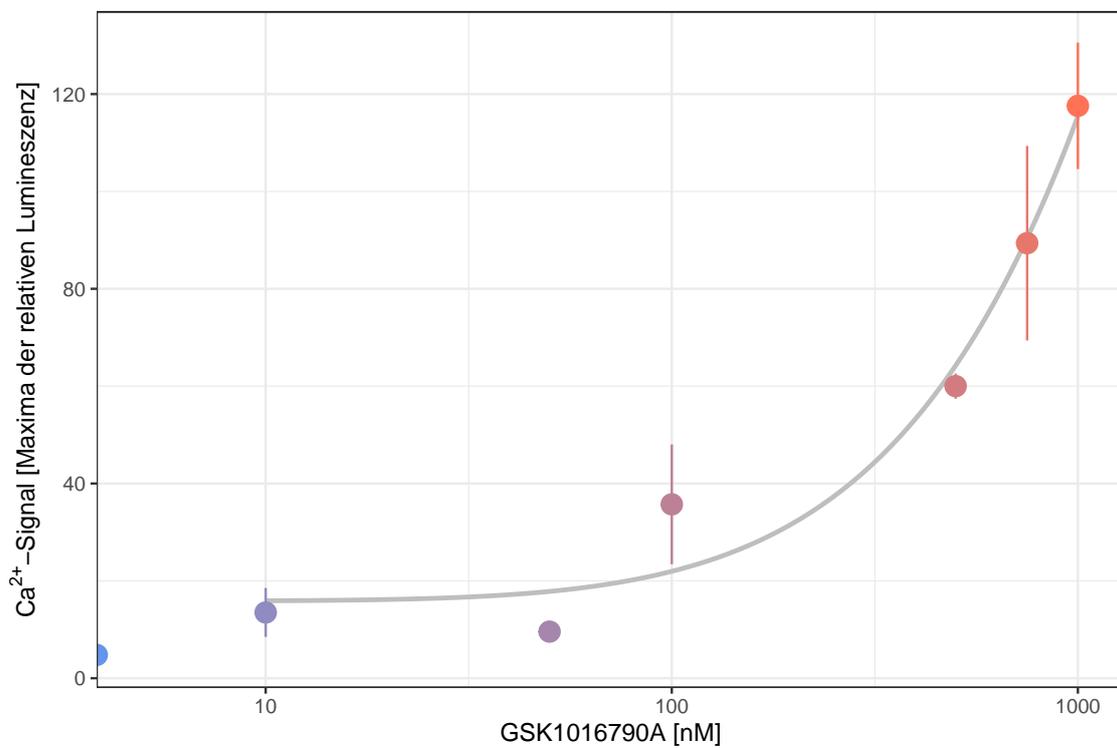
## HEK293-V4 Zellpool 2



**Abbildung 3.9:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 2.  $n_{bio} = 3$ .

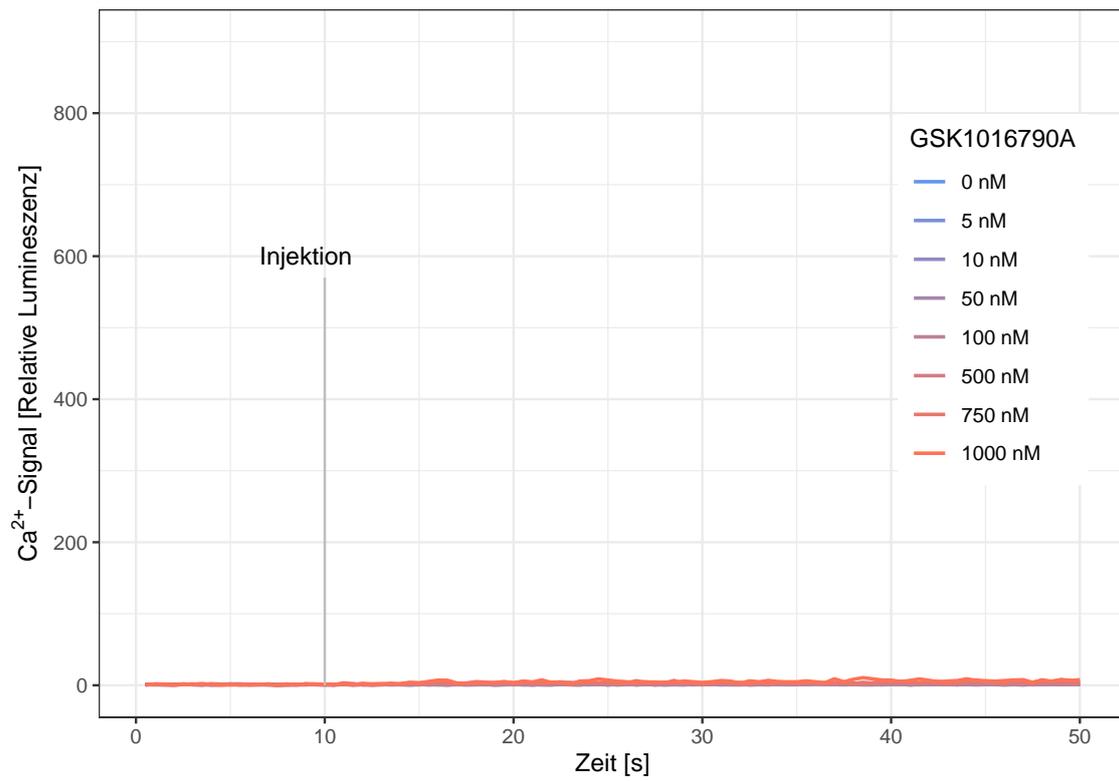


**Abbildung 3.10:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 2.  $n_{bio} = 3$ .

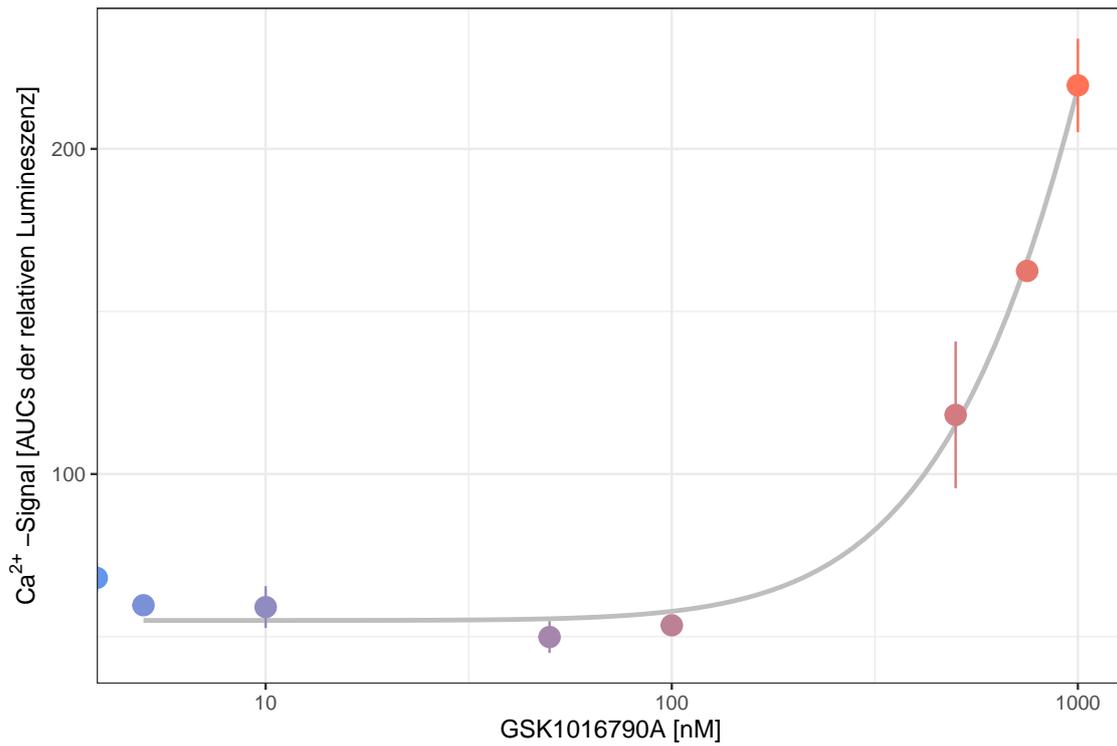


**Abbildung 3.11:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 2.  $n_{bio} = 3$ .

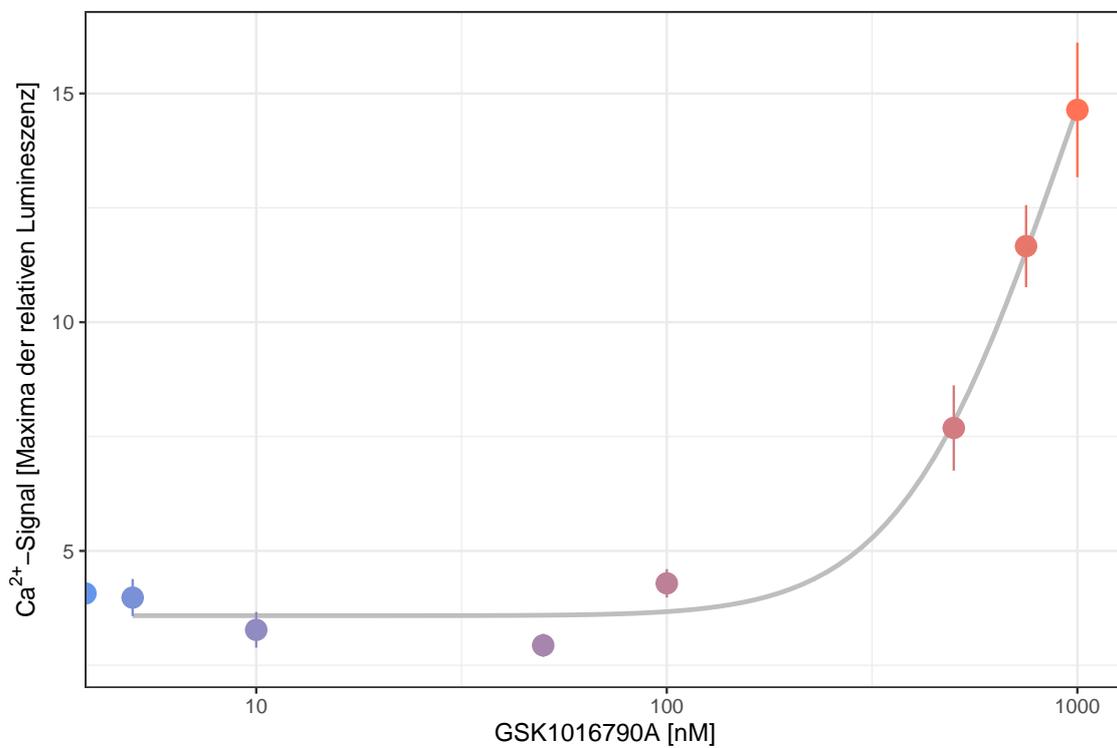
### HEK293-V4 Zellpool 3



**Abbildung 3.12:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 3.  $n_{bio} = 3$ .



**Abbildung 3.13:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 3.  $n_{bio} = 3$ .



**Abbildung 3.14:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 3.  $n_{bio} = 3$ .

### HEK293-V4 Zellpool 4

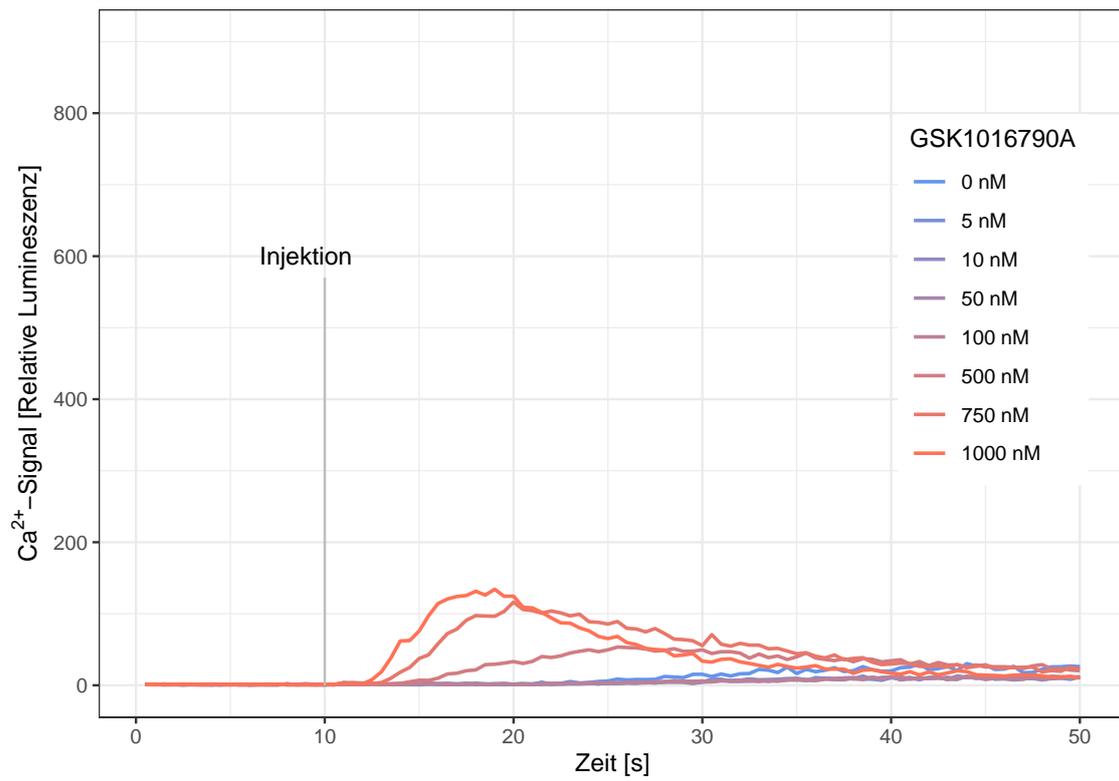
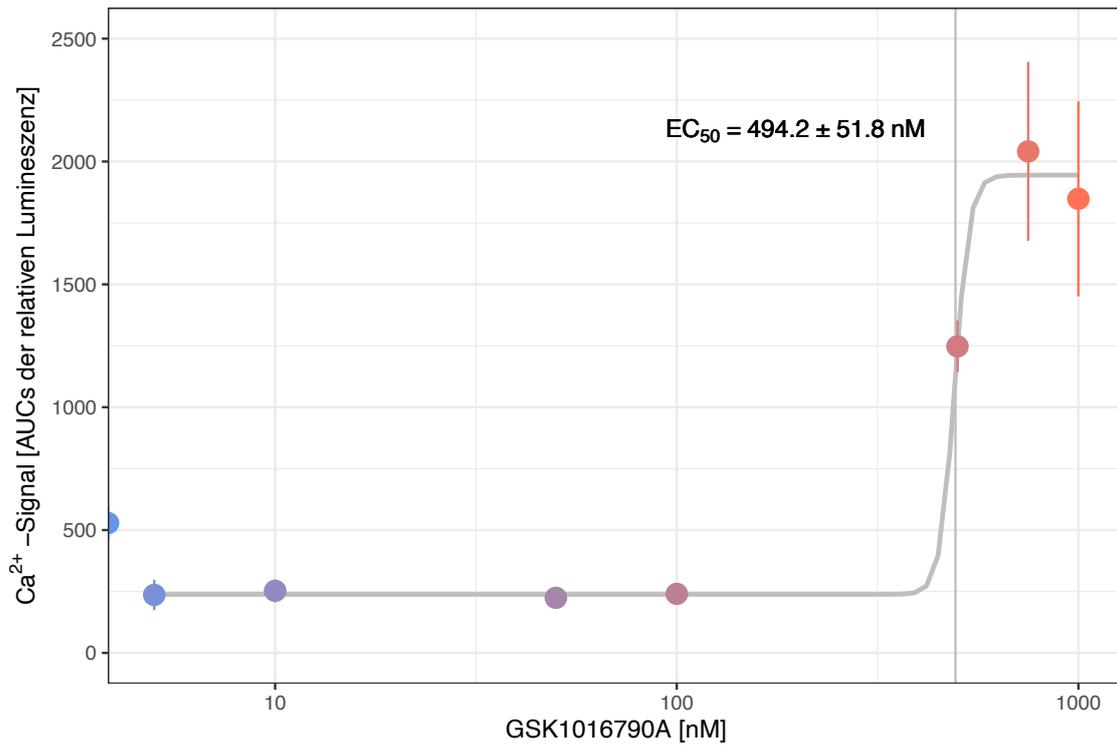
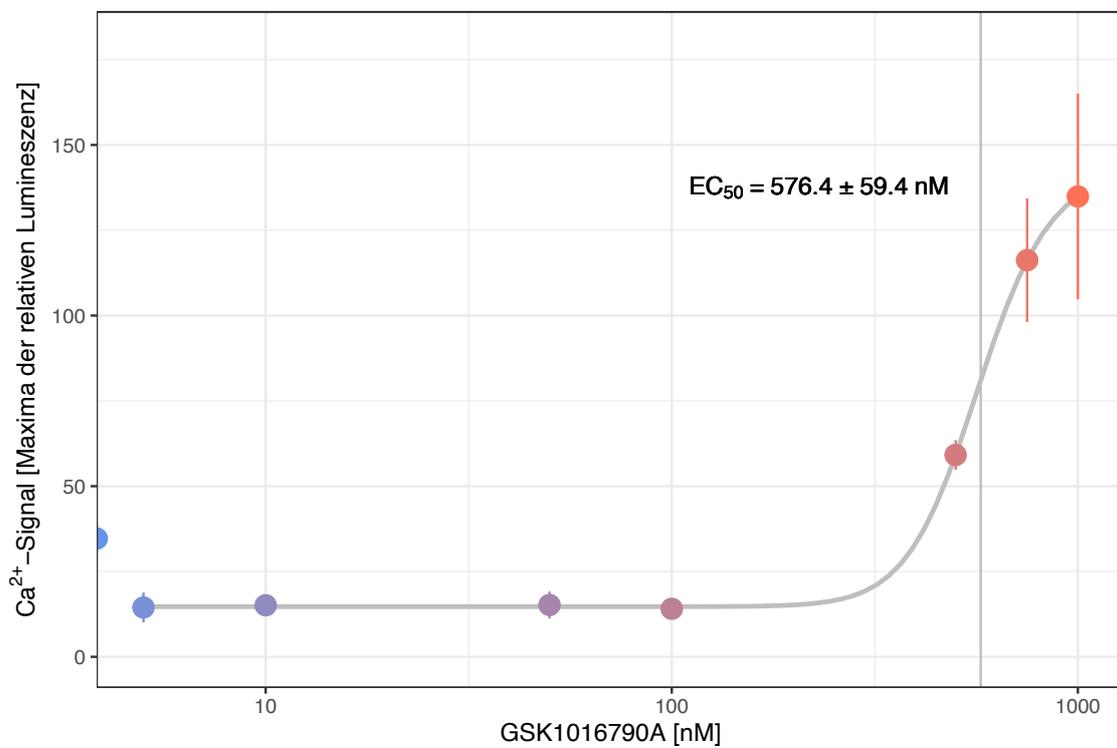


Abbildung 3.15: Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 4.  $n_{bio} = 3$ .

