

# **Physiologische Funktion und Modulation des TRPV2-Ionenkanals in Zellen des angeborenen Immunsystems**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Rick Paul Raudszus  
geboren am 15.07.1993 in Schwedt/Oder

angefertigt an / in: Universität Leipzig, Medizinische Fakultät  
Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Betreuer: Prof. Dr. Michael Schaefer

Ko-Betreuerin: PD Dr. Kerstin Hill

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 16.05.2023



## Vorbemerkung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine monografische Dissertation mit dem Thema „Physiologische Funktion und Modulation des TRPV2-Ionenkanals in Zellen des angeborenen Immunsystems“. Die wissenschaftliche Vorarbeit resultierte in einer Publikation mit Ko-Autorenschaft. Zusätzlich sind zwei weitere Publikationen auf Basis der experimentellen Daten, der Ergebnisse und der Diskussion dieser Dissertation bereits eingereicht bzw. in Vorbereitung.

### **Bibliografische Auflistung der Publikationen:**

1. Bluhm Y, Raudszus R, Wagner A, Urban N, Schaefer M, Hill K. Valdecoxib blocks rat TRPV2 channels. Eur J Pharmacol. 2022 Jan;15;915:174702.
2. Raudszus R, Urban N, Deckers A, Gräßle S, Vanderheiden S, Jung N, Bräse S, Schaefer M, Hill K. Pharmacological inhibition of TRPV2 attenuates phagocytosis and lipopolysaccharide-induced migration of primary macrophages. Eingereicht bei British Journal of Pharmacology.
3. Raudszus R, Schaefer M, Hill K. Superadditive combination of cannabidiol and probenecid induces TRPV2-mediated mast cell degranulation. In Vorbereitung.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
<b>1. Einführung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Moderne Entwicklung neuer Wirkstoffe .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Ca<sup>2+</sup>-Ionen in der Signaltransduktion.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1 Der sekundäre Botenstoff Ca<sup>2+</sup> .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2 Ca<sup>2+</sup>-Signale in Zellen des Immunsystems .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Die Familie der TRP-Ionenkanäle .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Die TRPV-Unterfamilie .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5 Der TRPV2-Ionenkanal .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5.1 Struktur und Eigenschaften von TRPV2 .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5.1.1 Struktureller Aufbau des TRPV2-Proteins .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5.1.2 Funktionelle Eigenschaften von TRPV2 .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.2 Pharmakologische Modulatoren der TRPV2-Kanalaktivität.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5.2.1 TRPV2-Aktivatoren.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5.2.2 TRPV2-Inhibitoren .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5.3 Expression von TRPV2 in Zellen des Immunsystems.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Aufgabenstellung .....</b>	<b>15</b>
<b>3. Materialien und Methoden .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Materialien .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.1 Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.2 Medien und Lösungen.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.3 Chemikalien und Substanzen .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.4 Puffer .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Zellkultur .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.1 Stabile Zelllinien .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.2 Immunzellen aus dem Knochenmark von Mäusen.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Fluoreszenz-basiertes <i>Imaging</i> .....</b>	<b>21</b>

3.3.1	Automatisiertes Screening.....	22
3.3.2	Einzelzell-Ca <sup>2+</sup> -Analysen .....	23
3.3.3	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie .....	24
3.5.1	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion .....	26
3.5.2	siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> .....	27
3.7	Funktionale Untersuchungen.....	29
3.8	Statistische Analyse .....	33
4.	Ergebnisse.....	34
4.1	Identifizierung des neuen TRPV2-Inhibitors IV2-1 .....	34
4.1.1	Wirkstoffscreening mittels Mediumdurchsatz-Verfahren .....	34
4.1.2	Funktionale Charakterisierung des neuen TRPV2-Inhibitors IV2-1.....	36
4.2	Physiologische Funktion von TRPV2 in primären Makrophagen .....	39
4.2.1	Expression und <i>knockdown</i> von TRPV2 in primären Makrophagen.....	40
4.2.2	TRPV2 in Phagozytose und Migration von primären Makrophagen .....	41
4.3	Superadditiver Effekt von CBD und Probenecid auf die TRPV2-Aktivität .....	44
4.3.1	Identifizierung des potenzierenden Effekts von Probenecid und CBD.....	44
4.3.2	IV2-1 inhibiert TRPV2 nach Aktivierung mit CBD/Probenecid.....	47
4.4	TRPV2 in der Physiologie von primären Mastzellen.....	50
4.4.1	TRPV2-vermittelte Mediatorfreisetzung in basophilen RBL-2H3-Zellen .....	50
4.4.2	Einfluss von TRPV2 auf die Degranulation von Mastzellen.....	52
5.	Diskussion.....	54
5.1	Der synergistische Effekt von 2-APB bzw. CBD und Probenecid auf TRPV2 ..54	
5.2	Der neue TRPV2 Blocker IV2-1 .....	55
5.3	TRPV2 in Makrophagen .....	56
5.4	TRPV2 in Mastzellen .....	58
5.5	Ausblick.....	59
5.5.1	Pharmakologische Modulation von TRPV2 .....	59
5.5.2	Die physiologische Aktivierung von TRPV2.....	60
5.5.3	TRPV2 in der Pathophysiologie Immunsystem-assoziiertes Erkrankungen.61	
6.	Zusammenfassung der Arbeit.....	62

<b>6.1</b>	<b>Identifizierung des neuen TRPV2-Inhibitors IV2-1 .....</b>	<b>62</b>
<b>6.2</b>	<b>Physiologische Funktion von TRPV2 in primären Makrophagen .....</b>	<b>63</b>
<b>6.3</b>	<b>Superadditiver Effekt von CBD und Probenecid auf die TRPV2-Aktivität .....</b>	<b>64</b>
<b>6.4</b>	<b>TRPV2 in der Physiologie von primären Mastzellen .....</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
	<b>Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit .....</b>	<b>VII</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>VIII</b>
	<b>Liste der Publikationen .....</b>	<b>IX</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>X</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
AM	Acetoxymethylester
anti-DNP-IgE	monoklonaler anti-Dinitrophenyl Antikörper Isotyp Maus-IgE
ARD	Ankyrindomäne
AS	Aminosäure
B-Zellen	B-Lymphozyten
BMDM	Knochenmark-differenzierte Makrophagen (engl. <i>bone marrow-derived macrophages</i> )
BMMC	Knochenmark-differenzierte Mastzellen (engl. <i>bone marrow-derived mast cells</i> )
BSA	bovines Serumalbumin
C-Terminus	Carboxyl-Terminus eines Proteins
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
cDNA	komplementäre DNA
CFP	cyan-fluoreszierendes Protein
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRAC	Ca <sup>2+</sup> - <i>release</i> aktivierte Ca <sup>2+</sup> Kanäle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP-HAS	humanes Serumalbumin-Dinitrophenyl
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
ER	endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötales Kälberserum
FLIPR	<i>Fluorescence Imaging Plate Reader</i>
G418	Geneticin
HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzelllinie 293
HEK <sub>rTRPV2</sub> -Zellen	Ratten-TRPV2-exprimierende HEK293-Zelllinie
HEK <sub>huTRPV2</sub> -Zellen	humane TRPV2-exprimierende HEK293-Zelllinie
HSA	humanes Serumalbumin
huTRPV2	humaner TRPV2-Ionenkanal
IC <sub>50</sub>	mittlere hemmende Konzentration
IgE	Immunglobuline E
IL-3	rekombinantes Maus-Interleukin-3

IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
L-Glut	L-Glutamin
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	rekombinantes Maus-M-CSF
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
mTRPV2	Maus-TRPV2-Ionenkanal
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
p	Zufallswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
PLL	poly-L-Lysin
PNAG	4-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid
PRO	Probenecid
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
rTRPV2	Ratten TRPV2-Ionenkanal
SD	Standartabweichung
siRNA <sub>mTRPV2</sub>	siRNA gegen Maus TRPV2
siRNA <sub>Neg</sub>	siRNA Negativkontrolle ohne Zielstruktur
T-Tellen	T-Lymphozyten
TCR	T-Zell-Rezeptoren
$\Delta^9$ -THC	(-)- $\Delta^9$ -trans-Tetrahydrocannabinol
TIRFM	interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptoren
TM	Transmembransegment
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPA	TRP <i>ankyrin</i> Unterfamilie
TRPC	TRP <i>canonical</i> Unterfamilie
TRPM	TRP <i>melastatin</i> Unterfamilie
TRPML	TRP <i>mucolipin</i> Unterfamilie
TRPN	TRP <i>NOMPC</i> Unterfamilie
TRPP	TRP <i>polycystin</i> Unterfamilie
TRPV	TRP <i>vanilloid</i> Unterfamilie
YFP	gelb-fluoreszierendes Protein



# 1. Einführung

Ein wichtiger Stützpfeiler der modernen Medizin sind die niedermolekularen Wirkstoffe, welche oft auch als *small molecules* bezeichnet werden. Grundsätzlich fallen die meisten Wirkstoffe der heutzutage zugelassenen Arzneimittel in diese Gruppe. Entscheidende Kenngrößen zur Beurteilung der Eignung eines solchen Wirkstoffes sind neben der Wasserlöslichkeit sowie der Anzahl an Donatoren und Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen vor allem Masse und Größe eines Moleküls [1]. Demnach überschreiten klassische niedermolekulare Wirkstoffe eine Molekülmasse von 500 Dalton typischerweise nicht. So grenzt sich diese Wirkstoffgruppe klar von den großen und komplexen Protein-Biologika ab. Auf Grund ihrer geringen molekularen Größe zeichnen sich *small molecule* Wirkstoffe dadurch aus, dass sie in Zellen eindringen oder Zellbarrieren durchdringen können. Deshalb können sie bestimmte Zielstrukturen wie z.B. Enzyme, Ionenkanäle oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in Zellen modulieren aber auch diverse andere Reaktionen verursachen.

## 1.1 Moderne Entwicklung neuer Wirkstoffe

Um solche Wirkstoffe zu entwickeln, gibt es abhängig von der Zielstruktur des Wirkstoffes verschiedene Wege. Eine Möglichkeit besteht darin, bioaktive Substanzen in der Natur zu suchen und neue Strukturen daraus abzuleiten. Bei der Entwicklung von neuen Antibiotika war diese Methode bisher von besonderer Bedeutung [2]. Über Jahrtausende entwickelten insbesondere Pilze und Bakterien antibiotisch wirksame Substanzen, um so einen evolutionären Vorteil gegenüber Wettbewerbern und Fressfeinden zu gewinnen [3]. Obwohl zwischen 1981 und 2002 noch etwa zwei Drittel der entwickelten Wirkstoffe von natürlichen Leitstrukturen abgeleitet wurden [4], sind heutzutage 99 Prozent aller bekannter organischen Verbindungen synthetischen Ursprungs [5]. Dementsprechend hat sich die Routine zur Identifizierung neuer Wirkstoffe verändert. Seit der Entwicklung von Kryoelektronenmikroskopie oder Röntgenkristallographie wurden diese Methoden stetig weiterentwickelt, um schließlich genaue Informationen zur dreidimensionalen Struktur von Proteinen wie Enzyme oder Ionenkanäle zu erlangen [6,7]. Mit Hilfe natürlicher Liganden können so Bindungstaschen von Enzymen oder Ionenkanälen identifiziert und visualisiert werden. Diese Daten ermöglichen im nächsten Schritt ein rationales Wirkstoffdesign und *in silico* Docking-Studien [8]. Wurde eine wirksame Leitstruktur gefunden, kann diese mit Blick auf Selektivität, Potenz und chemische Eigenschaften weiter angepasst und optimiert werden. Während diese Methode elegant und effizient erscheint, wird sie durch die Verfügbarkeit hochauflösender Kristallstrukturen oder den Mangel an (natürlichen) Liganden begrenzt. Existiert keine aktive Leitstruktur bzw. ist kein natürlicher Ligand bekannt, können Millionen bekannte Leitstrukturen auf die Initiierung von pharmakologischer Aktivität der Zielstruktur untersucht werden. Fortschritte in der Automatisierungstechnik sowie den Fluoreszenz-

basierten bildgebenden Methoden ermöglichen solche Untersuchungen *in vitro* im Hochdurchsatz-Verfahren und ermöglichen das Identifizieren neuer Leitstrukturen zur Modulation von z.B. Enzymen oder Ionenkanälen [9,10]. In abgewandelter Form können so auch neue Antikörper mittels Phagen-Display entwickelt oder diverse aufgereinigte Proteinstrukturen mittels DNA-kodierten Bibliotheken auf mögliche Liganden untersucht werden [11,12]. Allerdings gibt es große Unterschiede bei der Auswahl der Substanzbibliotheken. Während manche Plattformen eine möglichst große chemische Vielfalt an potentiell aktiven Substanzen abdecken, gibt es auch fokussierte Bibliotheken z.B. auf Basis von Naturstoffen. Beim *drug repurposing* hingegen werden ausschließlich bereits zugelassene Wirkstoffe oder bekannte bioaktive Substanzen genutzt [13], um diese auf weitere neue Zielstrukturen anzuwenden und zu optimieren. Auf Grundlage dieser Methoden wurden zuletzt enorme pharmakologische Fortschritte bei der Erforschung von Ionenkanälen und der Calcium-abhängigen Signaltransduktion erreicht.

## **1.2 Ca<sup>2+</sup>-Ionen in der Signaltransduktion**

Die Kommunikation auf zellulärer Ebene wird größtenteils durch chemische aber auch physikalische Reize und Signale gesteuert, welche die intrazelluläre Signaltransduktion initiieren können. Innerhalb dieser Signaltransduktion haben neben cyclischem Adenosinmonophosphat oder Inositol-1,4,5-trisphosphat vor allem Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Ca<sup>2+</sup>) eine enorme Bedeutung als sekundärer Botenstoff [14].

### **1.2.1 Der sekundäre Botenstoff Ca<sup>2+</sup>**

Bei der Funktionsweise von Ca<sup>2+</sup> als sekundärer Botenstoff unterscheidet man zwischen einer direkten und einer indirekten Wirkung auf zelluläre Prozesse. Auf direktem Weg kann der Einstrom von Ca<sup>2+</sup> in die Zelle z.B. die Muskelkontraktion beeinflussen, die Freisetzung von Neurotransmittern steuern oder die Apoptose einleiten [15]. Indirekt können Ca<sup>2+</sup>-Ionen bspw. die Zellproliferation beeinflussen oder immunologische Prozesse steuern, indem sie an spezifischen Bindungsstellen von Zielmolekülen wie Proteinkinase C oder Calmodulin binden [14]. Grundvoraussetzung dafür ist eine sensible Steuerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Dies ermöglicht der enorme Unterschied der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit etwa 100 nM im Vergleich zur extrazellulären Konzentration, welche etwa um das 20.000-fache größer ist [16]. Unter großem Energieaufwand halten Zellen diesen Gradienten durch aktiven Transport von Ca<sup>2+</sup> aus der Zelle oder aktive Speicherung von Ca<sup>2+</sup> im Endoplasmatischen Retikulum (ER) aufrecht [17]. Zudem können diverse Proteinstrukturen Ca<sup>2+</sup> binden und damit als Ca<sup>2+</sup>-Puffer agieren [16]. Dem starken Konzentrationsgradienten folgend können daher Ca<sup>2+</sup>-permeable Kanäle wie z.B. Ryanodin-Rezeptoren, spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, Ca<sup>2+</sup>-*release* aktivierte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (CRAC) oder *transient receptor potential* Kanäle (TRP) für zeitlich und räumlich koordinierte Ca<sup>2+</sup>-Signale sorgen [18].

In Abhängigkeit von der Lokalisierung und der Expressionshöhe können einzelne oder wenige Ionenkanäle statt globaler auch lokal beschränkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in der unmittelbaren Nähe zur Membran erzeugen [19]. Solche kurzlebigen, örtlich limitierten und hohen Fluktuationen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration werden als  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen bezeichnet [19,20]. Diese können  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Prozesse wie z.B. Ausschüttung von Vesikeln in räumlicher Nähe zum Ionenkanal initiieren und steuern [21]. Unabhängig davon können lokal beschränkte Signale auch durch flüssigkristalline Lipid-Mikrodomänen induziert werden [22–24], welche floßartige Bereiche der Zellmembran sind, in denen sich neben Cholesterol und Sphingolipiden vor allem funktionale Proteine wie z.B. TRP-Kanäle,  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen oder Calmodulin anreichern können [25,26]. Da in Abhängigkeit von zellulären Stimuli die Zusammensetzung der Proteine variieren kann, bieten Lipid-Mikrodomänen ähnlich wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen eine örtlich limitierte Plattform für die Signaltransduktion [27,28]. Somit könnten zielgerichtete Prozesse wie Phagozytose, Exozytose oder Migration direkt durch Lipid- oder insbesondere  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen beeinflusst werden [29,30].