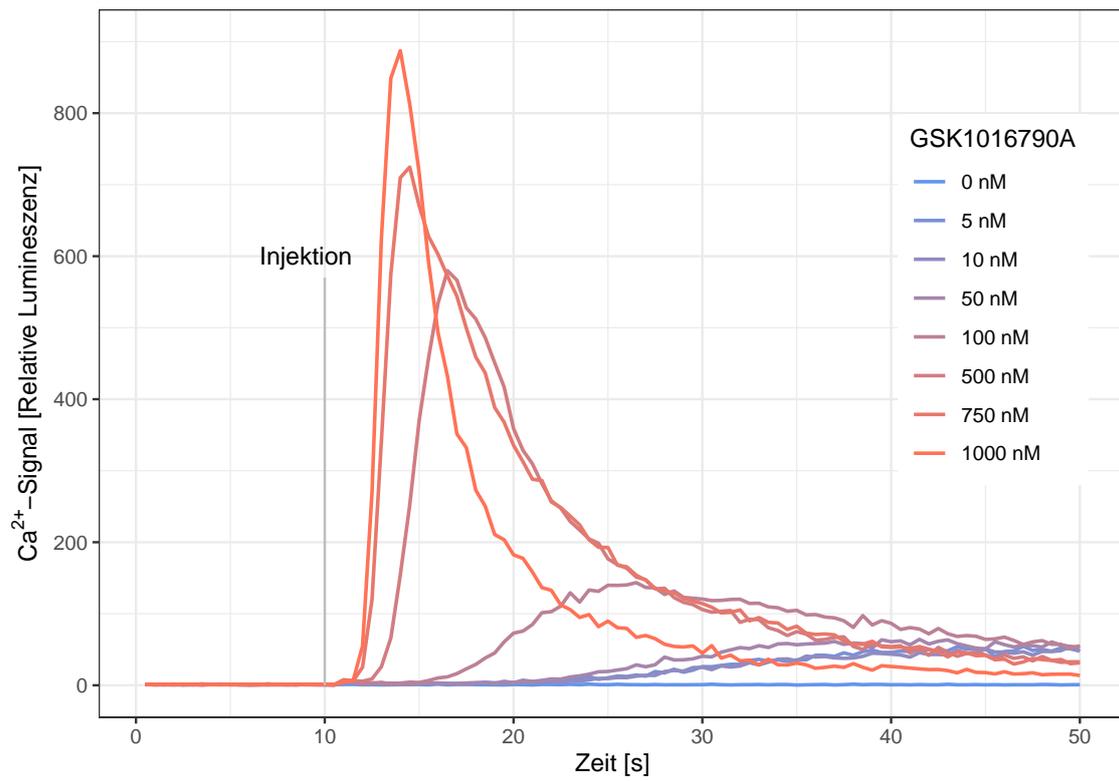


**Abbildung 3.16:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 4.  $n_{bio} = 3$ .

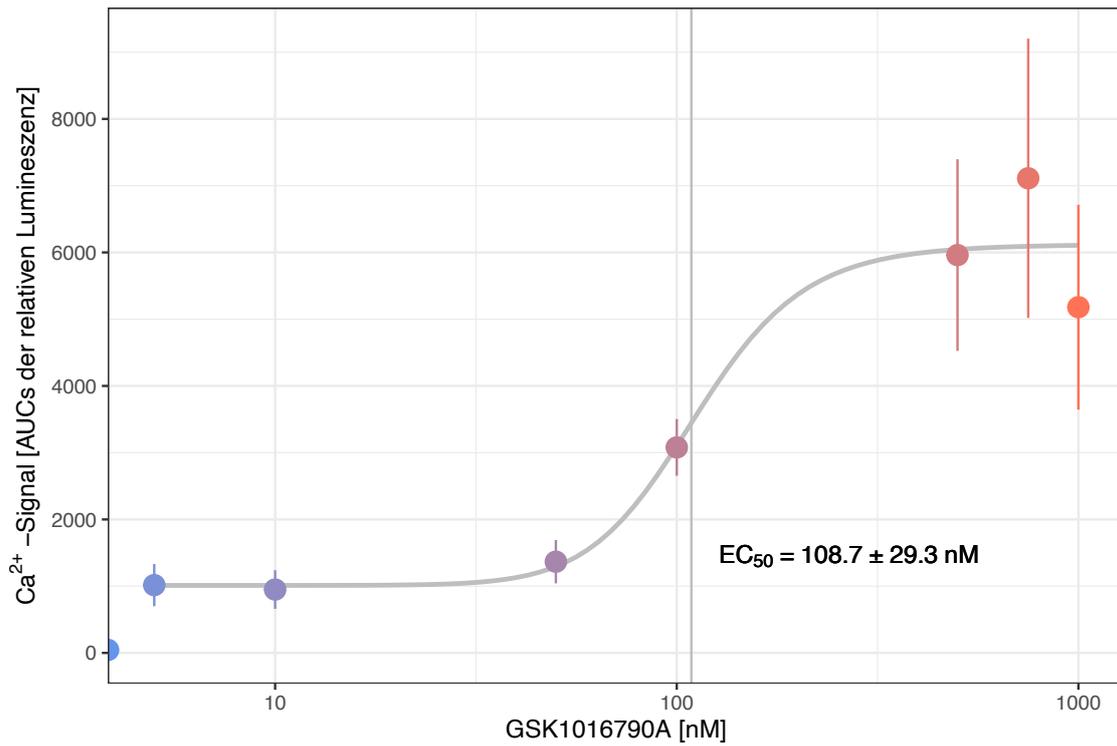


**Abbildung 3.17:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 4.  $n_{bio} = 3$ .

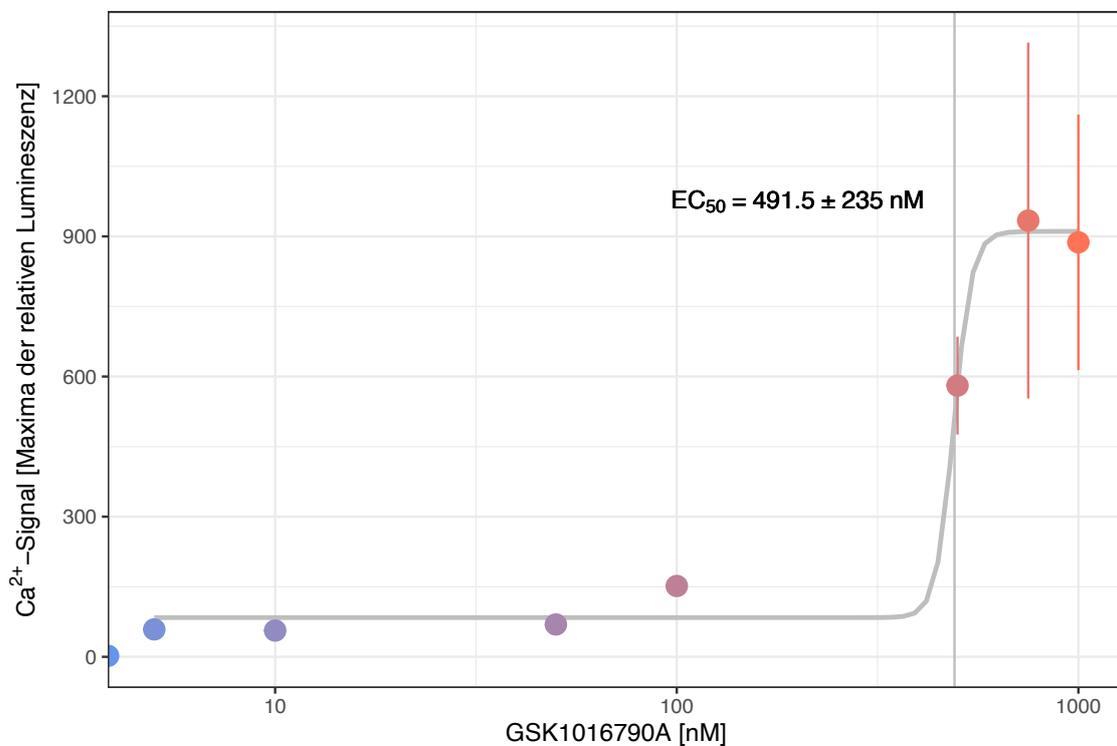
## HEK293-V4 Zellpool 5



**Abbildung 3.18:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 5.  $n_{bio} = 3$ .

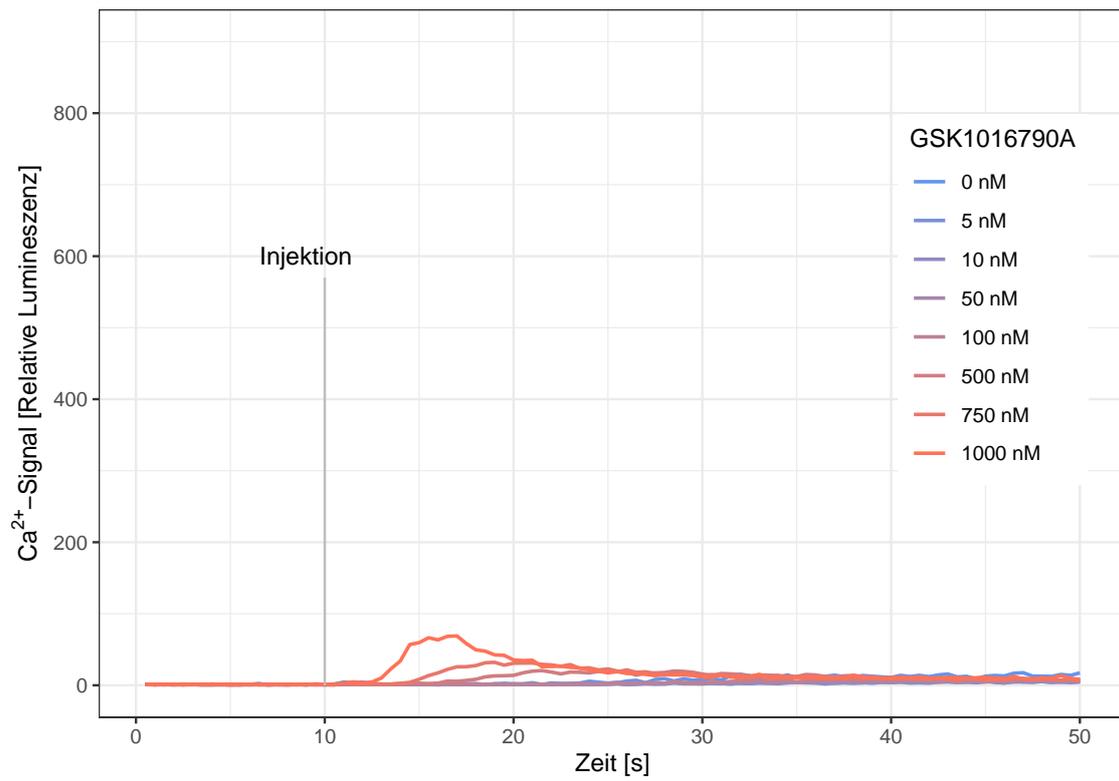


**Abbildung 3.19:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 5.  $n_{bio} = 3$ .

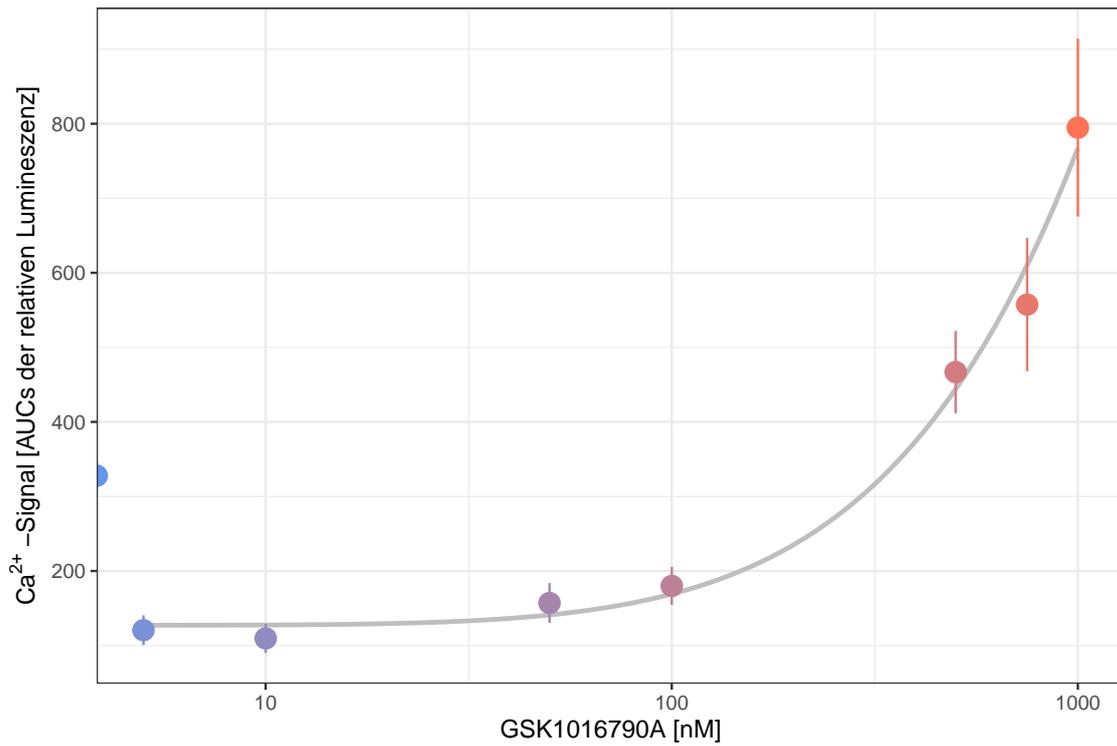


**Abbildung 3.20:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 5.  $n_{bio} = 3$ .

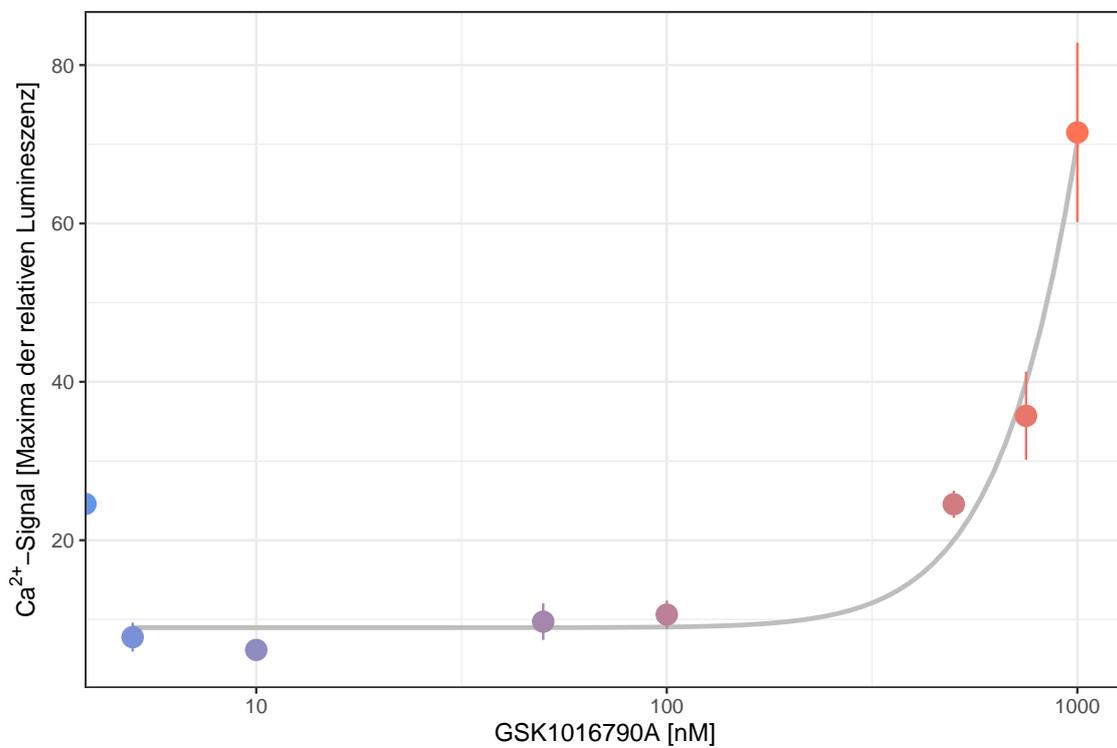
## HEK293-V4 Zellpool 6



**Abbildung 3.21:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 6.  $n_{bio} = 3$ .

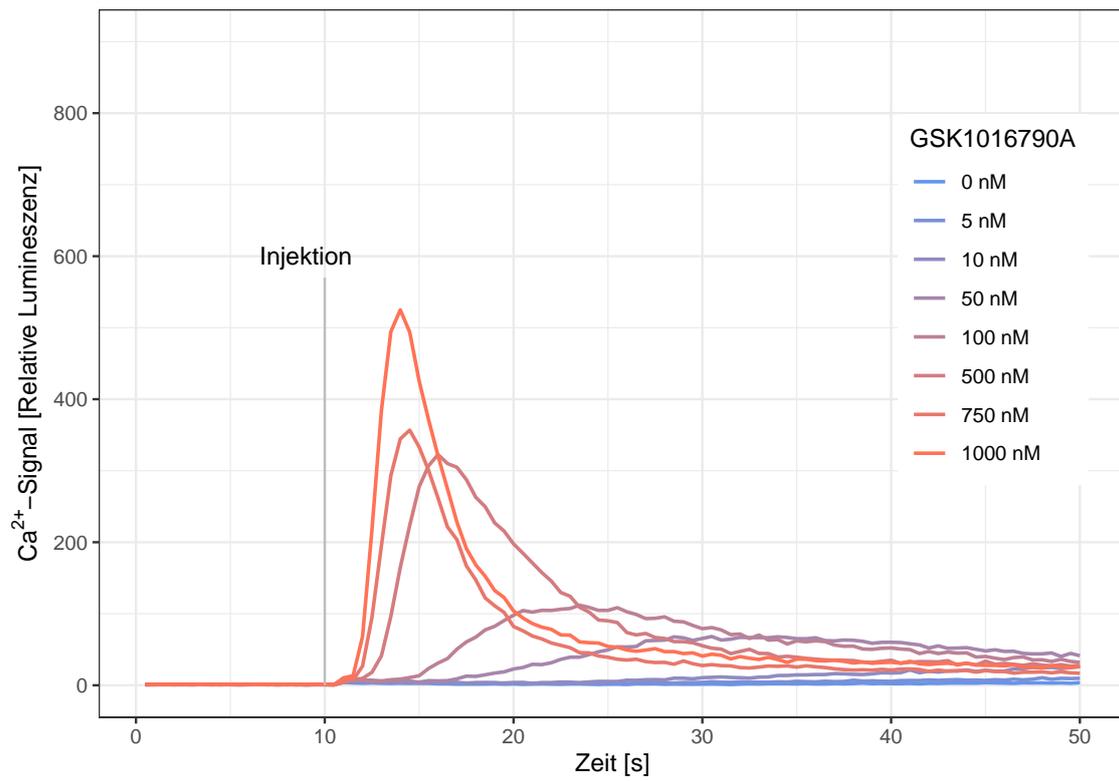


**Abbildung 3.22:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 6.  $n_{bio} = 3$ .

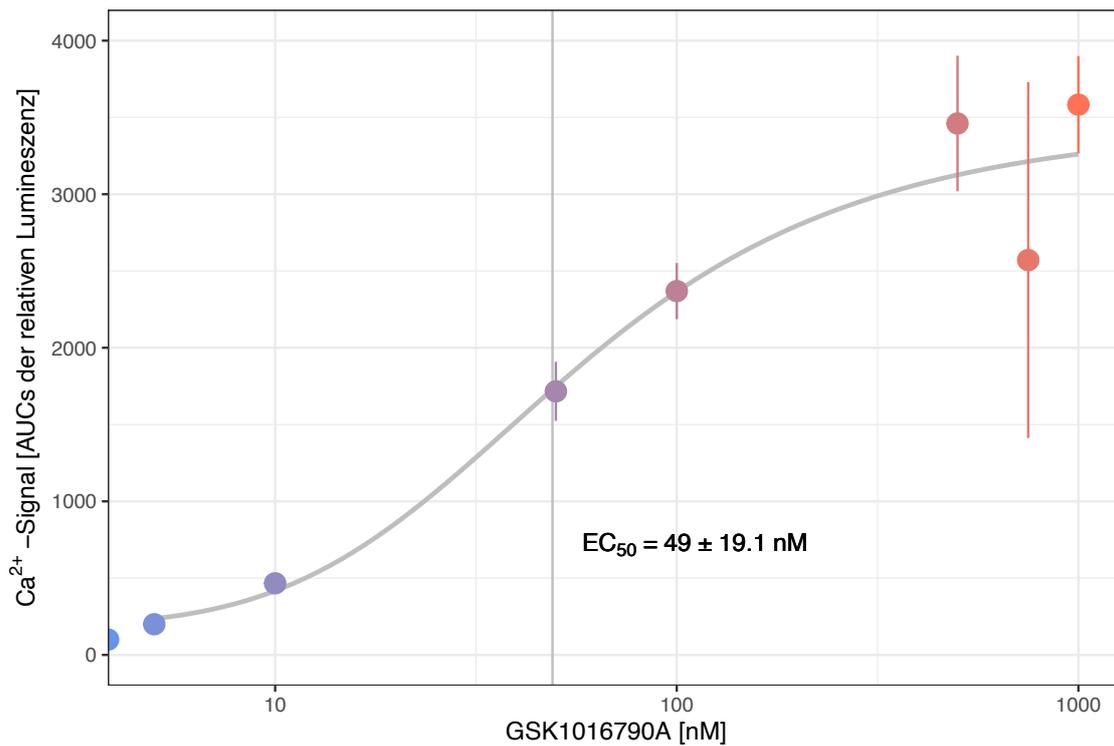


**Abbildung 3.23:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 6.  $n_{bio} = 3$ .

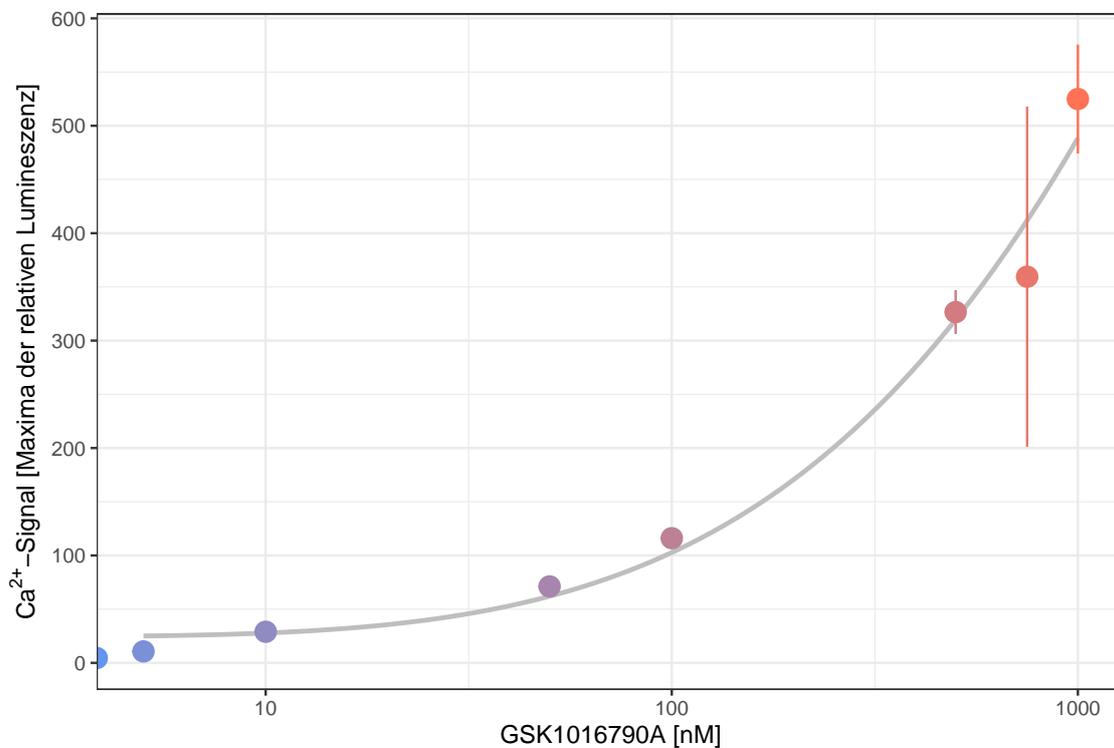
## HEK293-V4 Zellpool 7



**Abbildung 3.24:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 7.  $n_{bio} = 3$ .

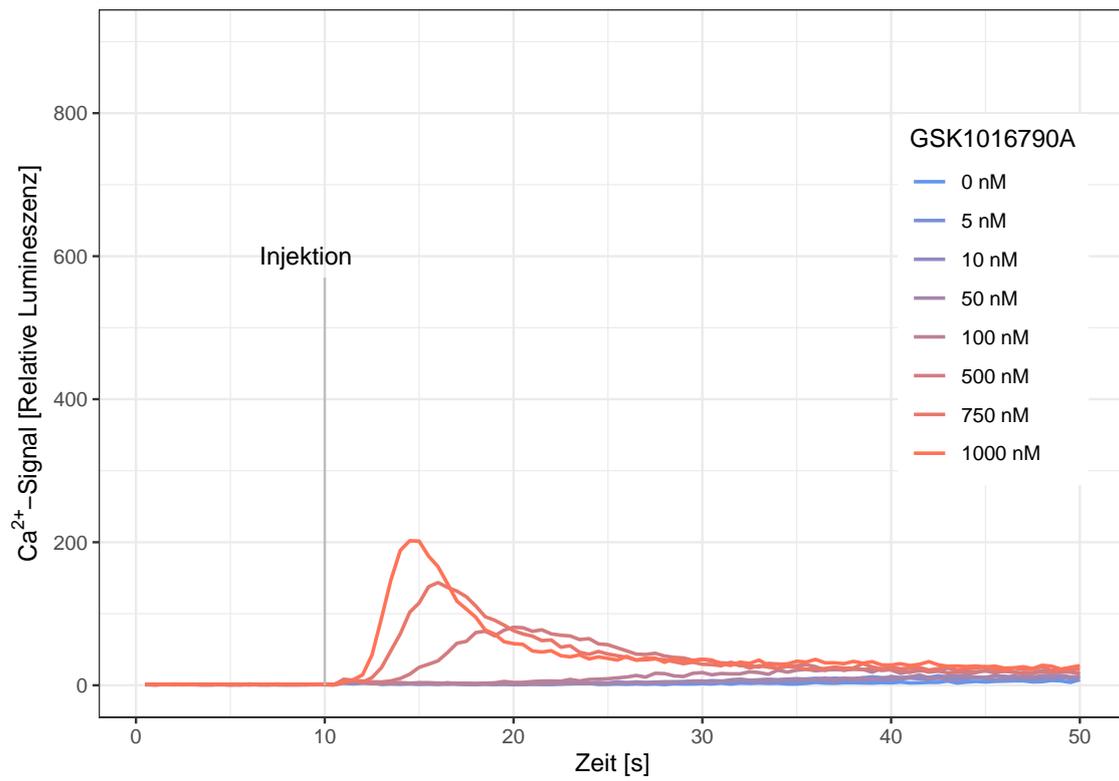


**Abbildung 3.25:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 7.  $n_{bio} = 3$ .

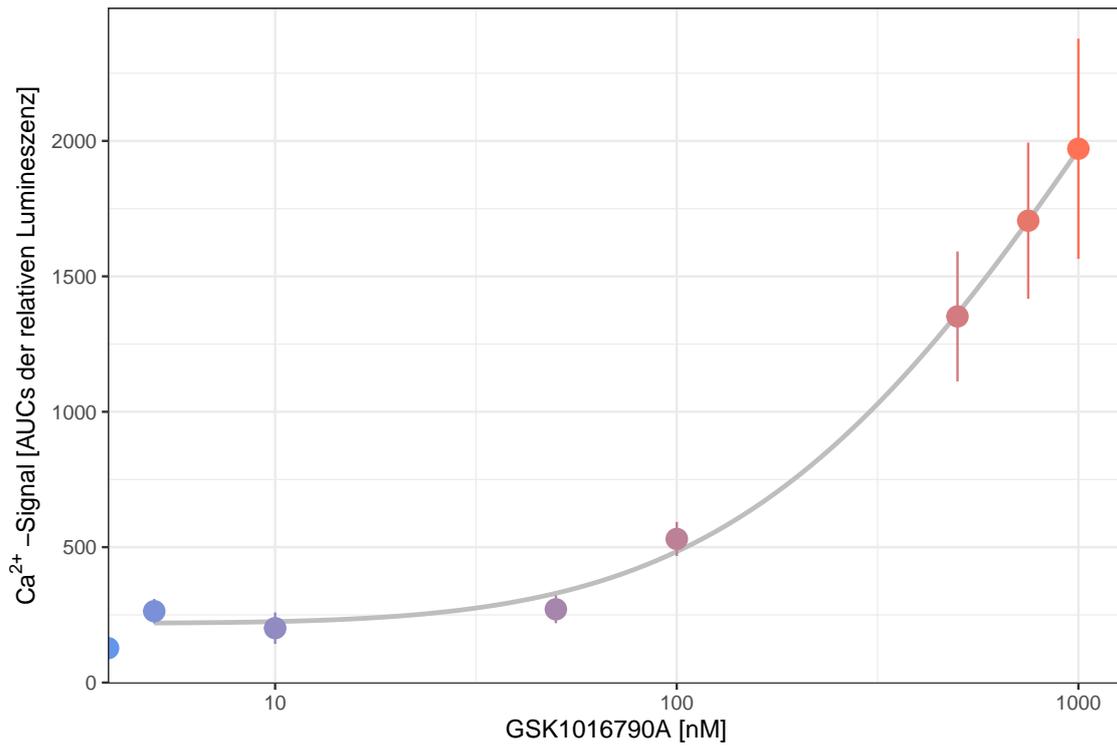


**Abbildung 3.26:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 7.  $n_{bio} = 3$ .

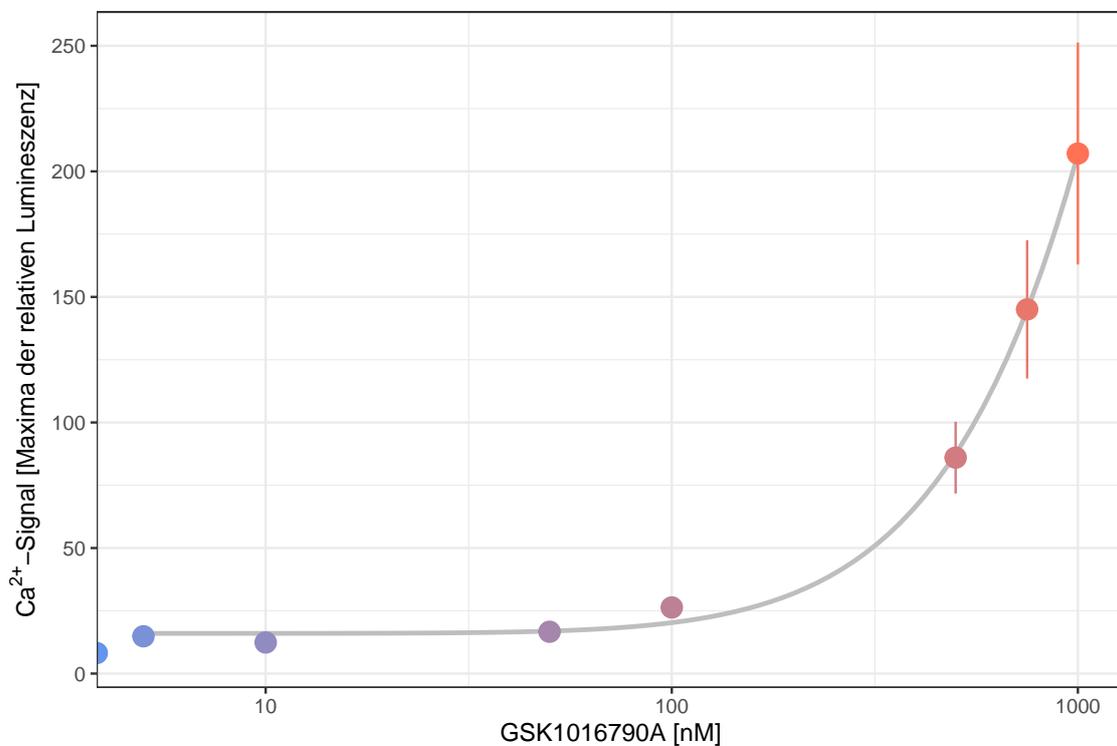
## HEK293-V4 Zellpool 8



**Abbildung 3.27:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 8.  $n_{bio} = 3$ .

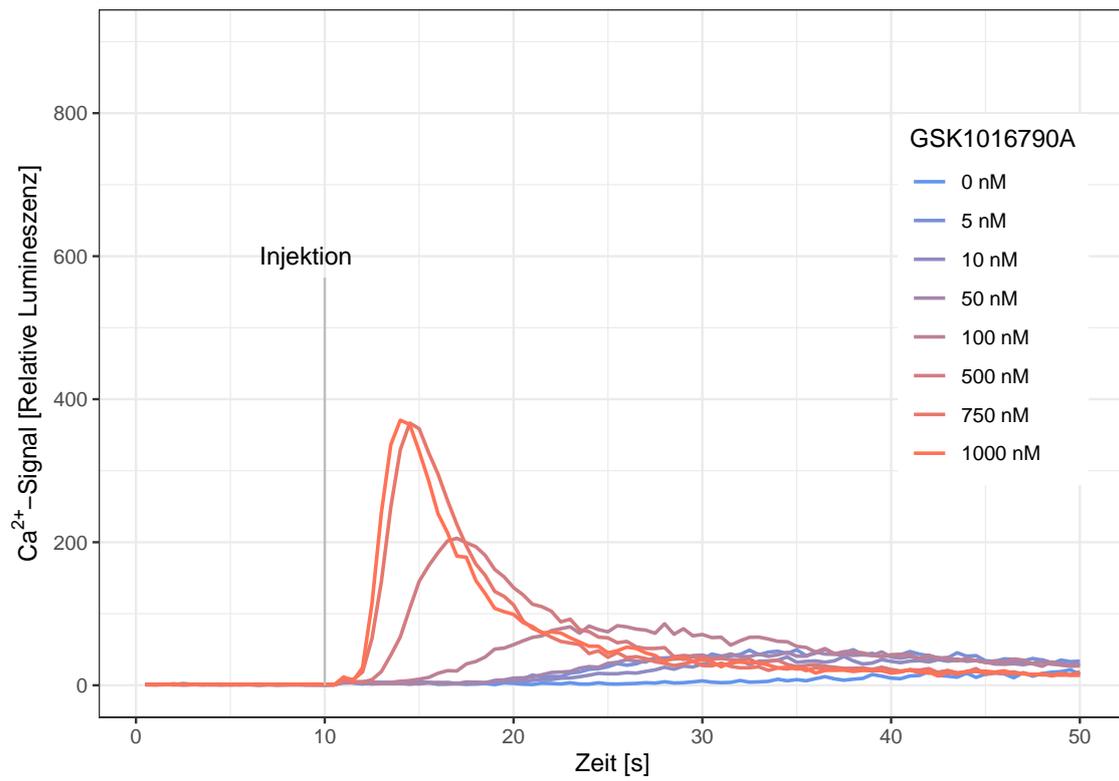


**Abbildung 3.28:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 8.  $n_{bio} = 3$ .

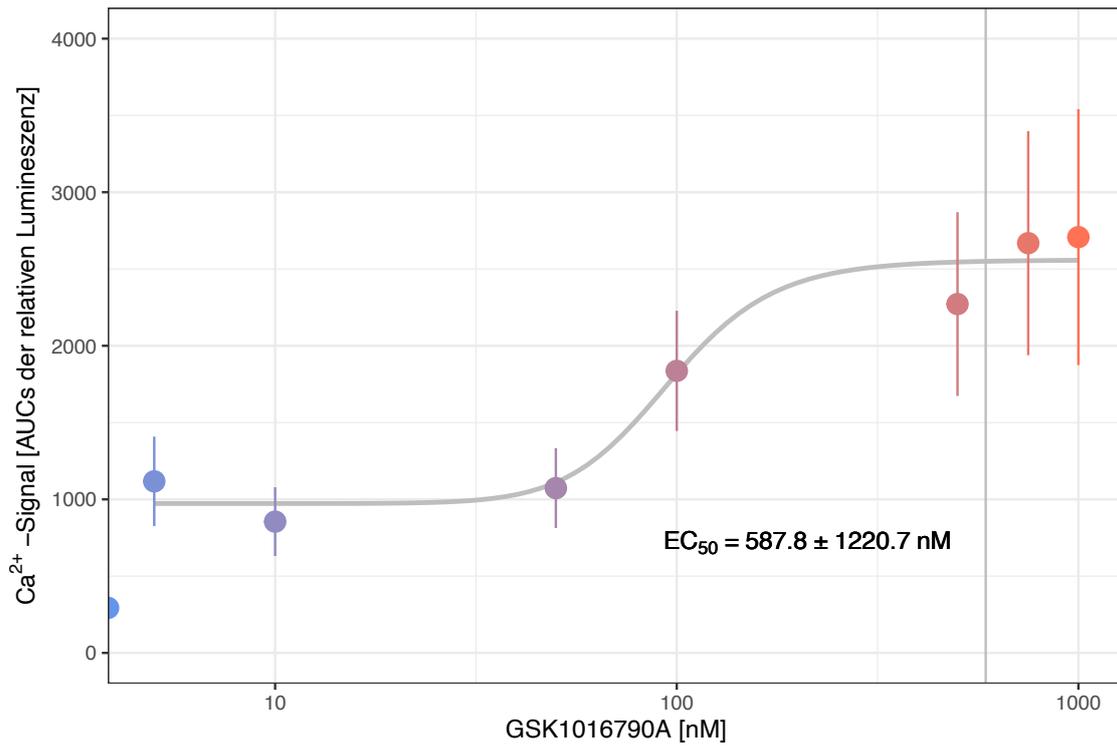


**Abbildung 3.29:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 8.  $n_{bio} = 3$ .

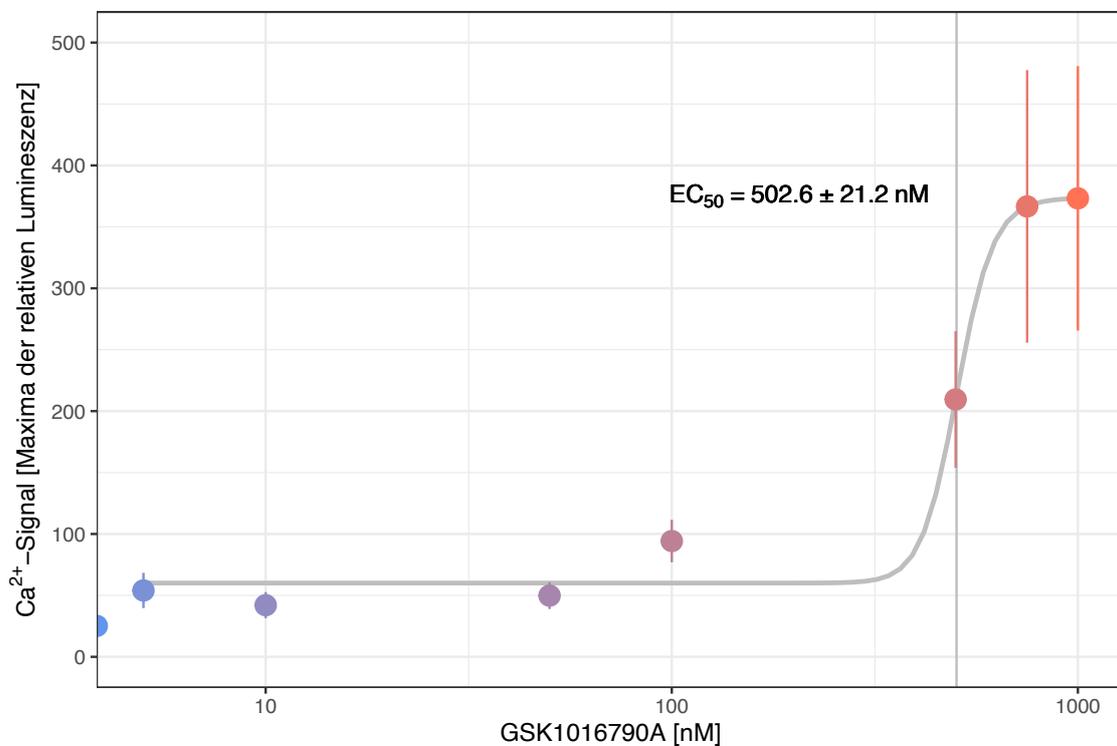
## HEK293-V4 Zellpool 9



**Abbildung 3.30:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 9.  $n_{bio} = 3$ .

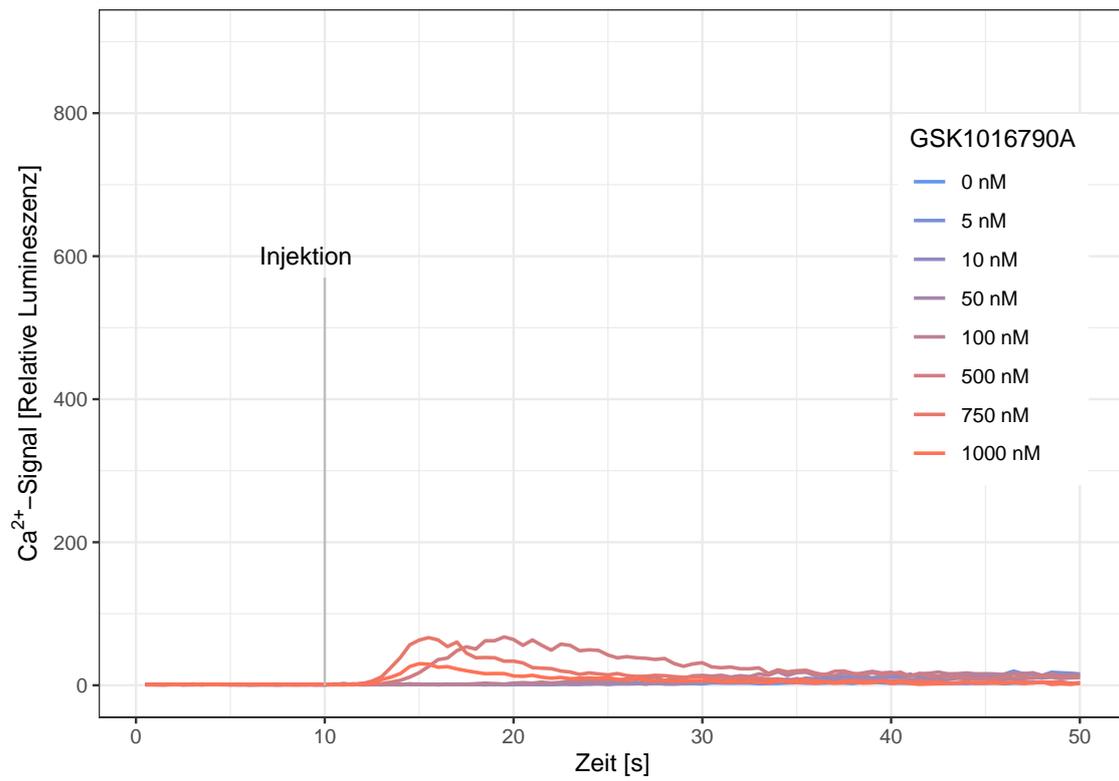


**Abbildung 3.31:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 9.  $n_{bio} = 3$ .

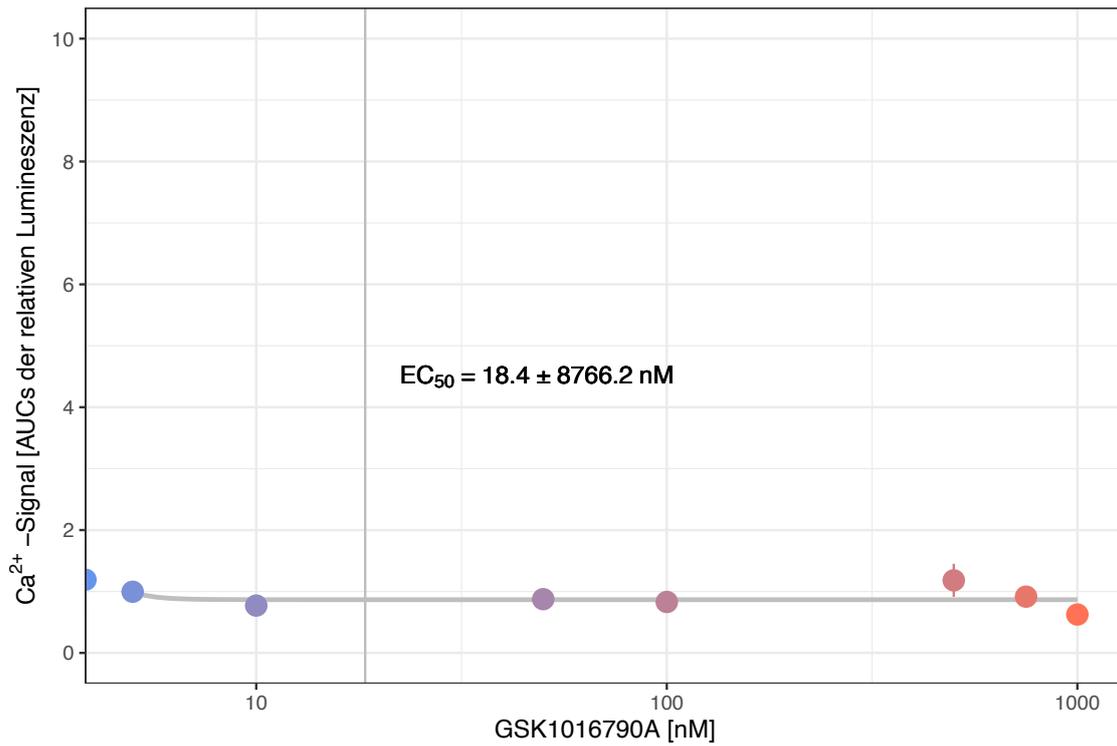


**Abbildung 3.32:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 9.  $n_{bio} = 3$ .

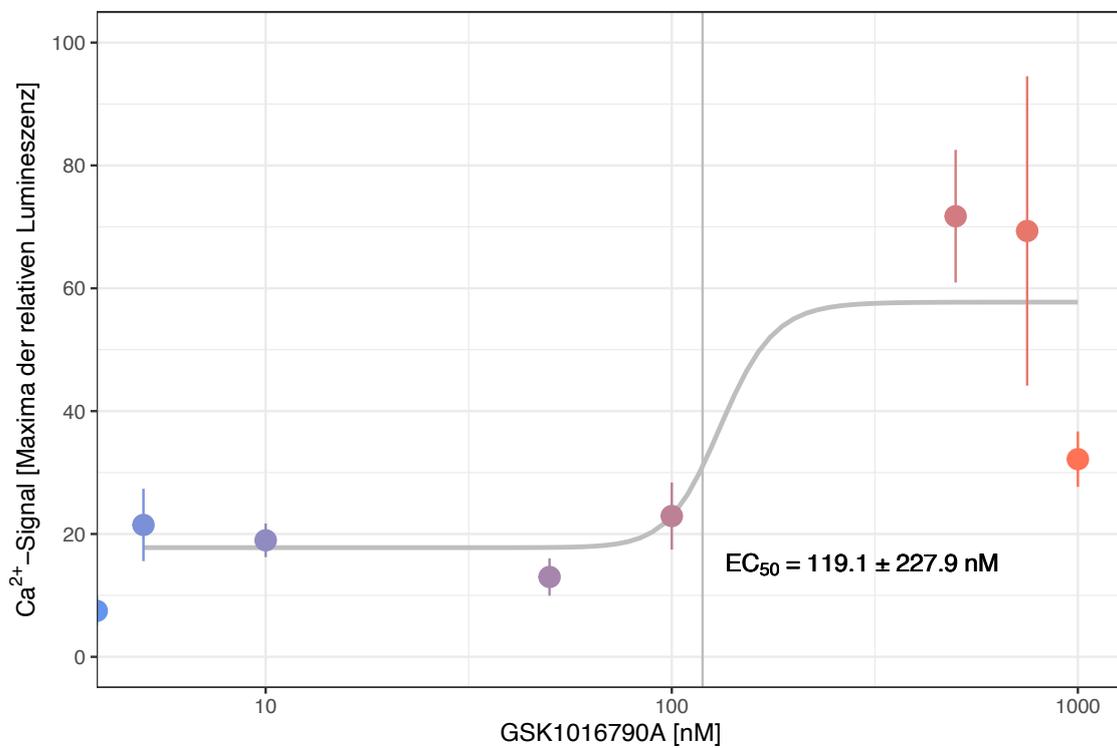
## HEK293-V4 Zellpool 10



**Abbildung 3.33:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 10.  $n_{bio} = 3$ .

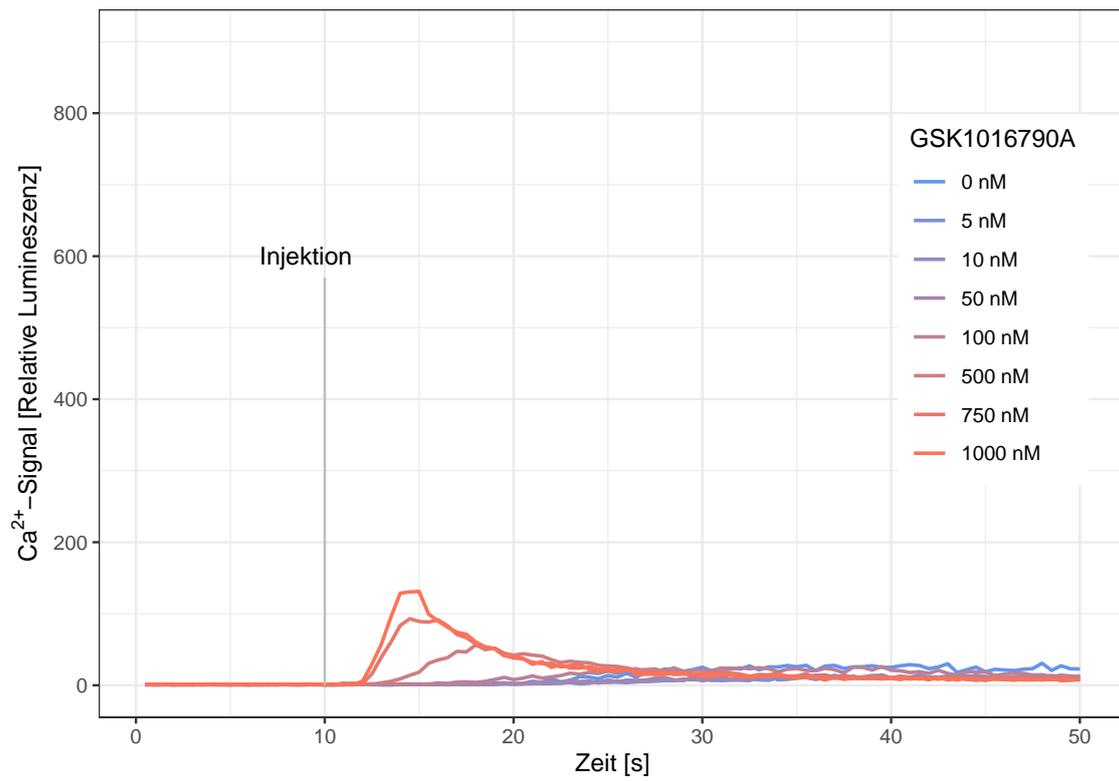


**Abbildung 3.34:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 10.  $n_{bio} = 3$ .

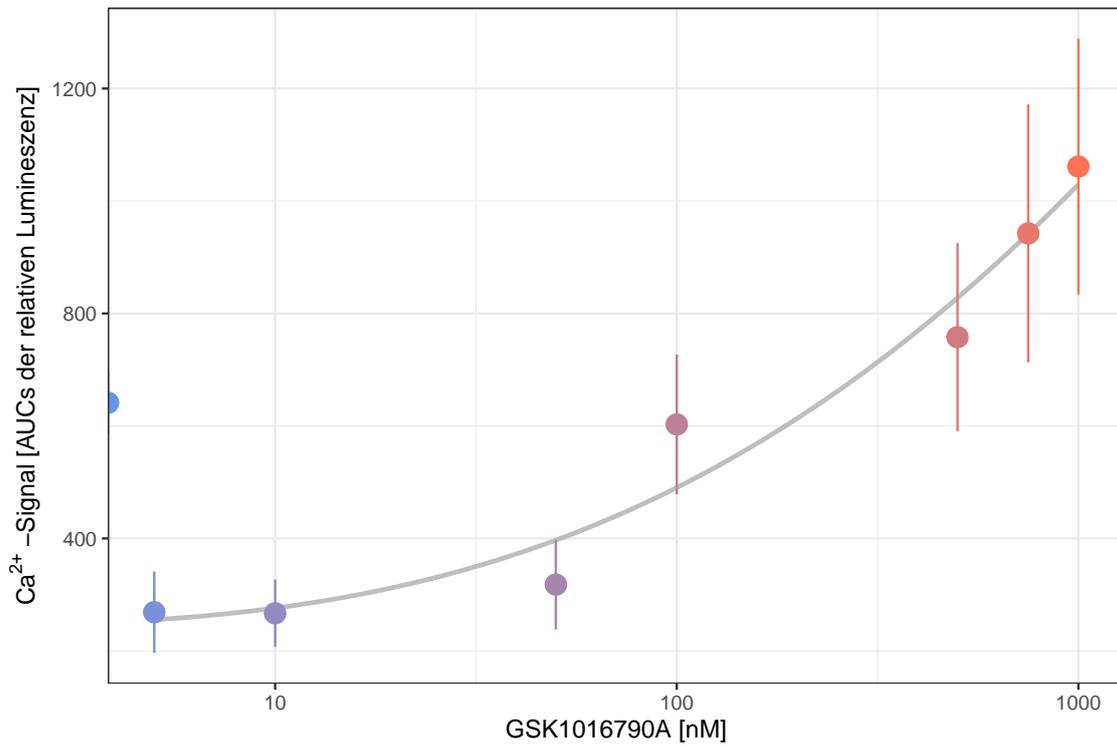


**Abbildung 3.35:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 10.  $n_{bio} = 3$ .

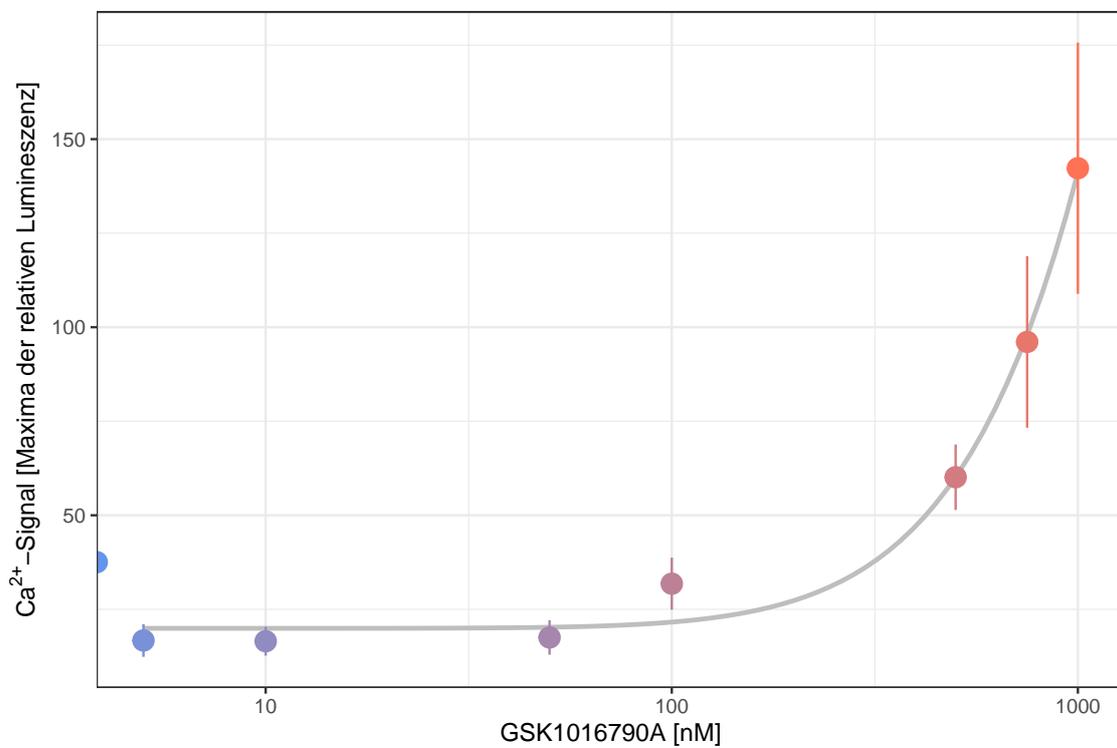