### **1.2.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Zellen des Immunsystems**

Das Immunsystem stellt die Fähigkeit zur Abwehr von krankheitserregenden Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten sowie körperfremder Substanzen dar. Die dafür zuständigen Immunzellen werden nach der Spezifität ihrer Immunantwort in Zellen der adaptiven oder angeborenen Immunabwehr eingeteilt [31]. Den Hauptbestandteil der adaptiven Immunzellen machen Lymphozyten aus, in denen  $\text{Ca}^{2+}$  neben klassischen Funktionen auch spezifische Mechanismen steuern kann [14,32]. Die T-Lymphozyten (T-Zellen) besitzen spezielle T-Zell-Rezeptoren (TCR), mit denen sie körperfremde Strukturen erkennen können, sofern diese von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden [33]. Anschließend können naive T-Zellen zu  $\text{CD4}^+$ -T-Helferzellen differenzieren und Zytokine ausschüttend die Immunantwort regulieren oder als  $\text{CD8}^+$ -T-Killerzellen infizierte Zellen abtöten [34]. B-Lymphozyten (B-Zellen) besitzen ihrerseits ebenfalls spezielle B-Zell-Rezeptoren (BCR), welche direkt körperfremde Antigene binden können [35]. Nach Bindung eines Antigens und Aktivierung durch T-Helferzellen können B-Zellen proliferieren und differenzieren, um anschließend spezifische Antikörper ausbilden zu können [36]. Allein innerhalb dieser komplexen TCR- und BCR-Signalkaskaden zur spezifischen Immunabwehr hat  $\text{Ca}^{2+}$  eine vielseitig regulierende Funktion [32].

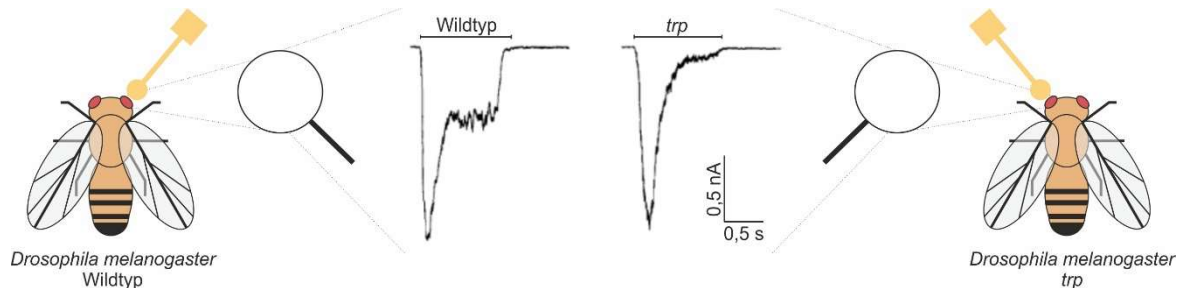
Während die Immunantwort von adaptiven Immunzellen ein Leben lang trainiert werden kann, liegt die angeborene Immunabwehr fest im Genom verschlüsselt. Eine Grundlage der angeborenen Immunantwort bilden zum einen die frei im Blut vorkommenden Plasmaproteine des Komplementsystems als auch im weitesten Sinne die Interleukine [37,38]. Zum anderen zählen auf zellulärer Ebene die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die Granulozyten, die Makrophagen, die dendritischen Zellen und die Mastzellen zum angeborenen Immunsystem

[39,40]. Wenn NK-Zellen körpereigene MHC-Strukturen mit speziellen Rezeptoren erkennen, bleiben sie im inaktiven Zustand [41]. Erst die Interaktion mit körperfremden MHC-Komplexen oder gar das Fehlen solcher bei Tumorzellen oder nach einer Virusinfektion führt zur Aktivierung der NK-Zellen, welche dann die Zielzellen lysieren können [42]. Sowohl dieser Vorgang der Lysierung von Zielzellen als auch die Freisetzung von Zytokinen werden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig gesteuert [43]. Eine weitere Untergruppe innerhalb der angeborenen Immunabwehr stellen die sogenannten Fresszellen dar, welche durch Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten definiert werden. Grob betrachtet sind diese Zellpopulationen für  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Prozesse wie das Aufspüren von Zytokinen oder körperfremden Strukturen wie bakterielle Lipopolysaccharide, das aktive Migrieren entlang dieses Gradienten zum Zielort sowie die Phagozytose und das Verdauen von Erregern verantwortlich [44–47]. Die Mastzellen generieren hingegen die Immunantwort für eine ganz andere Art von Erregern. Mit Hilfe des Antikörpers Immunglobulin E (IgE) können Mastzellen z.B. Parasiten und Allergene erkennen, in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen immunologische Mediatoren wie Zytokine oder Histamin ausschütten und folglich durch allergische und inflammatorische Reaktionen komplexe immunologische Antworten initiieren [48,49]. Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass der sekundäre Botenstoff  $\text{Ca}^{2+}$  in all diesen Prozessen und vielen mehr auf direktem oder indirektem Wege eine entscheidende Rolle spielt. Genauso vielseitig wie die beeinflussten Funktionen sind auch die involvierten Transmembranproteine, welche die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale überhaupt erst ermöglichen. Obwohl viele Mechanismen in diesem Zusammenhang noch nicht vollständig verstanden wurden, scheinen insbesondere TRP-Kanäle wichtige Funktionen der Immunantwort zu beeinflussen.

### 1.3 Die Familie der TRP-Ionenkanäle

Die Familie der TRP-Ionenkanäle steuert eine Vielzahl wichtiger physiologischer Prozesse, was dadurch verdeutlicht wird, dass es keine eukaryotische Zelle tierischen Ursprungs ohne einen TRP-Kanal gibt [50,51]. Damit ist die Erforschung der TRP-Ionenkanäle nicht nur ein Schlüssel zum besseren Verständnis der menschlichen Physiologie, sondern bietet auch eine Möglichkeit, vielversprechende Zielstrukturen zur Behandlung von Krankheiten zu identifizieren. Die Familie der TRP-Ionenkanäle umfasst im Säuger insgesamt 28 verschiedene Vertreter [52], wobei der erste TRP-Ionenkanal, welcher in Säugetieren und insbesondere Menschen nachgewiesen werden konnte, TRPC1 war [53]. Dabei lässt sich die erstmalige Beschreibung der TRP-Ionenkanäle auf einen spontan mutierten Stamm der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zurückführen. Die Photorezeptoren im Komplexauge von Wildtypfruchtfliegen reagierten normalerweise auf dauerhafte Lichtreize mit einem anhaltenden Rezeptorpotential, wohingegen der mutierte Stamm eine schnelle Adaption nach einem transienten Signal im Elektroretinogramm aufwies (Abb. 1.1) [54]. Von dieser Beobachtung leitet sich auch der heutige Name der *transient receptor potential* Kanäle ab [55].

In den folgenden Jahren konnte das entsprechende Gen des mutierten TRP-Kanals ermittelt und sequenziert werden [56], bevor dieser als  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiver Ionenkanal charakterisiert wurde [57]. Interessanterweise stimmt der Aufbau dieses ursprünglichen TRP-Proteins zu 40 Prozent mit der Struktur von humanen TRPC1 überein [53].

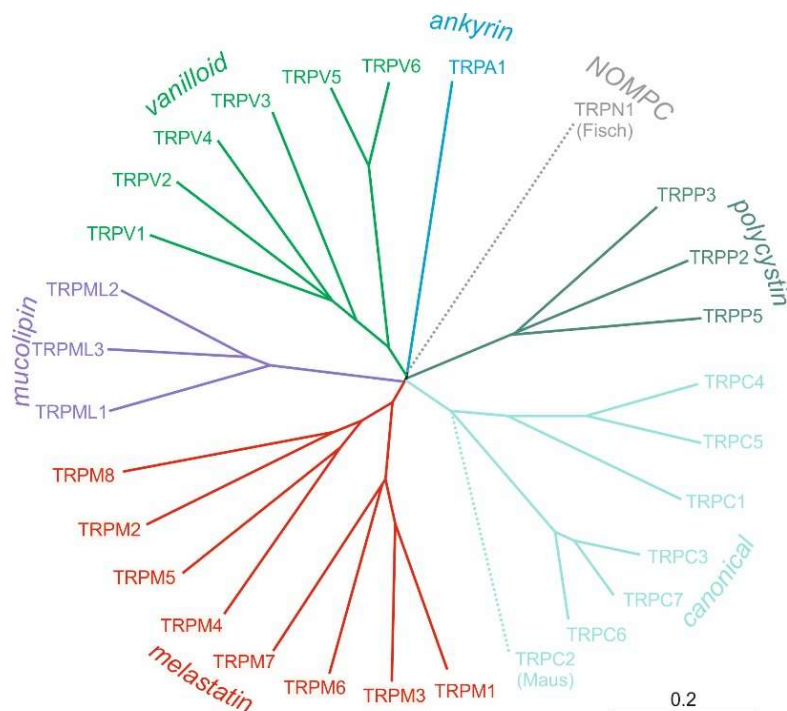


**Abb. 1.1: Elektretinogramme von *Drosophila melanogaster* Wildtyp und *trp*-Mutante.**

Reaktion der Photorezeptoren von *Drosophila melanogaster* Wildtyp (links) und *trp*-Mutante (rechts) auf einen 1 s orangenen Lichtreiz. Nachdem beide mit einem initialen Einwärtsstrom reagierten, bildete sich beim Wildtypen ein Plateau aus, welches bei den *trp*-Mutanten nicht vorhanden war. Abb. verändert nach Minke & Selinger 1996 [58].

Aufgrund ihrer Sequenzhomologie lassen sich die bisher 28 im Säugetier identifizierten TRP-Ionenkanäle nach heutiger Systematik in sechs Unterfamilien gliedern (Abb. 1.2) [59]. Die sieben Vertreter der TRP *canonical* Unterfamilie (TRPC) TRPC1-7 zeichnen sich durch eine Carboxy-terminale Bindestelle für bspw. Calmodulin oder Diacylglycerol aus und weisen die stärkste Sequenzähnlichkeit mit dem ursprünglichen TRP-Protein aus der *Drosophila* auf [52,53,60]. Neben der Regulierung der Kontraktilität bestimmter Abschnitte des Darms oder der Steuerung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion können TRPC-Ionenkanäle u.a. auch den Fettstoffwechsel beeinflussen [61–63]. Zu der TRP *ankyrin* Unterfamilie (TRPA) zählt mit TRPA1 lediglich ein in Säugetieren exprimierter Ionenkanal, der z.B. in Neuronen der Schmerzbahn vorkommt und nicht nur durch Temperaturreize moduliert wird [64], sondern vor allem als physiologischer Sensor für Irritantien und reizende Substanzen fungiert [65]. Die TRP *melastatin* Unterfamilie (TRPM) ist mit den acht Ionenkanälen TRPM1-8 vertreten. Während der zuerst entdeckte TRPM1 am Sehorgan beteiligt ist und bei Funktionsverlust zur Nachtblindheit führen kann [66,67], sind die anderen Kanäle der TRPM-Familie in verschiedene Prozesse wie z.B. Wahrnehmung von Geschmack oder Kälteempfinden involviert [68,69]. Die TRP *mucoipin* Unterfamilie (TRPML) umfasst insgesamt drei Ionenkanäle, die hauptsächlich in Endosomen und Lysosomen vorkommen und diese physiologisch regulieren [70,71]. Aus diesem Grund können Mutationen in TRPML1 zu einer neurodegenerativen Erkrankung (Mucopolidose Typ IV) führen [72]. Ebenfalls aus drei Vertretern bestehend sind Ionenkanäle der TRP *polycystin* Unterfamilie (TRPP) maßgeblich an der Entwicklung der Niere beteiligt und bei entsprechender Mutation der Kanäle für die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung verantwortlich [73,74]. Der am besten erforschte TRP-Ionenkanal zählt zu der *vanilloid* Unterfamilie (TRPV) und ist TRPV1, welcher in sensorischen Nervenzellen exprimiert wird und die Temperatur- sowie Schmerzempfindung steuert [75]. Weiterhin spielen Ionenkanäle der TRPV-Unterfamilie eine wichtige Rolle in der

Immunantwort oder können die Barriere-Funktion der Haut beeinflussen [76,77]. Zusätzlich gibt es eine siebte TRP *NOMPC* Unterfamilie (TRPN), die aber nicht in Säugetieren vorkommt.

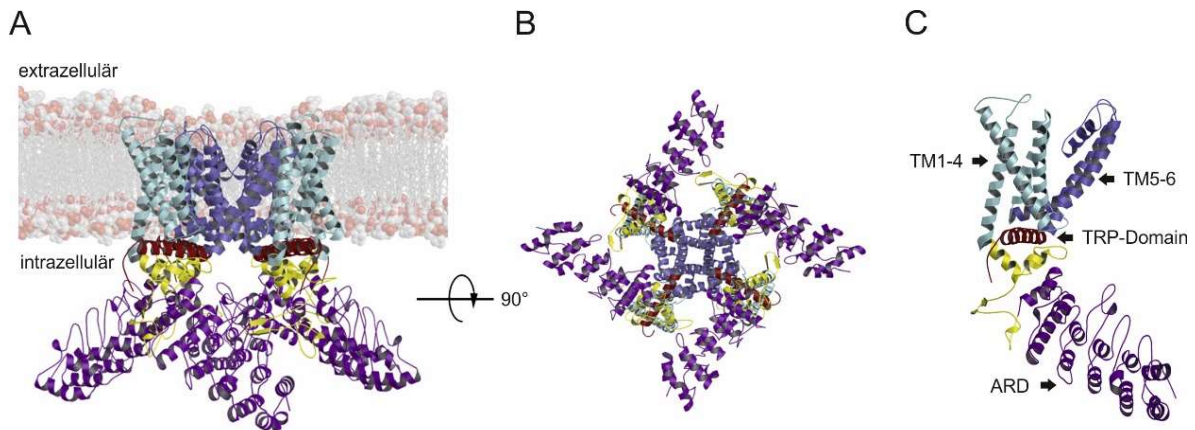


**Abb. 1.2: Stammbaum der TRP-Ionenkanäle gegliedert nach Sequenzhomologie**

Darstellung der einzelnen TRP-Ionenkanäle untergliedert nach Sequenzhomologie in die sieben Unterfamilien als Stammbaum. Maßstabsbalken entspricht 20 Prozent Unterschied in der Aminosäuresequenz der Proteine. Abbildung verändert nach Nilius & Owsianik 2011 [52].

Auch wenn die TRP-Ionenkanäle in unterschiedlichste physiologische Prozesse involviert sind, sind sie im Allgemeinen durch einen ähnlichen strukturellen Aufbau charakterisiert (Abb. 1.3). Betrachtet man zunächst die oligomere Struktur dieser transmembranen Proteine, weisen TRP-Ionenkanäle einen tetrameren Aufbau aus vier Untereinheiten auf. Dabei können sich Kanalkomplexe auch in Form von Heterotetrameren ausbilden. Im Regelfall lagern sich aber vier identische Monomere zu einem Homotetramer zusammen [78]. Diese Untereinheiten werden wiederum durch die intrazelluläre Lokalisierung der in ihrer Länge sehr unterschiedlichen Amino- (N-) und Carboxyl- (C-) Termini als auch die Zusammensetzung aus jeweils sechs Transmembransegmenten (TM) gekennzeichnet [79,80]. Hierbei bilden TM1-4 einen nicht-klassischen Spannungssensor und der kurze hydrophobe Abschnitt einer in die Membran eingelassenen Schleife zwischen TM5 und TM6 den Selektivitätsfilter, welcher nach Zusammenlagerung der vier Untereinheiten die Pore des Ionenkanals konstituiert [52,79]. Während alle TRP-Ionenkanäle Kationen leiten, unterscheiden sie sich teilweise sehr in ihrer Selektivität für einwertige Kationen wie  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  sowie zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  [81]. Eine strukturelle Gemeinsamkeit aller TRP-Ionenkanäle ist die auf TM6 folgende  $\alpha$ -Helix der TRP-Domäne, auch als TRP-Box bezeichnet [82]. Ein weiteres oft auftretendes Charakteristikum innerhalb der Familie der TRP-Ionenkanäle ist die Ankyrindomäne (ARD) im N-Terminus, die sich aus mehr oder weniger häufig wiederholenden einzelnen

Ankyrin-Einheiten zusammensetzt [52,83]. Diese sollen nicht nur im Zusammenhang mit der Ausbildung des oligomeren Tetramers stehen, sondern auch für die intrazelluläre Interaktion mit Liganden und Proteinen sorgen [83,84]. Somit könnten diese ARD eine wichtige Schnittstelle im Rahmen der physiologischen Signaltransduktion darstellen und eine potentielle Zielstruktur für eine pharmakologische Modulation sein. Interessanterweise wurden die ersten ARD-Strukturen innerhalb der TRPV-Unterfamilie aufgeklärt [85–88].



**Abb. 1.3: Beispielhafte Darstellung der Struktur von TRPV1**

(A, B) Abbildung der Zellmembran mit eingebettetem Modell der TRPV1-Proteinstruktur (PDB: 3J5P) in seitlicher Ansicht (A) und in 90° gedrehter Aufsicht (B). (C) Darstellung des TRPV1-Monomers mit den einzelnen Bestandteilen des Spannungssensors (TM1-4), der Pore (TM5-6), der TRP-Domäne und der ARD. Abbildung verändert nach Ladrón-de-Guevara et al. 2020 [82].

#### 1.4 Die TRPV-Unterfamilie

Die TRPV-Unterfamilie besteht aus insgesamt sechs Vertretern. Während über die physiologische Funktion einiger TRPV-Ionenkanäle wenig bekannt ist, zählt auch der am besten erforschte Ionenkanal TRPV1 in diese Gruppe [75]. Nach TRPC1 war TRPV1 einer der ersten identifizierten Ionenkanäle [89], dessen Entdeckung und Erforschung kürzlich mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde [90]. Neben einer wichtigen Beteiligung innerhalb der Nozizeption kann der nicht-selektive  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable TRPV1-Kanal vor allem die Thermoregulation beeinflussen oder u.a. auch eine Rolle bei der Überaktivität der Harnblasenfunktion spielen [75,91,92]. Dementsprechend kann eine starke Expression von TRPV1 in sensorischen Nervenzellen verschiedener Ganglien aber durchaus auch in Gefäßmuskelzellen lokalisiert werden [89,93]. TRPV1 wird nicht nur von zahlreichen pharmakologischen Liganden oder dem Scharfstoff Capsaicin moduliert [75], sondern auch durch Hitze, einen sauren pH-Wert bzw. Protonen oder verschiedene Toxine aktiviert [89,94]. Derzeit scheinen innerhalb der TRP-Familie elf Ionenkanäle durch Temperatur moduliert zu werden, welche daher als Thermo-TRPs bezeichnet werden [95]. Neben prominenten Vertretern wie TRPV1 oder TRPM8 kann auch TRPV3 thermosensorisch aktiviert werden [96]. Während andere Ionenkanäle wie z.B. TRPV1 durch wiederholte Stimulation desensitiviert werden [97], zeichnet den TRPV3 eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Sensitivierung nach repetitiver Stimulation durch Wärme oder pharmakologische Modulatoren aus [98,99]. Obwohl TRPV3 in

verschiedenen Geweben wie z.B. dem Darm, der Haut oder der Placenta exprimiert wird [100], scheint dieser Ionenkanal besonders im Zusammenhang mit der Barriere-Funktion der Haut und der Freisetzung von entzündlichen Mediatoren durch Keratinozyten von Interesse zu sein [101,102].

Auch TRPV4 kann durch Hitze stimuliert werden und zählt damit ebenso zu den Thermo-TRPs [103]. Zusätzlich modulieren mechanische Reize oder auch endogene Substanzen wie z.B. Arachidonsäure oder Anandamid die Kanalaktivität des nicht-selektiven aber  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -permeablen TRPV4-Kanals [104]. Seit der Entwicklung von selektiven pharmakologischen Liganden konnte der TRPV4-Kanal besser verstanden werden, welcher breit im humanen Gewebe exprimiert wird, u.a. in der Lunge, der Harnblase, den Arterien aber auch in der Haut, dem Herzen oder der Niere [104,105]. So konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter TRPV4-Aktivität und einer Überaktivität der Harnblase durch verstärkte Kontraktion der Blasenmuskulatur oder ein TRPV4-vermittelter distributiver Schock durch erhöhte Gefäßpermeabilität nachgewiesen werden [106,107].

Als einer von lediglich zwei Ionenkanälen innerhalb der TRPV-Unterfamilie weist TRPV5 eine hohe Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$  auf [108]. Diese strukturelle Eigenschaft der Kanalpore ist eine Grundvoraussetzung für die physiologische Rolle von TRPV5 innerhalb der Niere. Während bisherige Vertreter der TRP-Ionenkanäle oft in diversen Geweben exprimiert wurden, konnte TRPV5 hauptsächlich in der apikalen Membran der Zellen des distalen Tubulus der Niere nachgewiesen werden [109]. Dort reguliert TRPV5 maßgeblich die Rückresorption von  $\text{Ca}^{2+}$  und kann bei Mutation zu einer Hypercalciurie führen [108,110]. Dabei wird die Kanalaktivität oder Expression von TRPV5 in der Niere und damit verbunden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückresorption durch Botenstoffe der Calciumhomöostase wie z.B. Vitamin D, Parathyroidhormon oder durch Sexualhormone gesteuert [111–113].

Der zweite TRP-Ionenkanal mit einer hohen Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$  ist TRPV6, dessen Kanalaktivität u.a. durch Calmodulin und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) reguliert wird [114,115]. TRPV6 wird vor allem in der Prostata, in der Plazenta, im Pankreas, im Hoden aber auch im Darm exprimiert, wo er bspw. den transzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport beeinflussen könnte [116]. Während als pathophysiologischer Befund eine Überexpression von TRPV6 in Prostata- und Mammatumorzellen nachgewiesen werden konnte [117], haben Versuche an TRPV6-defizienten Mäusen gezeigt, dass TRPV6 eine wichtige physiologische Rolle bei der männlichen Fertilität zu spielen scheint [118].

### **1.5 Der TRPV2-Ionenkanal**

Auch wenn in den letzten Jahren die Anzahl an Publikationen im Zusammenhang mit TRPV2 stetig gestiegen ist, gibt es nur eine relativ überschaubare Menge an klaren Fakten zu dessen möglicher physiologischer Funktion. Das TRPV2-kodierende Gen befindet sich etwa 10

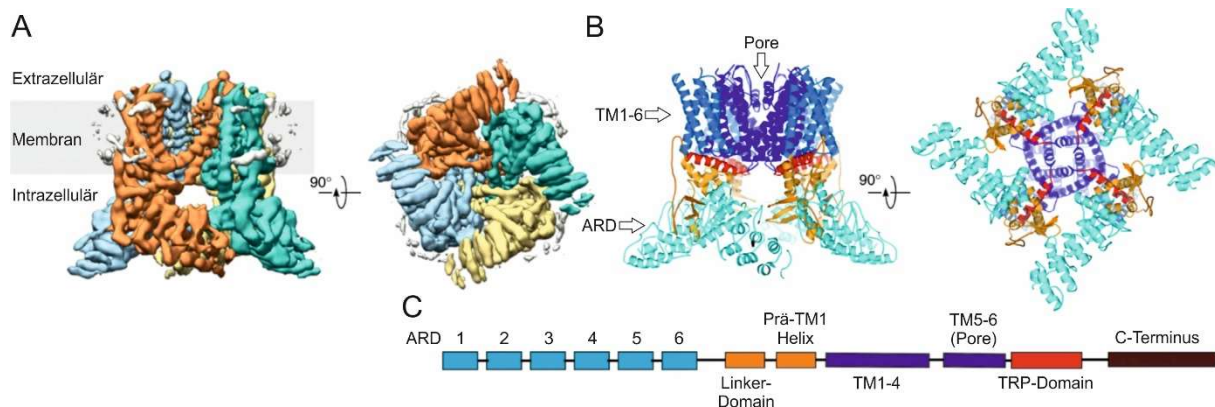


Megabasenpaare vom TRPV1-kodierenden Gen entfernt auf dem elften Chromosom des menschlichen Genoms [119]. Der 1999 erstmalig beschriebene TRPV2-Kanal wird nahezu ubiquitär in zahlreichen Geweben mehr oder weniger stark exprimiert [120,121]. Zunächst konnte eine hohe Expression von TRPV2 innerhalb von Zellen des Gehirns, der Lunge, der Milz oder in sensorischen Nervenzellen der Spinal- und Trigemininalganglien identifiziert werden [120,122]. Anschließend konnte TRPV2 u.a. auch in Purkinje-Zellen des Kleinhirns, in Pigmentepithelzellen der Netzhaut und in endokrinen Zellen nachgewiesen werden [123–125]. Zudem scheint TRPV2 aufgrund der breiten Expression in Zellen des Immunsystems dort eine besonders wichtige Rolle einzunehmen [77].

## 1.5.1 Struktur und Eigenschaften von TRPV2

### 1.5.1.1 Struktureller Aufbau des TRPV2-Proteins

Die Untereinheiten des nicht-selektiven,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen TRPV2-Ionenkanals umfassen 756 (Maus), 761 (Ratte) bzw. 764 (Mensch) Aminosäuren (AS). Dabei sind der Ratten TRPV2 (rTRPV2) und der humane TRPV2 (huTRPV2) zu 86,2 Prozent ähnlich aufgebaut [120]. Beide besitzen eine Sequenzähnlichkeit von 66 Prozent mit Ratten TRPV1 [120], wohingegen der Maus TRPV2 (mTRPV2) lediglich zu 44 Prozent mit diesem übereinstimmt [121]. Wie zuvor anhand des allgemeinen Aufbaus von TRP-Ionenkanälen beschrieben, besteht das TRPV2-Protein aus einem intrazellulären N-Terminus, sechs Transmembransegmenten und einem intrazellulären C-Terminus [80,87]. So formt der als Homotetramer vorkommende TRPV2-Kanal einen nicht-selektiven, für  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kationenkanal (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Kryoelektronenmikroskopie-Struktur von TRPV2**

Durch Kryoelektronenmikroskopie ermittelte Proteinstruktur von TRPV2, dargestellt als Homotetramer mit unterschiedlich gefärbten Monomeren (A) bzw. als Atommodell mit unterschiedlich eingefärbten Bestandteilen des Ionenkanals (B). (C) Darstellung des grundsätzlichen Aufbaus von TRPV2 mit den einzelnen Bestandteilen. Abbildung verändert nach Zubcevic et al. 2016 [126].

Der TM4-TM5-Linker scheint aufgrund seiner strukturellen Beschaffenheit und Möglichkeiten der Konformation ein weites Öffnen der Kanalpore zu ermöglichen, bei dem nicht nur  $\text{Ca}^{2+}$ , sondern auch große organische Kationen die Pore passieren können [127]. Diese Eigenschaft könnte im Rahmen einer Akkumulation von kationischen Zytostatika in TRPV2-exprimierenden Tumorzellen einen interessanten Therapieansatz darstellen [128,129]. Eine weitere

Besonderheit stellt der lange intrazelluläre N-Terminus des Proteins dar, welcher etwa 390 AS umfasst und im mittleren Abschnitt (AS 70-320) eine ARD aus sechs Ankyrin-Einheiten aufweist [87]. Diese ARD scheint bei TRPV2 weniger den homotetrameren Aufbau des Ionenkanals zu stabilisieren, als vielmehr Zielstruktur für Modulatoren oder Protein-Protein-Interaktionen zu sein [85,87]. So werden Bindungstaschen für potentielle Liganden bspw. zwischen den Ankyrin-Einheiten 4 und 5 sowie innerhalb der  $\beta$ -Schleife der 3. Einheit vermutet [87]. Im Gegensatz dazu weist der intrazelluläre C-Terminus die typische etwa 20 AS umfassende TRP-Domäne und Bindungsstellen für Calmodulin sowie PIP<sub>2</sub> auf [121,130,131]. Wie bei anderen Ionenkanälen dieser Unterfamilie auch, scheint die TRP-Domäne eine Rolle bei der Bildung des Homotetramers zu spielen und überschneidet sich hier sequenziell mit der Bindungsstelle von Calmodulin [121,132].

### 1.5.1.2 Funktionelle Eigenschaften von TRPV2

Die Aktivität des Thermo-TRPs TRPV2 kann erst mit Temperaturen über 52 °C induziert werden [120]. Diese Aktivierbarkeit von TRPV2 durch hohe Temperaturen könnte maßgeblich von dem 65 AS umfassenden und konservierten Abschnitt des N-Terminus zwischen ARD und TM beeinflusst werden [121,133]. Allerdings konnten Experimente mit TRPV2-defizienten Mäusen keine Veränderung in der Wahrnehmung von Temperatur aufzeigen [134]. Ein Zusammenhang zwischen TRPV2, solch hohen Temperaturen und der Nozizeption wird aufgrund der umfangreichen Expression innerhalb von z.B. Trigeminalganglien jedoch weiterhin diskutiert [120,135]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TRPV2 zu den mechanosensitiven Ionenkanälen zählt und durch Dehnung der Membran aktiviert werden kann [136]. Demnach scheinen in Myozyten der Aorta sowie in Erythrozyten hypotonische Verhältnisse bzw. das Anschwellen der Zellen eine TRPV2-Aktivität zu induzieren, welche eine Depolarisation der Membran verursachen kann [136,137]. Grundsätzlich konnte in nicht-stimulierten Zellen zahlreicher Gewebe nachgewiesen werden, dass TRPV2 vermehrt im ER statt der Plasmamembran vorkommt [122,138]. Ob TRPV2 im ER oder in frühen Endosomen auch als Ca<sup>2+</sup>-permeabler Ionenkanal eine Funktion hat, blieb bisher ungeklärt [139]. Auf eine Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie *insulin-like growth factor-1*, *platelet-derived growth factor* oder fötales Kälberserum (FKS) als Mischung verschiedener Wachstumsfaktoren wurde eine Translokation von TRPV2 hin zur Zellmembran beobachtet, was eine zusätzliche Möglichkeit zur Regulierung der TRPV2-Aktivität darstellen könnte [122]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Oxidation von Methionin 528 und 607 des Transmembranproteins durch Wasserstoffperoxid, UVA-Licht oder sogar intrazelluläre reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) TRPV2 aktivieren oder für andere Stimuli sensitivieren kann [140]. Während eine Oxidation die Sensitivität von TRPV2 gegenüber Hitze und pharmakologischen Modulatoren erhöhte, scheint dieser Prozess die Schwelle zur Aktivierung durch mechanische Stimuli nicht zu beeinflussen [141]. Insbesondere die Oxidation von TRPV2 durch intrazelluläre ROS

könnte im Zusammenhang mit der Erkennung von Erregern wie Bakterien oder Pilzen durch den Toll-like Rezeptor (TLR) 4 in Makrophagen einen endogenen Aktivierungsmechanismus darstellen [140]. So könnte innerhalb der angeborenen Immunabwehr die NADPH-Oxidase als Bestandteil der TLR4-Signalkaskade aktiviert werden und vermehrt ROS produzieren [142], welche dann TRPV2 oxidieren und folglich aktivieren oder zumindest sensitivieren könnten.

### **1.5.2 Pharmakologische Modulatoren der TRPV2-Kanalaktivität**

Während bereits einiges über die TRPV2 Aktivierung bzw. Sensitivierung durch physikalische Reize wie mechanischer Druck oder Hitze berichtet wurde, sind endogene Liganden zur direkten Modulation der TRPV2-Aktivität bislang unbekannt. Wenngleich Bindestellen für Calmodulin und PIP<sub>2</sub> identifiziert werden konnten, scheint bisher lediglich Evidenz für die Funktion von PIP<sub>2</sub> zur Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Desensitivierung zu existieren [130,131]. Zur Aktivierung oder Inhibition von TRPV2 konnten im Rahmen pharmakologischer Studien bisher wenige unspezifische Modulatoren identifiziert und in Zellkulturmodellen angewendet werden.

#### **1.5.2.1 TRPV2-Aktivatoren**

##### ***2-Aminoethoxydiphenylborat***

Einer der ersten bekannten Modulatoren von TRPV2 war die Substanz 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB). 2-APB wurde erstmals 1997 als Inhibitor des Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptors identifiziert und fiel erst später als Modulator von verschiedenen Ionenkanälen der TRP-Familie auf [143]. Da 2-APB u.a. die Kanalaktivität von diversen Ionenkanälen der TRPC- und TRPM-Unterfamilie inhibiert [144], wurde die Substanz ursprünglich als universaler und unspezifischer TRP-Blocker bezeichnet [145]. Allerdings konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass 2-APB die Kanalaktivität der drei Vertreter TRPV1 (EC<sub>50</sub> = 114 µM), TRPV2 (EC<sub>50</sub> = 129 µM) und TRPV3 (EC<sub>50</sub> = 34 µM) aktiviert [146]. Obwohl weitere unspezifische Wirkungen von 2-APB auf speichervermittelte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle oder *gap junctions* bekannt sind [147–149], wurden relativ hohe Konzentrationen von 2-APB zur Aktivierung von TRPV2 genutzt [129,150]. Weiterhin scheint es innerhalb der Bindungstasche von TRPV2 für 2-APB speziesabhängige Unterschiede zu geben, da 2-APB keine Wirkung auf huTRPV2 zu haben scheint [151].