## HEK293-V4 Zellpool 11



**Abbildung 3.36:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 11.  $n_{bio} = 3$ .

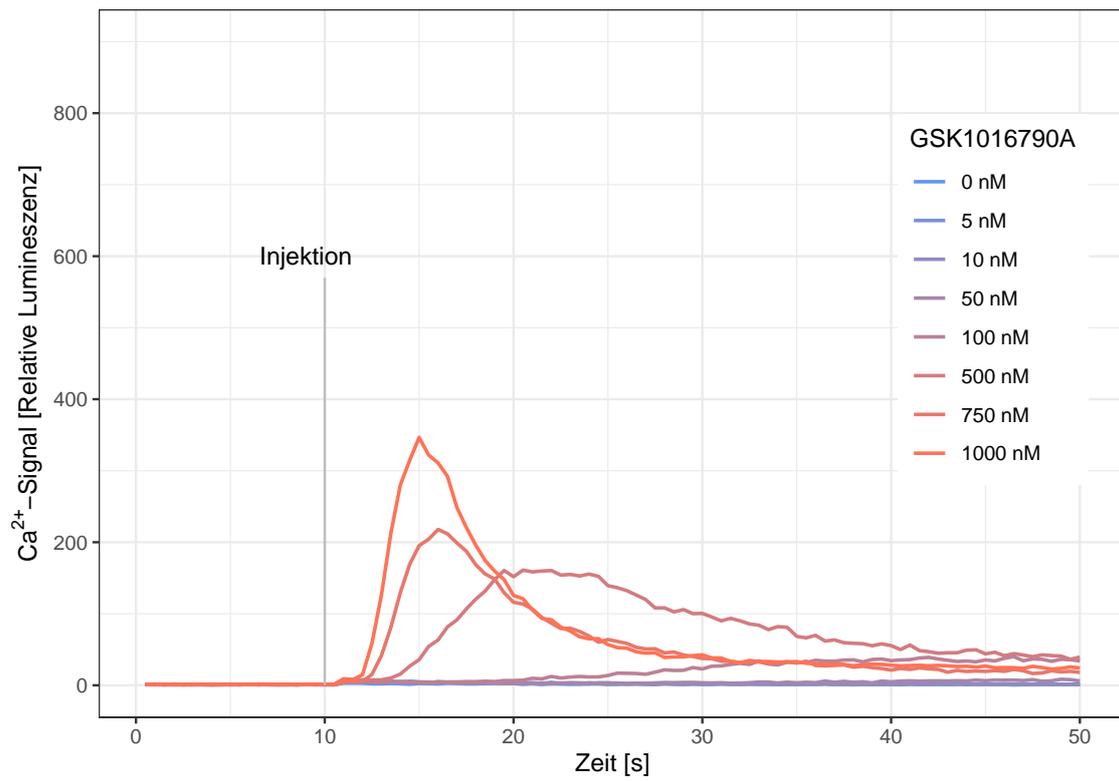


**Abbildung 3.37:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 11.  $n_{bio} = 3$ .

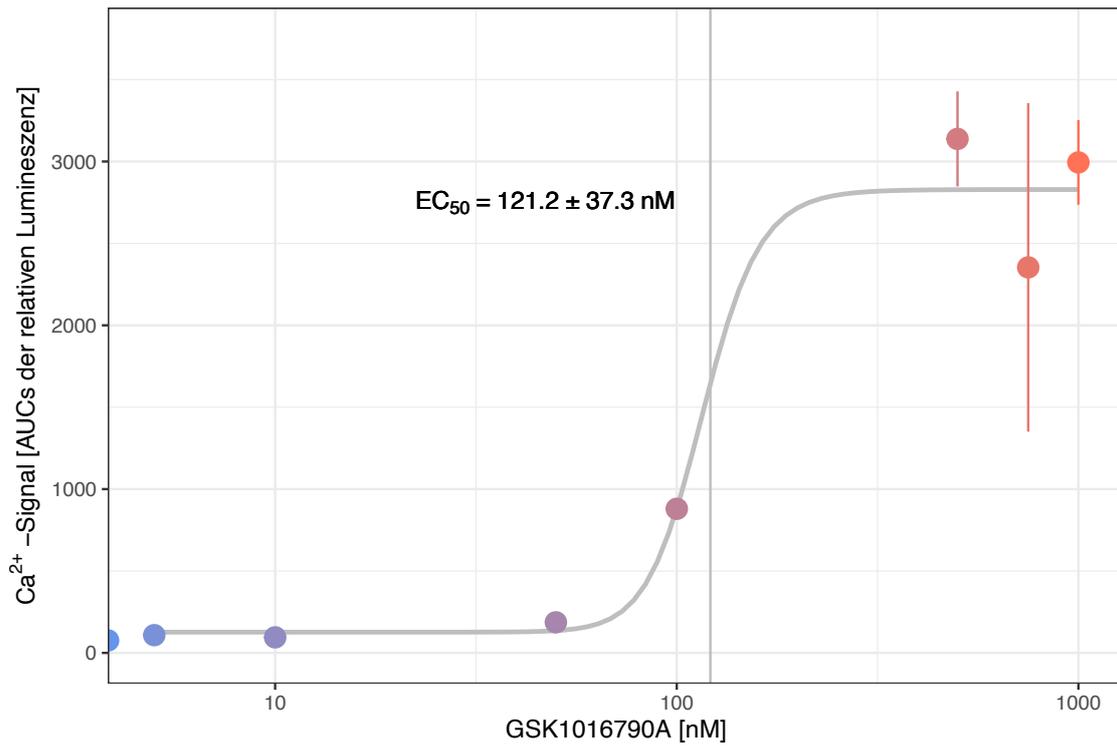


**Abbildung 3.38:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 11.  $n_{bio} = 3$ .

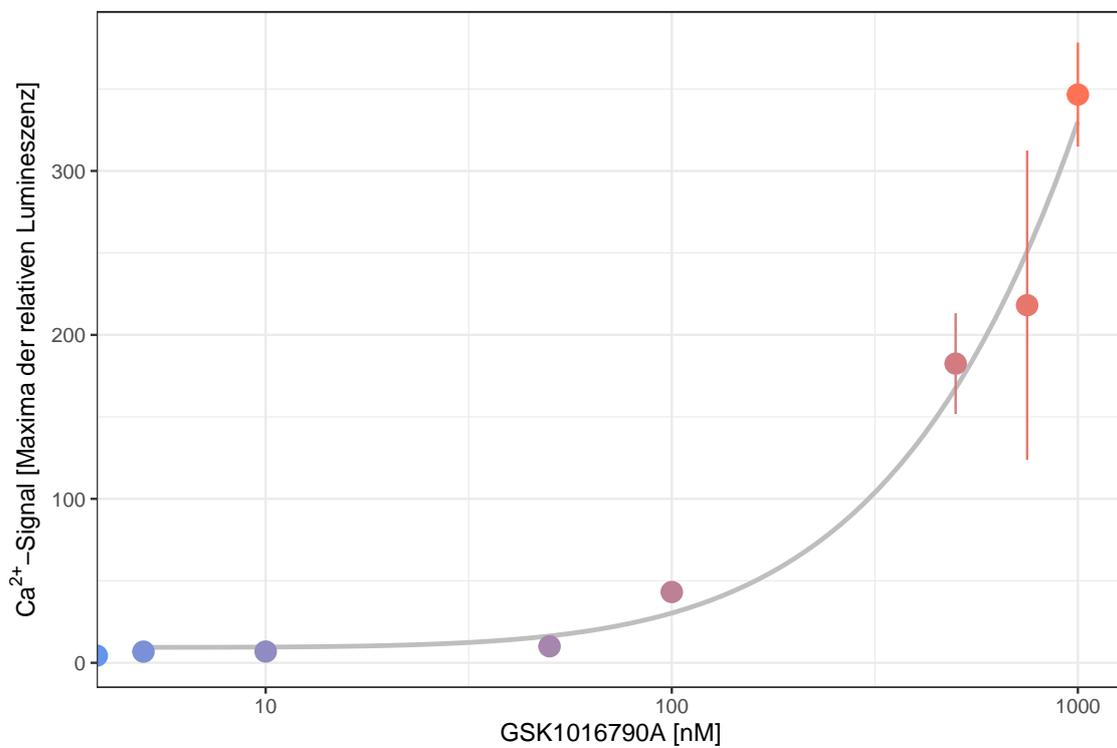
## HEK293-V4 Zellpool 12



**Abbildung 3.39:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 12.  $n_{bio} = 3$ .



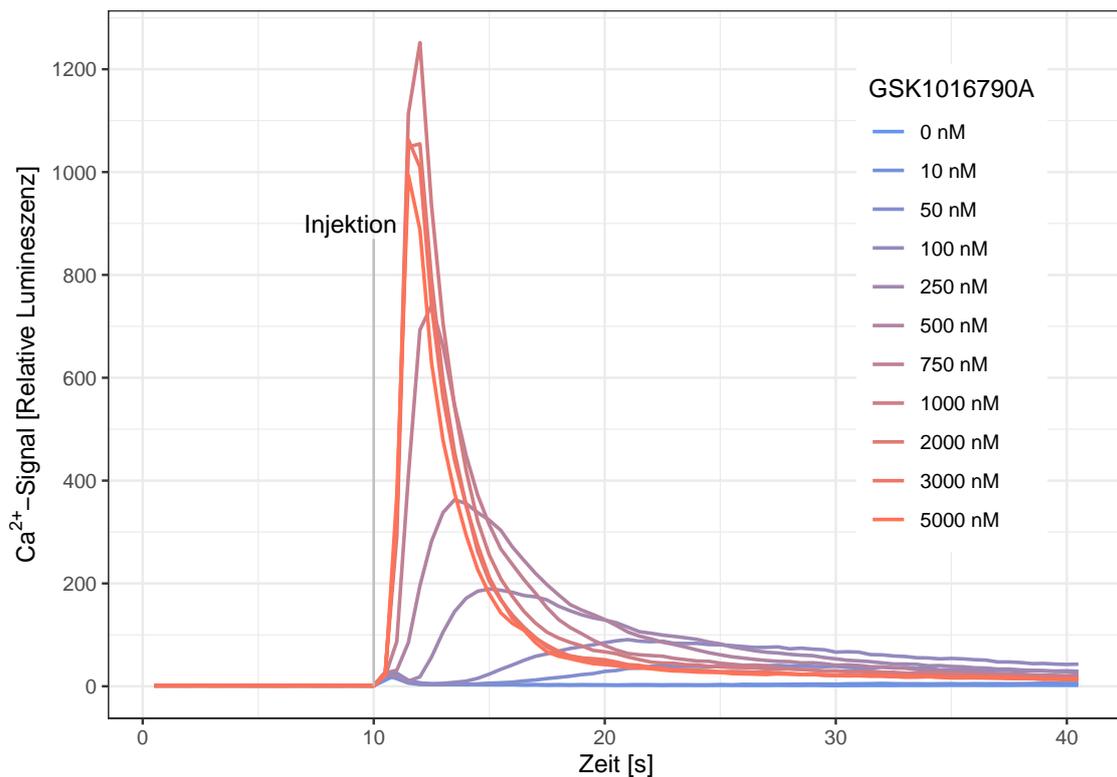
**Abbildung 3.40:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 12.  $n_{bio} = 3$ .



**Abbildung 3.41:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A. HEK293-V4 Zellpool 12.  $n_{bio} = 3$ .

### 3.4.2 Finale Bestimmung der $EC_{50}$ -Werte von GSK1016790A für die Zelllinie HEK293-V4

Zur Bestimmung der endgültigen  $EC_{50}$ -Werte von GSK1016790A für HEK293-V4-Zellen wurde eine im Vergleich zur Zellpoolselektion erweiterte Bandbreite von Injektionskonzentrationen verwendet (s. Kapitel 2.6.1). Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, wurde hierfür der HEK293-V4 Zellpool 7 ausgewählt. Für das gewählte Spektrum der Injektionskonzentrationen von GSK1016790A wurden bei niedrigen und hohen Werten keine großen Schwankungen für die AUC oder das Maximum im Kurvenverlauf der relativen Lumineszenz im Vergleich zu benachbarten Werten beobachtet. Dies ist als Voraussetzung für valide  $EC_{50}$ -Werte anzusehen. Abbildung 3.42 zeigt den Kurvenverlauf der Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach jeweiliger Injektion von GSK1016790A. Die Größe der Stichprobe betrug  $n_{bio} = 6$ .

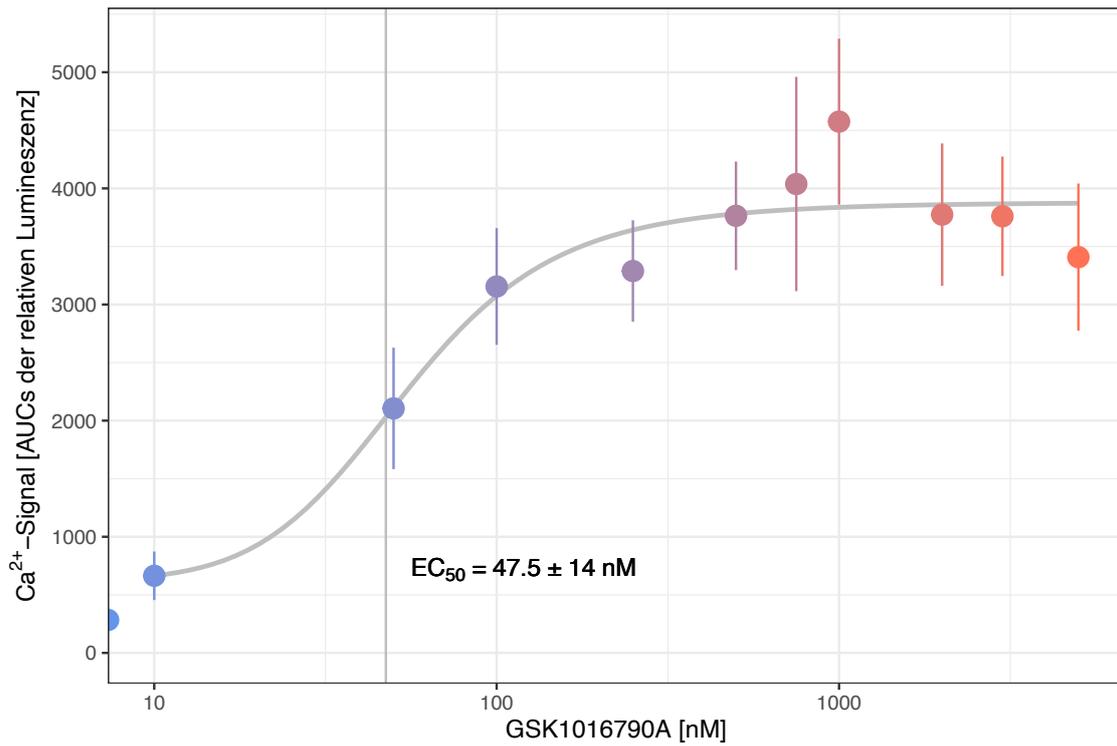


**Abbildung 3.42:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A.  $n_{bio} = 6$ .

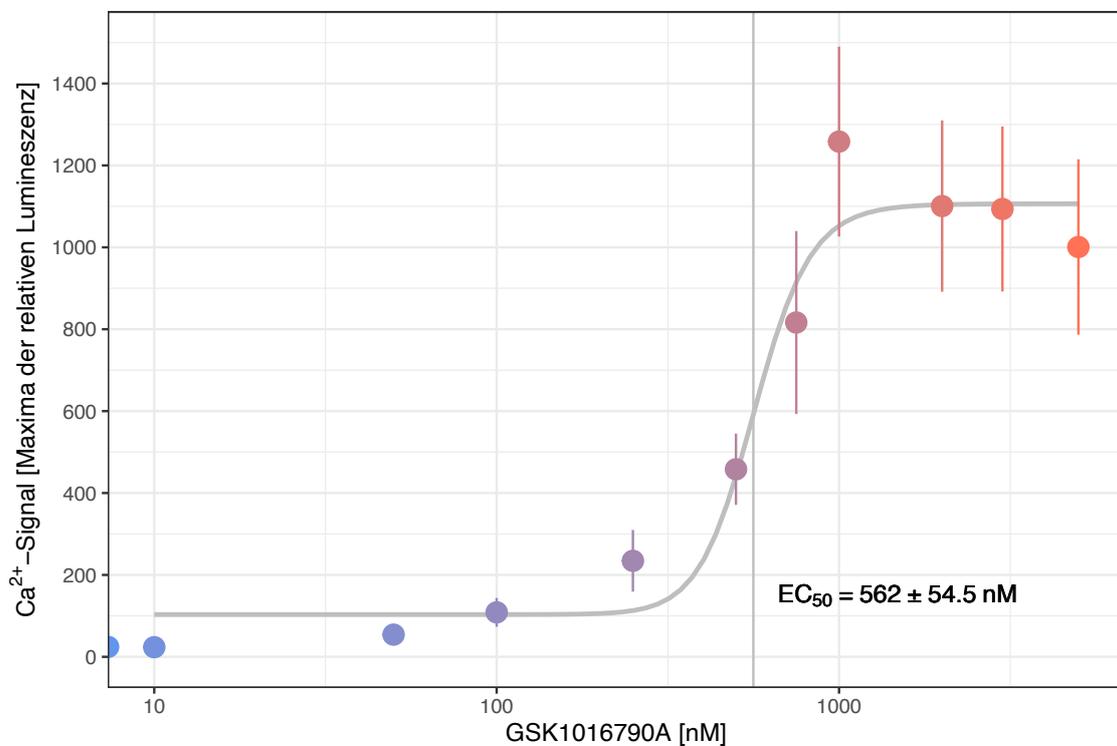
Im Anschluss wurden die  $EC_{50}$ -Werte von GSK1016790A für die Zelllinie HEK293-V4 mithilfe der jeweiligen AUCs und der jeweiligen Maxima analog zur Auswertung in Kapitel 3.4.1 errechnet. Ein in der Literatur gefundener  $EC_{50}$ -Wert von GSK1016790A befand sich bei 5 nM (s. [166], Kapitel 2.6.1). Für den *fit* der Kurven und die Berechnung der  $EC_{50}$ -Werte wurde die Logistische Regression mit 4 Parametern angewandt (s. Kapitel 2.2).

Abbildung 3.43 zeigt die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung der AUCs der relativen Lumineszenz für die jeweiligen Injektionskonzentrationen von GSK1016790A. Der kalkulierte Wert für die  $EC_{50}$  lag bei  $47,5 \pm 14$  nM.

Abbildung 3.44 zeigt die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung der Maxima der relativen Lumineszenz für die jeweiligen Injektionskonzentrationen von GSK1016790A. Der kalkulierte Wert für die  $EC_{50}$  lag bei  $562 \pm 54,5$  nM.



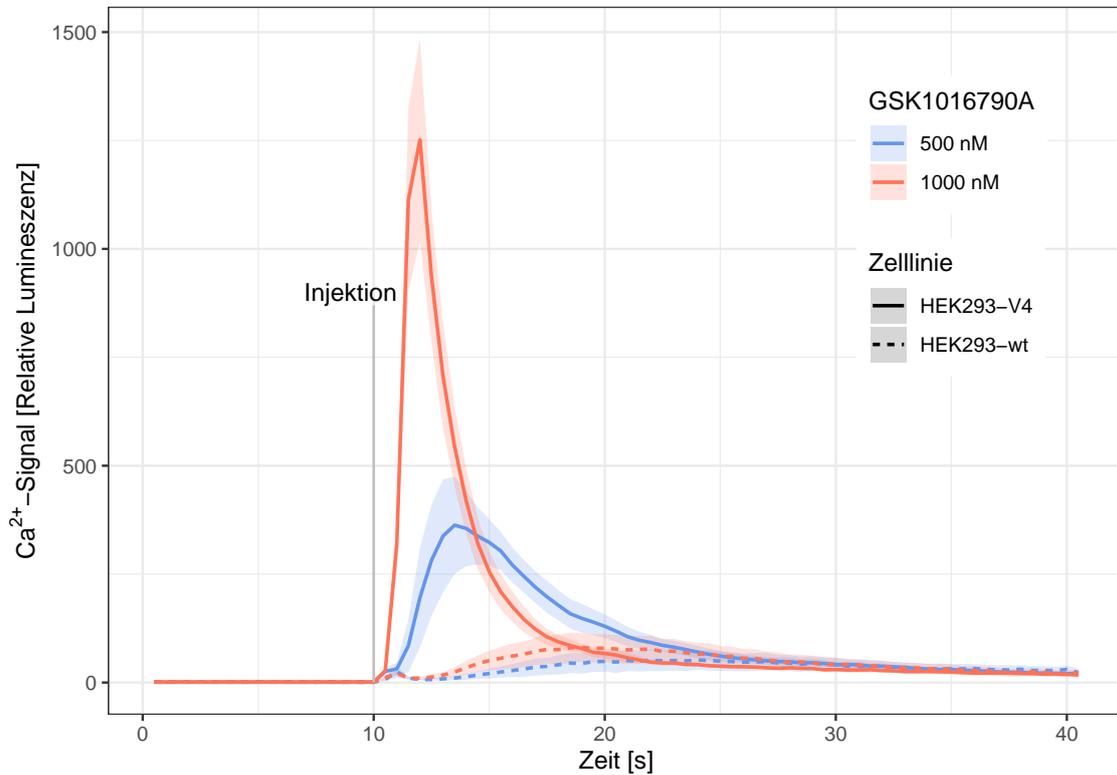
**Abbildung 3.43:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A.  $n_{bio} = 6$ .