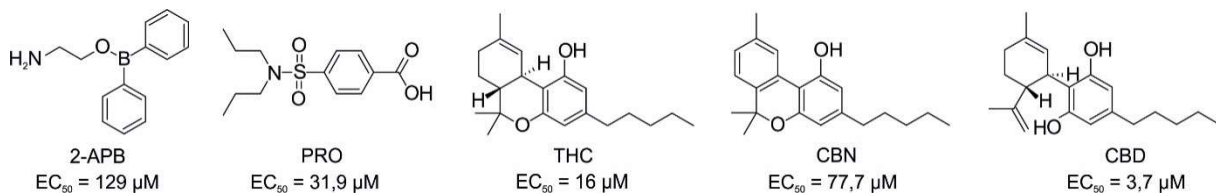
##### ***Probenecid***

Ein weiterer Modulator von TRPV2 ist der Wirkstoff Probenecid (PRO), welcher organische Anionentransporter blockiert und zur Therapie der Gicht eingesetzt wird. Bei der Erforschung von TRPV2 im Rahmen der Schmerzentscheidung in Trigeminalneuronen konnten Bang et al. Probenecid als einen TRPV2-Aktivatoren identifizieren (EC<sub>50</sub> = 31,9 µM) [152]. Der niedrige EC<sub>50</sub>-Wert konnte bisher jedoch nicht bestätigt werden und könnte auch durch Protonen der Carbonsäure-Funktion von Probenecid bei ungenügender Pufferung beeinflusst worden sein.

Allerdings scheint Probenecid weder TRPV1, TRPV3 noch TRPV4 zu aktivieren und damit zumindest innerhalb der TRPV-Unterfamilie spezifisch zu wirken. Außerdem konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe eine potenzierende Wirkung von Probenecid auf 2-APB nachgewiesen werden [153], welche zur Minimierung verwendeter Konzentrationen genutzt werden könnte.

### **Cannabinoide**

Zusätzlich zeigen auch verschiedene Cannabinoide der Pflanze *Cannabis sativa* eine aktivierende Wirkung auf TRPV2. (-)- $\Delta^9$ -trans-Tetrahydrocannabinol (THC) aktiviert sowohl rTRPV2 ( $EC_{50} = 16 \mu\text{M}$ ) als auch huTRPV2 ( $EC_{50} = 43 \mu\text{M}$ ) [151]. Da die Substanz zusätzlich auch TRPA1 moduliert [154], wurden 20 weitere Cannabinoid-Derivate durch Qin et al. hinsichtlich ihrer TRPV2-Aktivität überprüft [155]. So konnten zusätzlich die beiden nicht-psychoaktiven Cannabinoid-Derivate Cannabinol (CBN) ( $EC_{50} = 77,7 \mu\text{M}$ ) und Cannabidiol (CBD) ( $EC_{50} = 3,7 \mu\text{M}$ ) als TRPV2-Aktivatoren identifiziert werden. Während CBN ebenfalls TRPA1 aktivieren kann, ist CBD auch ein TRPV1- aber kein TRPA1-Aktivator [155]. Allerdings sind alle drei Cannabinoide zusätzlich potente Modulatoren der Cannabinoid-Rezeptoren und müssen zur Aktivierung von TRPV2 in relativ hohen Konzentrationen genutzt werden, was die Wahrscheinlichkeit für unspezifische und zytotoxische Effekte erhöhen kann.



**Abb. 1.5: Schema der bekannten TRPV2-Aktivatoren**

Das Schema bildet die fünf bekannten TRPV2-Aktivatoren mit Namen, chemischer Struktur und  $EC_{50}$ -Wert ab

#### **1.5.2.2 TRPV2-Inhibitoren**

##### **Ruthenium-Rot**

Die erste bekannte Substanz, welche die Aktivität von TRPV2 blockieren konnte, war Ruthenium-Rot. Dabei stellt Ruthenium-Rot grundsätzlich einen unspezifischen Blocker der TRPV-Unterfamilie dar [146], welcher auch die Kanalpore von TRPV2 in nicht-kompetitiver Weise potent inhibiert ( $IC_{50} = 0,62 \mu\text{M}$ ) [120]. So konnte sich Ruthenium-Rot trotz mangelnder Selektivität als häufig genutzter spannungsabhängiger Blocker von TRPV2 durchsetzen.

##### **Tranilast**

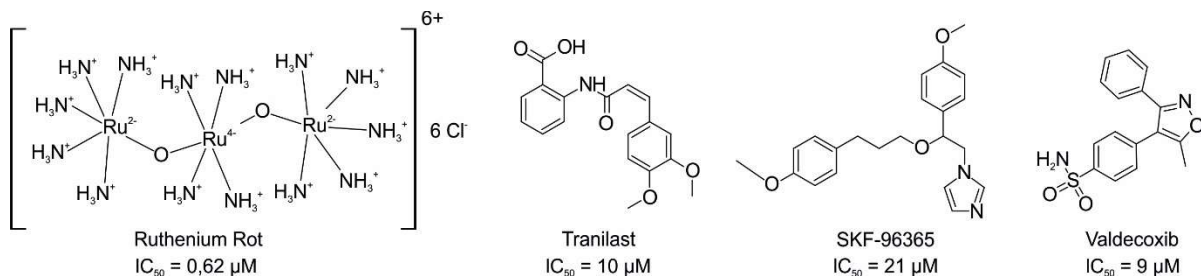
Ursprünglich wurde Tranilast 1982 als Antiallergikum etabliert und zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen wie Asthma bronchiale eingesetzt. Obwohl die Substanz bei guter Verträglichkeit jahrelang verwendet und getestet wurde, scheint Tranilast diverse Zielstrukturen zu beeinflussen [156]. So konnte Tranilast auch als unspezifischer TRPV2-Inhibitor etabliert werden ( $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ ) [125,157].

## SKF96365

Ein weiterer unspezifischer TRPV2-Blocker ist die 1990 entdeckte Substanz SKF96365 [158]. Während die Substanz erst im Zusammenhang mit u.a. speichervermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen genutzt wurde, stellte sich heraus, dass SKF96365 auch Ionenkanäle der TRPC-Unterfamilie und TRPV2 blockiert [159,160]. Dabei konnte SKF96365 TRPV2 lediglich dann blockieren, wenn die Kanalaktivität mit höchstens 100  $\mu\text{M}$  2-APB induziert wurde ( $\text{IC}_{50} = 21 \mu\text{M}$ ) [160].

## Valdecoxib

Kürzlich konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe der Inhibitor der Cyclooxygenase-2 (COX-2) Valdecoxib als ein TRPV2 Blocker etabliert werden [153]. Während Valdecoxib die TRPV2-Aktivität inhibieren kann ( $\text{IC}_{50} = 9 \mu\text{M}$ ), zeigt der COX-2-Inhibitor keine Wirkung auf TRPV1, TRPV3 sowie TRPV4 und scheint damit innerhalb der TRPV-Unterfamilie spezifisch zu wirken. Dennoch werden weitere potente und vor allem TRPV2-selektive Blocker dringend benötigt.



**Abb. 1.6: Schema der bekannten TRPV2-Inhibitoren**

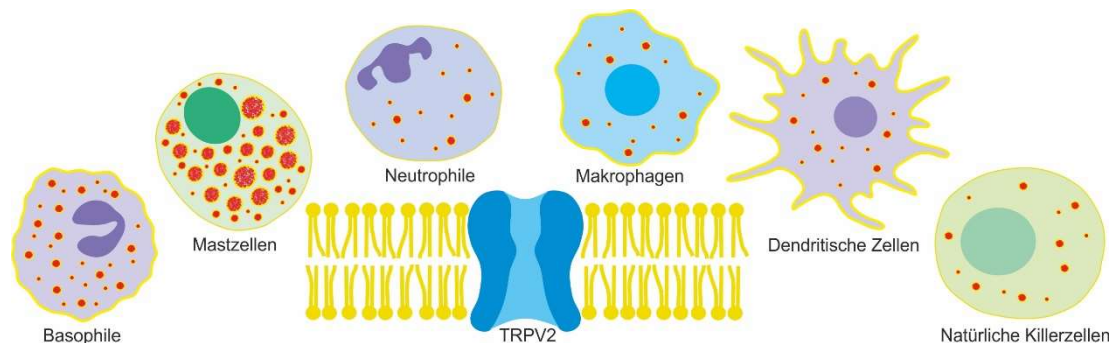
Darstellung der bisher identifizierten Inhibitoren von TRPV2 mit Namen, chemischer Strukturen und  $\text{IC}_{50}$ -Werten.

### 1.5.3 Expression von TRPV2 in Zellen des Immunsystems

Innerhalb des adaptiven Immunsystems konnte zunächst TRPV2-mRNA in B-Zellen sowie besonders in  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen nachgewiesen werden [161]. Auch in der immortalisierten Jurkat-Zelllinie wurde die Expression von TRPV2 mRNA bestätigt, wobei ein siRNA-vermittelter *knockdown* von TRPV2 dort die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation innerhalb der TCR-Signalkaskade beeinträchtigt [162]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der mechanosensitive TRPV2-Kanal in T-Zellen mittels Dehnung aktiviert werden kann, was einen möglichen Aktivierungsmechanismus der TCR-Signalkaskade bspw. im Rahmen der Zell-Zell Interaktion darstellen könnte und die physiologische Relevanz von TRPV2 in T-Zellen verdeutlicht [163,164]. In B-Zellen wird der TRPV2-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom im Kontext der Zellentwicklung und Regulierung der Zellproliferation diskutiert [77,165], wobei weitere Studien zum besseren Verständnis ausstehen.

Im besonderen Umfang kommt TRPV2 jedoch in Zellen des angeborenen Immunsystems vor (Abb. 1.7). Dabei exprimieren bspw. humane  $\text{CD56}^+$  NK-Zellen 10- bis 30-fach mehr TRPV2 als alle anderen Immunzellen [166]. Dennoch konnte die physiologische Funktion von TRPV2 in NK-Zellen bislang nicht aufgeklärt werden [77]. Auch in dendritischen Zellen sowie

neutrophilen und basophilen Granulozyten wird TRPV2 exprimiert. Hier konnte bisher ebenso keine TRPV2-Beteiligung an entsprechenden Funktionen nachgewiesen werden [77,166–168]. In Monozyten sowie differenzierten Makrophagen des Blutes und verschiedener Gewebe konnte ebenfalls TRPV2-mRNA nachgewiesen werden [169,170]. So konnte in Makrophagen gezeigt werden, dass die Translokation von TRPV2 zur Zellmembran mit dem chemotaktischen Peptid fMet-Leu-Phe induziert und damit die Migration beeinflusst werden kann [138]. Zusätzlich konnten Link et al. demonstrieren, dass TRPV2 eine wichtige Rolle bei der Bindung von Partikeln wie z.B. Zymosan spielt und die Phagozytose durch Rekrutierung zu frühen Phagosomen und anschließender Depolarisation der Membran beeinflusst [45]. Außerdem wiesen TRPV2-defiziente Mäuse eine schlechtere Zellmotilität der Makrophagen sowie eine höhere Sterblichkeit auf Grund einer geringeren Eliminierung von Bakterien nach Infektion auf [45]. Aber auch ein Einfluss von TRPV2 auf die Zelldifferenzierung wird diskutiert [171]. Obwohl die genaueren Mechanismen einer TRPV2-Beteiligung noch ungeklärt sind, scheint der Kanal eine enorm wichtige Rolle bei der Immunabwehr durch Makrophagen einzunehmen. Als wichtiger sezernierender Bestandteil des angeborenen Immunsystems exprimieren auch Mastzellen hohe Mengen an TRPV2 [168,172]. Ein möglicher Mechanismus, der durch einen TRPV2-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom beeinflusst werden kann, stellt die Degranulation von Mastzellen dar. So konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von TRPV2 Hitze und mechanischer Druck die Degranulation von Mastzellen induzieren können [173]. Im Gegensatz dazu konnte in peritonealen Mastzellen von Mäusen weder ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration noch eine Freisetzung von Mediatoren nach TRPV2-Aktivierung beobachtet werden [174]. Dementsprechend sollte ein möglicher Einfluss von TRPV2 auf die Degranulation von Mastzellen weiter untersucht werden.



**Abb. 1.7: Übersicht der TRPV2 exprimierenden Zellen des angeborenen Immunsystems.**  
Schematische Darstellung der Zellen des angeborenen Immunsystems, welche TRPV2 exprimieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TRPV2 in nahezu allen Zellen des Immunsystems exprimiert wird [77], wobei bisher relativ wenig über die physiologische Funktion verstanden worden ist. Allerdings könnte TRPV2 gerade in Makrophagen und Mastzellen eine vielversprechende Zielstruktur für die Behandlung von infektiösen, entzündlichen und allergischen Erkrankungen darstellen, wobei eine weitere Erforschung insbesondere mit spezifischen pharmakologischen Modulatoren zwingend erforderlich ist.

## 2. Aufgabenstellung

Zur pharmakologischen Aktivierung des TRPV2-Ionenkanals konnten bis dato lediglich hohe Konzentrationen an unspezifischen Aktivatoren wie 2-APB, THC oder Probenecid genutzt werden [144], welche neben *off-target*-Effekten auch eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung verursachen können. Zur Inhibition von TRPV2-Aktivität standen ebenfalls nur unspezifische Inhibitoren wie Ruthenium-Rot, Tranylactam oder SKF96365 zur Verfügung. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte ich bei der Entdeckung des potenzierenden Effektes von Probenecid auf 2-APB sowie der Identifizierung einer hemmenden Wirkung des COX-2-Inhibitors Valdecoxib auf TRPV2 mitwirken [153]. Dennoch ist die weitere Erforschung von potenten TRPV2-selektiven Modulatoren notwendig, um zum einen die physiologische Funktion von TRPV2 innerhalb des angeborenen Immunsystems besser zu verstehen und zum anderen TRPV2 als mögliche Zielstruktur zu therapeutischen Zwecken gezielt regulieren zu können. Unter diesen Aspekten entwickelten wir folgende Zielstellungen für meine Promotion:

1. Durchführung eines Mediumdurchsatz-Screenings der Substanzbibliothek des Molekulararchivs (erhalten vom Karlsruher Institut für Technologie) mit dem TRPV2-Ionenkanal zur Identifizierung und Validierung von neuartigen Modulatoren.
2. Quantitativer Nachweis der Expression von TRPV2-mRNA, Bestätigung der funktionellen TRPV2-Expression sowie Etablierung des siRNA-vermittelten *Knockdowns* von TRPV2 in primären Makrophagen.
3. Untersuchung des Einflusses von TRPV2 auf Phagozytose und Migration von primären Makrophagen.
4. Nachweis der Bildung von  $Ca^{2+}$ -Mikrodomänen durch einzelne TRPV2-Ionenkanäle in primären Makrophagen.
5. Evaluierung des potenzierenden Effekts von Probenecid auf andere Aktivatoren von TRPV2 zur Identifizierung weiterer Möglichkeiten der TRPV2-Aktivierung.
6. Quantitativer Nachweis der Expression von TRPV2-mRNA sowie Bestätigung der funktionellen TRPV2-Expression in primären Mastzellen.
7. Untersuchung eines Effektes von TRPV2 auf die Ausschüttung von Mediatoren wie Histamin bei der Degranulation primärer Mastzellen.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Artikelnummer</i>
Zellkulturflaschen, 75 mm <sup>2</sup>	Greiner	658175
Zellkulturflaschen, 25 mm <sup>2</sup>	Greiner	690175
Suspensionskulturflasche, 250 ml	Greiner	658195
Suspensionskulturflasche, 50 ml	Greiner	690195
serologische Pipetten, 2 ml	Sarstedt	86.1252
serologische Pipetten, 5 ml	Sarstedt	86.1253
serologische Pipetten, 10 ml	Sarstedt	86.1254
serologische Pipetten, 25 ml	Sarstedt	86.1685
384 Well-Mikrotiterplatten, non-binding, µClear, schwarz, F-Boden	Greiner	781906
96 Well-Mikrotiterplatten, CELLSTAR µClear, schwarz, F-Boden	Greiner	655090
96 Well-Mikrotiterplatten, CELLSTAR	Greiner	655189
96 Well-Mikrotiterplatten, F-Boden	Greiner	655101
runde Deckgläschen, 25 mm	Th. Geyer	6080195
35-mm-Kulturschale	Corning	430165
Zellkultur 24 Well-Multiwellplatten	Greiner	662160
Zellkultur Einsatz für 24 Well-Platten, transluzente Membran, 8 µM Porengröße	Greiner	662638
Sterican Insulin-Kanüle 27 G	Braun	4665406
10-ml-Spritze Luer-Lock	BD	300912
Zellsieb, 70 µm, Nylon	Greiner	542070