**Abbildung 3.44:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK1016790A.  $n_{bio} = 6$ .

### 3.4.3 Vergleich der Zelllinien HEK293-V4 und HEK293-wt

Als Teil des Nachweises der Überexpression von TRPV4 der Linie HEK293-V4 wurde im Vergleich die Zelllinie HEK293-wt im Lumineszenz-Assay mit GSK1016790A untersucht. Abbildung 3.45 zeigt die Mittelwerte des Kurvenverlaufes der relativen Lumineszenz nach jeweiliger Injektion von GSK1016790A. Beispielhaft sind hier die Konzentrationen 500 nM und 1000 nM GSK1016790A dargestellt. Die Größe der Stichprobe betrug in diesem Fall  $n_{bio} = 4$ .



**Abbildung 3.45:** Vergleich der Zelllinien HEK293-V4 und HEK293-wt bezüglich der Mittelwerte der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion von GSK1016790A.  $n_{bio} = 4$ .

Nachdem auch im Kurvenverlauf der Zelllinie HEK293-wt nach Injektion des TRPV4-Agonisten GSK1016790A ein leichter Anstieg für das Ca<sup>2+</sup>-Signal zu verzeichnen war, kann davon ausgegangen werden, dass ebenso eine leichte endogene Expression des Zellmembrankanals TRPV4 in HEK293-wt-Zellen besteht.

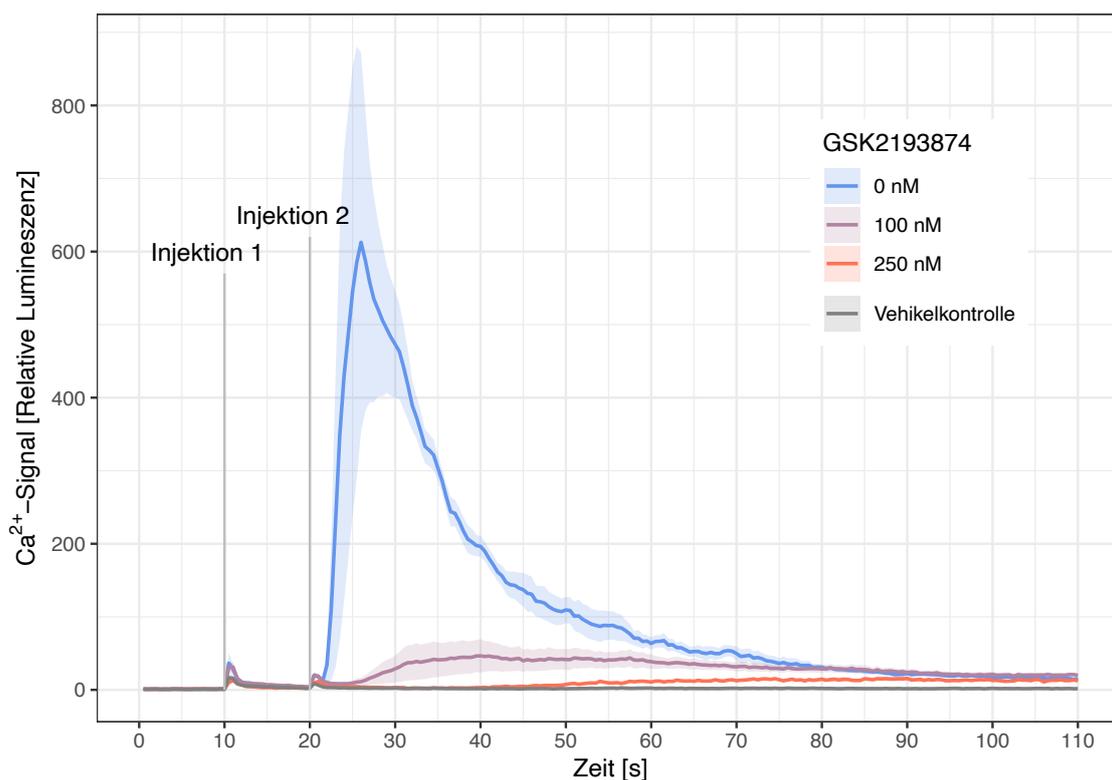
### 3.4.4 Bestimmung des $IC_{50}$ -Wertes von GSK2193874 für die Zelllinie HEK293-V4

Im Anschluss an die Untersuchungen der Zelllinien HEK293-wt und HEK293-V4 mit dem spezifischen TRPV4-Agonisten GSK1016790A sollte gezeigt werden, dass das gemessene Lumineszenzsignal durch Aktivierung des Kanals auch zu unterdrücken ist.

Hierfür wurde, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, vor Injektion des TRPV4-Agonisten GSK1016790A der spezifische Antagonist GSK2193874 injiziert. Abbildung 3.46 zeigt eine Auswahl von Kurvenverläufen und deren Standardabweichung nach Injektion des Antagonisten (Injektion 1) und des Agonisten (Injektion 2). Beispielhaft sind hier die Konzentrationen 0 nM, 100 nM und 250 nM GSK2193874 dargestellt. Die Konzentration des Agonisten GSK1016790A entsprach jeweils 285,7 nM ( $\sim 300$  nM). Auch der Kurvenverlauf der Vehikelkontrolle ist zum Vergleich dargestellt. Tabelle 3.3 zeigt zur Verdeutlichung die in Abbildung 3.46 dargestellten Injektionskonditionen. Die Größe der Stichprobe betrug  $n_{bio} = 2-8$ .

**Tabelle 3.3:** Übersicht der in Abbildung 3.46 dargestellten Injektionskonditionen

	1. Injektion GSK2193874 [nM]	2. Injektion GSK1016790A [nM]
Vehikelkontrolle	0 (DMSO)	0 (DMSO)
Positivkontrolle	0 (DMSO)	300
Suppression 1	100	300
Suppression 2	250	300

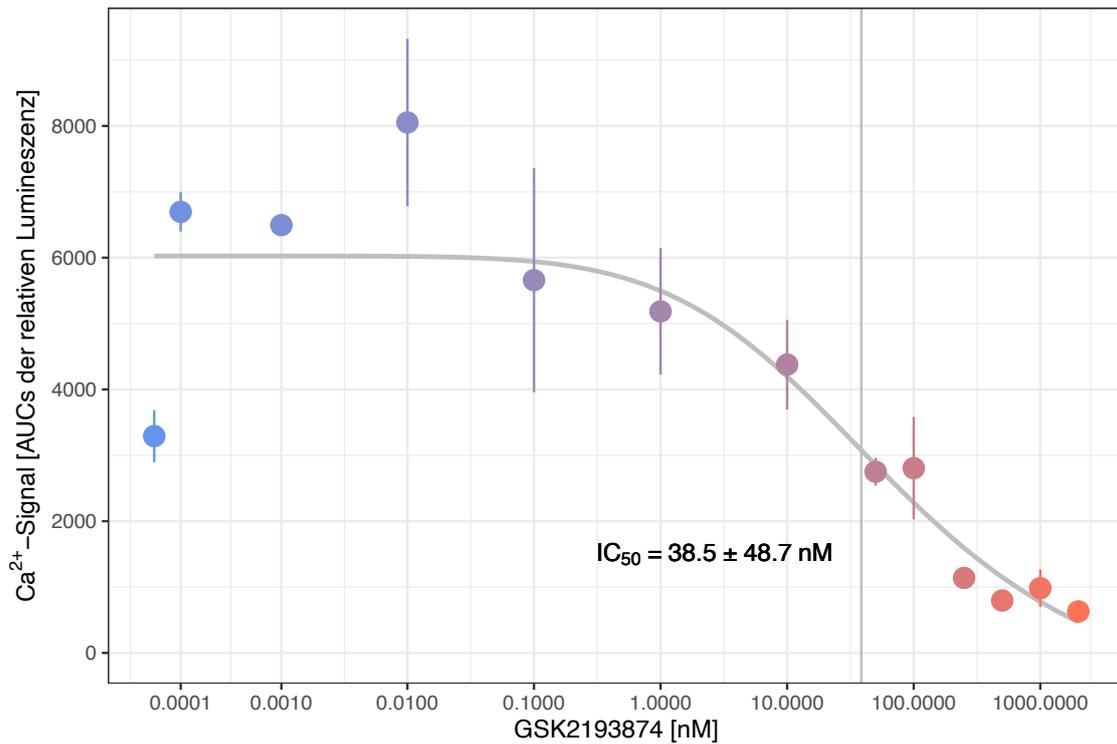


**Abbildung 3.46:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK2193874 (Injektion 1) und 300 nM GSK1016790A (Injektion 2).  $n_{bio} = 2-8$ .

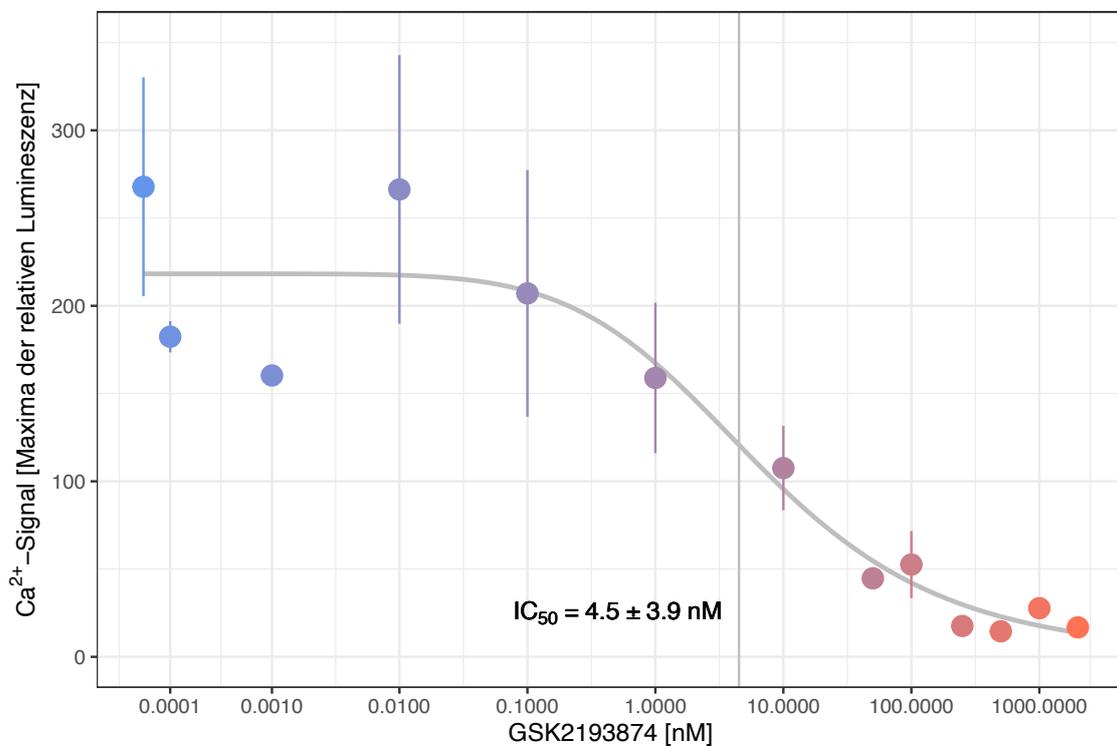
Über die AUCs und Maxima der relativen Lumineszenz wurde im Anschluss die jeweilige halbmaximal inhibierende Wirkstoffkonzentration ( $IC_{50}$ ) von GSK2193874 für HEK293-V4-Zellen bei einer Injektionskonzentration des Agonisten GSK1016790A von 300 nM errechnet. In der Literatur gefundene  $IC_{50}$ -Werte von GSK2193874 betragen 40–50 nM bei einer Aktivierung mit 10 nM GSK1016790A (s. [52], Kapitel 2.6.1). Für den *fit* der Kurven und die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte wurde die Logistische Regression mit 4 Parametern angewandt (s. Kapitel 2.2).

Abbildung 3.47 zeigt die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung der AUCs der relativen Lumineszenz bei den Injektionskonzentrationen von GSK2193874. Der kalkulierte Wert für die  $IC_{50}$  lag bei 38,5 nM. Die Größe der Stichprobe betrug  $n_{bio} = 2-8$ .

Abbildung 3.48 zeigt die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung der Maxima der relativen Lumineszenz bei den Injektionskonzentrationen von GSK2193874. Der kalkulierte Wert für die  $IC_{50}$  lag bei 4,5 nM. Die Größe der Stichprobe betrug  $n_{bio} = 2-8$ .



**Abbildung 3.47:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK2193874 und 300 nM GSK1016790A.  $n_{bio} = 2-8$ .



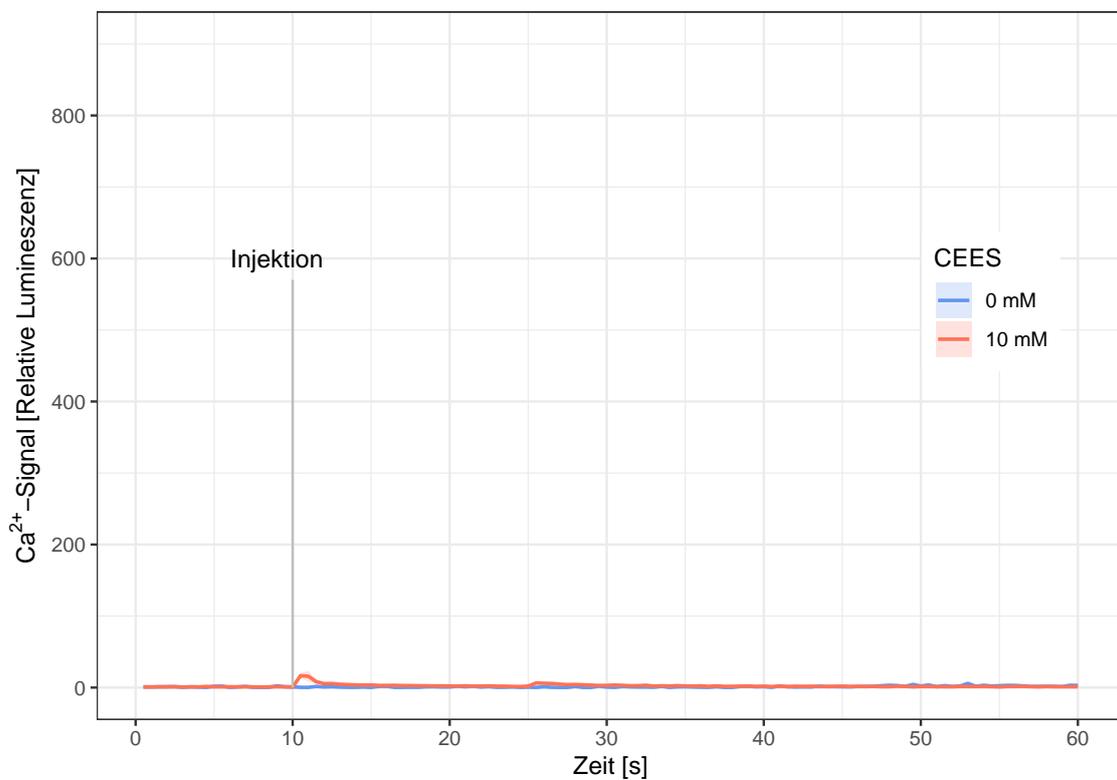
**Abbildung 3.48:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion verschiedener Konzentrationen GSK2193874 und 300 nM GSK1016790A.  $n_{bio} = 2-8$ .

### 3.4.5 Untersuchungen der Zelllinie HEK293-V4 im Zusammenhang mit CEES

Um nun den Effekt von CEES auf HEK293-V4-Zellen im Lumineszenz-Assay zu untersuchen, wurden wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, verschiedene Versuchsbedingungen entwickelt.

#### Untersuchung eines agonistischen Effektes

Ein möglicher agonistischer Effekt (s. Kapitel 1.4) der Substanz am TRPV4-Kanal wurde durch direkte Injektion der Substanz im Lumineszenz-Assay untersucht. Wie in Tabelle 2.20 dargestellt, wurden mehrere Endkonzentrationen von 6,25  $\mu\text{M}$  bis 10.000  $\mu\text{M}$  CEES gewählt. Bei keiner der Injektionen war jedoch ein relevanter Ausschlag der relativen Lumineszenz festzustellen. Abbildung 3.49 zeigt den Kurvenverlauf und dessen Standardabweichung nach Injektion von 10 mM CEES. Zum Vergleich ist ebenso der Kurvenverlauf nach Injektion der Vehikelkontrolle dargestellt. Die Größe der Stichprobe betrug  $n = 2$ .

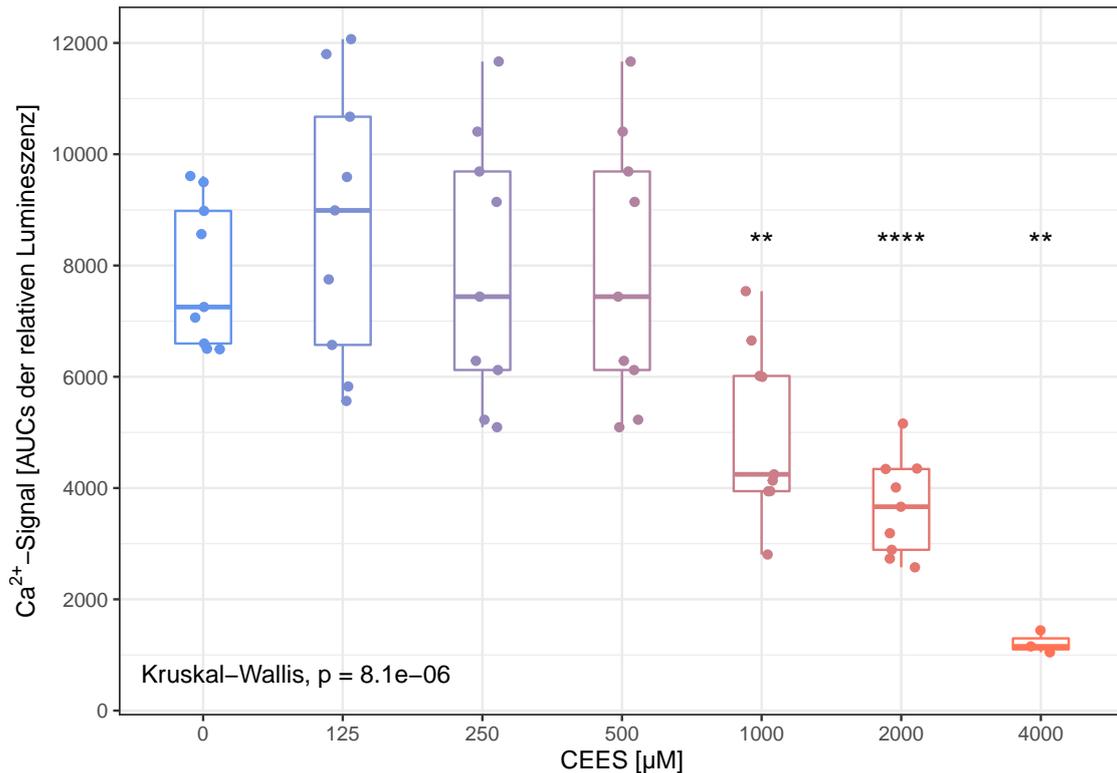


**Abbildung 3.49:** Mittelwerte der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion von 10 mM CEES.  $n_{bio} = 2$ .

### Untersuchung eines antagonistischen Effektes

Für den Nachweis eines möglichen antagonistischen Effektes wurden die Zellen im Lumineszenz-Assay vor Injektion des Agonisten GSK1016790A mit CEES inkubiert (s. Kapitel 2.6.1).

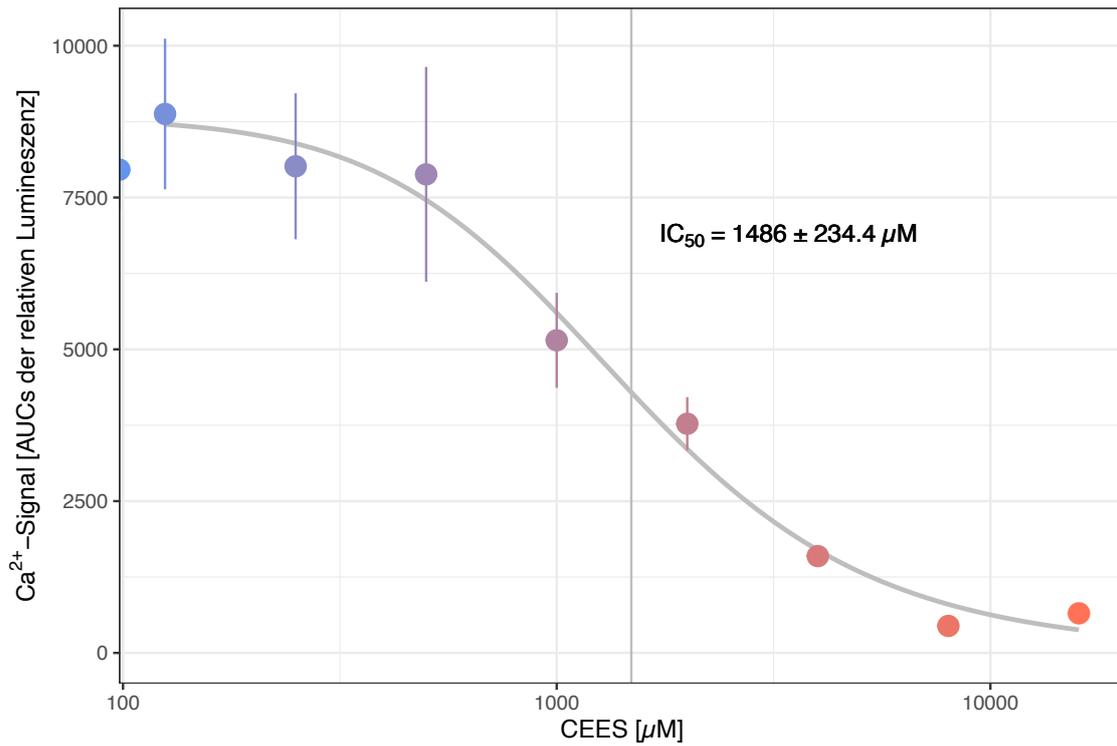
Abbildung 3.50 zeigt die AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von 300 nM GSK1016790A nach 30-minütiger Präinkubation mit CEES in verschiedenen Konzentrationen. Die Größe der Stichprobe betrug  $n_{bio} = 3-9$ . Die statistische Analyse der Daten nach Kruskal-Wallis ergab einen signifikanten Unterschied zur Vergleichsgruppe 0  $\mu\text{M}$  CEES ab 1.000  $\mu\text{M}$  CEES.



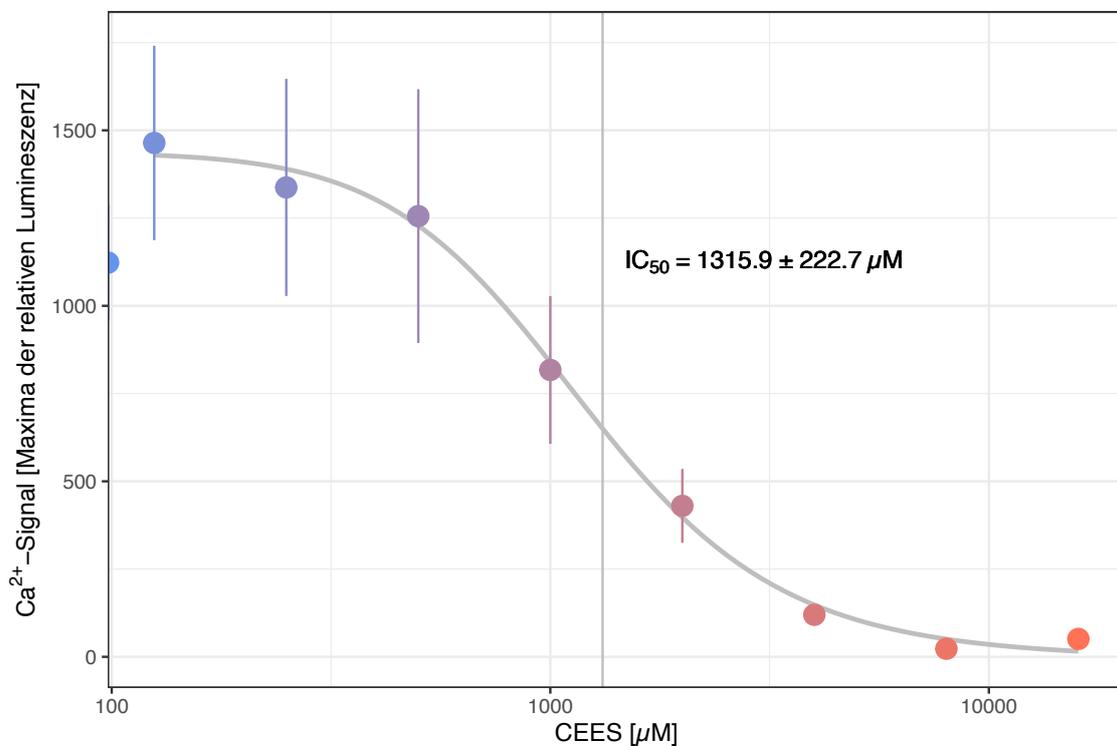
**Abbildung 3.50:** AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von 300 nM GSK1016790A nach 30-minütiger Präinkubation mit CEES in verschiedenen Konzentrationen.  $n_{bio} = 3-9$ .  $**p \leq 0,01$ .  $****p \leq 0,0001$ .

Über die AUCs und Maxima der relativen Lumineszenz wurde im Anschluss der jeweilige  $IC_{50}$ -Wert von CEES für HEK293-V4-Zellen bei einer Injektionskonzentration des Agonisten GSK1016790A von 300 nM errechnet. Für den *fit* der Kurven und die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte wurde die Logistische Regression mit 4 Parametern angewandt (s. Kapitel 2.2). Abbildung 3.51 zeigt die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung der AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von 300 nM GSK1016790A und vorheriger 30-minütiger Präinkubation mit CEES in verschiedenen Konzentrationen. Der kalkulierte Wert für die  $IC_{50}$  lag bei 1486  $\mu\text{M}$ . Die Größe der Stichprobe betrug  $n_{bio} = 3-9$ .

Abbildung 3.52 zeigt die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung der Maxima der relativen Lumineszenz nach Injektion von 300 nM GSK1016790A und vorheriger 30-minütiger Präinkubation mit CEES in verschiedenen Konzentrationen. Der kalkulierte Wert für die  $IC_{50}$  lag bei 1315,9  $\mu\text{M}$ . Die Größe der Stichprobe betrug  $n_{bio} = 3-9$ .



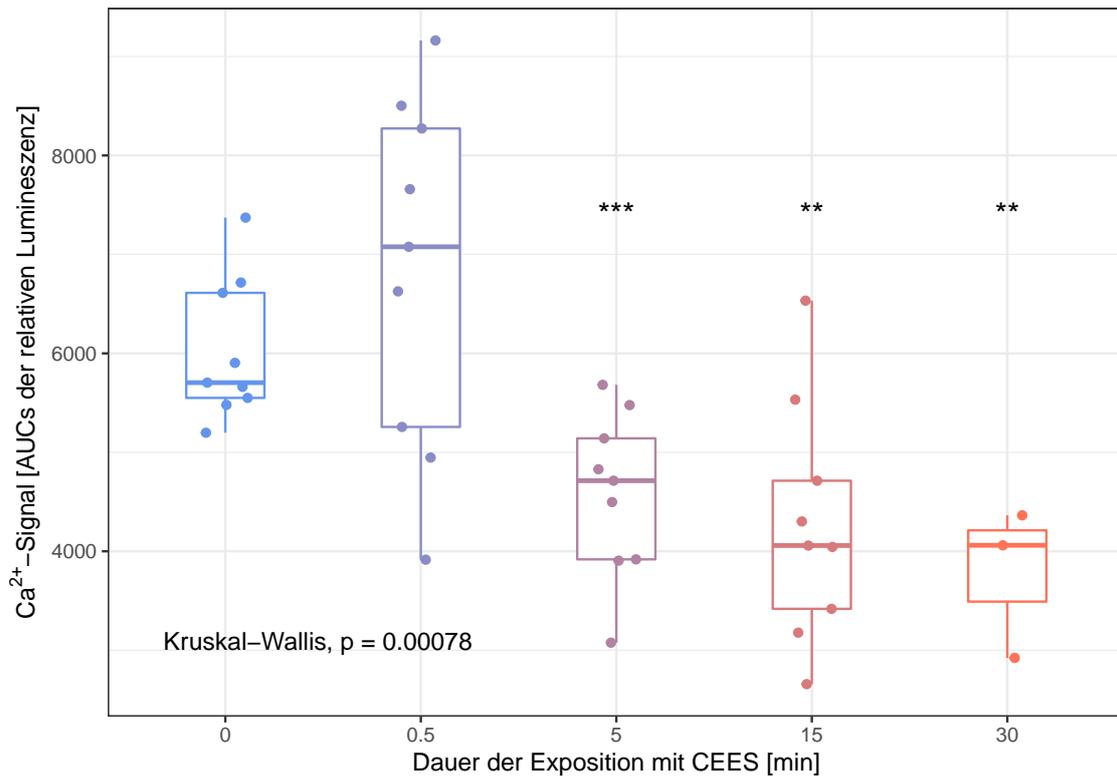
**Abbildung 3.51:** Mittelwerte der AUCs der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion von 300 nM GSK1016790A nach 30-minütiger Präinkubation mit CEES in verschiedenen Konzentrationen.  $n_{bio} = 3-9$ .



**Abbildung 3.52:** Mittelwerte der Maxima der relativen Lumineszenz und deren Standardabweichung nach Injektion von 300 nM GSK1016790A nach 30-minütiger Präinkubation mit CEES in verschiedenen Konzentrationen.  $n_{bio} = 3-9$ .

### Untersuchung des antagonistischen Effektes nach Dauer der Exposition

Um zu untersuchen, ob die Dauer der Exposition der HEK293-V4-Zellen mit CEES eine Rolle spielt, wurde eben diese in einer weiteren Versuchskondition abgewandelt. Abbildung 3.53 zeigt die AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von 300 nM GSK1016790A und vorheriger Präinkubation verschiedener Dauer mit 1.000  $\mu\text{M}$  CEES. Die Größe der Stichprobe betrug  $n_{bio} = 3-9$ . Die statistische Analyse der Daten nach Kruskal-Wallis ergab einen signifikanten Unterschied zur Vergleichsgruppe 0 Minuten ab 5 Minuten Präinkubation mit CEES.

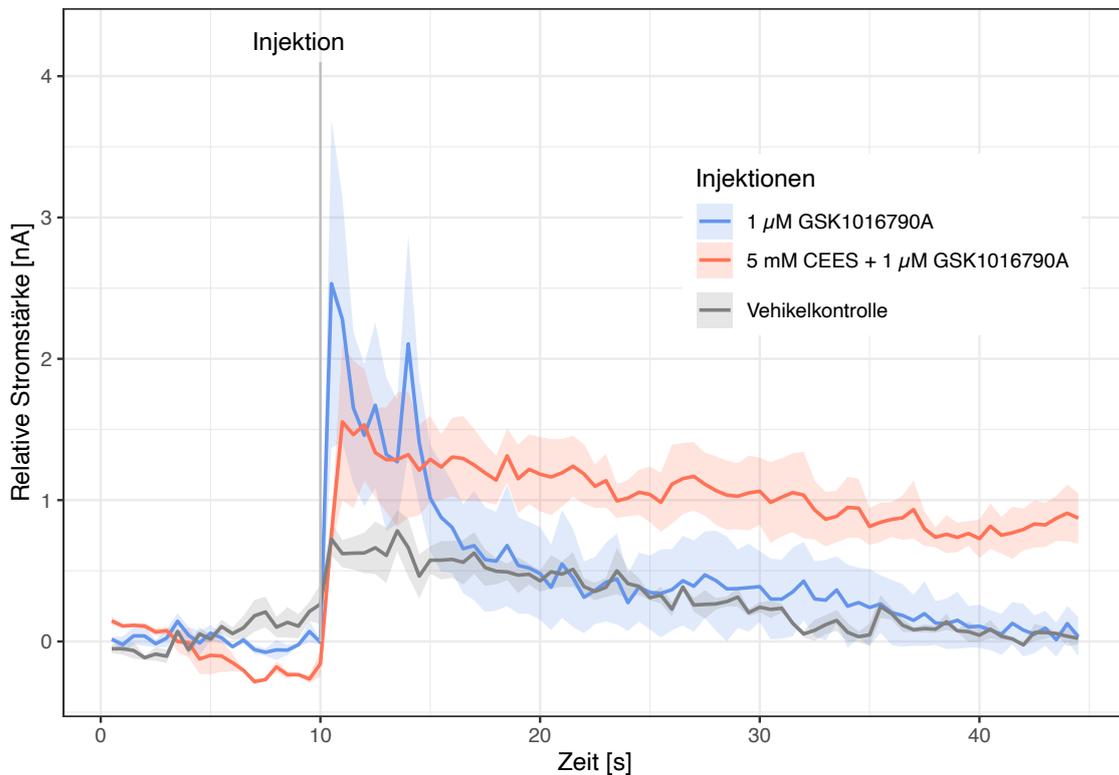


**Abbildung 3.53:** AUCs der relativen Lumineszenz nach Injektion von 300 nM GSK1016790A nach Präinkubation verschiedener Dauer mit 1.000  $\mu\text{M}$  CEES.  $n_{bio} = 3-9$ . \*\* $p \leq 0,01$ . \*\*\* $p \leq 0,001$ .

### 3.5 Patch-Clamp-Technik im endogenen System

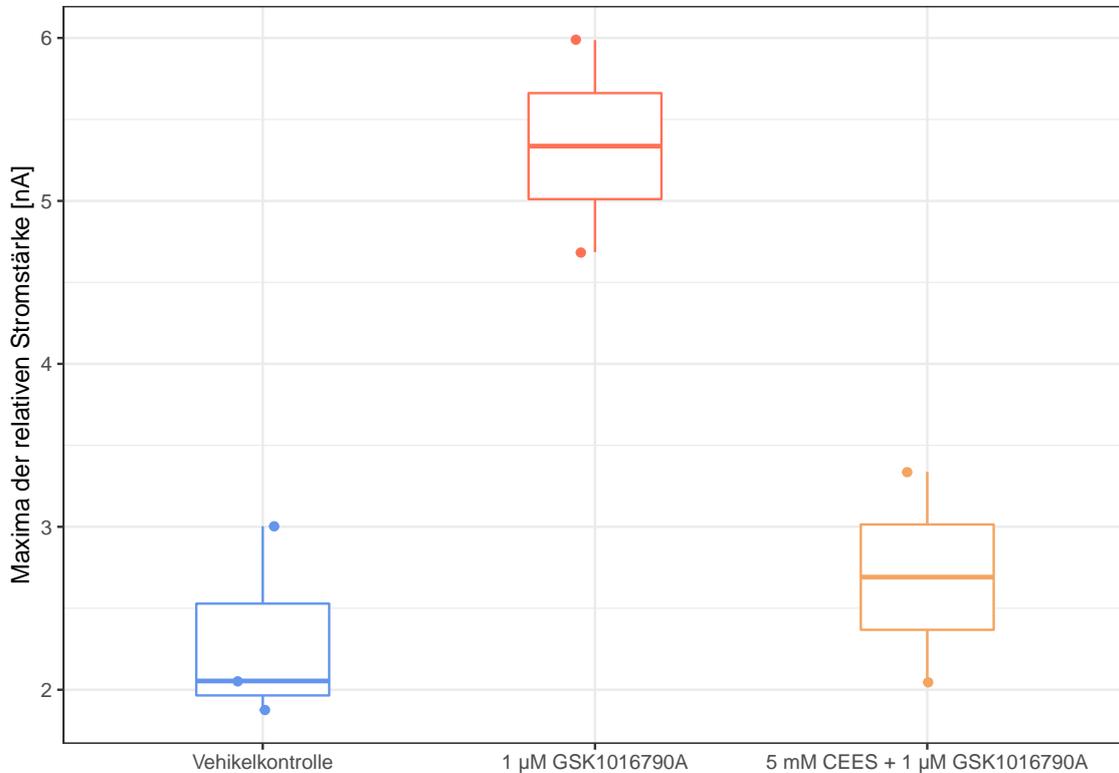
Die Patch-Clamp-Technik wurde gewählt, um die gefundenen Ergebnisse im Lumineszenz-Assay zu unterstreichen. Die überraschend inhibierende Wirkung von CEES auf TRPV4 sollte nun in einer Aequorin unabhängigen Methode untersucht werden. Wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben, wurden dafür Zellen der Linie A549 im *Whole-Cell* Patch-Clamp-Ansatz untersucht. Nachdem A549-Zellen den TRPV4-Kanal endogen exprimieren, war dies eine willkommene Möglichkeit, einen Vergleich zur Zelllinie HEK293-V4 mit Überexpression des TRPV4-Kanals anzustellen [167].

Abbildung 3.54 zeigt die gemessene relative Stromstärke nach Injektion von 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A im Vergleich zur Injektion von 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A nach 30-minütiger Präinkubation der Zellen mit 5 mM CEES und der Vehikelkontrolle DMSO. Die Größe der Stichprobe betrug  $n_{bio} = 2-3$ .



**Abbildung 3.54:** Relative Stromstärke nach Injektion von 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A ( $\pm$  5 mM CEES-Präinkubation für 30 Minuten) für A549-Zellen.  $n_{bio} = 2-3$ .

Abbildung 3.55 zeigt die Maxima der relativen Stromstärke nach Injektion von 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A im Vergleich zur Injektion von 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A nach 30-minütiger Präinkubation der Zellen mit 5 mM CEES und der Vehikelkontrolle DMSO. Bei einer Größe der Stichprobe von  $n_{bio} = 2-3$  konnte die statistische Auswertung keinen signifikanten Unterschied zur Vergleichsgruppe der Vehikelkontrolle ergeben.

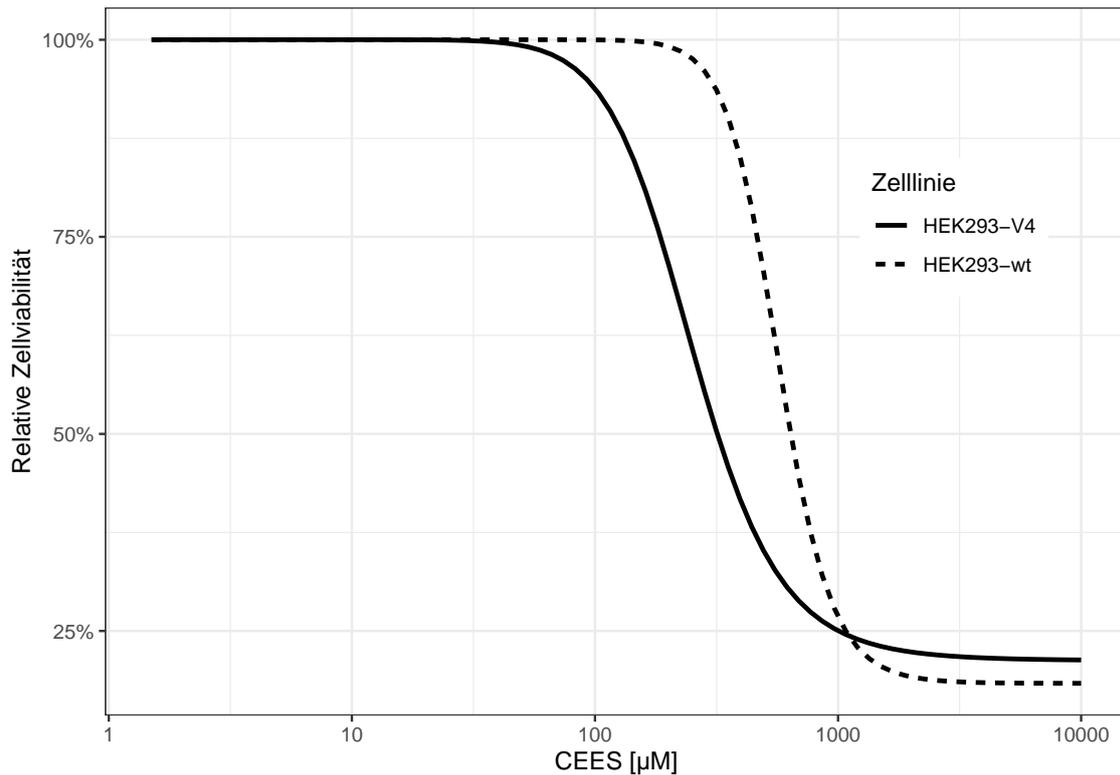


**Abbildung 3.55:** Maxima der relativen Stromstärke nach Injektion von 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A ( $\pm$  5 mM CEES-Präinkubation für 30 Minuten) für A549-Zellen.  $n_{bio} = 2-3$ .

### 3.6 Zellviabilität

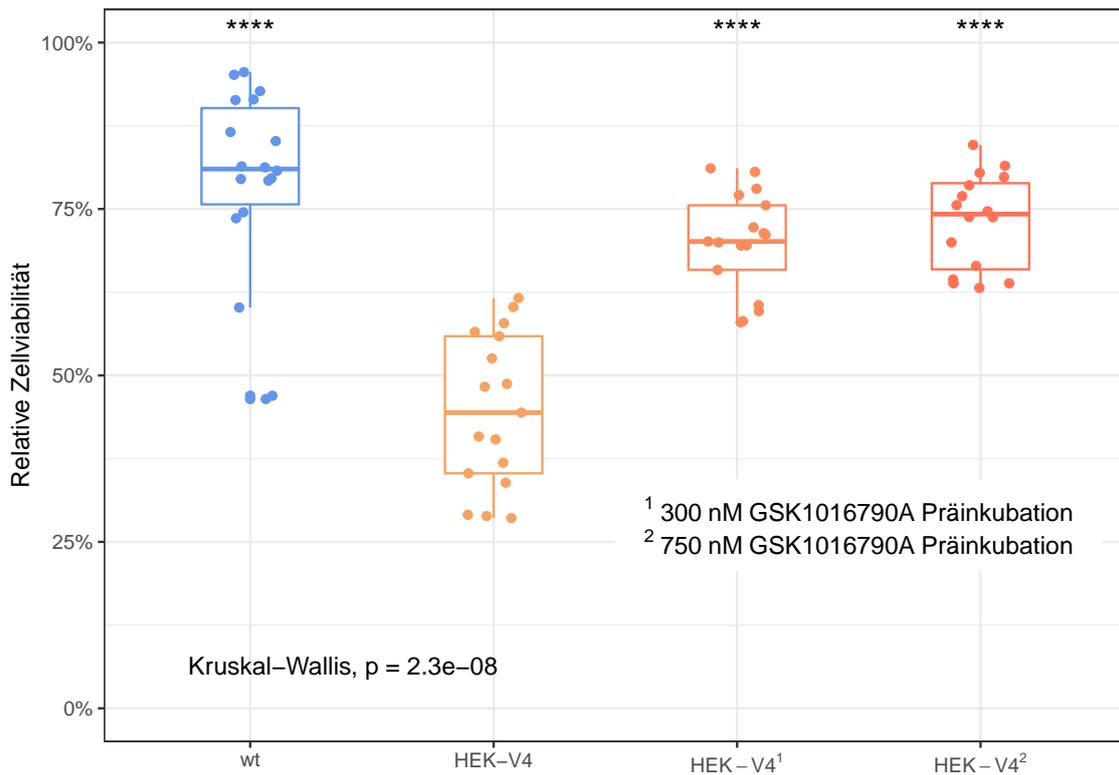
Um mögliche Auswirkungen von CEES auf die Zellviabilität der Zelllinie HEK293-V4 zu untersuchen, wurden wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, mehrere Konzentrationen der Substanz zur Vergiftung verwendet.

Abbildung 3.56 zeigt für die beiden Zelllinien HEK293-wt und HEK293-V4 die jeweilige Regressionsanalyse der Einzelwerte der relativen Zellviabilität nach 24-stündiger Exposition mit verschiedenen Konzentrationen CEES. Als relative Zellviabilität wird hier der prozentuale Anteil an der Viabilität von unbehandelten Zellen der jeweiligen Zelllinie verstanden. Die Größe der Stichprobe betrug  $n_{bio} = 16-18$ .



**Abbildung 3.56:** Relative Zellviabilität als prozentualer Anteil der Viabilität von nicht mit CEES vergifteten Zellen der Zelllinien HEK293-wt und HEK293-V4 nach 24-stündiger Exposition mit verschiedenen CEES-Konzentrationen.

Abbildung 3.57 präsentiert eine Auswahl der Daten aus Abbildung 3.56 bei Exposition mit 370,37  $\mu\text{M}$  ( $\sim 370 \mu\text{M}$ ) CEES. Zunächst sieht man den Vergleich der Zelllinien HEK293-wt beziehungsweise HEK293-V4. Ebenso dargestellt sind für die Zelllinie HEK293-V4 zwei Konditionen mit Präinkubation der Zellen mit 300 nM und 750 nM GSK1016790A. Diese wurden für die Exposition mit CEES bei 370  $\mu\text{M}$  gesondert untersucht. Als relative Zellviabilität wird hier der prozentuale Anteil an der Viabilität von nicht mit CEES vergifteten Zellen der jeweiligen Zelllinie verstanden. Im Falle der Präinkubation mit GSK1016790A bedeutet eine Viabilität von 100 % also, dass die Zellen mit GSK1016790A behandelt wurden, nicht aber mit CEES. Die Größe der Stichprobe betrug  $n_{bio} = 16-18$ . Die statistische Analyse der Daten nach Kruskal-Wallis ergab einen signifikanten Unterschied zur Vergleichsgruppe HEK293-V4 (ohne Präinkubation).



**Abbildung 3.57:** Relative Zellviabilität als prozentualer Anteil der Viabilität von nicht mit CEES vergifteten Zellen der Zelllinien HEK293-wt und HEK293-V4 nach 24-stündiger Exposition mit 370  $\mu\text{M}$  CEES  $\pm$  GSK1016790A-Präinkubation.  $n_{bio} = 16-18$ . \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

## 4 Diskussion

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse des Projektes diskutiert und in Kontext mit dem aktuellen Stand der Forschung gesetzt.

### 4.1 Etablierung der Zelllinie HEK293-V4

Als erster Teil der Arbeit konnte die Etablierung der TRPV4-überexprimierenden Zelllinie HEK293-V4 erfolgreich abgeschlossen werden. Diese Zelllinie wurde für die meisten der nachfolgenden Untersuchungen benötigt.

Die stabile Expression von TRPV4 wurde auf verschiedenen Ebenen erfolgreich nachgewiesen. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass sowohl TRPV4-mRNA als auch TRPV4-Kanalprotein in den Zellen der transfizierten Zelllinie vorlag. Insbesondere wurde durch Sequenzierung nachgewiesen, dass die gesamte kodierende Sequenz von *TRPV4* unverändert im Vergleich zur Sequenz des transfizierten Plasmids vorlag.

Im Anschluss wurde auch die Funktionalität des transfizierten Proteins als Membrankanäle nachgewiesen:

1. Zunächst konnte der erwartete Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Aktivierung des Kanals durch den spezifischen TRPV4-Agonisten GSK1016790A beobachtet werden.
2. In einem zweiten Schritt wurde vor Injektion des Agonisten der spezifische TRPV4-Antagonist GSK2193874 injiziert. Das gemessene Lumineszenzsignal war wie erwartet dosisabhängig supprimierbar.
3. Ein Vergleich zur Zelllinie HEK293-wt konnte des Weiteren eine große Differenz der gemessenen  $Ca^{2+}$ -Signale nach GSK1016790A-Injektion darstellen.

Alle 3 Faktoren deuten auf einen spezifisch durch TRPV4-Membrankanäle verursachten  $Ca^{2+}$ -Einstrom hin [52, 166].

Das gemessene  $Ca^{2+}$ -Signal nach TRPV4-Aktivierung für die Zelllinie HEK293-V4 erreicht jeweils schnell ein Maximum und geht alsbald wieder auf Werte nahe der *baseline* zurück. Dieser Kurvenverlauf ist typisch für TRP-Kanäle [4].

Die Tatsache, dass auch für HEK293-wt-Zellen ein kleines TRPV4-spezifisches Signal verzeichnet werden konnte, ist nicht weiter verwunderlich und könnte durch eine geringe endogene Expression von TRPV4 in der Niere erklärt werden [17].

Für nachgeschaltete Untersuchungen wurde ein HEK293-V4-Zellpool mit besonders niedrigem  $EC_{50}$ -Wert ( $47,5 \pm 14$  nM) ausgewählt. Die Auswertung nach AUC der relativen Lumineszenz lag dabei im Bereich aus der Literatur bekannter Werte ( $\sim 5$  nM) [166]. Der im Vergleich höhere  $EC_{50}$ -Wert unserer Auswertung könnte durch viele Einflussfaktoren erklärt sein. Beispielhaft zu nennen wäre eine etwas niedrigere Transfektionseffizienz.

Ein Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte von GSK2193874 für die Zelllinie HEK293-V4 mit aus der Literatur bekannten Vergleichswerten [52] ist nur bedingt sinnvoll, da diese nicht wenig von den verwendeten Konzentrationen des Agonisten abhängen.

## 4.2 Inhibierender Effekt von CEES für TRPV4-vermitteltes Ca<sup>2+</sup>-Signal

Zunächst wurde ein möglicher agonistischer Effekt von CEES am TRPV4-Kanal untersucht. Eine ausführliche Literaturrecherche und Vorversuche des Instituts führten zur Formulierung der ursprünglichen Hypothese (s. Kapitel 1.4). Ein agonistischer Effekt von CEES konnte für die Zelllinie HEK293-V4 im Lumineszenzassay jedoch nicht nachgewiesen werden.

Um die möglichen Effekte von CEES auf Zellen der Zelllinie HEK293-V4 jedoch vollumfänglich im Lumineszenzassay zu untersuchen, wurde in einem zweiten Schritt ein möglicher antagonistischer Effekt untersucht.

Interessanter Weise wurde ein solcher nicht nur in dosisabhängiger Wirkung, sondern auch in Abhängigkeit zur Einwirkungsdauer vor Injektion von GSK1016790A festgestellt. Im Falle der nachgewiesenen Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde zusätzlich zum Nachweis im Lumineszenzassay der Ansatz der Patch-Clamp-Technik gewählt, um die Ergebnisse mit einer Methode zu verifizieren, die nicht auf einer 2. Transfektion mit Aequorin basiert. Dies gelang nicht nur durch die alternative Untersuchungsmethode, sondern auch mit einer alternativen Zelllinie (A549). Stenger *u. a.* [129] hatten diese Methodik für Untersuchungen im Zusammenhang mit alkylierenden Substanzen bereits ebenfalls im Einsatz. A549-Zellen weisen eine endogene Expression von TRPV4 auf und lassen somit vermuten, dass der Effekt auch im menschlichen Körper ähnlich aussehen könnte [167].

Der durch Einwirkungsdauer vermittelte Effekt kann durch mehrere Mechanismen erklärt sein:

Einer der Erklärungsansätze wäre ein enzymkinetischer. Durch die längere Inkubationszeit könnten immer weitere TRPV4-Proteine besetzt und eine spätere Aktivierung durch GSK1016790A dadurch verhindert werden. Auch eine kovalente Bindung mit möglicher konformationeller Änderung wäre denkbar.

Ein weiterer Erklärungsweg wäre eine toxische Wirkung von CEES auf HEK293-V4. Eine geringere Anzahl voll funktionstüchtiger Zellen in der untersuchten Suspension würde logischer Weise ein kleineres gemessenes Ca<sup>2+</sup>-Signal vermitteln. Diese Erklärungsmöglichkeit wären im Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur Zellviabilität, welche in Kapitel 4.3 diskutiert werden.

Möglich wäre auch eine Störung der Integrität der Zellmembran durch CEES. Diese könnte bewirken, dass der elektrochemische Gradient für Ca<sup>2+</sup> fällt und folglich nach Aktivierung von TRPV4 nur weniger Ca<sup>2+</sup> in die Zellen strömen kann.

## 4.3 Einfluss von CEES und GSK1016790A in Bezug auf Zellviabilität

Im Rahmen der Untersuchungen zur Zellviabilität im Zusammenhang mit CEES wurde eine erhöhte Suszeptibilität der Zelllinie HEK293-V4 im Vergleich zu HEK293-wt nachgewiesen. Diese Erkenntnis ist durch mehrere Ansätze erklärbar:

Erstens könnte eine gestörte Detoxifikation für die erhöhte Anfälligkeit von HEK293-V4 gegenüber CEES verantwortlich sein. Mutationen in zentralen Bereichen für die Expression von Enzymen für die Detoxifikation oder die Reparatur von DNA-Schäden könnten ein schnelleres Absterben der Zellen nach Behandlung mit CEES bewirken.

Ein zweiter Ansatz zur Erklärung wäre eine in HEK293-V4 erhöhte Zellmembranpermeabilität. Die Membranen von HEK293-wt-Zellen könnten resistenter sein, wodurch CEES langsamer ins Zellinnere eindringen und somit langsamer eine toxische Wirkung entfalten würde. Losgelöst davon könnten schlichtweg andere Signalwege, die durch die Vergiftung mit CEES angestoßen werden, zur unterschiedlichen Suszeptibilität gegenüber CEES führen. Um die genauen Ursachen unserer Beobachtung zu verstehen, sind ohne Zweifel weiter

Untersuchungen notwendig.

Eine weitere Entdeckung im Rahmen der Untersuchungen zur Zellviabilität war, dass das Überleben von HEK293-V4-Zellen nach Vergiftung mit CEES höher war, nachdem die Zellen mit GSK1016790A vorbehandelt wurden. Dabei stieg die protektive Wirkung von GSK1016790A mit der Konzentration. In diesem Zusammenhang liegt nahe, dass die einmalige Aktivierung der TRPV4-Kanäle diesen protektiven Effekt vermittelt. Mehrere Interpretationen dieser Einsicht sind möglich:

Einer der Erklärungsansätze wäre eine Internalisierung von TRPV4-Membrankanälen nach Aktivierung durch den spezifischen Agonisten. Dieser Mechanismus wurde bereits in der Literatur beschrieben und wäre auch im Zusammenhang mit einer Aktivierung durch GSK1016790A denkbar [177]. Je nach Grad der Aktivierung könnte ein Teil der Membrankanäle internalisiert werden und somit für eine nächste potentielle Aktivierung nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies könnte ein Schutzmechanismus der Zellen sein, denn zu große  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bewirken pathologische Prozesse [69, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 79]. Diese Kanalinternalisierung hätte den Nebeneffekt, dass auch der Effekt von CEES auf HEK293-V4-Zellen weniger schädlich wäre. Zellen der Zelllinie HEK293-V4 wären nach Internalisierung einiger TRPV4 Kanäle den Zellen der Zelllinie HEK293-wt ähnlicher und resistenter gegenüber einer Vergiftung durch CEES. Eine weitere mögliche Interpretation wäre ein sekundär inhibierender Effekt von GSK1016790A. Die Substanz könnte zu einem gewissen Teil an TRPV4 gebunden verbleiben und so eine Form der Enzymhemmung vermitteln.

#### 4.4 Kontext und Forschungsperspektiven

Wie in Kapitel 1.2.4 beschrieben, ist ein TRPV4 vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins Zellinnere in zu großem Maße schädlich. Pathologien wie Arteriosklerose, ARDS, COPD, Asthma oder fibrotische Prozesse sind die Folge [69, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 79]. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression von TRPV4 auch einen Vulnerabilitätsfaktor in Bezug auf die Vergiftung mit CEES darstellt.

Zwar ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen keine TRPV4-vermittelte Folge der Exposition mit CEES, wohl aber eine Folge, welche durch andere Kanäle vermittelt wird [129, 130].

Vor diesem Zusammenhang ist eine Beteiligung von TRPV4 an destruktiven Prozessen in indirekter Form durchaus denkbar. Um die möglichen zellulären Signalwege in Zusammenhang mit CEES besser zu verstehen sind weitere Untersuchungen unabdingbar.

Insbesondere die Erkenntnis, dass die Applikation von GSK1016790A mit einer Protektion von HEK293-V4-Zellen gegenüber CEES verbunden ist, bietet einen vielversprechenden Ansatz für weitere Untersuchungen zur Behandlung von Vergiftungen durch CEES und TRPV4-vermittelten Pathologien.

So könnte GSK1016790A auch übertragen auf den menschlichen Organismus protektive Prozesse vermitteln und beispielsweise zur Prävention genannter TRPV4-vermittelter Pathologien beitragen.

Vorausgesetzt es existieren keine zu großen adversen Effekte, könnte eine präventive systemische Gabe von GSK1016790A auch einen großen Nutzen bezüglich der Exposition mit CEES darstellen. Zumindest potenziell von einer Exposition bedrohte Personengruppen könnten von solch einer Maßnahme im Idealfall profitieren.

Der nachgewiesene antagonistische Effekt von CEES auf das TRPV4-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal wurde im Zusammenhang der Studien in einem System der Überexpression nachgewiesen. Um letztendlich zu beweisen, dass dieser Effekt von TRPV4 abhängig ist, bedarf es weiterer Untersuchungen. Diese könnten beispielsweise pharmakologischer Natur sein, oder sich auf andere Zellsysteme und Organismen konzentrieren.

Nachdem die Ausgangshypothese im Verlauf falsifiziert werden musste, bleibt offen, wie sich das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach Aktivierung durch CEES und vollständige Antagonisierung des TRPA1-Signals erklärt [129]. Neben TRPV4 existieren zahlreiche andere in der Lunge exprimierte Membrankanäle, die damit in Verbindung stehen könnten [130]. Aus der Gruppe der TRP-Kanäle lässt sich hier beispielsweise TRPV1 nennen. Weitere Untersuchungen mit dieser Fragestellung sind ohne Zweifel sinnvoll und notwendig.

## 5 Literatur

1. Himmel, N. J. & Cox, D. N. Transient receptor potential channels: current perspectives on evolution, structure, function and nomenclature. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **287**, 20201309. doi:10.1098/rspb.2020.1309 (2020).
2. Clapham, D. E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517–24. doi:10.1038/nature02196 (2003).
3. Damann, N., Voets, T. & Nilius, B. TRPs in our senses. *Curr Biol* **18**, R880–9. doi:10.1016/j.cub.2008.07.063 (2008).
4. D. J. Cosens, A. M. Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* **224**, 285–287. doi:10.1038/224285a0 (Okt. 1969).
5. Montell, C., Jones, K., Hafen, E. & Rubin, G. Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* **230**, 1040–1043. doi:10.1126/science.3933112 (Nov. 1985).
6. Levy, L. S. & Manning, J. E. Expression of a set of head-specific genes during *Drosophila* development. *Developmental Biology* **94**, 465–476. doi:10.1016/0012-1606(82)90363-3 (Dez. 1982).
7. Wong, F., Hokanson, K. M. & Chang, L. T. Molecular basis of an inherited retinal defect in *Drosophila*. *Investigative ophthalmology and visual science* **26**, 243–246 (2 Feb. 1985). ppublish.
8. Montell, C. & Rubin, G. M. Molecular characterization of the *drosophila trp* locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313–1323. doi:10.1016/0896-6273(89)90069-x (Apr. 1989).
9. Wong, F., Schaefer, E. L., Roop, B. C., LaMendola, J. N., Johnson-Seaton, D. & Shao, D. Proper function of the *drosophila trp* gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult. *Neuron* **3**, 81–94. doi:10.1016/0896-6273(89)90117-7 (Juli 1989).
10. Minke, B. & Selinger, Z. Chapter 5 Inositol lipid pathway in fly photoreceptors: Excitation, calcium mobilization and retinal degeneration. *Progress in Retinal Research* **11**, 99–124. doi:10.1016/0278-4327(91)90026-x (Jan. 1991).
11. Hardie, R. C. & Minke, B. The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* **8**, 643–651. doi:10.1016/0896-6273(92)90086-s (Apr. 1992).
12. Hardie, R. C. Whole-cell recordings of the light induced current in dissociated *Drosophila* photoreceptors: evidence for feedback by calcium permeating the light-sensitive channels. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **245**, 203–210. doi:10.1098/rspb.1991.0110 (Sep. 1991).
13. Hellmich, U. A. & Gaudet, R. in *Handbook of Experimental Pharmacology* 963–990 (Springer International Publishing, 2014). doi:10.1007/978-3-319-05161-1\_10.
14. Liedtke, W. B. & Heller, S. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades (2007). ppublish.
15. Kadowaki, T. Evolutionary dynamics of metazoan TRP channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **467**, 2043–2053. doi:10.1007/s00424-015-1705-5 (2015).

16. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry* **76**, 387–417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819 (2007).
17. Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M. & Heller, S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* **103**, 525–35. doi:10.1016/s0092-8674(00)00143-4 (2000).
18. *TRPV4 transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 [Homo Sapiens (human)] - gene - NCBI* 2004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59341>.
19. Dietrich, A., Steinritz, D. & Gudermann, T. Transient receptor potential (TRP) channels as molecular targets in lung toxicology and associated diseases. *Cell Calcium* **67**, 123–137. doi:10.1016/j.ceca.2017.04.005 (2017).
20. Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G. & Schaefer, M. Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *Journal of Cell Science* **118**, 917–928. doi:10.1242/jcs.01675 (2005).
21. Sullivan, J. M., Zimanyi, C. M., Aisenberg, W., Bears, B., Chen, D.-H., Day, J. W., Bird, T. D., Siskind, C. E., Gaudet, R. & Sumner, C. J. Novel mutations highlight the key role of the ankyrin repeat domain in TRPV4-mediated neuropathy. *Neurology Genetics* **1**, e29. doi:10.1212/nxg.0000000000000029 (2015).
22. Plant, T. D. & Strotmann, R. in *Transient Receptor Potential (TRP) Channels* 189–205 (Springer Berlin Heidelberg). doi:10.1007/978-3-540-34891-7\_11.
23. Stewart, A. P., Smith, G. D., Sandford, R. N. & Edwardson, J. M. Atomic force microscopy reveals the alternating subunit arrangement of the TRPP2-TRPV4 heterotetramer. *Biophys J* **99**, 790–7. doi:10.1016/j.bpj.2010.05.012 (2010).
24. Watanabe, H., Davis, J. B., Smart, D., Jerman, J. C., Smith, G. D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., Wissenbach, U., Prenen, J., Flockerzi, V., Droogmans, G., Benham, C. D. & Nilius, B. Activation of TRPV4 Channels (hVRL-2/mTRP12) by Phorbol Derivatives. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 13569–13577. doi:10.1074/jbc.m200062200 (2002).
25. Peng, J. B. in *Transient Receptor Potential Channels* 239–275 (Springer Netherlands, 2010). doi:10.1007/978-94-007-0265-3\_14.
26. Phelps, C. B., Wang, R. R., Choo, S. S. & Gaudet, R. Differential Regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 Sensitivity through a Conserved Binding Site on the Ankyrin Repeat Domain. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 731–740. doi:10.1074/jbc.m109.052548 (2010).
27. Strotmann, R., Schultz, G. & Plant, T. D. Ca<sup>2+</sup>-dependent Potentiation of the Non-selective Cation Channel TRPV4 Is Mediated by a C-terminal Calmodulin Binding Site. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 26541–26549. doi:10.1074/jbc.m302590200 (2003).
28. Vriens, J., Owsianik, G., Janssens, A., Voets, T. & Nilius, B. Determinants of 4alpha-Phorbol Sensitivity in Transmembrane Domains 3 and 4 of the Cation Channel TRPV4. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 12796–12803. doi:10.1074/jbc.m610485200 (2007).
29. Nakashimo, Y., Takumida, M., Fukui, T., Anniko, M. & Hirakawa, K. Expression of transient receptor potential channel vanilloid (TRPV) 1-4, melastin (TRPM) 5 and 8, and ankyrin (TRPA1) in the normal and methimazole-treated mouse olfactory epithelium. *Acta Oto-Laryngologica* **130**, 1278–1286. doi:10.3109/00016489.2010.489573 (2010).