#### 3.1.2 Medien und Lösungen

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Artikelnummer</i>
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Merck	M-2279
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Merck	I-3390
Opti-MEM I	Thermo Fisher	11524456
fötale Kälberserum	Thermo Fisher	8933D
L-Glutamin (L-Glut)	Merck	G7513
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Merck	D-8537
Trypanblau	Merck	T8154
Trypsin/EDTA	Merck	T4174



Penicillin-Streptomycin	Merck	P-0781
Geneticin (G418)	Capricorn	G-418-Q
2-Mercaptoethanol	Merck	M3148
rekombinantes Maus M-CSF (M-CSF)	PeptoTech	315-02
rekombinantes Maus IL-3 (IL-3)	PeptoTech	213-13
poly-L-Lysin	Merck	P-9155
EIA-Grade Ultrapure Water	Biomol	BR-A07001.1
Chloroform	Merck	496189
Ethanol	Th. Geyer	8025.2500PE
Isopropanol	Merck	34863
Aqua ad iniectabilia	Braun	8001988
Methanol	Merck	34860-2.5L-R

### 3.1.3 Chemikalien und Substanzen

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
4-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid (PNAG)	Carl Roth	4062.3
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher	11668019
mTRPV2 Primer (siehe Tab. 3.3)	Merck	-
Cell Proliferation Reagent WST-1	Merck	11644807001
TRI Reagent	Merck	T9424
TRPV2 siRNA (MSS212426)	Thermo Fisher	1320001
siRNA-Negativkontrolle (Med GC)	Thermo Fisher	12935300
Zymosan A ( <i>Sacch. cerevisiae</i> )	Merck	Z4250
Lipopolysaccharide von <i>E. coli</i> O111:B4	Merck	L-2630
humanes Albumin, dinitrophenyl (DNP-HSA)	Merck	A-6661
monoklonaler anti-Dinitrophenyl Antikörper Isotyp Maus-IgE (anti-DNP-IgE)	Merck	D-8406
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid	Merck	M5655
Fluo-4/AM	Thermo Fisher	F14202
Fura-2/AM	biomol	ABD-21021
Cal-520FF/AM	biomol	ABD-21142
bovines Serumalbumin (BSA)	Merck	A 2153
2-Aminoethyldiphenylborat	Merck	8.41636
(-)-Cannabidiol	Tocris	1570
Probenecid	Hycultec	HY-B0545
Valdecoxib	Merck	PZ0179
Cytochalasin D	Merck	C-8273

RevertAid H- First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher	K1632
DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit	Thermo Fisher	F416L
pHrodo Green Zymosan Bioparticles	Thermo Fisher	P35365
pHrodo Green <i>S. aureus</i> Bioparticles	Thermo Fisher	P35367
Histamine EIA Kit	Biomol (bertin)	BR-A05890.96

### 3.1.4 Puffer

#### *HBS-Puffer*

Zusammensetzung: 132 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 5,5 mM Glukose, 10 mM HEPES, NaOH bis pH 7,4

#### *HBS-Puffer (0,1 % BSA)*

Zusammensetzung: 132 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 5,5 mM Glukose, 10 mM HEPES, 0,1 % BSA, NaOH bis pH 7,4

#### *HBS (1,8 mM Ca<sup>2+</sup>)*

Zusammensetzung: 132 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,5 mM Glukose, 10 mM HEPES, NaOH bis pH 7,4

#### *Intrazellulärer Puffer (Patch-Clamp)*

Zusammensetzung: 120 mM Cs-Aspartat, 10 mM CsCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, CsOH bis pH 7,4

#### *Extrazellulärer Puffer (Patch-Clamp)*

Zusammensetzung: 140 mM NaCl, 5 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, NaOH bis pH 7,4

#### *Extrazellulärer Puffer (0,1 % BSA) (Patch-Clamp)*

Zusammensetzung: 140 mM NaCl, 5 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 0,1 % BSA, NaOH bis pH 7,4

## 3.2 Zellkultur

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien und primären Zellen erfolgte in abgedunkelten Brutschränken (Hera Cell 150, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt. Allgemeine sterile Arbeiten mit den Zellkulturen wie z.B. Transfizieren, Passagieren oder Aussetzen wurden unter einer Sterilbank (Hera Safe, Haereus Instruments, Hanau, Deutschland) durchgeführt.

### 3.2.1 Stabile Zelllinien

Um bestimmte Zielstrukturen wie z.B. TRPV2 in stabilen Zelllinien zu exprimieren und gleichzeitig zu visualisieren, kodieren die Plasmide in der Regel die Zielstruktur gekoppelt mit fluoreszierenden Proteinen wie bspw. cyan (CFP), grün (GFP) oder gelb (YFP) fluoreszierendes Protein. Innerhalb dieser Arbeit wurden menschliche embryonale Nierenzellen (HEK293) als Grundlage verwendet. Parentale HEK293-Zellen dienten dabei stets als untransfizierte Kontrollzellen, während verschiedene HEK293-Zelllinien hergestellt wurden, die stabil mit Plasmiden transfiziert wurden, welche CFP-markierten Ratten-TRPV1, CFP-markierten rTRPV2 (HEK<sub>rTRPV2</sub>), GFP-markierten huTRPV2 (HEK<sub>huTRPV2</sub>), CFP-

markierten Maus-TRPV3 oder YFP-markierten Maus-TRPV4 kodieren (Tab. 3.1). Die Generierung dieser stabilen Linien erfolgte wie von Urban et al. publiziert [175]. Zusätzlich wurde im Rahmen einer Kooperation mit Frühwald et al. eine HEK293-Zelllinie bereitgestellt, die stabil mit einem myc-TRPM3 $\alpha$ 2-kodierenden Plasmid transfiziert war [176]. Weiterhin wurden RBL-2H3-Zellen als endogen TRPV2-exprimierendes Modell sowie als alternatives Zellmodell für Mastzellen verwendet. Die Zelllinien wurden mit MEM Medium in T25- oder T75-Zellkulturflaschen kultiviert (Tab. 3.1) und alle zwei bis drei Tage passagiert. Dafür wurde das Medium der adhären Zellen abgezogen und diese vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml (T25) bzw. 1,0 ml (T75) 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und geschwenkt, bis sie sich begannen abzulösen. Dann wurden die Zellen mit 5.5 ml (T25) bzw. 11 ml (T75) entsprechenden Mediums vom Boden der Flasche gewaschen, durch vorsichtiges Mischen vereinzelt, im entsprechenden Verhältnis weitergeführt und der Rest verworfen bzw. für Experimente genutzt. Die weiterzuführenden Zellen wurden auf 7,0 ml (T25) bzw. 20 ml (T75) Gesamtvolumen mit Medium aufgefüllt und weiterverwendet. Die Kulturflaschen wurden alle drei bis vier Passagen ausgetauscht.

**Tab. 3.1: Übersichtstabelle der verwendeten stabilen Zelllinien mit entsprechenden Kulturmedien**

Die Tabelle listet die verwendeten stabilen Zelllinien mit exprimierten Kanalprotein und dessen Spezies sowie die Zusammensetzung des erforderlichen Kulturmediums auf.

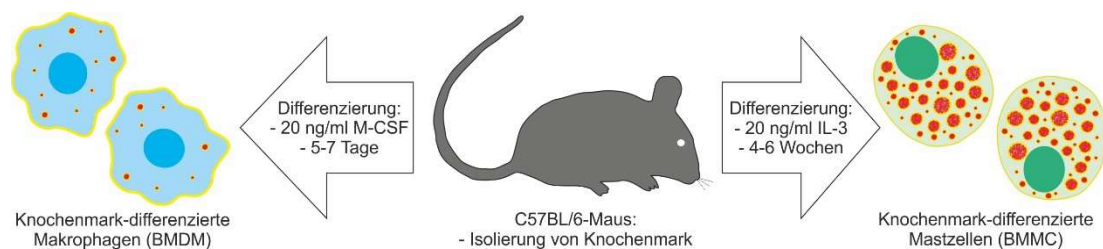
Zelllinie			Medium					
Stamm	Kanalprotein	Spezies	Medium	FKS	L-Glut	Penicillin	Streptomycin	G418
HEK293	TRPV1-CFP	<i>R. norvegicus</i>	MEM	10 %	2 mM	100 U/ml	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml
HEK293	TRPV2-CFP	<i>R. norvegicus</i>	MEM	10 %	2 mM	100 U/ml	0,1 mg/ml	0,8 mg/ml
HEK293	TRPV2-GFP	<i>H. sapiens</i>	MEM	10 %	2 mM	100 U/ml	0,1 mg/ml	0,6 mg/ml
HEK293	TRPV3-CFP	<i>M. musculus</i>	MEM	10 %	2 mM	100 U/ml	0,1 mg/ml	0,6 mg/ml
HEK293	TRPV4-YFP	<i>M. musculus</i>	MEM	10 %	2 mM	100 U/ml	0,1 mg/ml	0,6 mg/ml
HEK293	myc-TRPM3 $\alpha$ 2	<i>M. musculus</i>	MEM	10 %	2 mM	100 U/ml	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml
RBL-2H3	(-)	(-)	MEM	10 %	2 mM	100 U/ml	0,1 mg/ml	(-)

Damit die stabilen Zelllinien nicht ständig kultiviert werden mussten, konnten sie zur Lagerung in flüssigem Stickstoff weggefroren und zur erneuten Nutzung wieder aufgetaut werden. Dafür wurden die Zellen wie beschrieben mit mindestens 80 Prozent Konfluenz von einer T75-Kulturflasche abgelöst, bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert (Labofuge 400 R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) und das Pellet in 3 ml Einfriermedium (50 % FKS, 40 % Medium, 10 % DMSO) resuspendiert. Daraus konnten dreimal 1 ml Aliquote in Kryoröhrchen für 24 Stunden bei -20 °C und 24 Stunden bei -80 °C eingefroren werden, bevor sie im Stickstofftank gelagert wurden. Zum Auftauen wurde ein Kryoröhrchen mit Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 13 ml Medium pipettiert. Die Zellen wurden bei 100 g für 5 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 7 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellen in eine T25-Kulturflasche ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Mediums. Sobald die Zellen eine Konfluenz von mindestens 80 Prozent erreicht hatten,

konnten sie passagiert und weiter genutzt werden. Wenn Zellen für bestimmte Experimente auf 25-mm-Deckgläschen ausgesetzt wurden, mussten diese Gläschen zuvor mit poly-L-Lysin (PLL) beschichtet werden. Dafür wurden die Deckgläschen innerhalb von 35-mm-Kulturschalen liegend für 30 Minuten mit jeweils 1,0 ml einer 0,001 % PLL-Lösung inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen sowie unter der Sterilbank getrocknet.

### 3.2.2 Immunezellen aus dem Knochenmark von Mäusen

Da primäre Immunezellen wie bspw. Makrophagen und Mastzellen von Mäusen TRPV2 (mTRPV2) exprimieren, sollten entsprechende primäre Zellen von C57BL/6-Mäusen isoliert und in entsprechendem Medium (Tab. 3.2) differenziert werden. Die Experimente mit Mäusen bzw. Zellen von Mäusen wurden unter strenger Einhaltung europäischer (2010/63/EU) und deutscher Richtlinien zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt. Zusätzlich wurden die Versuche von der zuständigen Behörde (Landesdirektion Leipzig, Sachsen – DD24-5131/347/7)) genehmigt, nachdem alle möglichen Alternativen zum Ersatz, zur Reduktion oder zur Verbesserung der Versuche geprüft wurden.



**Abb. 3.1: Differenzierung von Makrophagen bzw. Mastzellen aus dem Knochenmark von Mäusen.** Schematische Darstellung der Differenzierung von primären Makrophagen bzw. Mastzellen nach der Isolierung von Knochenmark aus den unteren Extremitäten von C57BL/6-Mäusen.

#### ***Differenzierung von Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen***

Die Isolierung und Differenzierung von primären Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen (BMDM) wurde in abgewandelter Form nach Zhang et al. durchgeführt [177]. Dafür wurden etwa drei Monate alte C57BL/6-Mäuse mittels Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation euthanasiert. Als nächstes wurden die unteren Extremitäten entfernt und die Schienbein- (Tibia) sowie die Oberschenkelknochen (Femur) vorsichtig separiert. Sobald die Knochen von jeglichem anderen Gewebe befreit waren, wurden die oberen und unteren Enden mit einer Rasierklinge abgetrennt. Im Anschluss wurde das Knochenmark mit Hilfe einer 10-ml-Spritze, einer 27 G-Kanüle und PBS aus den Knochen gespült und durch ein Zellsieb (70 µm) gefiltert. Die erhaltene Zellsuspension wurde bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in entsprechendem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden für 8-24 Stunden in einer T25- oder T75-Zellkulturflasche kultiviert und anschließend die adhärennten Zellen verworfen. Die restlichen Suspensionszellen wurden in 35-mm-Kulturschalen (mit oder ohne Deckgläschen) oder T25-Zellkulturflaschen überführt und in entsprechendem Medium unter Zusatz von 20 ng/ml M-CSF differenziert. Alle zwei bis drei

Tage wurde das Medium gewechselt. Die adhärenen BMDM konnten nach etwa sieben Tagen für Experimente verwendet werden.

### **Isolierung von peritonealen Makrophagen aus Mäusen**

Primäre peritoneale Makrophagen von Mäusen (PM) konnten mittels peritonealer Lavage nach Zhang et al. isoliert werden [177]. Dafür wurden C57BL/6-Mäuse wie zuvor beschrieben narkotisiert, euthanasiert und vorsichtig das Peritoneum mit Hilfe einer 10-ml-Spritze, einer 27 G-Kanüle und 5 ml PBS gespült. Die Spüllösung wurde dann bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in entsprechendem Medium resuspendiert. Die Zellen konnten in 35-mm-Zellkulturschalen anwachsen und wurden nach 1-2 Stunden von nicht-adhärenen Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS befreit. Die adhärenen Zellen sollten zu über 90 Prozent PM sein und konnten nun verwendet oder weiter kultiviert werden [177].

### **Differenzierung von Mastzellen aus dem Knochenmark von Mäusen**

Zur Isolierung und Differenzierung von primären Mastzellen aus dem Knochenmark von Mäusen (BMMC) wurden C57BL/6-Mäuse wie zuvor beschrieben unter Narkose gesetzt, euthanasiert und das Knochenmark aus den unteren Extremitäten präpariert. Anschließend wurden die BMMC aus dem Knochenmark nach Meurer et al. differenziert [178]. Dabei wurden die Zellen des Knochenmarks mit entsprechendem Medium unter Zusatz von 20 ng/ml IL-3 in T25- oder T75-Suspensionskulturflaschen kultiviert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Suspensionszellen abgenommen, bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert, das Pellet mit frischem Medium resuspendiert und in neue Suspensionskulturflaschen überführt. Nach vier bis sechs Wochen der Kultivierung konnten die fertig differenzierten BMMC für Experimente verwendet werden.

**Tab. 3.2: Zusammensetzung der Medien für die primären Zellkulturen**

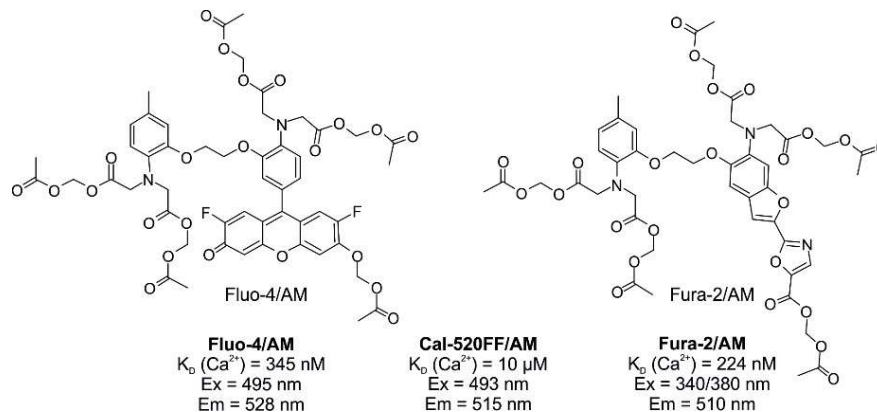
Die folgende Tabelle listet die Zusammensetzung der Medien für die entsprechenden primären Zellkulturen auf. Dabei wurde das Makrophagen-Medium sowohl für peritoneale als auch aus dem Knochenmark differenzierte Makrophagen verwendet.

primäre Zellkultur	Medium						
	Medium	FKS	L-Glut	Penicillin	Streptomycin	2-Mercaptoethanol	Zytokine
Makrophagen	IMDM	10 %	2 mM	100 U/ml	0,1 mg/ml	50 µM	20 ng/ml M-CSF
Mastzellen	IMDM	10 %	2 mM	100 U/ml	0,1 mg/ml	50 µM	20 ng/ml IL-3

### **3.3 Fluoreszenz-basiertes Imaging**

Mit Hilfe von Fluoreszenz-basierten *Imaging*-Methoden können am Mikroskop Fluoreszenz-markierte Strukturen innerhalb einer Zelle visualisiert und je nach Auflösung sogar lokalisiert werden. Mit der Entwicklung von chemischen Fluoreszenzindikatoren können zudem Veränderungen in der Konzentration von bestimmten Ionen bestimmt werden. Solche Indikatoren sind oftmals selbst (negativ) geladene Moleküle, die nur als geschützte Vorstufe

eines Acetoxymethylesters (AM) zellgängig sind. Einmal in die Zelle aufgenommen, spalten Esterasen den AM und der nun anionische Indikator bleibt in der Zelle „gefangen“. Lediglich Strukturen wie z.B. organische Anionentransporter könnten den Indikator wieder aus der Zelle transportieren, sind aber relativ einfach mit 0,5-2,5 mM Probenecid zu blockieren [179]. Für drei unterschiedliche Methoden des Fluoreszenz-basierten *Imaging* wurden innerhalb dieser Arbeit auch drei verschiedene Fluoreszenzindikatoren verwendet (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Übersicht der verwendeten Fluoreszenzindikatoren**

Dargestellt sind die drei verschiedenen Indikatoren Fluo-4/AM, Cal-520FF/AM und Fura-2/AM mit den chemischen Strukturen (Cal-520FF/AM nicht publiziert),  $K_D$ -Werten für deren  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsaffinität sowie maximale Anregungs- (Ex) und Emissionswellenlängen (Em) der Fluoreszenz-Signale.

### 3.3.1 Automatisiertes Screening

Seit der Entwicklung der *Fluorescence Imaging Plate Reader* (FLIPR) können Fluoreszenz-Signale einzelner Wells von bspw. 96 oder 384 Well-Mikrotiterplatten mit hoher Sensitivität und Wiederholungsrate ausgelesen werden. Mit Hilfe von Fluoreszenzindikator-beladenen Zellsuspensionen können so Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von aktiven Substanzen bestimmt oder etwa 384 Substanzen parallel auf Bioaktivität in lebenden Zellen untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein selbst gebauter automatisierter FLIPR für Echtzeitmessungen verwendet, um eine mehrere Tausend Verbindungen umfassende Substanzbibliothek auf Modulatoren von TRPV2 zu untersuchen oder die Potenz aktiver Substanzen mit Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen zu charakterisieren. Wie bereits durch Urban et al. publiziert, wurde dafür in einen Pipettierroboter (Freedom Evo 150, Tecan, Männedorf, Schweiz) mit einem 96 Well-Pipettierkopf (MCA96, Tecan, Männedorf, Schweiz) ein FLIPR bestehend aus einem blauen 4x4 LED Array (470 nm Wellenlänge), einer Sammellinse, einem Farbteiler, einem dichroiden Spiegel und einem Gehäuse zur Befestigung der Mikrotiterplatte eingebaut [180]. Die Fluoreszenz-Signale wurden mit der LED angeregt und durch einen 515 nm Wellenlänge Langpassfilter mittels einer Kamera (Zyla 5.5, Andor, Belfast, UK) aufgezeichnet, wobei Kamera und LED durch den Output-Trigger der Kamera synchronisiert wurden. Der Pipettierroboter wurde mit der dazugehörigen Software gesteuert (Freedom EVOware 2 Standard v2.3 SP4) und die Bilder mit der  $\mu$ Manager Software (<http://micro-manager.org>) aufgenommen [181].

Während Suspensionszellen wie BMMC direkt in entsprechender Zellzahl genutzt werden konnten, mussten adhärenente Zellen wie HEK<sub>rTRPV2</sub><sup>-</sup>, HEK<sub>hTRPV2</sub><sup>-</sup> oder RBL-2H3-Zellen dafür als erstes wie zuvor beschrieben mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst werden. Anschließend wurde die Zellsuspension einer halben T75-Flasche mit mindestens 80 Prozent Konfluenz im Kulturmedium mit 4 µM des Fluoreszenzindikators Fluo-4/AM für 30 Minuten bei 37 °C im abgedunkelten Wärmeschrank beladen, bevor diese bei 100 g für 3 Minuten zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets vorsichtig in 5,5 ml HBS resuspendiert und jeweils 10 µl Zellsuspension in die Wells einer schwarzen 384 Well-Mikrotiterplatte pipettiert, in die bereits 26 µl HBS Puffer je Well vorgelegt wurde. Die Zellen wurden für 60 Sekunden bei 100 g auf den Boden der Wells zentrifugiert und im Anschluss mit Hilfe des FLIPRs vermessen. Dabei wurde für 60 s die Basalfluoreszenz gemessen, bevor im ersten Schritt die in HBS gelösten Verdünnungsreihen oder Substanzen und im zweiten Schritt entsprechende Aktivator zur Identifizierung von potentiellen Blockern in Doppelbestimmung durch den Pipettierroboter akut hinzugefügt wurden. Zur Analyse der Fluoreszenz-Signale eines jeden Wells wurde die Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) verwendet [182], die Hintergrundfluoreszenz abgezogen und die korrigierten Signale in Bezug zur Basalfluoreszenz normalisiert ( $F/F_0$ ).

### 3.3.2 Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Analysen

Bei Fluoreszenz-basierten kalibrierten Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Messungen kann die modulierende Wirksamkeit von Substanzen auf der Ebene einzelner Zellen und deren intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen ( $[Ca^{2+}]_i$ ) mit Hilfe von ratiometrischen Fluoreszenzindikatoren wie Fura-2 nachvollzogen werden. Für diese Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Messungen wurden die entsprechenden Zellen 24-48 Stunden vorher auf PLL-beschichtete Deckgläschen ausgesetzt oder BMDM direkt auf Deckgläschen differenziert. Als nächstes wurde das Medium abgezogen und die Zellen in einem abgedunkelten Brutschrank für 30 Minuten bei 37 °C in HBS mit 0,2 % BSA und 5 µM des Fluoreszenzindikators Fura-2/AM inkubiert. Anschließend wurde das Deckgläschen vorsichtig mit HBS gewaschen, in eine Messkammer eingespannt und mit HBS überschichtet. So wurden die Zellen mit einer entsprechenden Haltevorrichtung auf einem invertierten Mikroskop (Fluar 10x/0.5 und Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) befestigt. Die Fluoreszenz-Signale der Fura-2-beladenen Zellen wurden mit einem Monochromator (Polychrome V, TILL-Photonics, Gräfelfing, Deutschland) sequentiell bei 340 nm, 358 nm und 380 nm Wellenlänge angeregt und die Fluoreszenz-Emission durch einen 515 nm Wellenlänge Langpassfilter mit einer 12-bit CCD Kamera (IMAGO, TILL-Photonics, Gräfelfing, Deutschland) und der TILLvisION Software im 1-sekündigen Intervall aufgezeichnet. Nach 60-sekündiger Messung der Basalfluoreszenz wurden die in HBS gelösten Substanzen bzw. Wirkstoffe in entsprechender Konzentration hinzugefügt und das Kammervolumen durch mehrmaliges vorsichtiges Aufziehen und Pipettieren manuell

durchmischt. Die Kalibrierung und Auswertung der  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgte wie bereits durch Lenz et al. publiziert mittels der FRETsolver Software [183]. Je Experiment wurden etwa 50 – 80 einzelne Zellen vermessen und der Mittelwert aus diesen gebildet.

### 3.3.3 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie

Mit der internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) können Fluoreszenz-Signale in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran gemessen werden. Dabei werden keine Signale der Epifluoreszenz nach Anregung der gesamten Zelle gemessen, sondern durch Totalreflexion der Lichtquelle ein evaneszentes Feld erzeugt, das lediglich ca. hundert Nanometer tief in die Zelle eindringt und damit nur Fluoreszenz-Signale direkt unterhalb der Zellmembran anregt. Die Verwendung eines niederaffinen  $Ca^{2+}$ -Indikators ermöglichte zusätzlich die ausschließliche Detektion von örtlich-begrenzten Signalen sehr hoher  $Ca^{2+}$ -Konzentration, wie sie z.B. durch  $Ca^{2+}$ -Mikrodomänen verursacht werden können. Die zu untersuchenden Zellen wurden 24-48 Stunden vorher auf PLL-beschichtete Deckgläschen ausgesetzt oder BMDM direkt auf Deckgläschen differenziert. Vor der Messung wurde das Medium abgezogen und die Zellen in einem abgedunkelten Brutschrank für 30 Minuten bei 37 °C in HBS mit 0,2 % BSA, 500  $\mu$ M Probenecid und 10  $\mu$ M des Fluoreszenzindikators Cal-520FF/AM inkubiert. Im Anschluss wurde das Deckgläschen mit den beladenen Zellen vorsichtig mit HBS gespült, in eine Messkammer eingespannt und mit HBS überschichtet. Danach wurden die Zellen mit einem Mikroskop ( $\alpha$  Plan-Fluar 100x 1.45 NA und Axiovert 135, Carl Zeiss, Jena, Deutschland), wie kürzlich publiziert, unter Zugabe von in HBS gelösten Modulatoren vermessen [184]. Dafür wurden die Fluoreszenz-Signale mittels einer high Power-LED mit einer zentralen Wellenlänge von 470 nm (Luxeon CZ Color, Lumileds, Aachen, Deutschland) angeregt und mit einer Kamera (Zyla 5.5, Andor, Belfast, UK) und der  $\mu$ Manager Software alle 10-20 Millisekunden aufgezeichnet [181]. Zur Auswertung wurde eine Varianzanalyse der Basalfluoreszenz sowie der Aktivierung oder Inhibition des Kanals durchgeführt und mittels ImageJ visualisiert [182]. Dabei wurden die Fluoreszenzsignale der Mikrodomänen mit der Eigenschaft einer Zirkularität von 0,15-1,0 und einer Größe von 10-unendlich mittels 8 Bit Auto-Threshold (minimal) lokalisiert. Weiterhin konnten die Fluoreszenz-Signale der Mikrodomänen über die Zeit aufgelöst werden. Zur statistischen Analyse konnte das Verhältnis der Anzahl an Mikrodomänen zur Anzahl der Zellen ermittelt werden.

### 3.4 Elektrophysiologische Methoden

Mit Hilfe einer intrazellulären und einer extrazellulären Elektrode konnte mit dem *voltage-clamp* Verfahren der Patch-Clamp-Methode eine Spannung angelegt und gleichzeitig über die Membran bzw. durch Ionenkanäle fließender Ausgleichsstrom aufgezeichnet werden [185]. Dafür wurden in dieser Arbeit TRPV2 Einwärts- und Auswärtsströme von HEK<sub>TRPV2</sub>-



HEK<sub>huTRPV2</sub>- und RBL-2H3-Zellen in der Ganzzelleableitung (*whole-cell configuration*) gemessen.

Die entsprechenden Zellen wurden 4-24 Stunden vor dem Experiment auf Deckgläschen innerhalb einer 35-mm-Kulturschale mit einer Konfluenz von etwa 20 Prozent ausgesät. Zur Messung wurden die Deckgläschen in eine Messkammer mit 500 µl Volumen (20KZ, Warner Instruments, Hamden, CT, USA) eingespannt und diese mit extrazellulären Puffer befüllt. Diese wurde wiederum in eine Haltevorrichtung eines Mikroskops (AxioVert 100, Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) gelegt, das auf einem gegen Schwingungen gedämpften Tisch (TMC, Peabody, MA, USA) stand. Die Wirkstoffe und Substanzen wurden in finaler Konzentration in extrazellulären Puffer gelöst und mittels eines gravitationsgetriebenen Achtkanal-Perfusionssystems (VC-8, Warner Instruments, Hamden, CT, USA) den Zellen bei Raumtemperatur hinzugefügt sowie überschüssiger Puffer mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Mit Hilfe eines vertikalen Pipettenpullers (PIP6, HEKA Products, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (GB150F-8P, Science Products, Kamenz, Deutschland) Patch-Pipetten mit einem Widerstand von 3-10 MΩ gezogen und mit einem Filamentdraht (Micro Forge MF-830, Narishige Group, Japan) durch Hitze poliert. Anschließend konnten die Pipetten etwa zur Hälfte mit intrazellulärem Puffer ohne Luftblasen befüllt, auf die Elektrode gesteckt und an der Headstage (CV-203BU, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) des Verstärkers (Multiclamp 700 B, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) befestigt werden. Als Elektroden wurden chlorierte Silberdrähte zur Messung verwendet und die Signale durch einen Analog-Digital-Wandler (Digidata 1440A, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) mit PClamp v.10.7 Software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) aufgezeichnet sowie ausgewertet. Zur Herstellung des Zellkontaktes wurde Überdruck auf die Pipette angelegt, diese mit Hilfe eines Mikromanipulators an die Zelle geführt und dann ein leichter Unterdruck erzeugt, wodurch die Öffnung der Pipette so dicht mit der Zellmembran verschlossen wird, dass ein Widerstand im GΩ-Bereich (*gigaseal*) entstand. Durch weiteren Unterdruck konnte die Membran aufgerissen und der für die Ganzzellkonfiguration benötigte Zugang zur Zelle geschaffen werden. In allen Messungen war der Serienwiderstand geringer als 15 MΩ. Die zu ermittelnden Daten wurden mit einem 2 kHz Bessel-Filter 4. Ordnung gefiltert, bevor sie mit einer Frequenz von 5 kHz aufgezeichnet wurden. Als Messprotokoll wurde eine linear ansteigende Spannungsrampe von -100 mV bis 100 mV über 500 ms angelegt, wobei sowohl zu Beginn bei -100 mV als auch am Ende bei 100 mV die Spannung für je 100 ms konstant gehalten wurde. Diese Rampe dauerte insgesamt 700 ms und wurde mit einem Intervall von 1 s wiederholt durchgeführt. Da die gemessenen Zellen unterschiedliche Größen aufwiesen, wurden zur Normierung der Ergebnisse die Stromdichten (pA/pF) berechnet. Zur Auswertung konnten die Stromspannungskennlinien aus den Spannungsrampen extrahiert werden oder die Mittelwerte der Plateaus bei -100 mV sowie

100 mV gegen die Zeit bzw. Anzahl der Intervalle aufgetragen werden. Zur statistischen Analyse wurden die  $I_{\max}$ -Werte verwendet. Für hemmende Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen wurde die inhibitorische Wirkung in Bezug zur Aktivierung wie folgt berechnet:

$$\text{inhibitorische Wirkung (\%)} = 100 \times \frac{I_{\text{Inhibitor}} - I_{\text{Puffer}}}{I_{\text{Aktivator}} - I_{\text{Puffer}}}$$

### 3.5 Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) wurde stellvertretend zur Expression des Kanalproteins die Menge an mRNA von TRPV2 nachgewiesen und in Bezug zu ribosomaler 18S-RNA als Referenz gesetzt.

Die entsprechenden Zellen wurden in 35-mm-Zellkulturschalen adhären wachsend oder als Pellet nach der Zentrifugation für fünf Minuten bei 200 g mit PBS gewaschen. Anschließend wurde PBS abgezogen, die Zellen wurden in 1 ml TRI-Reagent gründlich resuspendiert und in 2-ml-Tubes überführt. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 0,2 ml Chloroform hinzupipettiert und die Proben kräftig geschüttelt. Danach wurden die Tubes für 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erzielen. Zur Extraktion der RNA wurde die obere wässrige Phase vorsichtig in neue 2-ml-Tubes pipettiert und mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Die Proben wurden gründlich gemischt, 10 Minuten bei 4 °C inkubiert und im Anschluss bei 4 °C und 12.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen, die RNA-Pellets mit jeweils 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und bei 4 °C und 12.000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets für 5 bis 10 Minuten an der Luft getrocknet, in 10-20 µl RNase-freiem Wasser gelöst und für 5 Minuten auf 55 °C (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) erhitzt. Abschließend wurde die RNA-Konzentration spektrophotometrisch ermittelt (Nanodrop 2000c, peqlab, Erlangen, Deutschland).

**Tab. 3.3: Übersicht der genutzten Primer für die RT-qPCR**

Die verwendeten Sets der Primer bestanden aus Vorwärtsprimer sowie Rückwärtsprimer. Die 18S-RNA-Primer lagen dem Institut bereits vor, während die mTRPV2-Primer nach Sawatani et al. genutzt wurden [186].