30. Güler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M. & Caterina, M. Heat-Evoked Activation of the Ion Channel, TRPV4. *The Journal of Neuroscience* **22**, 6408–6414. doi:10.1523/jneurosci.22-15-06408.2002 (2002).
31. Sibbald, J., Hubbard, J. & Sirett, N. Responses from osmosensitive neurons of the rat subfornical organ in vitro. *Brain Research* **461**, 205–214. doi:10.1016/0006-8993(88)90251-x (1988).
32. Bourque, C. W., & Oliet, S. H. R. OSMORECEPTORS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Annual Review of Physiology* **59**, 601–619. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.601 (1997).
33. Denton, D. A., McKinley, M. J. & Weisinger, R. S. Hypothalamic integration of body fluid regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 7397–7404. doi:10.1073/pnas.93.14.7397 (1996).
34. McKinley, M., Bicknell, R., Hards, D., McAllen, R., Vivas, L., Weisinger, R. & Oldfield, B. in *Progress in Brain Research* 395–402 (Elsevier, 1992). doi:10.1016/s0079-6123(08)62358-4.
35. Hori, A., Minato, K. & Kobayashi, S. Warming-activated channels of warm-sensitive neurons in rat hypothalamic slices. *Neuroscience Letters* **275**, 93–96. doi:10.1016/s0304-3940(99)00732-6 (1999).
36. Köhler, R., Heyken, W.-T., Heinau, P., Schubert, R., Si, H., Kacik, M., Busch, C., Grgic, I., Maier, T. & Hoyer, J. Evidence for a Functional Role of Endothelial Transient Receptor Potential V4 in Shear Stress-Induced Vasodilatation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 1495–1502. doi:10.1161/01.atv.0000225698.36212.6a (2006).
37. Marrelli, S. P., O'Neil, R. G., Brown, R. C. & Bryan, R. M. PLA2 and TRPV4 channels regulate endothelial calcium in cerebral arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **292**, H1390–H1397. doi:10.1152/ajpheart.01006.2006 (2007).
38. Todaka, H., Taniguchi, J., Ichi Satoh, J., Mizuno, A. & Suzuki, M. Warm Temperature-sensitive Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Plays an Essential Role in Thermal Hyperalgesia. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 35133–35138. doi:10.1074/jbc.m406260200 (2004).
39. Alessandri-Haber, N. A Transient Receptor Potential Vanilloid 4-Dependent Mechanism of Hyperalgesia Is Engaged by Concerted Action of Inflammatory Mediators. *Journal of Neuroscience* **26**, 3864–3874. doi:10.1523/jneurosci.5385-05.2006 (2006).
40. Alessandri-Haber, N., Yeh, J. J., Boyd, A. E., Parada, C. A., Chen, X., Reichling, D. B. & Levine, J. D. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* **39**, 497–511 (2003).
41. Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K. & Imai, M. Impaired Pressure Sensation in Mice Lacking TRPV4. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 22664–22668. doi:10.1074/jbc.m302561200 (2003).
42. Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T. & Nilius, B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**, 434–438. doi:10.1038/nature01807 (2003).
43. Bang, S, Yoo, S, Yang, T., Cho, H & Hwang, S. Nociceptive and pro-inflammatory effects of dimethylallyl pyrophosphate via TRPV4 activation. *British Journal of Pharmacology* **166**, 1433–1443. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01884.x (2012).

44. Thorneloe, K. S., Sulpizio, A. C., Lin, Z., Figueroa, D. J., Clouse, A. K., McCafferty, G. P., Chendrimada, T. P., Lashinger, E. S. R., Gordon, E., Evans, L., Misajet, B. A., DeMarini, D. J., Nation, J. H., Casillas, L. N., Marquis, R. W., Votta, B. J., Sheardown, S. A., Xu, X., Brooks, D. P., Laping, N. J. & Westfall, T. D. N-(1S)-1-[4-((2S)-2-[(2,4-dichlorophenyl)sulfonyl]amino-3-hydroxypropanoyl)-1-piperazinyl]carbonyl-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a Novel and Potent Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channel Agonist Induces Urinary Bladder Contraction and Hyperactivity: Part I. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **326**, 432–442. doi:10.1124/jpet.108.139295 (2008).
45. Smith, P. L., Maloney, K. N., Pothen, R. G., Clardy, J. & Clapham, D. E. Bisandrographolide from *Andrographis paniculata* Activates TRPV4 Channels. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 29897–29904. doi:10.1074/jbc.M605394200 (2006).
46. Ma, X., He, D., Ru, X., Chen, Y., Cai, Y., Bruce, I. C., Xia, Q., Yao, X. & Jin, J. Apigenin, a plant-derived flavone, activates transient receptor potential vanilloid 4 cation channel. *British Journal of Pharmacology* **166**, 349–358. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01767.x (2012).
47. Klausen, T. K., Pagani, A., Minassi, A., Ech-Chahad, A., Prenen, J., Owsianik, G., Hoffmann, E. K., Pedersen, S. F., Appendino, G. & Nilius, B. Modulation of the Transient Receptor Potential Vanilloid Channel TRPV4 by 4 $\alpha$ -Phorbol Esters: A Structure-Activity Study. *Journal of Medicinal Chemistry* **52**, 2933–2939. doi:10.1021/jm9001007 (2009).
48. Vincent, F., Acevedo, A., Nguyen, M. T., Dourado, M., DeFalco, J., Gustafson, A., Spiro, P., Emerling, D. E., Kelly, M. G. & Duncton, M. A. Identification and characterization of novel TRPV4 modulators. *Biochem Biophys Res Commun* **389**, 490–4. doi:10.1016/j.bbrc.2009.09.007 (2009).
49. Gao, X., Wu, L. & O’Neil, R. G. Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* **278**, 27129–37. doi:10.1074/jbc.M302517200 (2003).
50. Bang, S., Yoo, S., Yang, T., Cho, H., Kim, Y. & Hwang, S. Resolvin D1 attenuates activation of sensory transient receptor potential channels leading to multiple antinociception. *British Journal of Pharmacology* **161**, 707–720. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00909.x (2010).
51. Huh, D., Leslie, D. C., Matthews, B. D., Fraser, J. P., Jurek, S., Hamilton, G. A., Thorneloe, K. S., McAlexander, M. A. & Ingber, D. E. A Human Disease Model of Drug Toxicity-Induced Pulmonary Edema in a Lung-on-a-Chip Microdevice. *Science Translational Medicine* **4**. doi:10.1126/scitranslmed.3004249 (2012).
52. Thorneloe, K. S., Cheung, M., Bao, W., Alsaïd, H., Lenhard, S., Jian, M.-Y., Costell, M., Mascalco-Hauk, K., Krawiec, J. A., Olzinski, A., Gordon, E., Lozinskaya, I., Elefante, L., Qin, P., Matasic, D. S., James, C., Tunstead, J., Donovan, B., Kallal, L., Waszkiewicz, A., Vaidya, K., Davenport, E. A., Larkin, J., Burgert, M., Casillas, L. N., Marquis, R. W., Ye, G., Eidam, H. S., Goodman, K. B., Toomey, J. R., Roethke, T. J., Jucker, B. M., Schnackenberg, C. G., Townsley, M. I., Lepore, J. J. & Willette, R. N. An Orally Active TRPV4 Channel Blocker Prevents and Resolves Pulmonary Edema Induced by Heart Failure. *Science Translational Medicine* **4**, 159ra148–159ra148. doi:10.1126/scitranslmed.3004276 (Nov. 2012).

53. Everaerts, W., Zhen, X., Ghosh, D., Vriens, J., Gevaert, T., Gilbert, J. P., Hayward, N. J., McNamara, C. R., Xue, F., Moran, M. M., Strassmaier, T., Uykai, E., Owsianik, G., Vennekens, R., Ridder, D. D., Nilius, B., Fanger, C. M. & Voets, T. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 19084–19089. doi:10.1073/pnas.1005333107 (2010).
54. Wei, Z. L., Nguyen, M. T., O'Mahony, D. J., Acevedo, A., Zipfel, S., Zhang, Q., Liu, L., Dourado, M., Chi, C., Yip, V., DeFalco, J., Gustafson, A., Emerling, D. E., Kelly, M. G., Kincaid, J., Vincent, F. & Duncton, M. A. Identification of orally-bioavailable antagonists of the TRPV4 ion-channel. *Bioorg Med Chem Lett* **25**, 4011–5. doi:10.1016/j.bmc.2015.06.098 (2015).
55. Phan, M. N., Leddy, H. A., Votta, B. J., Kumar, S., Levy, D. S., Lipshutz, D. B., Lee, S. H., Liedtke, W. & Guilak, F. Functional characterization of TRPV4 as an osmotically sensitive ion channel in porcine articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* **60**, 3028–3037. doi:10.1002/art.24799 (2009).
56. Stotz, S. C., Vriens, J., Martyn, D., Clardy, J. & Clapham, D. E. Citral Sensing by TRANSient Receptor Potential Channels in Dorsal Root Ganglion Neurons. *PLoS ONE* **3** (Hrsg. Greene, E.) e2082. doi:10.1371/journal.pone.0002082 (2008).
57. Berrout, J., Jin, M., Mamenko, M., Zaika, O., Pochynyuk, O. & O'Neil, R. G. Function of transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4) as a mechanical transducer in flow-sensitive segments of renal collecting duct system. *J Biol Chem* **287**, 8782–91. doi:10.1074/jbc.M111.308411 (2012).
58. Hartmannsgruber, V., Heyken, W.-T., Kacik, M., Kaistha, A., Grgic, I., Harteneck, C., Liedtke, W., Hoyer, J. & Köhler, R. Arterial Response to Shear Stress Critically Depends on Endothelial TRPV4 Expression. *PLoS ONE* **2** (Hrsg. Mansvelder, H.) e827. doi:10.1371/journal.pone.0000827 (2007).
59. Mendoza, S. A., Fang, J., Gutterman, D. D., Wilcox, D. A., Bubolz, A. H., Li, R., Suzuki, M. & Zhang, D. X. TRPV4-mediated endothelial Ca<sup>2+</sup> influx and vasodilation in response to shear stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **298**, H466–H476. doi:10.1152/ajpheart.00854.2009 (2010).
60. Falcone, J. C., Kuo, L. & Meininger, G. A. Endothelial cell calcium increases during flow-induced dilation in isolated arterioles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **264**, H653–H659. doi:10.1152/ajpheart.1993.264.2.h653 (1993).
61. Muller, J. M., Davis, M. J., Kuo, L. & Chilian, W. M. Changes in coronary endothelial cell Ca<sup>2+</sup> concentration during shear stress- and agonist-induced vasodilation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **276**, H1706–H1714. doi:10.1152/ajpheart.1999.276.5.h1706 (1999).
62. Fleming, I., Bauersachs, J., Fisslthaler, B. & Busse, R. Ca<sup>2+</sup>-Independent Activation of the Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Tyrosine Phosphatase Inhibitors and Fluid Shear Stress. *Circulation Research* **82**, 686–695. doi:10.1161/01.res.82.6.686 (1998).
63. Xu, H., Zhao, H., Tian, W., Yoshida, K., Rouillet, J.-B. & Cohen, D. M. Regulation of a Transient Receptor Potential (TRP) Channel by Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 11520–11527. doi:10.1074/jbc.m211061200 (2003).
64. Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Droogmans, G., Voets, T. & Nilius, B. Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 396–401. doi:10.1073/pnas.0303329101 (2003).

65. Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G. & Plant, T. D. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nature Cell Biology* **2**, 695–702. doi:10.1038/35036318 (2000).
66. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. & Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816–824. doi:10.1038/39807 (1997).
67. Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I. & Julius, D. The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron* **21**, 531–543. doi:10.1016/s0896-6273(00)80564-4 (1998).
68. Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J. & Julius, D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**, 436–441. doi:10.1038/18906 (1999).
69. Rao, Y., Gai, X., Xiong, J., Le, Y. & Sun, Y. Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 4 Mediates Pyroptosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Frontiers in Physiology* **12**. doi:10.3389/fphys.2021.783891 (2021).
70. Swain, S. M., Romac, J. M.-J., Shahid, R. A., Pandol, S. J., Liedtke, W., Vigna, S. R. & Liddle, R. A. TRPV4 channel opening mediates pressure-induced pancreatitis initiated by Piezo1 activation. *Journal of Clinical Investigation* **130**, 2527–2541. doi:10.1172/jci134111 (2020).
71. Wang, Z., Zhou, L., An, D., Xu, W., Wu, C., Sha, S., Li, Y., Zhu, Y., Chen, A., Du, Y., Chen, L. & Chen, L. TRPV4-induced inflammatory response is involved in neuronal death in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Cell Death & Disease* **10**. doi:10.1038/s41419-019-1612-3 (2019).
72. Pairet, N., Mang, S., Fois, G., Keck, M., Kühnbach, M., Gindele, J., Frick, M., Dietl, P. & Lamb, D. J. TRPV4 inhibition attenuates stretch-induced inflammatory cellular responses and lung barrier dysfunction during mechanical ventilation. *PLOS ONE* **13** (Hrsg. Ryffel, B.) e0196055. doi:10.1371/journal.pone.0196055 (2018).
73. Godo, S. & Shimokawa, H. Endothelial Functions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **37**. doi:10.1161/atvbaha.117.309813 (2017).
74. Lu, T., Zhang, Y., Su, Y., Zhou, D. & Xu, Q. Role of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in cardiovascular disease. *Cell Communication and Signaling* **20**. doi:10.1186/s12964-022-00829-z (2022).
75. Alvarez, D. F., King, J. A., Weber, D., Addison, E., Liedtke, W. & Townsley, M. I. Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury. *Circ Res* **99**, 988–95. doi:10.1161/01.Res.0000247065.11756.19 (2006).
76. Balakrishna, S., Song, W., Achanta, S., Doran, S. F., Liu, B., Kaelberer, M. M., Yu, Z., Sui, A., Cheung, M., Leishman, E., Eidam, H. S., Ye, G., Willette, R. N., Thorne-Loe, K. S., Bradshaw, H. B., Matalon, S. & Jordt, S.-E. TRPV4 inhibition counteracts edema and inflammation and improves pulmonary function and oxygen saturation in chemically induced acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **307**, L158–L172. doi:10.1152/ajplung.00065.2014 (2014).
77. Zhan, L. & Li, J. The role of TRPV4 in fibrosis. *Gene* **642**, 1–8. doi:10.1016/j.gene.2017.10.067 (2018).

78. Rahaman, S. O., Grove, L. M., Paruchuri, S., Southern, B. D., Abraham, S., Niese, K. A., Scheraga, R. G., Ghosh, S., Thodeti, C. K., Zhang, D. X., Moran, M. M., Schilling, W. P., Tschumperlin, D. J. & Olman, M. A. TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice. *J Clin Invest* **124**, 5225–38. doi:10.1172/jci75331 (2014).
79. Yao, L., Chen, S., Tang, H., Huang, P., Wei, S., Liang, Z., Chen, X., Wang, H., Tao, A., Chen, R. & Zhang, Q. Transient Receptor Potential Ion Channels Mediate Adherens Junctions Dysfunction in a Toluene Diisocyanate-Induced Murine Asthma Model. *Toxicological Sciences* **168**, 160–170. doi:10.1093/toxsci/kfy285 (2018).
80. Baxter, M., Eltom, S., Dekkak, B., Yew-Booth, L., Dubuis, E. D., Maher, S. A., Belvisi, M. G. & Birrell, M. A. Role of transient receptor potential and pannexin channels in cigarette smoke-triggered ATP release in the lung. *Thorax* **69**, 1080–1089. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-205467 (2014).
81. GESTIS. Bis(2-chlorethyl)sulfid. <https://gestis.dguv.de/data?name=510748> (Okt. 2022).
82. Eidgenössische Institut für ABC-Schutz. Factsheet SENFGAS. [https://www.spiezlab.admin.ch/content/spiezlab-internet/de/publikationen/factsheetsposters/\\_jcr\\_content/contentPar/accordion/accordionItems/70\\_1597846000705/accordionPar/downloadlist\\_copy/downloadItems/85\\_1597846458640.download/Factsheet\\_Senfgas\\_de.pdf](https://www.spiezlab.admin.ch/content/spiezlab-internet/de/publikationen/factsheetsposters/_jcr_content/contentPar/accordion/accordionItems/70_1597846000705/accordionPar/downloadlist_copy/downloadItems/85_1597846458640.download/Factsheet_Senfgas_de.pdf) (2015).
83. Kehe, K., Balszuweit, F., Steinritz, D. & Thiermann, H. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology* **263**, 12–19. doi:10.1016/j.tox.2009.01.019 (2009).
84. Naderi, M., Jadidi, K., Falahati, F. & Alavi, S. A. The effect of sulfur mustard and nitrogen mustard on corneal collagen degradation induced by the enzyme collagenase. *Cutaneous and Ocular Toxicology* **29**, 234–240. doi:10.3109/15569527.2010.491102 (2010).
85. Hefazi, M., Maleki, M., Mahmoudi, M., Tabatabaee, A. & Balali-Mood, M. Delayed complications of sulfur mustard poisoning in the skin and the immune system of Iranian veterans 16-20 years after exposure. *International Journal of Dermatology* **45**, 1025–1031. doi:10.1111/j.1365-4632.2006.03020.x (2006).
86. B, P., AJ, F., SI, R. & RD, F. *Medical Defense Against Mustard Gas: Toxic Mechanisms and Pharmacological Implications* 1991.
87. Kilic, E., Ortatatli, M., Sezigen, S., Eyison, R. K. & Kenar, L. Acute intensive care unit management of mustard gas victims: the Turkish experience. *Cutaneous and Ocular Toxicology* **37**, 332–337. doi:10.1080/15569527.2018.1464018 (2018).
88. Pechura, C. M. & Rall, D. P. Veterans at Risk: The Health Effects of Mustard Gas and Lewisite. *National Academies Press (US)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK236059/> (1993).
89. Eisenmenger, W., Drasch, G., von Clarmann, M., Kretschmer, E. & Roieder, G. Clinical and morphological findings on mustard gas [bis(2-chloroethyl)sulfide] poisoning. *Journal of forensic sciences* **36**, 1688–1698 (6 Nov. 1991). ppublish.
90. Butt, Y., Kurdowska, A. & Allen, T. C. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **140**, 345–350. doi:10.5858/arpa.2015-0519-ra (2016).

91. Chao Mao, G., chu Gong, C., Wang, Z., xue Sun, M., peng Pei, Z., qi Meng, W., feng Cen, J., wen He, X., Lu, Y., qiang Xu, Q. & Xiao, K. BMSC-derived exosomes ameliorate sulfur mustard-induced acute lung injury by regulating the GPRC5A–YAP axis. *Acta Pharmacologica Sinica* **42**, 2082–2093. doi:10.1038/s41401-021-00625-4 (2021).
92. Tomashefski, J. F. PULMONARY PATHOLOGY OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME. *Clinics in Chest Medicine* **21**, 435–466. doi:10.1016/s0272-5231(05)70158-1 (2000).
93. Rowell, M., Kehe, K., Balszuweit, F. & Thiermann, H. The chronic effects of sulfur mustard exposure. *Toxicology* **263**, 9–11. doi:10.1016/j.tox.2009.05.015 (2009).
94. KRUMBHAAR, E. B. RÔLE OF THE BLOOD AND THE BONE MARROW IN CERTAIN FORMS OF GAS POISONING. *Journal of the American Medical Association* **72**, 39. doi:10.1001/jama.1919.26110010018009f (1919).
95. Evison, D. Regular review: Chemical weapons. *BMJ* **324**, 332–335. doi:10.1136/bmj.324.7333.332 (2002).
96. Lomash, V., Deb, U., Rai, R., Jadhav, S. E., Vijayaraghavan, R. & Pant, S. Designing of mouse model: A new approach for studying sulphur mustard-induced skin lesions. *Burns* **37**, 851–864. doi:10.1016/j.burns.2010.12.010 (2011).
97. Sharma, D. R., Sunkaria, A., Bal, A., Bhutia, Y. D., Vijayaraghavan, R., Flora, S. & Gill, K. D. Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of pro-apoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain. *Toxicology and Applied Pharmacology* **240**, 208–218. doi:10.1016/j.taap.2009.06.015 (2009).
98. Leffmann, H. Callinicus. A defence of chemical warfare. **199**, 712. doi:10.1016/s0016-0032(25)91233-1 (1925).
99. Anderson, D. R., Holmes, W. W., Lee, R. B., Dalal, S. J., Hurst, C. G., Maliner, B. I., Newmark, J. & Smith, W. J. Sulfur Mustard-Induced Neutropenia: Treatment with Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Military Medicine* **171**, 448–453. doi:10.7205/milmed.171.5.448 (2006).
100. Tewari-Singh, N., Inturi, S., Jain, A. K., Agarwal, C., Orlicky, D. J., White, C. W., Agarwal, R. & Day, B. J. Catalytic antioxidant AEOL 10150 treatment ameliorates sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-associated cutaneous toxic effects. *Free Radical Biology and Medicine* **72**, 285–295. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.022 (2014).
101. Pohanka, M. Antioxidants Countermeasures Against Sulfur Mustard. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **12**, 742–748. doi:10.2174/138955712801264783 (2012).
102. Ghanei, M., Rajaeinejad, M., Motiei-Langroudi, R., Alaeddini, F. & Aslani, J. Helium: oxygen versus air: oxygen noninvasive positive-pressure ventilation in patients exposed to sulfur mustard. *Heart & Lung* **40**, e84–e89. doi:10.1016/j.hrtlng.2010.04.001 (2011).
103. Mellor, S., Rice, P. & Cooper, G. Vesicant burns. *British Journal of Plastic Surgery* **44**, 434–437. doi:10.1016/0007-1226(91)90202-u (1991).
104. Rice, P., Brown, R., Lam, D., Chilcott, R. & Bennett, N. Dermabrasion — a novel concept in the surgical management of sulphur mustard injuries. *Burns* **26**, 34–40. doi:10.1016/s0305-4179(99)00096-0 (2000).
105. Newman-Taylor, A. & Morris, A. Experience with mustard gas casualties. *The Lancet* **337**, 242. doi:10.1016/0140-6736(91)92210-s (1991).

106. Fischer, K. Wilhelm Steinkopf. *Sächsische Biografie*. [https://saebi.isgv.de/biografie/Wilhelm\\_Steinkopf\\_\(1879-1949\)](https://saebi.isgv.de/biografie/Wilhelm_Steinkopf_(1879-1949)) (Juni 2004).
107. Kaiser, J. As Syria Crisis Mounts, Scientist Looks Back at Last Major Chemical Attack. *Science* **341**, 1051–1051. doi:10.1126/science.341.6150.1051 (2013).
108. Technical Secretariat. Report of the OPCW fact-finding mission in Syria regarding alleged incidents in Marea, Syrian Arab Republic August 2015. [https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/2018/11/s-1320-2015\\_e\\_.pdf](https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/2018/11/s-1320-2015_e_.pdf) (Aug. 2015).
109. Chemical Weapons Convention. <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention> (Nov. 2022).
110. OPCW by the Numbers. <https://www.opcw.org/media-centre/opcw-numbers> (Nov. 2022).
111. Stewart, C. E. *Weapons of mass casualties and terrorism response handbook* Includes bibliographical references and index. XVII, 286 (Jones und Bartlett, Sudbury, Mass. [u.a.], 2006).
112. Somani, S. M. & Babu, S. R. Toxicodynamics of sulfur mustard. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology* **27**, 419–435 (9 Sep. 1989). ppublish.
113. Dacre, J. C. & Goldman, M. Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard. *Pharmacological reviews* **48**, 289–326 (2 Juni 1996). ppublish.
114. Black, R., Hambrook, J., Howells, D. & Read, R. Biological Fate of Sulfur Mustard, 1,1'-Thiobis(2-chloroethane). Urinary Excretion Profiles of Hydrolysis Products and beta-Lyase Metabolites of Sulfur Mustard after Cutaneous Application in Rats. *Journal of Analytical Toxicology* **16**, 79–84. doi:10.1093/jat/16.2.79 (1992).
115. Black, R. M. & Read, R. W. Biological fate of sulphur mustard, 1,1'-thiobis(2-chloroethane): identification of beta-lyase metabolites and hydrolysis products in human urine. *Xenobiotica* **25**, 167–173. doi:10.3109/00498259509061842 (1995).
116. Barr, J. R., Pierce, C. L., Smith, J. R., Capacio, B. R., Woolfitt, A. R., Solano, M. I., Wooten, J. V., Lemire, S. W., Thomas, J. D., Ash, D. H. & Ashley, D. L. Analysis of urinary metabolites of sulfur mustard in two individuals after accidental exposure. *Journal of analytical toxicology* **32**, 10–16 (1 2008). ppublish.
117. Laskin, J. D., Black, A. T., Jan, Y.-H., Sinko, P. J., Heindel, N. D., Sunil, V., Heck, D. E. & Laskin, D. L. Oxidants and antioxidants in sulfur mustard-induced injury. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1203**, 92–100. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05605.x (2010).
118. Hamza, A., Broch, H. & Vasilescu, D. Quantum molecular study of S-methylated forms of sulfur mustard. *Chemical Physics* **204**, 373–389. doi:10.1016/0301-0104(95)00338-x (1996).
119. Ludlum, D. B., Austin-Ritchie, P., Hagopian, M., Niu, T.-Q. & Yu, D. Detection of sulfur mustard-induced DNA modifications. *Chemico-Biological Interactions* **91**, 39–49. doi:10.1016/0009-2797(94)90005-1 (1994).
120. Matijasevic, Z., Stering, A., Niu, T.-Q., Austin-Ritchie, P. & Ludlum, D. B. Release of sulfur mustard-modified DNA bases by Escherichia coli 3-methyladenine DNA glycosylase II. *Carcinogenesis* **17**, 2249–2252. doi:10.1093/carcin/17.10.2249 (1996).
121. Jowsey, P. A., Williams, F. M. & Blain, P. G. DNA damage, signalling and repair after exposure of cells to the sulphur mustard analogue 2-chloroethyl ethyl sulphide. *Toxicology* **257**, 105–112. doi:10.1016/j.tox.2008.12.001 (2009).

122. Isabelle, M., Moreel, X., Gagné, J.-P., Rouleau, M., Ethier, C., Gagné, P., Hendzel, M. J. & Poirier, G. G. Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry. *Proteome Science* **8**. doi:10.1186/1477-5956-8-22 (2010).
123. Hinshaw, D. B., Lodhi, I. J., Hurley, L. L., Atkins, K. B. & Dabrowska, M. I. Activation of Poly [ADP-Ribose] Polymerase in Endothelial Cells and Keratinocytes: Role in an In Vitro Model of Sulfur Mustard-Mediated Vesiculation. *Toxicology and Applied Pharmacology* **156**, 17–29. doi:10.1006/taap.1999.8634 (1999).
124. Cole, K. K. & Perez-Polo, J. R. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury. *Journal of Neurochemistry* **82**, 19–29. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.00935.x (2002).
125. Korkmaz, A., Yaren, H., Kunak, Z., Uysal, B., Kurt, B., Topal, T., Kenar, L., Ucar, E. & Oter, S. Epigenetic perturbations in the pathogenesis of mustard toxicity; hypothesis and preliminary results. *Interdisciplinary Toxicology* **1**. doi:10.2478/v10102-010-0048-5 (2008).
126. Wormser, U., Brodsky, B., Proscura, E., Foley, J. F., Jones, T. & Nyska, A. Involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  in sulfur mustard-induced skin lesion; effect of topical iodine. *Archives of Toxicology* **79**, 660–670. doi:10.1007/s00204-005-0681-5 (2005).
127. Ahmad, S. & Ahmad, A. Emerging targets for treating sulfur mustard-induced injuries. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1374**, 123–131. doi:10.1111/nyas.13095 (2016).
128. Wang, Q.-Q., Begum, R. A., Day, V. W. & Bowman-James, K. Sulfur, oxygen, and nitrogen mustards: stability and reactivity. *Organic and Biomolecular Chemistry* **10**, 8786. doi:10.1039/c2ob26482j (2012).
129. Stenger, B., Zehfuss, F., Muckter, H., Schmidt, A., Balszuweit, F., Schafer, E., Buch, T., Gudermann, T., Thiermann, H. & Steinritz, D. Activation of the chemosensing transient receptor potential channel A1 (TRPA1) by alkylating agents. *Arch Toxicol* **89**, 1631–43. doi:10.1007/s00204-014-1414-4 (2015).
130. Steinritz, D., Stenger, B., Dietrich, A., Gudermann, T. & Popp, T. TRPs in Tox: Involvement of Transient Receptor Potential-Channels in Chemical-Induced Organ Toxicity-A Structured Review. *Cells* **7**. doi:10.3390/cells7080098. [https://res.mdpi.com/d\\_attachment/cells/cells-07-00098/article\\_deploy/cells-07-00098.pdf](https://res.mdpi.com/d_attachment/cells/cells-07-00098/article_deploy/cells-07-00098.pdf) (2018).
131. Emmler, J., Hermanns, M. I., Steinritz, D., Kreppel, H., Kirkpatrick, C. J., Bloch, W., Szinicz, L. & Kehe, K. Assessment of Alterations in Barrier Functionality and Induction of Proinflammatory and Cytotoxic Effects After Sulfur Mustard Exposure of an In Vitro Coculture Model of the Human Alveolo-Capillary Barrier. *Inhalation Toxicology* **19**, 657–665. doi:10.1080/08958370701353726 (2007).
132. Ricketts, K. M., Santai, C. T., France, J. A., Graziosi, A. M., Doyel, T. D., Gazaway, M. Y. & Casillas, R. P. Inflammatory cytokine response in sulfur mustard-exposed mouse skin. *Journal of applied toxicology : JAT* **20 Suppl 1**, S73–S76. doi:10.1002/1099-1263(200012)20:1+<::aid-jat685>3.0.co;2-h (Dez. 2000). ppublish.
133. Mishra, N. C., Sima, J. R., March, T., Weber, W., Benson, J., Jaramillo, R., Seagrave, J.-C., Schultz, G., Grotendorst, G. & Sopori, M. Sulfur mustard induces immune sensitization in hairless guinea pigs. *International Immunopharmacology* **10**, 193–199. doi:10.1016/j.intimp.2009.10.015 (2010).
134. Wickham, H. *Ggplot2. elegant graphics for data analysis* 212 (Springer, 2009).

135. Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. & Gerhard, D. Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE* **10** (Hrsg. Xia, Y.) e0146021. doi:10.1371/journal.pone.0146021 (2015).
136. Ritz, C. & Streibig, J. C. Package 'drc'. <https://cran.r-project.org/web/packages/drc/drc.pdf> (Aug. 2016).
137. Drummond, J. E. Four Parameter Logistic Regression. <https://www.myassays.com/four-parameter-logistic-regression.html> (2022).
138. Schmidt, E. V., Christoph, G, Zeller, R & Leder, P. The cytomegalovirus enhancer: a pan-active control element in transgenic mice. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 4406–4411. doi:10.1128/mcb.10.8.4406 (Aug. 1990).
139. Buchman, A. R. & Berg, P. Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 4395–4405. doi:10.1128/mcb.8.10.4395 (Okt. 1988).
140. Huang, M. T. & Gorman, C. M. Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Research* **18**, 937–947. doi:10.1093/nar/18.4.937 (1990).
141. Bernstein, P. & Ross, J. Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends in Biochemical Sciences* **14**, 373–377. doi:10.1016/0968-0004(89)90011-x (Sep. 1989).
142. Jackson, R. J. & Standart, N. Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* **62**, 15–24. doi:10.1016/0092-8674(90)90235-7 (Juli 1990).
143. Davies, J. & Jimenez, A. A New Selective Agent for Eukaryotic Cloning Vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **29**, 1089–1092. doi:10.4269/ajtmh.1980.29.1089 (Sep. 1980).
144. Oswald, N. How to Make the Perfect Agar Plate Every Time. <https://bitesizebio.com/6938/how-to-make-the-perfect-agar-plate-every-time/> (Nov. 2020).
145. Hanahan, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557–580. doi:10.1016/s0022-2836(83)80284-8 (Juni 1983).
146. Chan, W.-T., Verma, C. S., Lane, D. P. & Gan, S. K.-E. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli. *Bioscience Reports* **33**. doi:10.1042/bsr20130098 (Dez. 2013).
147. Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110–4. doi:10.1073/pnas.69.8.2110 (1972).
148. Hennen, S., Wang, H., Peters, L., Merten, N., Simon, K., Spinrath, A., Blattermann, S., Akkari, R., Schrage, R., Schroder, R., Schulz, D., Vermeiren, C., Zimmermann, K., Kehraus, S., Drewke, C., Pfeifer, A., Konig, G. M., Mohr, K., Gillard, M., Muller, C. E., Lu, Q. R., Gomez, J. & Kostenis, E. Decoding Signaling and Function of the Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR17 with a Small-Molecule Agonist. *Science Signaling* **6**, ra93–ra93. doi:10.1126/scisignal.2004350 (Okt. 2013).
149. Chen, Q., Behar, K. L., Xu, T., Fan, C. & Haddad, G. G. Expression of Drosophila Trehalose-Phosphate Synthase in HEK-293 Cells Increases Hypoxia Tolerance. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 49113–49118. doi:10.1074/jbc.m308652200 (Sep. 2003).
150. Southern, P. J. & Berg, P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *Journal of molecular and applied genetics* **1**, 327–341 (4 1982).