Primer		Sequenz
mTRPV2	Vorwärtsprimer	5'-TGATGAAGGCTGTGCTGAAC-3'
mTRPV2	Rückwärtsprimer	5'-CACACAGGCTCCTCTTCTC-3'
18S-RNA	Vorwärtsprimer	5'-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC-3'
18S-RNA	Rückwärtsprimer	5'-TGTACAAAGGGCAGGGACTT-3'

Zum Umschreiben der RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Dabei wurden je RNA-Probe zunächst 1 µl *random hexamer primer*, 1-4 µl RNA-Probe und 7-10 µl Aqua ad iniectabilia so gemischt, dass ein finales Volumen von 12 µl je Probe erreicht wurde. Die Proben wurden für zwei Minuten auf

65 °C erhitzt, auf 25 °C temperiert und anschließend jeweils 4 µl *5x first strand buffer*, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl dNTP Mix (10 mM) und 1 µl RevertAid H Minus Reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugefügt. Abschließend wurden die RNA-Proben bei 25 °C für 5 Minuten, 42 °C für 60 Minuten und 70 °C für 5 Minuten mit Hilfe eines *Thermo Cycler* (PTC 200, MJ Research Inc, St. Bruno, Kanada) umgeschrieben.

Die RT-qPCR wurde mit Hilfe des DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit durchgeführt. Dafür wurden je Probe 7,4 µl Aqua ad iniectionem, 10 µl *2x Master Mix*, 1 µl cDNA Probe sowie jeweils 0,8 µl der entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 µM) (Tab. 3.3) in 24 Well-qPCR-Platten verwendet und mit klarer Schutzfolie dicht verschlossen. Die Proben wurden für 7 Minuten auf 95 °C erhitzt, über 30 – 50 Zyklen bei 95 °C für 15 Sekunden, bei 59 °C für 20 Sekunden und bei 72 °C für 30 Sekunden mit einem PCR-System (PikoReal 24, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) inkubiert sowie abschließend für 2 Minuten auf 72 °C erhitzt, wobei je Probe nach jedem Zyklus die Fluoreszenz von SYBR-Green ausgelesen wurde. Am Ende wurde noch eine Schmelzkurve von 65 °C bis 95 °C bestimmt. Die Berechnung der Expression von TRPV2 mRNA erfolgte nach Ct-Methode in Bezug zur Referenz (ribosomale 18S-RNA):

$$TRPV2\text{-Expression} = 2^{-(Ct_{mTRPV} - Ct_{18S\text{RNA}})}$$

### 3.5.2 siRNA-vermittelter *knockdown*

**Tab. 3.4: Übersichtstabelle der verwendeten Substanzen für den *knockdown***

Zuerst wurden siRNA und Lipofectamine 2000 in Opti-MEM I in 2-ml-Tubes pipettiert und gemischt. Anschließend wurde das Medium mit Lipofectamine 2000 in das Medium mit siRNA pipettiert und gemischt. Nach 20 Minuten Inkubation konnte das Gemisch auf die BMDM mit antibiotikafreiem Medium gegeben werden.

Kulturgefäß	Lipofectamine 2000		siRNA		antibiotikafreies Medium	finales Volumen
	Lipofectamine	Opti-MEM I	siRNA	Opti-MEM I		
96 Well-Mikrotiterplatte (je Well)	0,25 µl	25 µl	5 pmol	25 µl	100 µl	150 µl
35-mm-Kulturschale	5,0 µl	250 µl	50 pmol	250 µl	1500 µl	2000 µl
T25-Kulturflasche	15 µl	750 µl	150 pmol	750 µl	4500 µl	6000 µl

Zur Durchführung des siRNA-vermittelten *knockdown* von mTRPV2 wurden BMDM in schwarze 96 Well-Mikrotiterplatten, 35-mm-Kulturschalen oder T25-Zellkulturflaschen ausgesät und nach 24 Stunden Ruhe in einem angedunkelten Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt mit einer Konfluenz von 60 – 90 % verwendet. Als nächstes wurden entsprechende Mengen Stealth siRNA gegen Maus TRPV2 (siRNA<sub>mTRPV2</sub>) (ID: MSS212426) oder siRNA Negativkontrolle (siRNA<sub>Neg</sub>) (med GC) mit Lipofectamine 2000 in Opti-MEM I gemischt (Tab. 3.4) und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der BMDM durch entsprechende Mengen von antibiotikafreiem Medium ersetzt (Tab. 3.4). Im Anschluss wurde das entsprechende Gemisch aus siRNA und Lipofectamine 2000 zu den jeweiligen Proben pipettiert und für 6 – 8 Stunden inkubiert, bevor das Medium durch

frisches Zellkulturmedium ersetzt wurde. Die Experimente mit den Zellen konnte nach 24 – 48 Stunden durchgeführt werden.

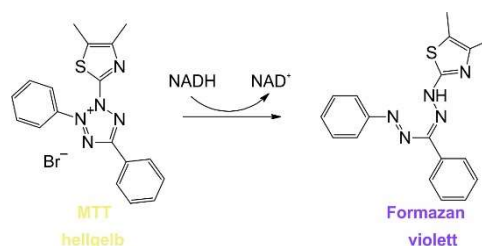
### 3.6 Bestimmung zytotoxischer Effekte

Um zytotoxische Effekte der Substanzen auf die verwendeten Zellen ausschließen zu können, wurde stellvertretend für die Zellviabilität deren metabolische Aktivität nach Substanzexposition ermittelt und mit jener unbehandelter Kontrollzellen verglichen.

#### 3.6.1 MTT-Assay

Die metabolische Aktivität von adhärenenten HEK293-Zellen, RBL-2H3-Zellen oder BMDM wurde mit Hilfe von MTT-Tests analysiert. Dafür wurden als erstes entsprechende Zellen mit Trypsin von den Zellkulturflaschen abgelöst, mit Medium resuspendiert und mit einer Zelldichte von 25.000 Zellen pro Well in durchsichtige 96 Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Dann konnten die Zellen für 24 bis 48 Stunden im Brutschrank adhärenieren und anschließend wurden die entsprechenden Substanzen oder Lösungsmittelkontrollen hinzupipettiert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig abgezogen und durch frisches Medium mit 0,5 mg/ml gelösten MTT ersetzt. Im nächsten Schritt reduziert z.B. NADH lebendiger Zellen das wasserlösliche MTT zu einem unlöslichen Formazan (Abb. 3.3). Nach weiteren drei Stunden Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgezogen, das ausgefallene Formazan gründlich in DMSO gelöst und die Absorption als optische Dichte (OD) bei 560 nm und 670 nm Wellenlänge mit einem Plattenlesegerät (Polarstar Omega, BMG Labtech, Germany) ausgelesen. Die optische Dichte der Referenzwellenlänge 670 nm wurde jeweils subtrahiert und die Zellviabilität im Anschluss wie folgt berechnet:

$$\text{Zellviabilität (\%)} = 100 \times \frac{\text{behandelte Zellen (OD}_{560})}{\text{unbehandelte Zellen (OD}_{560})}$$



**Abb. 3.3: Schema der Farbreaktion bei Reduktion von MTT**

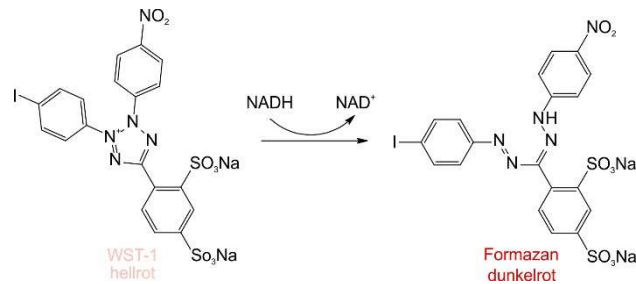
Schema der Reduktion von wasserlöslichem hellgelbem MTT zum wasserunlöslichen violetten Formazan durch z.B. NADH als Produkt der Glykolyse in Abhängigkeit vom ER bzw. von intakten Mitochondrien.

#### 3.6.2 WST-1-Assay

Da BMMC nicht adhärenent, sondern in Suspension wachsen, wurde für dieses Projekt WST-1 gegenüber MTT zur Ermittlung der metabolischen Aktivität vorgezogen, da die Absorption direkt im Medium ausgelesen werden konnte. Dafür wurden RBL-2H3-Zellen oder BMMC mit einer Zelldichte von 20.000 Zellen pro Well in eine durchsichtige 96 Well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 Stunden im Brutschrank weiterverwendet. Anschließend wurden die

Zellen für weitere 24 Stunden mit den entsprechenden Substanzen oder Lösungsmittelkontrollen inkubiert. Danach wurde die WST-1-Lösung 1:10 hinzupipettiert und nach 4 Stunden Inkubation die OD der Proben bei 440 nm und 670 nm Wellenlänge mit einem Plattenlesegerät ausgelesen. Zum Schluss wurde jeweils die optische Dichte der Referenzwellenlänge 670 nm subtrahiert und die Zellviabilität folgendermaßen berechnet:

$$\text{Zellviabilität (\%)} = \frac{\text{behandelte Zellen (OD}_{440}) - \text{Blank (OD}_{440})}{\text{unbehandelte Zellen (OD}_{440}) - \text{Blank (OD}_{440})}$$



**Abb. 3.4: Schema der intrazellulären Reduktion von WST-1 zum dunkelroten Formazan**

Schema der Reduktion von hellroten WST-1 zum dunkelroten Formazan durch bspw. NADH als Produkt der Glykolyse in Abhängigkeit vom ER bzw. von intakten Mitochondrien.

### 3.7 Funktionale Untersuchungen

Um den Einfluss von TRPV2 auf verschiedene Mechanismen von Makrophagen und Mastzellen zu untersuchen, in denen Ca<sup>2+</sup>-Signale eine wichtige Rolle spielen, wurden verschiedene funktionale Tests mit den primären Zellen durchgeführt.

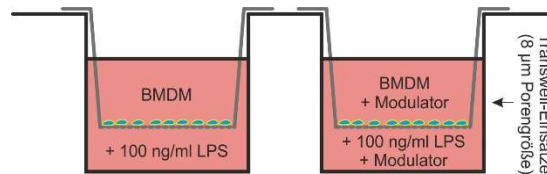
#### 3.7.1 Untersuchung der Phagozytose von Makrophagen

Für die Untersuchung des Effekts von TRPV2 auf die Phagozytose von Makrophagen wurden 30,000 bis 50,000 BMDM je Well in schwarze 96 Well-Mikrotiterplatten pipettiert und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden diese BMDM weiterverwendet oder zuvor mit siRNA<sub>mTRPV2</sub> bzw. siRNA<sub>Neg</sub> transfiziert. Unabhängig davon wurden die BMDM als nächstes über 24 Stunden mit Lipopolysacchariden (LPS) und Interferon  $\gamma$  polarisiert. Im Anschluss wurde das Medium vorsichtig abgezogen und durch HBS ersetzt. Nach 30-minütigem Ruhen bei 37 °C wurden die entsprechenden Substanzen bzw. Kontrollen und pHrodo Green-markierte Zymosan- oder *S. aureus*-Biopartikel hinzugefügt. Zusätzlich wurden die entsprechenden Biopartikel in Wells ohne Zellen pipettiert, um diese Blanks bei der Auswertung für die Subtraktion des Hintergrunds nutzen zu können. Anschließend konnten die BMDM für 60 Minuten bei 37 °C in einem abgedunkelten Wärmeschrank die Biopartikel per Phagozytose aufnehmen. Da aufgrund des niedrigeren pH-Wertes ausschließlich phagozytierte Biopartikel zu fluoreszieren begannen, musste nicht zusätzlich gewaschen und fixiert werden. Die Fluoreszenz der aufgenommenen Partikel konnte mit Hilfe des Plattenlesegerätes ausgelesen werden. Dazu wurden zur Anregung ein 505/10 nm Bandpassfilter und zur Messung der Emission ein 540/10 nm Bandpassfilter verwendet. Die

Experimente wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt, daraus Mittelwerte ermittelt und abschließend die Phagozytoseaktivität anhand der Fluoreszenz-Signale wie folgt berechnet:

$$\text{Phagozytoseaktivität (\%)} = 100 \times \frac{\text{behandelte BMDM} - \text{Blank}}{\text{unbehandelte BMDM} - \text{Blank}}$$

### 3.7.2 Messung der Migration von Makrophagen



**Abb. 3.5: Schema des zweidimensionalen Transwell-Migrationsassays**

Bei den zweidimensionalen Transwell-Migrationsassays migrierten die BMDM über 14 Stunden durch eine Filtermembran (Porengröße = 8 µm) in Richtung eines 100 ng/ml LPS-Gradienten.

Zur Messung des Einflusses von TRPV2-Aktivität auf die Migration von Makrophagen wurden BMDM verwendet oder diese zuvor wie beschrieben mit siRNA<sub>mTRPV2</sub> bzw. siRNA<sub>Neg</sub> transfiziert, bevor sie unabhängig davon über 24 Stunden mit LPS und Interferon γ polarisiert wurden. Etwa zwei Stunden vor Beginn der Messung wurden die BMDM an Medium mit reduziertem FKS Gehalt von 1 % gewöhnt. Anschließend wurden sie abgelöst und 40.000 bis 50.000 BMDM in Transwell-Einsätze pipettiert, welche bereits Medium mit 1 % FKS und entsprechenden Substanzen oder Kontrollen enthielten. Daraufhin wurden alle Transwell-Einsätze gleichzeitig in Wells einer durchsichtigen 24 Well Mikrotiterplatte überführt, welche Medium mit 1 % FKS, entsprechende Substanzen oder Kontrollen und zusätzlich 100 ng/ml LPS enthielten. In einem Brutschrank migrierten diese BMDM für 14 Stunden durch die Transwell-Membran in Richtung des LPS-Gradienten (Abb. 3.5). Im Anschluss wurden die Transwell-Einsätze dreimalig mit HBS-Puffer gewaschen, mit -20 °C kaltem Methanol fixiert und mit einer 0,2 % Kristallviolett-Lösung gefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen auf der Oberseite der Transwell-Einsätze vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt und die Einsätze getrocknet. Die migrierten BMDM auf der Unterseite der Einsätze wurden in drei zufälligen Bereichen mit Hilfe eines invertierten Axiovert 100 Mikroskops (LD Achroplan 40x/0.6, Carl Zeiss, Jena, Germany) gezählt und der Mittelwert ermittelt. Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte der unabhängigen Messungen wie folgt verwendet:

$$\text{LPS-induzierte Migration (\%)} = 100 \times \frac{\text{Anzahl behandelter BMDM}}{\text{Anzahl unbehandelte BMDM}}$$

### 3.7.3 Analyse der Freisetzung von β-Hexosaminidase

Die Untersuchungen zur Freisetzung des Mediators β-Hexosaminidase wurden in abgewandelter Form nach Kuehn et al. mit RBL-2H3-Zellen und BMDC durchgeführt [187]. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt und am Ende jeweils die Mittelwerte zur statistischen Analyse verwendet.