151. Eipper, B. A., Perkins, S. N., Husten, E. J., Johnson, R. C., Keutmann, H. T. & Mains, R. E. Peptidyl-alpha-hydroxyglycine alpha-amidating lyase. Purification, characterization, and expression. *The Journal of biological chemistry* **266**, 7827–7833 (12 Apr. 1991). ppublish.
152. Kolakowski, L. F., O'Neill, G. P., Howard, A. D., Broussard, S. R., Sullivan, K. A., Feighner, S. D., Sawzdargo, M., Nguyen, T., Kargman, S., Shiao, L. L., Hreniuk, D. L., Tan, C. P., Evans, J., Abramovitz, M., Chateauneuf, A., Coulombe, N., Ng, G., Johnson, M. P., Tharian, A., Khoshbouei, H., George, S. R., Smith, R. G. & O'Dowd, B. F. Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *Journal of neurochemistry* **71**, 2239–2251. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.71062239.x (6 Dez. 1998). ppublish.
153. Cloning. [https://www.embl.de/pepcore/pepcore\\_services/cloning/pcr\\_strategy/primer\\_design/](https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/pcr_strategy/primer_design/) (Nov. 2020).
154. Paul, N., Shum, J. & Le, T. in *Methods in Molecular Biology* 301–318 (Humana Press, 2010). doi:10.1007/978-1-60761-629-0\_19.
155. Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. & Klenk, D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7 (Okt. 1985).
156. Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**, 223–239. doi:10.1002/jcp.1030590302 (Juni 1962).
157. Shimomura, O & Johnson, F. H. Regeneration of the photoprotein aequorin. *Nature* **256**, 236–238. doi:10.1038/256236a0 (Juli 1975).
158. Head, J. F., Inouye, S., Teranishi, K. & Shimomura, O. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. **405**, 372–376. doi:10.1038/35012659 (Mai 2000).
159. Baubet, V., Mouellic, H. L., Campbell, A. K., Lucas-Meunier, E., Fossier, P. & Brûlet, P. Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca<sup>2+</sup> reporters at the single-cell level. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 7260–7265. doi:10.1073/pnas.97.13.7260 (Juni 2000).
160. Shimomura, O & Johnson, F. H. Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **75**, 2611–2615. doi:10.1073/pnas.75.6.2611 (Juni 1978).
161. Campbell, A. K., Sala-Newby, G., Aston, P. J., Kalsheker, N., Kishi, Y. & Shimomura, O. FromLuc andPhot genes to the hospital bed. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **5**, 131–139. doi:10.1002/bio.1170050209 (Apr. 1990).
162. Kendall, J. M. & Badminton, M. N. Aequorea victoria bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends in Biotechnology* **16**, 216–224. doi:10.1016/s0167-7799(98)01184-6 (Dez. 1998).
163. Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. & Tsien, R. Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 448–455. doi:10.1016/s0968-0004(00)89099-4 (Nov. 1995).
164. Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H. & Winant, J. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea. *Biochemistry* **13**, 2656–2662. doi:10.1021/bi00709a028 (Juni 1974).

165. GmbH, B. L. Luminescence (incl. BRET). <https://www.bmglabtech.com/en/luminescence/> (2022).
166. Willette, R. N., Bao, W., Nerurkar, S., li Yue, T., Doe, C. P., Stankus, G., Turner, G. H., Ju, H., Thomas, H., Fishman, C. E., Sulpizio, A., Behm, D. J., Hoffman, S., Lin, Z., Lozinskaya, I., Casillas, L. N., Lin, M., Trout, R. E. L., Votta, B. J., Thorneloe, K., Lashinger, E. S. R., Figueroa, D. J., Marquis, R. & Xu, X. Systemic Activation of the Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 4 Channel Causes Endothelial Failure and Circulatory Collapse: Part 2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **326**, 443–452. doi:10.1124/jpet.107.134551 (Mai 2008).
167. Henry, C. O., Dalloneau, E., Pérez-Berezo, M.-T., Plata, C., Wu, Y., Guillon, A., Morello, E., Aimar, R.-F., Potier-Cartereau, M., Esnard, F., Coraux, C., Börnchen, C., Kieffmann, R., Vandier, C., Touqui, L., Valverde, M. A., Cenac, N. & Si-Tahar, M. In vitro and in vivo evidence for an inflammatory role of the calcium channel TRPV4 in lung epithelium: Potential involvement in cystic fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **311**, L664–L675. doi:10.1152/ajplung.00442.2015 (Sep. 2016).
168. Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. & Parks, W. P. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **51**, 1417–1423. doi:10.1093/jnci/51.5.1417 (Nov. 1973).
169. Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A. & Nelson-Rees, W. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer* **17**, 62–70. doi:10.1002/ijc.2910170110 (Jan. 1976).
170. Wu, Y., Gao, B., Xiong, Q.-J., Wang, Y.-C., Huang, D.-K. & Wu, W.-N. Acid-sensing ion channels contribute to the effect of extracellular acidosis on proliferation and migration of A549 cells. *Tumor Biology* **39**, 101042831770575. doi:10.1177/1010428317705750 (2017).
171. Wang, M., Zhang, Y., Xu, M., Zhang, H., Chen, Y., Chung, K. F., Adcock, I. M. & Li, F. Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke -induced airway epithelial cell injury model. *Free Radical Biology and Medicine* **134**, 229–238. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.004 (2019).
172. Canella, R., Martini, M., Cavicchio, C., Cervellati, F., Benedusi, M. & Valacchi, G. Involvement of the TREK-1 channel in human alveolar cell membrane potential and its regulation by inhibitors of the chloride current. *Journal of Cellular Physiology* **234**, 17704–17713. doi:10.1002/jcp.28396 (Feb. 2019).
173. Lee, J.-R., Lee, J.-Y., Kim, H.-J., Hahn, M.-J., Kang, J.-S. & Cho, H. The inhibition of chloride intracellular channel 1 enhances Ca<sup>2+</sup> and reactive oxygen species signaling in A549 human lung cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine* **51**, 1–11. doi:10.1038/s12276-019-0279-2 (Juli 2019).
174. Fertig, N., Blick, R. H. & Behrends, J. C. Whole Cell Patch Clamp Recording Performed on a Planar Glass Chip. *Biophysical Journal* **82**, 3056–3062. doi:10.1016/s0006-3495(02)75646-4 (Juni 2002).
175. Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., Mizoguchi, M. & Pin-gang, H. E. A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **41**, 1118–1122. doi:10.1248/cpb.41.1118 (1993).
176. Berridge, M., Tan, A., McCoy, K. & Wang, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* **4**, 15–19 (1996).

177. Zaccor, N. W., Sumner, C. J. & Snyder, S. H. The nonselective cation channel TRPV4 inhibits angiotensin II receptors. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 9986–9997. doi:10.1074/jbc.ra120.014325 (2020).

## Anhang

### Code der Datenauswertung mit R

Die Daten der Abbildungen 3.6 bis 3.57 wurden mit der Programmiersprache R ausgewertet und visualisiert. Im Folgenden stehen relevante Code-Abschnitte des *data wrangling* und der statistischen Auswertung für die jeweiligen Abbildungen niedergeschrieben.

```
1 #Tibble mit Baseline-Mittelwert
2 tibble_mean <- dplyr::slice(tibble_df, 1:40)
3
4 # Baseline hier von Sekunde 0 bis 19,5 -> 40 Werte
5 tibble_mean <- summarise_all(tibble_mean, funs(mean))
6 tibble_mean[[1, 1]] <- 1
7 n <- nrow(tibble_df)
8 tibble_mean <- tibble_mean[rep(seq_len(nrow(tibble_mean)), each=n),]
9 tibble_mean <- as_tibble(tibble_mean)
10
11 #Urspruengliches Tibble durch Baseline-Mittelwert teilen
12 tibble_df <- tibble_df/tibble_mean
13
14 #Nur Werte von 10s bis 60s
15 tibble_df <- dplyr::slice(tibble_df, 21:120)
16
17 #wide -> long-Format
18 tibble_df_l <- tidyr::gather(data = tibble_df,
19                             key = concentration,
20                             value = RLU,
21                             -1, -2)
22
23 #Neuer Tibble mit berechnetem Mittelwert und Standardabweichung
24 tibble_sd <- tibble_df_l %>%
25   group_by(.,concentration, rowid) %>%
26   summarise(RLU_mean = mean(RLU), RLU_sd = sd(RLU))
```

**Code 5.1:** Abschnitte des R-Codes repräsentativ für die Abbildungen 3.6, 3.9, 3.12, 3.15, 3.18, 3.21, 3.24, 3.27, 3.30, 3.33, 3.36, 3.39, 3.42, 3.45, 3.46, 3.49 und 3.54.

```
1 #Tibble mit Baseline-Mittelwert
2 tibble_mean <- dplyr::slice(tibble_df, 1:20)
3
4 #Baseline hier von Sekunde 0 bis 9,5 -> 20 Werte
5 tibble_mean <- summarise_all(tibble_mean, funs(mean))
6 n <- nrow(tibble_df)
7 tibble_mean <- tibble_mean[rep(seq_len(nrow(tibble_mean)), each=n),]
8 tibble_mean <- as_tibble(tibble_mean)
9
10 #Urspruengliches Tibble durch Baseline-Mittelwert teilen
11 tibble_df_b <- tibble_df/tibble_mean
12
13 #Baseline-Werte aus Tibble entfernen
14 tibble_df_b <- tibble_df_b[-c(1:20), ]
15
16 #Tibble auf AUC reduzieren
17 AUC_df <- function(i) {
18   x <- DescTools::AUC(x=tibble_df$X, y=tibble_df[[i]])
19   return(x)}
20
```

```

21 c_auc <- NULL
22 for (l in 2:67){
23   new_value <- AUC_df(l)
24   c_auc <- c(c_auc, new_value)}
25
26 #Tibble auf Spaltennamen rezuzieren
27 tibble_df <- dplyr::select(tibble_df, -1)
28 tibble_df <- dplyr::slice(tibble_df, 1)
29
30 #Tibble mit AUC-Werten füllen
31 tibble_df[1,] <- c_auc
32
33 #wide -> long-Format
34 tibble_df_l <- tidyr::gather(data = tibble_df,
35                             key = concentration,
36                             value = RLU_auc)
37
38 #Neuer Tibble mit berechnetem Mittelwert und Standardabweichung
39 tibble_sd <- tibble_df_l %>%
40   group_by(., concentration) %>%
41   summarise(RLU_auc_mean = mean(RLU_auc), RLU_auc_sd = sd(RLU_auc))
42
43 #EC50 Schätzung
44 DR.m <- drm(RLU_auc_mean ~ concentration,
45            data= tibble_sd,
46            robust = 'mean', #non-robust least squares estimation ("mean")
47            fct = LL.4(names = c("Hill slope", "Min", "Max", "EC50")))
48 v_ec_50 <- DR.m[["coefficients"]][["EC50:(Intercept)"]]
49 v_ec_50_r <- round(v_ec_50, 1)
50 sd_ec_50 <- summary(DR.m)$coefficients[4 , 2]
51 sd_ec_50_r <- round(sd_ec_50, 1)

```

**Code 5.2:** Abschnitte des R-Codes repräsentativ für die Abbildungen 3.7, 3.10, 3.13, 3.16, 3.19, 3.22, 3.25, 3.28, 3.31, 3.34, 3.37, 3.40, 3.43, 3.47 und 3.51.

```

1 #Tibble mit Baseline-Mittelwert
2 tibble_mean <- dplyr::slice(tibble_df, 1:40)
3 # Baseline hier von Sekunde 0 bis 19,5 -> 40 Werte
4 tibble_mean <- summarise_all(tibble_mean, funs(mean))
5 n <- nrow(tibble_df)
6 tibble_mean <- tibble_mean[rep(seq_len(nrow(tibble_mean)), each=n),]
7 tibble_mean <- as_tibble(tibble_mean)
8
9 #Urspruengliches Tibble durch Baseline-Mittelwert teilen
10 tibble_df <- tibble_df/tibble_mean
11
12 #Tibble auf Maxima reduzieren
13 tibble_df <- summarise_all(tibble_df, funs(max))
14
15 #wide -> long-Format
16 tibble_df_l <- tidyr::gather(data = tibble_df,
17                             key = concentration,
18                             value = RLU_max)
19
20 #Neuer Tibble mit berechnetem Mittelwert und Standardabweichung
21 tibble_sd <- tibble_df_l %>%
22   group_by(., concentration) %>%
23   summarise(RLU_max_mean = mean(RLU_max), RLU_max_sd = sd(RLU_max))
24
25 #EC50 Schätzung
26 DR.m <- drm(RLU_max_mean ~ concentration,
27            data= tibble_sd,
28            robust = 'mean', #non-robust least squares estimation ("mean")
29            fct = LL.4(names = c("Hill slope", "Min", "Max", "EC50")))

```

```

30 v_ec_50 <- DR.m[["coefficients"]][["EC50:(Intercept)"]]
31 v_ec_50_r <- round(v_ec_50, 1)
32 sd_ec_50 <- summary(DR.m)$coefficients[4, 2]
33 sd_ec_50_r <- round(sd_ec_50, 1)

```

**Code 5.3:** Abschnitte des R-Codes repräsentativ für die Abbildungen 3.8, 3.11, 3.14, 3.17, 3.20, 3.23, 3.26, 3.29, 3.32, 3.35, 3.38, 3.41, 3.44, 3.48 und 3.52.

```

1 #Tibble mit Baseline-Mittelwert
2 tibble_mean <- dplyr::slice(tibble_df, 1:20)
3
4 #Baseline hier von Sekunde 0 bis 9,5 -> 20 Werte
5 tibble_mean <- summarise_all(tibble_mean, funs(mean))
6 n <- nrow(tibble_df)
7 tibble_mean <- tibble_mean[rep(seq_len(nrow(tibble_mean)), each=n),]
8 tibble_mean <- as_tibble(tibble_mean)
9
10 #Urspruengliches Tibble durch Baseline-Mittelwert teilen
11 tibble_df_b <- tibble_df/tibble_mean
12
13 #Baseline-Werte aus Tibble entfernen
14 tibble_df_b <- tibble_df_b[-c(1:20), ]
15
16 #Tibble auf AUC reduzieren
17 AUC_df <- function(i) {
18   x <- DescTools::AUC(x=tibble_df$X, y=tibble_df[[i]])
19   return(x)}
20
21 c_auc <- NULL
22 for (l in 2:55){
23   new_value <- AUC_df(l)
24   c_auc <- c(c_auc, new_value)}
25
26 #Tibble auf Spaltennamen rezuzieren
27 tibble_df <- dplyr::select(tibble_df, -1)
28 tibble_df <- dplyr::slice(tibble_df, 1)
29
30 #Tibble mit AUC-Werten füllen
31 tibble_df[1,] <- c_auc
32
33 #wide -> long-Format
34 tibble_df_l <- tidyr::gather(data = tibble_df,
35                             key = time,
36                             value = RLU_auc)

```

**Code 5.4:** Abschnitte des R-Codes repräsentativ für die Abbildungen 3.50, 3.53, 3.55 und 3.57.

```

1 #wide -> long-Format
2 tibble_df_l1 <- tidyr::gather(data = tibble_df1,
3                               key = concentration,
4                               value = viability)
5 tibble_df_l2 <- tidyr::gather(data = tibble_df2,
6                               key = concentration,
7                               value = viability)
8
9 # Neuer Tibble mit berechnetem Mittelwert und Standardabweichung
10 tibble_sd1 <- tibble_df_l1 %>%
11   group_by(., concentration) %>%
12   summarise(viability_mean = mean(viability), viability_sd = sd(viability))
13
14 tibble_sd2 <- tibble_df_l2 %>%
15   group_by(., concentration) %>%
16   summarise(viability_mean = mean(viability), viability_sd = sd(viability))
17

```

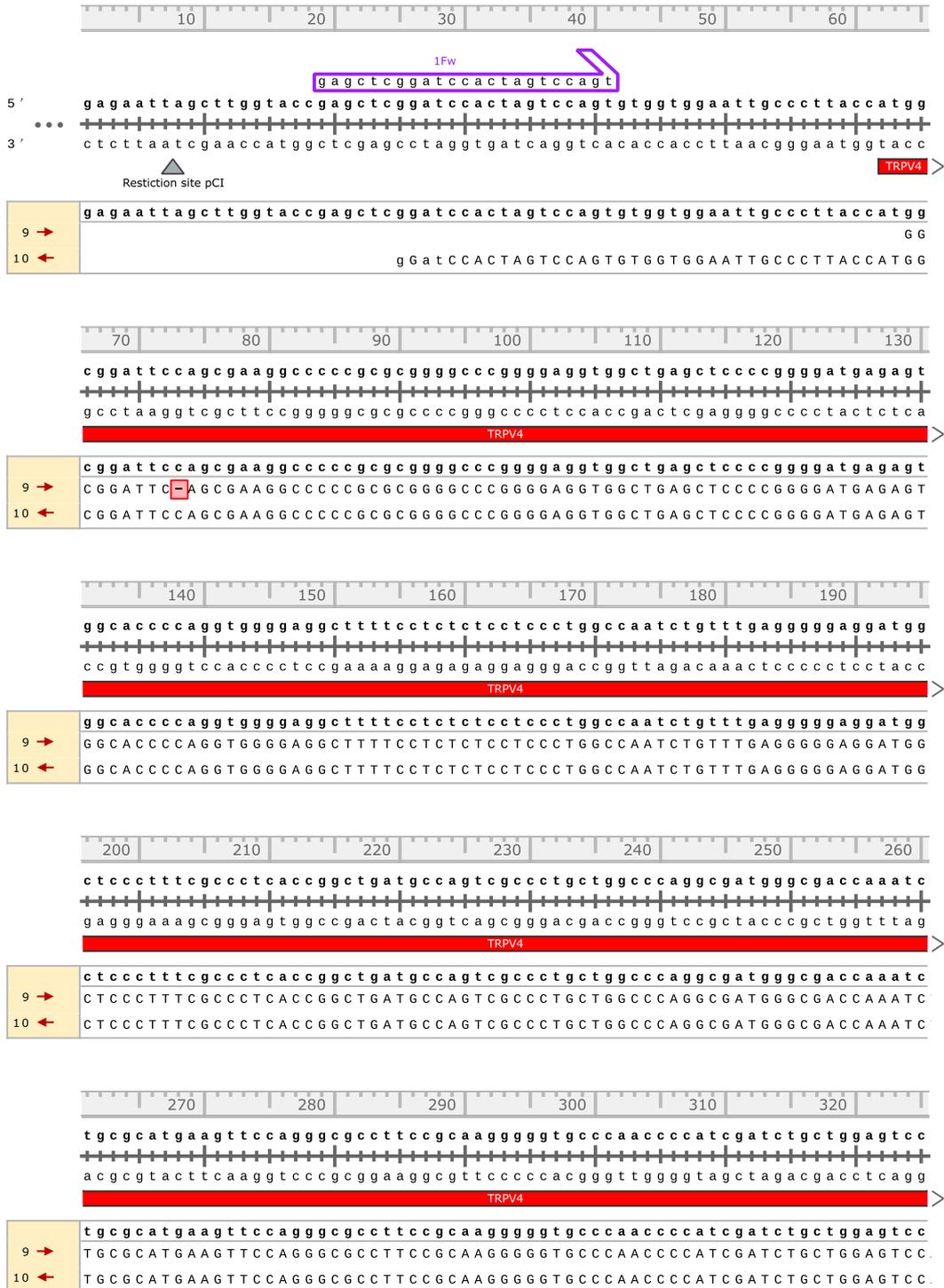
```

18 #In logscale nicht darstellbare Werte entfernen
19 tibble_sd1 <- tibble_sd1[-c(1:2),]
20 tibble_sd2 <- tibble_sd2[-c(1:2),]
21
22 #viability_mean für Prozentangabe normalisieren und linearen Beginn der Fit-
    Curve auf 100 % adjustieren
23 tibble_sd1$viability_mean <- tibble_sd1$viability_mean/(max(tibble_sd1$
    viability_mean)-0.008)
24 tibble_sd2$viability_mean <- tibble_sd2$viability_mean/(max(tibble_sd2$
    viability_mean)-0.092)
25
26 #Ein Tibble gruppiert nach Zelllinie
27 tibble_sd1$cellline <- "HEK293-V4"
28 tibble_sd2$cellline <- "HEK293-wt"
29 tibble_sd <- bind_rows(tibble_sd1, tibble_sd2)

```

**Code 5.5:** Relevante Abschnitte des R-Codes für Abbildung 3.56.

# Alignment verschiedener Sequenzierungsansätze mit der Originalsequenz des TRPV4-Plasmids



330 340 350 360 370 380 390  
 accctatatgagtcctcgggtggtgcctgggcccagaagagcaccatggactcactgtttgacta  
 tgggatatactcaggagccaccacggaccgggttctttctgtgggtacctgagtgacaaactgat  
 TRPV4

9 → accctatatgagtcctcgggtggtgcctgggcccagaagagcaccatggactcactgtttgacta  
 ACCCTATATGAGTCCTCGGTGGTGCCTGGGCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTGTTTGACTA  
 10 ← ACCCTATATGAGTCCTCGGTGGTGCCTGGGCCCAAGAAAGCACCCATGGACTCACTGTTTGACTA

400 410 420 430 440 450  
 cggcacctatcgtcaccactccagtgacaacaagaggtggagggaagaagatcatagagaagcagc  
 gccgtggatagcagtggtgaggtcactgttgttctccacctctcttcttagtatctctctgctg  
 TRPV4

9 → cggcacctatcgtcaccactccagtgacaacaagaggtggagggaagaagatcatagagaagcagc  
 CGGCACCTATCGTCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAAGAAGATCATAGAGAAGCAGC  
 10 ← CGGCACCTATCGTCACTCCAGTGACAACAAGAGGTGGAGGAAGAAGATCATAGAGAAGCAGC

460 470 480 490 500 510 520  
 cgcagagccccaaagcccctgccctcagccgcccccatcctcaaagtcttcaaccggcctatc  
 gcgtctcggggtttcggggacggggagtcggcgggggtaggagtttcagaagttggccggatag  
 TRPV4

9 → cgcagagccccaaagcccctgccctcagccgcccccatcctcaaagtcttcaaccggcctatc  
 CGCAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCTCAGCCGCCCCCATCCTCAAAGTCTTCAACCGGCCTATC  
 10 ← CGCAGAGCCCCAAAGCCCCTGCCCTCAGCCGCCCCCATCCTCAAAGTCTTCAACCGGCCTATC

530 540 550 560 570 580  
 ctctttgacatcgtgttcccggggctccactgctgacctggacgggctgctcccatcttctgctgac  
 gagaaactgtagcacagggccccgaggtgacgactggacctgcccagcaggggtaagaacgactg  
 TRPV4

9 → ctctttgacatcgtgttcccggggctccactgctgacctggacgggctgctcccatcttctgctgac  
 CTCTTTGACATCGTGTCCCAGGGCTCCACTGCTGACCTGGACGGGCTGCTCCCATCTTCTGCTGAC  
 10 ← CTCTTTGACATCGTGTCCCAGGGCTCCACTGCTGACCTGGACGGGCTGCTCCCATCTTCTGCTGAC

590 600 610 620 630 640 650

3Fw  
 gagtttcgagagccatctacg

2Fw  
 gagtttcgagagccatctacg

ccacaagaaacgcctaactgatgaggagtttcgagagccatctacggggaagacctgcctgcccc  
 ggtgttcttctgaggattgactactcctcaaagctctcggtagatgcccttctggacggacgggt  
 TRPV4

5 → ccacaagaaacgcctaactgatgaggagtttcgagagccatctacggggaagacctgcctgcccc  
 CCA  
 9 → CCACAAGAAACGCCTAACTGATGAGGAGTTTCGAGAGCCATCTACGGGAAGACCTGCCTGCCCA.  
 10 ← CCACAAGAAACGCCTAACTGATGAGGAGTTTCGAGAGCCATCTACGGGAAGACCTGCCTGCCCA.

660 670 680 690 700 710  
 aggccttgctgaaacctgagcaaatggccgcaacgacaccatccctgtgctgctggacatcgcggag  
 tccggaacgacttggactcgttaccggcgttgcgtggtagggacacgacacctgtagcgcctc  
 TRPV4

5 → aggccttgctgaaacctgagcaaatggccgcaacgacaccatccctgtgctgctggacatcgcggag  
 aGGCCTTGCTGAacCTGAGCAaTGGCCGCAACGACACCCATCCCTGTGCTGCTGGACATCGCGGAG  
 9 → AGGCCTTGCTGAACTGAGCAATGGCCGCAACGACACCCATCCCTGTGCTGCTGGACATCGCGGAG  
 10 ← AGGCCTTGCTGAACTGAGCAATGGCCGCAACGACACCCATCCCTGTGCTGCTGGACATCGCGGAG

720 730 740 750 760 770  
 cgcaccggcaacatgCGGGAGttcattaactcgcccttccgtga catctactatcgaggctcag  
 gCGTGGcCGTtGTacGCCctcaagtaattgagCGGgaaggcact gtagatgatagctccagtc  
 TRPV4

ttgagcgggaaggcact gtagatg  
 IRv

5 → cgcaccggcaacatgCGGGAGttcattaactcgcccttccgtga catctactatcgaggctcag  
 CGCACCGGCAACATGCGGGAGTTCATTAAC TCGCCCTTCCGTGA CATCTACTATCGAGGTCAG  
 9 → CGCACCGGCAACATGCGGGAGTTCATTAAC TCGCCCTTCCgTGA AaCATCTA  
 10 ← CGCaCCGGCAAc

0 790 800 810 820 830 840  
 acagccctgacatcgccattgagcgtcgcctgcaaacactacgtggaacttctcgtggccaggg  
 tgtcgggacgtgtagcggtaactcgcagcgacgttctgtgatgcaccttgaagagcaccgggtccc  
 TRPV4

5 → acagccctgacatcgccattgagcgtcgcctgcaaacactacgtggaacttctcgtggccaggg  
 ACAGCCCTGCACATCGCCATTGAGCGTGCCTGCAAAACTACGTGGAACCTTCTCGTGGCCAGGG

850 860 870 880 890 900  
 agctgatgtccacgcccaggcccgctggcgcttcttccagcccaaggatgaggggggctacttct  
 tcgactacaggtgcgggtccgggcaccgcgaagaggtcgggttccctactcccccgatgaaga  
 TRPV4

5 → agctgatgtccacgcccaggcccgctggcgcttcttccagcccaaggatgaggggggctacttct  
 AGCTGATGTCCACGCCCAAGCCCGTGGCGCTTCTTCCAGCCCAAGGATGAGGGGGGCTACTTCT  
 6 ← cGngGGCGctTCTCCAGCCCAAGGATGAgGGGGGCTACTTCT

0 920 930 940 950 960 970  
 actttggggagctgccccctgctcgtggctgcctgcaccaaccagccccacattgtcaactacctg  
 tgaaccctcgcaggggacagcgaccgacgagctgggttggctcggggtgtaacagttgatggac  
 TRPV4

5 → actttggggagctgccccctgctcgtggctgcctgcaccaaccagccccacattgtcaactacctg  
 ACTTTGGGGAGCTGCCCTGTCGCTGGCTGCCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCTG  
 6 ← ACTTTGGGGAGCTGCCCTGTCGCTgGctGCCTGCACCAACCAGCCCCACATTGTCAACTACCTG



1240 1250 1260 1270 1280 1290  
 gg c g g g a g g t g a c g g a t g a g g a c a c a c g g c a c c t g t c c c g c a a g t t c a a g g a c t g g g c c t a t g g g  
 c c g c c c t c c a c t g c c t a c t c c t g t g t g c c g t g g a c a g g g c g t t c a a g t t c c t g a c c c g g a t a c c c  
 TRPV4

1 ← gg c g g g a g g t g a c g g a t g a g g a c a c a c g g c a c c t g t c c c g c a a g t t c a a g g a c t g g g c c t a t g g g  
 GGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCC GCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGG  
 2 → gg c g g g a g g t g a c g g a t g a g g a c a c a c g g c a c c t g t c c c g c a a g t t c a a g g a c t g g g c c t a t g g g  
 GGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCC GCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGG  
 3 → gg c g g g a g g t g a c g g a t g a g g a c a c a c g g c a c c t g t c c c g c a a g t t c a a g g a c t g g g c c t a t g g g  
 GGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCC GCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGG  
 4 ← gg c g g g a g g t g a c g g a t g a g g a c a c a c g g c a c c t g t c c c g c a a g t t c a a g g a c t g g g c c t a t g g g  
 GGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCC GCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGG  
 5 → gg c g g g a g g t g a c g g a t g a g g a c a c a c g g c a c c t g t c c c g c a a g t t c a a g g a c t g g g c c t a t g g g  
 GGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCC GCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGG  
 6 ← gg c g g g a g g t g a c g g a t g a g g a c a c a c g g c a c c t g t c c c g c a a g t t c a a g g a c t g g g c c t a t g g g  
 GGCGGGAGGTGACGGATGAGGACACACGGCACCTGTCCC GCAAGTTCAAGGACTGGGCCTATGGG

1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360  
 c c a g t g t a t t c c t c g c t t t a t g a c c t c t c c t c c c t g g a c a c g t g t g g g g a a g a g g c c t c c g t g c t  
 g g t c a c a t a a g g a g c g a a a t a c t g g a g a g a g g a c c t g t g c a c a c c c t t c t c c g g a g g c a c g a  
 TRPV4

1 ← c c a g t g t a t t c c t c g c t t t a t g a c c t c t c c t c c c t g g a c a c g t g t g g g g a a g a g g c c t c c g t g c t  
 CCAGTGATTCCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCCTCCGTGCT  
 2 → c c a g t g t a t t c c t c g c t t t a t g a c c t c t c c t c c c t g g a c a c g t g t g g g g a a g a g g c c t c c g t g c t  
 CCAGTGATTCCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCCTCCGTGCT  
 3 → c c a g t g t a t t c c t c g c t t t a t g a c c t c t c c t c c c t g g a c a c g t g t g g g g a a g a g g c c t c c g t g c t  
 CCAGTGATTCCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCCTCCGTGCT  
 4 ← c c a g t g t a t t c c t c g c t t t a t g a c c t c t c c t c c c t g g a c a c g t g t g g g g a a g a g g c c t c c g t g c t  
 CCAGTGATTCCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCCTCCGTGCT  
 5 → c c a g t g t a t t c c t c g c t t t a t g a c c t c t c c t c c c t g g a c a c g t g t g g g g a a g a g g c c t c c g t g c t  
 CCAGTGATTCCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCCTCCGTGCT  
 6 ← c c a g t g t a t t c c t c g c t t t a t g a c c t c t c c t c c c t g g a c a c g t g t g g g g a a g a g g c c t c c g t g c t  
 CCAGTGATTCCTCGCTTTATGACCTCTCCTCCCTGGACACGTGTGGGGAAGAGGCCCTCCGTGCT

1370 1380 1390 1400 1410 1420  
 g g a g a t c c t g g t g t a c a a c a g c a a g a t t g a g a a c c g c c a c g a g a t g c t g g c t g t g g a g c c c a t c a  
 c c t c t a g g a c c a c a t g t t g t c g t t c t a a c t c t t g g c g g t g c t c t a c g a c c g a c a c c t c g g g t a g t  
 TRPV4

1 ← g g a g a t c c t g g t g t a c a a c a g c a a g a t t g a g a a c c g c c a c g a g a t g c t g g c t g t g g a g c c c a t c a  
 GGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACC GCCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCA  
 2 → g g a g a t c c t g g t g t a c a a c a g c a a g a t t g a g a a c c g c c a c g a g a t g c t g g c t g t g g a g c c c a t c a  
 GGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACC GCCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCA  
 3 → g g a g a t c c t g g t g t a c a a c a g c a a g a t t g a g a a c c g c c a c g a g a t g c t g g c t g t g g a g c c c a t c a  
 GGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACC GCCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCA  
 4 ← g g a g a t c c t g g t g t a c a a c a g c a a g a t t g a g a a c c g c c a c g a g a t g c t g g c t g t g g a g c c c a t c a  
 GGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACC GCCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCA  
 5 → g g a g a t c c t g g t g t a c a a c a g c a a g a t t g a g a a c c g c c a c g a g a t g c t g g c t g t g g a g c c c a t c a  
 GGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACC GCCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCA  
 6 ← g g a g a t c c t g g t g t a c a a c a g c a a g a t t g a g a a c c g c c a c g a g a t g c t g g c t g t g g a g c c c a t c a  
 GGAGATCCTGGTGTACAACAGCAAGATTGAGAACC GCCACGAGATGCTGGCTGTGGAGCCCATCA

1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490  
 a t g a a c t g c t g c g g g a c a a g t g g c g c a a g t t c g g g c c g t c t c c t t c t a c a t c a a c g t g g t c t c c  
 t a c t t g a c g a c g c c c t g t t c a c c g c g t t c a a g c c c g g c a g a g g a a g a t g t a g t t g c a c c a g a g g  
 TRPV4

1 ← a t g a a c t g c t g c g g g a c a a g t g g c g c a a g t t c g g g c c g t c t c c t t c t a c a t c a a c g t g g t c t c c  
 ATGAAC TGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTGCGGGCCGCTCTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCC  
 2 → a t g a a c t g c t g c g g g a c a a g t g g c g c a a g t t c g g g c c g t c t c c t t c t a c a t c a a c g t g g t c t c c  
 ATGAAC TGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTGCGGGCCGCTCTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCC  
 3 → a t g a a c t g c t g c g g g a c a a g t g g c g c a a g t t c g g g c c g t c t c c t t c t a c a t c a a c g t g g t c t c c  
 ATGAAC TGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTGCGGGCCGCTCTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCC  
 4 ← a t g a a c t g c t g c g g g a c a a g t g g c g c a a g t t c g g g c c g t c t c c t t c t a c a t c a a c g t g g t c t c c  
 ATGAAC TGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTGCGGGCCGCTCTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCC  
 5 → a t g a a c t g c t g c g g g a c a a g t g g c g c a a g t t c g g g c c g t c t c c t t c t a c a t c a a c g t g g t c t c c  
 ATGAAC TGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTGCGGGCCGCTCTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCC  
 6 ← a t g a a c t g c t g c g g g a c a a g t g g c g c a a g t t c g g g c c g t c t c c t t c t a c a t c a a c g t g g t c t c c  
 ATGAAC TGCTGCGGGACAAGTGGCGCAAGTTGCGGGCCGCTCTCCTTCTACATCAACGTGGTCTCC

1500 1510 1520 1530 1540 1550

6Fw  
g c a c a c c g c c  
t a c c t g t g t g c c a t g g t c a t c t t c a c t c t c a c c g c c t a c t a c c a g c c g c t g g a g g g c a c a c c g c c  
a t g g a c a c a c g g t a c c a g t a g a a g t g a g a g t g g c g g a t g a t g g t c g g c g a c c t c c c g t g t g g c g g  
TRPV4

1	←	t a c c t g t g t g c c a t g g t c a t c t t c a c t c t c a c c g c c t a c t a c c a g c c g c t g g a g g g c a c a c c g c c
2	→	T A C C T G T G T G C C A T G G T C A T C T T C A C T C T C A C C G C C T A C T A C C A G C C G C T G G A G G G C A C A C C G C C
3	→	T A C C T G T G T G C C A T G G T C A T C T T C A C T C T C A C C G C C T A C T A C C A G C C G C T G G A G G G C A C A C C G C C
4	←	T A C C T G T G T G C C A T G G T C A T C T T C A C T C T C A C C G C C T A C T A C C A G C C G C T G G A G G G C A C A C C G C C
5	→	T A C C T G T G T G C C A T G G T C A T C T T C A C T C T C A C C G C C T A C T A C C A G C C G C T G G A G G G C A C A C C G C C
6	←	T A C C T G T G T G C C A T G G T C A T C T T C A C T C T C A C C G C C T A C T A C C A G C C G C T G G A G G G C A C A C C G C C
8	←	G C A C A C C G C C

1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620

6Fw  
g t a c c c t t a  
g t a c c c t t a c c g c a c c a c g g t g g a c t a c c t g c g g c t g g c t g g c g a g g t c a t t a c g c t c t t c a c t g  
c a t g g a a t g g c g t g g t g c c a c c t g a t g g a c g c c g a c c g a c c g c t c c a g t a a t g c g a g a a g t g a c  
TRPV4

1	←	g t a c c c t t a c c g c a c c a c g g t g g a c t a c c t g c g g c t g g c t g g c g a g g t c a t t a c g c t c t t c a c t g
2	→	G T A C C C T T A C C G C A C C A C G G T G G A C T A C C T G C G G C T G G C T G G C G A G G T C A T T A C G C T C T T C A C T G
3	→	G T A C C C T T A C C G C A C C A C G G T G G A C T A C C T G C G G C T G G C T G G C G A G G T C A T T A C G C T C T T C A C T G
4	←	G T A C C C T T A C C G C A C C A C G G T G G A C T A C C T G C G G C T G G C T G G C G A G G T C A T T A C G C T C T T C A C T G
5	→	G T A C C C T T A C C G C A C C A C G G T G G A C T A C C T G C G G C T G G C T G G C G A G G T C A T T A C G C T C T T C A C T G
6	←	G T A C C C T T A C C G C A C C A C G G T G G A C T A C C T G C G G C T G G C T G G C G A G G T C A T T A C G C T C T T C A C T G
7	→	c T G C G G C T G G C T G G C G A G G T C A T T A C G C T C T T C A C T G
8	←	G T A C C C T T A C C G C A C C A C G G T G G A C T A C C T G C G G C T G G C T G G C G A G G T C A T T A C G C T C T T C A C T G

1630 1640 1650 1660 1670 1680

g g g t c c t g t t c t t c t t c a c c a a c a t c a a a g a c t t g t t c a t g a a g a a a t g c c c t g g a g t g a a t t c t  
c c c a g g a c a a g a a g a a g t g g t t g t a g t t t c t g a a c a a g t a c t t c t t a c g g g a c c t c a c t t a a g a  
TRPV4  
g a a g a a g t g g t t g t a g t t t c t g a a c  
3Rv

1	←	g g g t c c t g t t c t t c t t c a c c a a c a t c a a a g a c t t g t t c a t g a a g a a a t g c c c t g g a g t g a a t t c t
2	→	G G G T C C T G T T C T T C T T C A C C A A C A T C A A A G A C T T G T T C A T G A A G A A A T G C C C T G G A G T G A A T T C T
3	→	G G G T C C T G T T C T T C T T C A C C A A C A T C A A A G A C T T G T T C A T G A A G A A A T G C C C T G G A G T G A A T T C T
4	←	G G G T C C T G T T C T T C T T C A C C A A C A T C A A A G A C T T G T T C A T G A A G A A A T G C C C T G G A G T G A A T T C T
5	→	G G G T C C T G T T C T T C T T C A C C A A C A T C A A A g A C T T G T T C A T G A a n A A a T G C C C T G G a g t G A A T T c t
6	←	G G G T C C T G T T C T T C T T C A C C A A C A T C A A A G A C T T G T T C A T G A A G A A A T G C C C T G G A G T G A A T T C T
7	→	G G G T C C T G T T C T T C T T C A C C A A C A T C A A A G A C T T G T T C A T G A A G A A A T G C C C T G G A G T G A A T T C T
8	←	G G G T C C T G T T C T T C T T C A C C A A C A T C A A A G A C T T G T T C A T G A A G A A A T G C C C T G G A G T G A A T T C T

1700 1710 1720 1730 1740 1750

ctcttcattgatggctccttccagctgctctacttcatctactctgtcctgggtgatcgtctcagc  
 gagaagtaactaccgaggaaggctcgacgagatgaagtagatgagacaggaccactagcagagtcg

TRPV4

1 ← CTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTTCATCTACTCTGTCTGCTGGTGATCGTCTCAGC  
 2 → CTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTTCATCTACTCTGTCTGCTGGTGATCGTCTCAGC  
 3 → CTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTTCATCTACTCTGTCTGCTGGTGATCGTCTCAGC  
 4 ← CTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTTCATCTACTCTGTCTGCTGGTGATCGTCTCAGC  
 5 → ctcttcattgatgGGCTCCTTCCAGCTggtntACTTTCATCAActnngtccggggatcgtntcnnn  
 6 ← CTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTTCATCTACTCTGTCTGCTGGTGATCGTCTCAGC  
 7 → CTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTTCATCTACTCTGTCTGCTGGTGATCGTCTCAGC  
 8 ← CTCTTCATTGATGGCTCCTTCCAGCTGCTCTACTTTCATCTACTCTGTCTGCTGGTGATCGTCTCAGC

1760 1770 1780 1790 1800 1810

agccctctacctggcagggatcgagggcctacctggccgtgatggctttgccctggctcctgggct  
 tcgggagatggaccgtccctagctccggatggaccggcactaccagaaacgggaccaggaccga

TRPV4

1 ← AGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTCCTGGGCT  
 2 → AGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTCCTGGGCT  
 3 → AGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTCCTGGGCT  
 4 ← AGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTCCTGGGCT  
 5 → agCCctctAcnGGgCAGGGaTcgaGgCCTACctggCCG  
 6 ← AGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTCCTGGGCT  
 7 → AGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTCCTGGGCT  
 8 ← AGCCCTCTACCTGGCAGGGATCGAGGGCCTACCTGGCCGTGATGGTCTTTGCCCTGGTCTCCTGGGCT

1830 1840 1850 1860 1870 1880

ggatgaatgccctttacttcacccgtgggctgaagctgacggggacctatagcatcatgatcc a  
 cctacttacgggaaatgaagtgggcacccgacttcgactgcccctggatatcgtagtactagg t

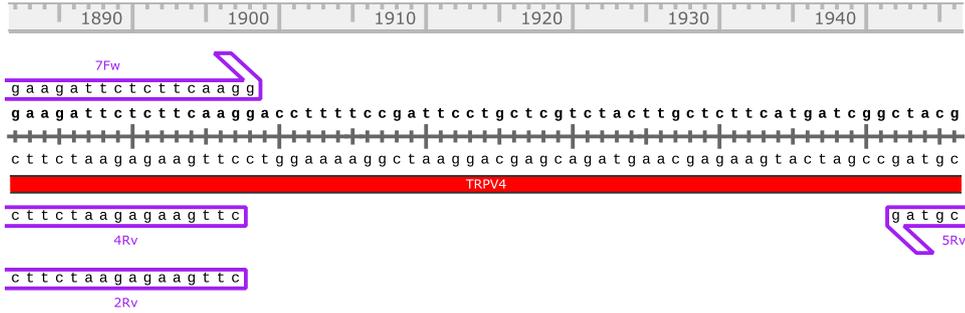
TRPV4

7Fw catgatcc a

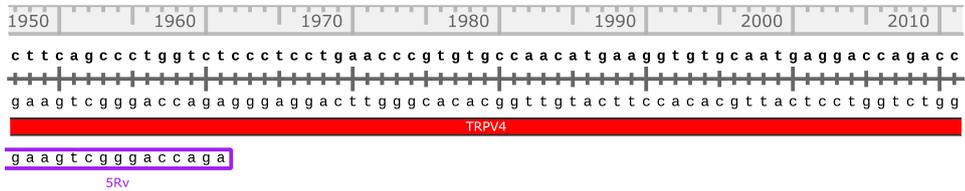
actagg t  
4Rv

actagg t  
2Rv

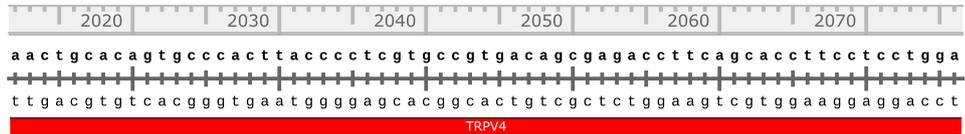
1 ← GGATGAATGCCCTTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCC A  
 2 → GGATGAATGCCCTTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCC A  
 3 → GGATGAATGCCCTTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCC A  
 4 ← GGATGAATGCCCTTTACTTCACCCgtGGGCTGAAGCTGACGG  
 6 ← GGATGAATGCCCTTTACTTCACCCgtGgGCTGAAGCTGACGG  
 7 → GGATGAATGCCCTTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCC A  
 8 ← GGATGAATGCCCTTTACTTCACCCGTGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCC A  
 12 ← tCATGATccCn



	gaagattctcttcaaggaccttttccgattcctgctcgtctacttgctcttcatgatcggctacg
1 ←	GAAGATTCTCTTCAAGGACCTTTCCGattcCTgctcnnctac
2 →	GAAGATTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTTCATGATCGGCTACG
3 →	GAAGATcCTCTTCAA g
7 →	GAAGATTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTTCATGATCGGCTACG
8 ←	GAAGATTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTTCATGATCGGCTACG
11 →	TcctGCTCGTctACTTGCTCTTTCATGATCGGCTACG
12 ←	ngAGATTCTCTTCAAGGACCTTTTCCGATTCTGCTCGTCTACTTGCTCTTTCATGATCGGCTACG



	cttcagccctgggtctccctcctgaaccctggtgccaacatgaagggtgtgcaatgaggaccagacc
2 →	CTTCAGCCCTGGTc
7 →	CTTCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAGACC
8 ←	CTTCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAGACC
11 →	CTTCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAGACC
12 ←	CTTCAGCCCTGGTCTCCCTCCTGAACCCGTGTGCCAACATGAAGGTGTGCAATGAGGACCAGACC



	aactgcacagtgcccacttaccctcgtgccgtgacagcgagaccttcagcaccttccctcctgga
7 →	AACTGCACAGTGCCCACCTTACCCTCGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTCCTCCTGGA
8 ←	AACTGCACAGTGCCCACCTTACCCTCGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTCCTCCTGGA
11 →	AACTGCACAGTGCCCACCTTACCCTCGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTCCTCCTGGA
12 ←	AACTGCACAGTGCCCACCTTACCCTCGTGCCGTGACAGCGAGACCTTCAGCACCTTCCTCCTGGA

2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140  
 c c t g t t t a a g c t g a c c a t t g g c a t g g g c g a c c t g g a g a t g c t g a g c a g c a c c a a g t a c c c c g t g g  
 g g a c a a a t t c g a c t g g t a a c c g t a c c c g c t g g a c c t c t a c g a c t c g t c g t g g t t c a t g g g g c a c c  
 TRPV4

7 → c c t g t t t a a g c t g a c c a t t g g c a t g g g c g a c c t g g a g a t g c t g a g c a g c a c c a a g t a c c c c g t g g  
 CCTGTTTAAGCTGACCATTGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGG  
 8 ← c c t g t t t a a g c t g a c c a t t g g c a t g g g c g a c c t g g a g a t g c t g a g c a g c a c c a a g t a c c c c g t g g  
 CCTGTTTAAGCTGACCATTGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGG  
 11 → c c t g t t t a a g c t g a c c a t t g g c a t g g g c g a c c t g g a g a t g c t g a g c a g c a c c a a g t a c c c c g t g g  
 CCTGTTTAAGCTGACCATTGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGG  
 12 ← c c t g t t t a a g c t g a c c a t t g g c a t g g g c g a c c t g g a g a t g c t g a g c a g c a c c a a g t a c c c c g t g g  
 CCTGTTTAAGCTGACCATTGGCATGGGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTACCCCGTGG

2150 2160 2170 2180 2190 2200  
 t c t t c a t c a t c c t g c t g g t g a c c t a c a t c a t c c t c a c c t t t g t g c t g c t c c t c a a c a t g c t c a t t  
 a g a a g t a g t a g g a c g a c c a c t g g a t g t a g t a g g a g t g g a a a c a c g a c g a g g a g t t g t a c g a g t a a  
 TRPV4

7 → t c t t c a t c a t c c t g c t g g t g a c c t a c a t c a t c c t c a c c t t t g t g c t g c t c c t c a a c a t g c t c a t t  
 TCTTCATCATCCTGCTGGTGACCTACATCATCTCACCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATT  
 8 ← t c t t c a t c a t c c t g c t g g t g a c c t a c a t c a t c c t c a c c t t t g t g c t g c t c c t c a a c a t g c t c a t t  
 TCTTCATCATCCTGCTGGTGACCTACATCATCTCACCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATT  
 11 → t c t t c a t c a t c c t g c t g g t g a c c t a c a t c a t c c t c a c c t t t g t g c t g c t c c t c a a c a t g c t c a t t  
 TCTTCATCATCCTGCTGGTGACCTACATCATCTCACCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATT  
 12 ← t c t t c a t c a t c c t g c t g g t g a c c t a c a t c a t c c t c a c c t t t g t g c t g c t c c t c a a c a t g c t c a t t  
 TCTTCATCATCCTGCTGGTGACCTACATCATCTCACCTTTGTGCTGCTCCTCAACATGCTCATT

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270  
 g c c c t c a t g g g c g a g a c a g t g g g c c a g g t c t c c a a g g a g a g c a a g c a c a t c t g g a a g c t g c a g t g  
 c g g g a g t a c c c g c t c t g t c a c c c g g t c c a g a g g t c c t c t c g t t c g t g t a g a c c t t c g a c g t c a c  
 TRPV4

7 → g c c c t c a t g g g c g a g a c a g t g g g c c a g g t c t c c a a g g a g a g c a a g c a c a t c t g g a a g c t g c a g t g  
 GCCCTCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGCTGCAGTG  
 8 ← g c c c t c a t g g g c g a g a c a g t g g g c c a g g t c t c c a a g g a g a g c a a g c a c a t c t g g a a g c t g c a g t g  
 GCCCTCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGCTGCAGTG  
 11 → g c c c t c a t g g g c g a g a c a g t g g g c c a g g t c t c c a a g g a g a g c a a g c a c a t c t g g a a g c t g c a g t g  
 GCCCTCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGCTGCAGTG  
 12 ← g c c c t c a t g g g c g a g a c a g t g g g c c a g g t c t c c a a g g a g a g c a a g c a c a t c t g g a a g c t g c a g t g  
 GCCCTCATGGGCGAGACAGTGGGCCAGGTCTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGCTGCAGTG

2280 2290 2300 2310 2320 2330  
 g g c c a c c a c c a t c c t g g a c a t t g a g c g c t c c t t c c c c g t a t t c c t g a g g a a g g c c t t c c g c t c t g  
 c c g g t g g t a g g a c c t g t a a c t c g c g a g g a a g g g c a t a a g g a c t c c t t c c g g a a g g c g a g a c  
 TRPV4

7 → g g c c a c c a c c a t c c t g g a c a t t g a g c g c t c c t t c c c c g t a t t c c t g a g g a a g g c c t t c c g c t c t g  
 GGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCTATTCTGAGGAAGGCCCTTCCGCTCTG  
 8 ← g g c c a c c a c c a t c c t g g a c a t t g a g c g c t c c t t c c c c g t a t t c c t g a g g a a g g c c t t c c g c t c t g  
 GGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCTATTCTGAGGAAGGCCCTTCCGCTCTG  
 11 → g g c c a c c a c c a t c c t g g a c a t t g a g c g c t c c t t c c c c g t a t t c c t g a g g a a g g c c t t c c g c t c t g  
 GGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCTATTCTGAGGAAGGCCCTTCCGCTCTG  
 12 ← g g c c a c c a c c a t c c t g g a c a t t g a g c g c t c c t t c c c c g t a t t c c t g a g g a a g g c c t t c c g c t c t g  
 GGCCACCACCATCCTGGACATTGAGCGCTCCTTCCCCTATTCTGAGGAAGGCCCTTCCGCTCTG

2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400

8Fw  
g t g g t g c t t c a g g g t  
g g g a g a t g g t c a c c g t g g g c a a g a g c t c g g a c g g c a c t c c t g a c c g c a g g t g g t g c t t c a g g g t  
c c c t c t a c c a g t g g c a c c g t t c t c g a g c c t g c c g t g a g g a c t g g c g t c c a c c a c g a a g t c c c a  
TRPV4

c a c c a c g a a g t c c c a  
6Rv

7 → g g g a g a t g g t c a c c g t g g g c a a g a g c t c g g a c g g c a c t c c t g a c c g c a g g t g g t g c t t c a g g g t  
G G G A G A T G G T C A C C G T G G G C A A G A G C T C G G A C G G C A C T C C T G A C C G C A G G T G G T G C T T C A G G G T  
8 ← G G G A G A T G G T C A C C G t g G - C A A G A G n n t c g g a  
11 → G G G A G A T G G T C A C C G T G G G C A A G A G C T C G G A C G G C A C T C C T G A C C G C A G G T G G T G C T T C A G G G T  
12 ← G G G A G A T G G T C A C C G T G G G C A A G A G C T C G G A C G G C A C T C C T G A C C G C A G G T G G T G C T T C A G G G T

2410 2420 2430 2440 2450 2460

8Fw  
g g a t g a g  
c t g g a a c c a g a a c t t g g g c a t c  
9Fw  
g g a t g a g g t g a a c t g g t t c t c a c t g g a a c c a g a a c t t g g g c a t c a t c a a c g a g g a c c c g g g c a a g a  
c c t a c t c c a c t t g a c c a g a g t g a c c t t g g t c t t g a a c c g t a g t a g t t g c t c c t g g g c c g t t c t  
TRPV4

c c t a c t c  
6Rv

7 → g g a t g a g g t g a a c t g g t t c t c a c t g g a a c c a g a a c t t g g g c a t c a t c a a c g a g g a c c c g g g c a a g a  
G G A T G a g  
11 → G G A T G A G G T G A A C T G G T T C A C T G G A A C C A G A A C T T G G G C A T C A T C A A C G A G G A C C C G G G C A A G A  
12 ← G G A T G A G G T G A A C T G G T T C A C T G G A A C C A G A A C T T G G G C A T C A T C A A C G A G G A C C C G G G C A A G A  
14 ← C T G G A A C C A G A A C T T G G G C A T C A T C A A C G A G G A C C C G G G C A A G A

2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530

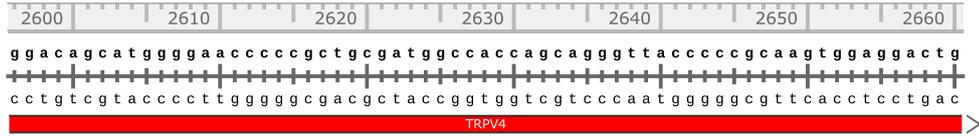
a t g a g a c c t a c c a g t a t t a t g g c t t c t c g c a t a c c g t g g g c c g c c t c c g c a g g g a t c g c t g g t c c  
t a c t c t g g a t g g t c a t a a t a c c g a a g a g c g t a t g g c a c c c g g c g g a g g c g t c c c t a g c g a c c a g g  
TRPV4

11 → a t g a g a c c t a c c a g t a t t a t g g c t t c t c g c a t a c c g t g g g c c g c c t c c g c a g g g a t c g c t g g t c c  
A T G A G A C C T A C C A G T A T T A T G G C T T C T C G C A T A C C G T G G G C C G C C T C C G C A G G G A T C G C T G G T C C  
12 ← A T G A G A C C T A C C A G T A T T A T G G C T T C T C G C A T A C C G T G G G C C G C C T C C G C A G G G A T C G C T G G T C C  
13 → c g c a t a c c g t g g g c c g c c t c c g c a g g g a t c g c t g g t c c  
14 ← A T G A G A C C T A C C A G T A T T A T G G C T T C T C G C A T A C C G T G G G C C G C C T C C G C A G G G A T C G C T G G T C C

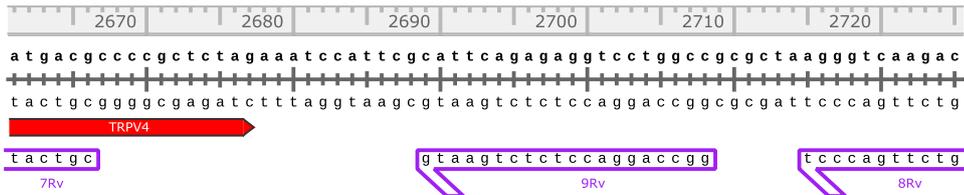
2540 2550 2560 2570 2580 2590

t c g g t g g t a c c c c g c g t g g t g g a a c t g a a c a a g a a c t c g a a c c c g g a c g a g g t g g t g g t g c c t c t  
a g c c a c c a t g g g g c g c a c c a c c t t g a c t t g t c t t g a g c t t g g g c c t g c t c c a c c a c c a c g g a g a  
TRPV4

11 → t c g g t g g t a c c c c g c g t g g t g g a a c t g a a c a a g a a c t c g a a c c c g g a c g a g g t g g t g g t g c c t c t  
T C G G T G G T A C C C C G C G T G G T G G A A C T G A A C A A G A A C T C G A A C C C G G A C G A G G T G G T G G T G C C T C T  
12 ← T C G G T G G T A C C C C G C G T G G T G G A A C T G A A C A A G A A C T C G A A C C C G G A C G A G G T G G T G G T G C C T C T  
13 → T C G G T G G T A C C C C G C G T G G T G G A A C T G A A C A A G A A C T C G A A C C C G G A C G A G G T G G T G G T G C C T C T  
14 ← T C G G T G G T A C C C C G C G T G G T G G A A C T G A A C A A G A A C T C G A A C C C G G A C G A G G T G G T G G T G C C T C T



	ggacagcatggggaacccccgctgcatggccaccagcaggggtaccgccgaagtggaggactg
11 →	GGACAGCATGGGGAACCCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTGGAG
12 ←	GGACAGCATgggA ACCCCCCGCTGCGAtngccaccagc
13 →	GGACAGCATGGGGAACCCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTGGAGGACTG
14 ←	GGACAGCATGGGGAACCCCCGCTGCGATGGCCACCAGCAGGGTTACCCCGCAAGTgGAGGACnG



	atgacgccccgctctagaaatccattcgcatcagagaggtcctggccgcgctaagggtcaagac
13 →	ATGACGCCCCGCTCTAGAAATCCATTGCGATTCAGAGAGGTCCTGgc
14 ←	AnGa

**Original Sequence: pCIneo IRES-GFP hVRL-2**

- 1: 5Rv ←  
773 bases  
1 .. 770 (2 mismatches, 2 gaps)
- 2: 5Fw →  
775 bases  
3 .. 773 (3 mismatches, 1 gap)
- 3: 4Fw →  
716 bases  
7 .. 715 (1 mismatch)
- 4: 4Rv ←  
711 bases  
4 .. 709
- 5: 2Fw →  
1147 bases  
4 .. 1146 (15 mismatches)
- 6: 2Rv ←  
1003 bases  
7 .. 1000 (2 mismatches)
- 7: 6Fw →  
823 bases  
1 .. 822
- 8: 6Rv ←  
824 bases  
4 .. 823 (1 mismatch, 2 gaps)
- 9: 1Fw →  
713 bases  
8 .. 710 (2 gaps)
- 10: 1Rv ←  
721 bases  
10 .. 712
- 11: 7Fw →  
758 bases  
11 .. 755
- 12: 7Rv ←  
763 bases  
1 .. 762 (4 mismatches, 2 gaps)
- 13: 9Fw →  
220 bases  
6 .. 220
- 14: 9Rv ←  
245 bases  
2 .. 244 (2 mismatches)

## Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meine aufrichtige Dankbarkeit gegenüber allen Personen ausdrücken, die mich auf meinem Weg zum Abschluss der Promotion unterstützt haben:

Zuerst möchte ich mich bei **Annelies Janssens** vom Laboratory of Ion Channel Research an der Katholischen Universität Löwen bedanken. Sie hat uns freundlicher Weise das TRPV4-Plasmid zur Verfügung gestellt, welches zur Etablierung der Zelllinie HEK293-V4 benötigt wurde.

Größter Dank gilt **Dr. rer. nat. Andreas Breit** vom Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München. Seine Supervision und seine Unterstützung bei allen Fragen rund um das Projekt waren von unschätzbarem Wert. Er unterstützte die Arbeitsgruppe fortwährend und hilfsbereit. Nicht zuletzt durch die Bereitstellung verschiedener Reagenzien, wie zum Beispiel dem Aequorin-Plasmid. Er half mir unermesslich bei der Anfertigung und Korrektur der Dissertation. Vor allem, dass ich die Schrift zügig fertigstellen konnte, habe ich zum Großteil ihm zu verdanken.

Ein besonderer Dank geht auch an meinen Bruder **Leonhard Thumann, M.A.**, der mich bei der Erstellung von Abbildungen und technischen Zeichnungen unterstützt hat und immer eine moralische Stütze für mich war. Seine wohlwollende Art und unsere Freundschaft waren nicht nur während der Arbeit an meinem Promotionsprojekt unverzichtbar.

Ebenso bedanke ich mich bei meinem Freund **Felix Husarek, B.Sc.**, der mir bei der Erstellung von Abbildungen chemischer Strukturen und Reaktionen geholfen hat.

Ich danke auch meinem Freund **Benedikt Hauner, M.Sc.**, der mir bei der Entwicklung des Codes für die Abbildungen mit R geholfen hat.

Ich bin auch meinem Freund und Mentor **Prof. Dr. med. Stefan Endres** sehr dankbar, der als Forschungsdekan der LMU München unermesslich viel für Forschung und Lehre getan hat und mir bezüglich der Planung des Projektes und der Dissertation wertvolle Ratschläge gegeben hat.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Freund und Mentor **PD Dr. med. Konstantin Dimitriadis** bedanken, der mich während meines klinischen Studiums wohlwollend begleitet hat und mir wertvolle Ratschläge zur Promotion gegeben hat.

Mein besonderer Dank geht auch an **Hanna Brückner**, die mir die Promotionsstelle vermittelt hat.

Die Mitglieder meiner Arbeitsgruppe haben nicht unerheblich zum Erfolg des Projektes beigetragen. **Dr. rer. nat. Bernhard Stenger** hat mich als Arbeitsgruppenleiter bei allen Fragen und Problemen prompt und hervorragend betreut. Es war eine große Bereicherung, mit ihm im Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München zusammen gearbeitet zu haben.

Auch meinem Freund und Mitdoktoranden **Florian Eggerbauer, M.Sc.**, bin ich zu tiefem Dank verpflichtet. Durch seine hilfsbereite, kollegiale und kompetente Art ist mir die Forschung im Labor viel leichter gefallen. Die Zusammenarbeit hat mir große Freude bereitet.

Auch möchte ich den drei Personen danken, die offiziell für die Betreuung meines Projektes zuständig waren:

Meinem Doktorvater **Prof. Dr. med. Dirk Steinritz** für seine Supervision als Vorsitzender der Betreuungskommission, sowie **Prof. Dr. med. Kai Kehe** und **Prof. Dr. rer. nat.**

**Christian Ries** als Mitglieder der Betreuungskommission. Ich war an vielen Stellen auf ihre fachliche Expertise und Unterstützung angewiesen und bin unbändig dankbar für Ihre Hilfe.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und Großeltern danken:

**StDin Nicola Thumann** hat mich, seit ich denken kann, immer seelisch unterstützt. So auch für das Promotionsprojekt. Sie ist für einen großen Teil meiner Motivation zur Promotion verantwortlich. **Dipl.-Forstw. Werner Thumann** unterstützte mich Zeit meines Lebens nicht minder. Er hat mir geholfen, das richtige Projekt auszuwählen und an vielen Stellen strategisch mitgewirkt. Ich bin meinen beiden Eltern für alles dankbar, was sie für mich seit meinen Kindertagen getan haben. Sie haben mir ermöglicht ein Studium zu absolvieren und Spaß am und Sinn im Lernen zu entdecken.

Genauso möchte ich meinen Großeltern, **Ingrid Schlierf, Irmgard Thumann, Gerhard Schlierf** und **Joseph Thumann**, danken. Sie begegnen mir mit großem Stolz, was mich ungemein antreibt. Ich empfinde dafür großen Respekt.

Mir ist bewusst, welches Privileg ich genießen durfte, in dieser familiären Umgebung aufgewachsen zu sein.

## **Affidavit**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Interaktion alkylierender Substanzen mit TRPV4-Kanälen“ selbständig 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, den 4. Mai 2023

---

Lorenz Thumann