Zunächst wurden 20.000 RBL-2H3-Zellen pro Well in durchsichtige für die Zellkultur geeignete Mikrotiterplatten ausgesät. Im Brutschrank wurden diese für 16 Stunden mit 200 ng/ml anti-DNP-IgE inkubiert. Anschließend wurde zur Beseitigung von ungebundenem IgE das Medium vorsichtig abgezogen und die RBL-2H3-Zellen dreimalig mit HBS (0,1 % BSA) gewaschen. Nun wurden 25 µl HBS (0,1 % BSA) je Well hinzugefügt und die Zellen für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden DNP-HSA mit einer finalen Konzentration von 400 ng/ml, CBD, Probenecid, IV2-1, Valdecoxib in entsprechenden Konzentrationen oder Puffer als Kontrolle so hinzugefügt, dass ein finales Volumen von 100 µl pro Well erreicht wurde. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C in einem abgedunkelten Wärmeschrank zur Initiierung der Immunreaktion wurden die Zellen bei 100 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nun konnten 50 µl des zellfreien Überstandes oder HBS (0,1 % BSA) als Blank in leere Wells einer neuen durchsichtigen 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert werden. Zusätzlich wurden die verbleibenden 50 µl mit den Zellen mit 150 µl einer 0,1 % Triton X-100-Lösung gemischt und so die Zellen lysiert. Von diesem Lysat wurden wiederum 50 µl in leere Wells der neuen Mikrotiterplatte überführt. Schließlich wurden zu den 50 µl Überstand bzw. Lysat und Puffer-Blank jeweils 100 µl PNAG-Lösung (3,5 mg/ml PNAG in Citrat-Puffer pH 4,5) pipettiert und diese Mikrotiterplatte für 90 Minuten bei 37 °C in einem abgedunkelten Wärmeschrank inkubiert. Nachdem in jedes Well jeweils 50 µl Glycin-Puffer (0,4 M; pH 10,7) hinzugefügt wurden, konnte eine gelbe Färbung beobachtet werden, deren Absorption als OD bei 405 nm und 620 nm Wellenlänge mit Hilfe des Plattenlesegeräts gemessen wurde. Nach Subtraktion von der jeweiligen optischen Dichte der Referenzwellenlänge 620 nm wurde die Degranulation in prozentualer Ausschüttung des Mediators nach Kuehn et al. berechnet [187]:

$$\text{Ausschüttung (\%)} = \frac{100 \times 2 \times (\text{Überstand}(OD_{405}) - \text{Blank}(OD_{405}))}{(\text{Überstand}(OD_{405}) - \text{Blank}(OD_{405})) + (4 \times (\text{Lysat}(OD_{405}) - \text{Blank}(OD_{405})))}$$

Auch die nicht-adhärenenten BMMC wurden im Brutschrank für 16 Stunden mit 200 ng/ml anti-DNP-IgE inkubiert. Anschließend wurden diese bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert und das Medium vorsichtig abgezogen. Nach dreimaligem Waschen mit HBS (0,1 % BSA) gefolgt von Zentrifugieren bei 200 g für 5 Minuten wurden die BMMC so in HBS (0,1 % BSA) resuspendiert, dass eine Zellzahl von zwei Millionen Zellen pro ml erreicht wurde, bevor jeweils 50.000 BMMC (25 µl) pro Well in durchsichtige 96 Well-Mikrotiterplatten ausgesät wurden. Nun konnten die BMMC für 5 Minuten bei 37 °C ruhen, bevor DNP-HSA mit einer finalen Konzentration von 100 ng/ml, CBD, Probenecid, IV2-1, Valdecoxib in entsprechenden Konzentrationen oder Puffer zur Kontrolle hinzugefügt wurden. Das finale Volumen pro Well betrug auch hier 100 µl. Die BMMC wurden für 30 Minuten bei 37 °C in einem abgedunkelten Wärmeschrank inkubiert und anschließend bei 100 g für 5 Minuten zentrifugiert. Als nächstes konnten vorsichtig 50 µl des zellfreien Überstandes oder HBS (0,1 % BSA) als Blank in leere Wells einer neuen durchsichtigen 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert werden, bevor die

verbleibenden 50 µl mit 150 µl einer 0,1 % Triton X-100-Lösung zur Lysierung der Zellen gemischt wurden. Von diesem Lysat wurden ebenfalls 50 µl in leere Wells der neuen Mikrotiterplatte überführt und jeweils 100 µl PNAG-Lösung (3,5 mg/ml PNAG in Citrat-Puffer) zu den 50 µl Überstand bzw. Lysat und Puffer-Blank pipettiert. Auch diese Mikrotiterplatte wurde für 90 Minuten bei 37 °C in einem abgedunkelten Wärmeschrank inkubiert und schließlich in jedes Well 50 µl Glycin-Puffer (0,4 M) hinzugefügt. Die Messung der OD sowie die Berechnung der prozentualen Ausschüttung wurde ebenfalls wie zuvor beschrieben nach Kuehn et al. durchgeführt [187].

#### **3.7.4 ELISA zur Ermittlung der Histamin-Freisetzung**

Zunächst wurden die BMMC für 16 Stunden im Brutschrank mit 200 ng/ml anti-DNP-IgE in Medium inkubiert. Um ungebundenes IgE zu beseitigen, wurden die BMMC anschließend bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, das Medium abgezogen und die Zellen dreimalig mit HBS (0,1 % BSA) gewaschen, gefolgt von Zentrifugieren bei 200 g für 5 Minuten. Nun wurden die BMMC mit einer Zellzahl von zwei Millionen Zellen pro ml in HBS (0,1 % BSA) resuspendiert und jeweils 50.000 BMMC (25 µl) pro Well in durchsichtige 96 Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 5-minütigem Ruhen bei 37 °C wurden DNP-HSA mit einer finalen Konzentration von 100 ng/ml, CBD, Probenecid, IV2-1 in entsprechenden Konzentrationen oder Puffer zur Kontrolle hinzugefügt. Das finale Volumen pro Well betrug stets 100 µl. Die BMMC wurden nun 30 Minuten bei 37 °C in einem abgedunkelten Wärmeschrank inkubiert und anschließend bei 100 g für 5 Minuten zentrifugiert. Aus jedem Well konnten vorsichtig 50 µl zellfreier Überstand abgenommen und in 0,5-ml-Tubes pipettiert werden. Über mehrere Wochen wurden von verschiedenen Kulturen Proben gesammelt und bei -20 °C gelagert.

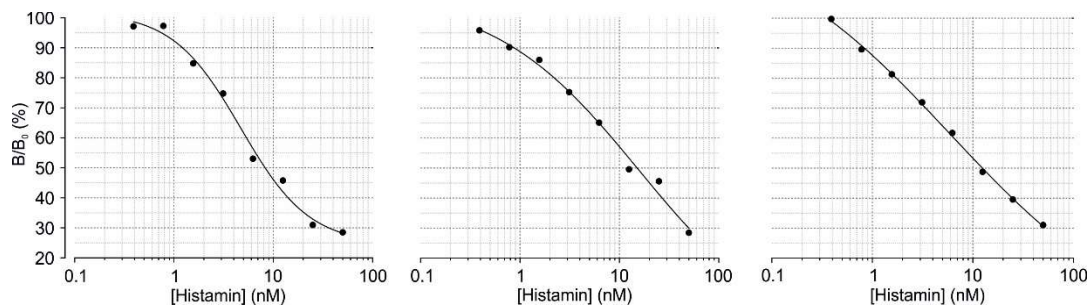
Zur Quantifizierung der Histamin-Freisetzung aus den BMMC wurde ein ELISA mittels Histamin EIA-Kit (A05890.98) nach Vorschrift verwendet. Die Proben, die Histamin-Standards für die Kalibriergerade und die Qualitätskontrollen wurden dafür als Doppelbestimmungen in HBS (0,1 % BSA) gelöst bzw. die Proben zusätzlich verdünnt. Anschließend wurden 200 µl davon sowie separat Puffer als Kontrolle in 0,5-ml-Tubes vorgelegt, jeweils 50 µl Derivatisierungspuffer hinzugefügt und die Tubes gemischt. Nun wurden jeweils 20 µl Derivatisierungsreagenz hinzugefügt und die Tubes ohne Verzögerung gründlich gemischt. Parallel wurden die entsprechenden Wells der mitgelieferten beschichteten 96 Well-Platte fünfmal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen und im Anschluss sämtliche Flüssigkeit entfernt, bevor in Doppelbestimmung jeweils 100 µl der Kontrollen, Histamin-Standards, Qualitätskontrollen sowie Proben in die Wells pipettiert wurden. Danach wurden zusätzlich 100 µl des Histamin AChE-Tracers in jedes Well hinzugefügt, die Platte mit der mitgelieferten Klebefolie verschlossen und bei 4 °C inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Wells geleert, fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und sämtliche Flüssigkeit gründlich entfernt, um



im letzten Schritt in alle entsprechenden sowie in zwei leere Wells als Blank jeweils 200 µl frisch hergestellte Ellman's-Reagenz zu pipettieren. Die Platte wurde sofort mit Alufolie bedeckt und auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Die OD der Gelbfärbung von den Blanks, Proben/Standards/Qualitätskontrollen (B) und der Kontrolle (B<sub>0</sub>) wurde halbstündlich bei 409 nm Wellenlänge mit einem Plattenlesegerät verfolgt und final nach etwa vier Stunden ausgelesen. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmung ermittelt und wie folgt in Bezug zur Maximalabsorption B<sub>0</sub> gesetzt:

$$B/B_0 (\%) = 100 \times \frac{B - \text{Blank}}{B_0 - \text{Blank}}$$

Aus den Histamin-Standards konnten die Kalibrierkurven abgebildet werden, mit denen die Konzentrationen der Proben sowie der Qualitätskontrolle ermittelt werden konnten (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6: Kalibrierkurven der Histamin-Standards.**

Dargestellt sind die Kalibrierkurven der Histamin-Standards aus den durchgeführten Experimenten. Diese wurden mittels vier Parameter *logistic fit* durch OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) ermittelt.

### 3.8 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Experimente werden als Mittelwerte (MW) von mindestens drei unabhängigen Versuchswiederholungen (n) präsentiert. Da die Messungen unabhängig voneinander durchgeführt wurden, entsprechen die dargestellten Fehlerbalken der Standardabweichung (SD). Zur statistischen Auswertung der gesammelten Daten wurde OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) verwendet und die Mittelwerte von mehr als zwei normalverteilten Datensätzen durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verglichen, gefolgt von einem post-hoc-Test nach Bonferroni. Die Zufallswahrscheinlichkeit (p) von  $p < 0.05$  wurde als Grenze zur Bestimmung auf Signifikanz festgelegt und wie folgt dargestellt:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p > 0,05$  (n. s.). Sowohl die Kurven der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen als auch die mittleren inhibitorischen (IC<sub>50</sub>) und effektiven Konzentrationen (EC<sub>50</sub>) wurden mittels der Hill-Gleichung ermittelt.

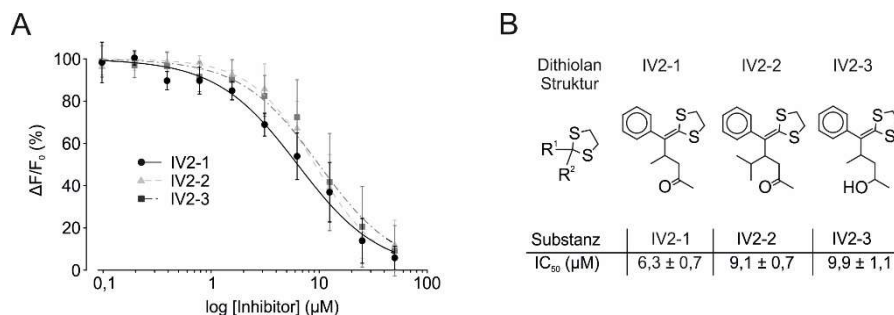
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung des neuen TRPV2-Inhibitors IV2-1

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die physiologische Funktion von TRPV2 in Zellen des angeborenen Immunsystems untersucht werden. Mit Hilfe von selektiven pharmakologischen Modulatoren könnten die TRPV2-Aktivität akut gesteuert und folglich TRPV2-regulierte Mechanismen identifiziert werden. Bisher genutzte Modulatoren wie 2-APB, Ruthenium Rot oder Tranilast wirken allerdings unspezifisch [145,146,156]. Obwohl Valdecoxib innerhalb der TRPV-Unterfamilie eine TRPV2-Selektivität aufweist [153], können COX-2-Inhibitoren oftmals auch unspezifische Effekte an diversen anderen Ionenkanälen induzieren [188,189]. Daher wurde zur möglichen Identifizierung von neuen TRPV2-selektiven Modulatoren ein Wirkstoffscreening durchgeführt.

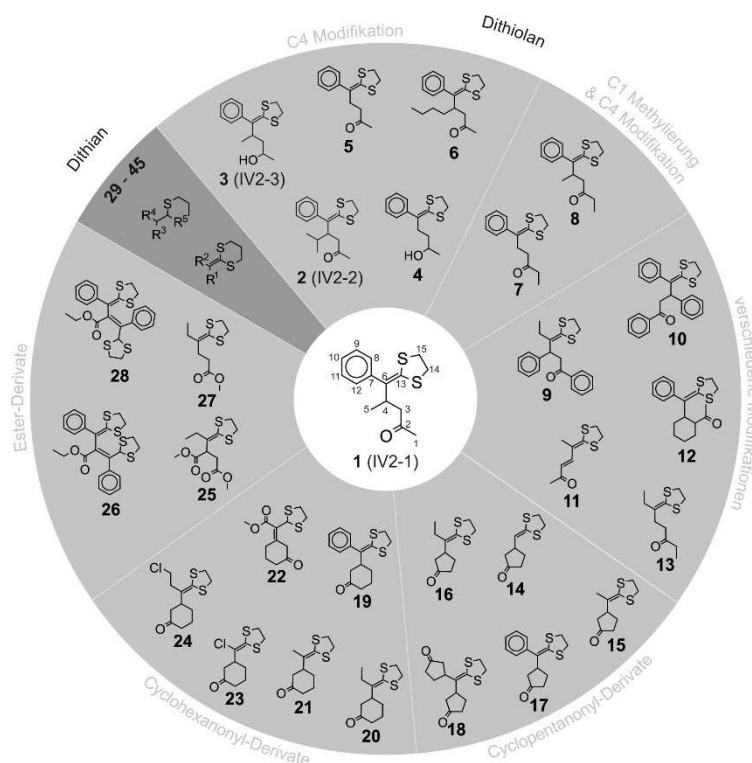
#### 4.1.1 Wirkstoffscreening mittels Mediumdurchsatz-Verfahren

Als TRPV2-exprimierendes Zellmodell wurden für die Suche nach neuen Modulatoren HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen verwendet, die zuvor mit dem Fluoreszenzindikator Fluo-4/AM beladen wurden. Mittels Fluoreszenz-basiertem Mediumdurchsatz-Screening der etwa 5.500 Verbindungen umfassenden Substanzbibliothek des Karlsruher Instituts für Technologie (Auszug aus dem Molekülarchiv) konnten 198 auffällige Substanzen ermittelt werden, welche mit einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  entweder die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach akuter Zugabe erhöhten oder im zweiten Schritt die Aktivierung durch 300  $\mu\text{M}$  2-APB inhibierten. Ein direkter Abgleich mit den Ergebnissen anderer Zielstrukturen wie TRPV3 oder TRPC6 ermöglichte das Aussortieren von 174 Substanzen, welche unspezifisch die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  modulierten, selbst fluoreszierten oder zytotoxisch wirkten. Bei Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der übrigen 24 Substanzen in Fluo-4-beladenen HEK<sub>TRPV2</sub>- oder parentalen HEK293-Zellen bestätigten sich schließlich drei Inhibitoren mit direkter chemischer Verwandtschaft (Abb. 4.1 A). Alle drei Inhibitoren weisen eine Dithiolan-Struktur sowie eine Hydroxyl- bzw. Ketongruppe auf und konnten den TRPV2-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch 2-APB komplett inhibieren.



**Abb. 4.1: Identifizierung von drei neuen TRPV2-Inhibitoren.**

**(A)** Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der drei neuen TRPV2-Inhibitoren IV2-1, IV2-2 und IV2-3, ermittelt in Fluo-4-beladenen HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellsuspensionen nach Stimulation mit 300  $\mu\text{M}$  2-APB. Die Basalfluoreszenz wurde subtrahiert und die Daten auf eine Kontrolle ohne Inhibitor normiert (0 entspricht der Basalfluoreszenz). Abgebildet sind MW  $\pm$  SD von n = 5 unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung **(B)** Darstellung der Dithiolan-Struktur und der drei TRPV2-Inhibitoren mit Namen, chemischer Struktur und fluorometrisch ermittelter IC<sub>50</sub>-Werte.

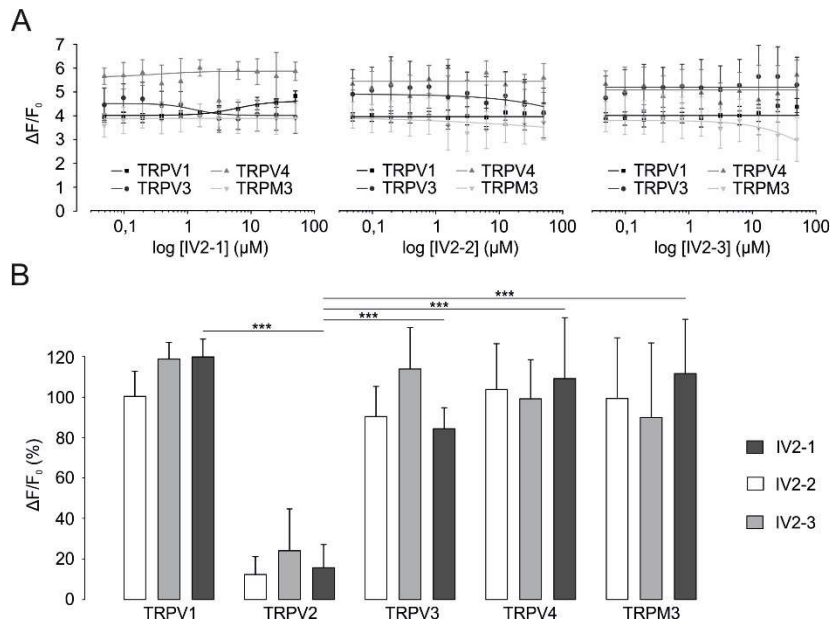


**Abb. 4.2: Chemisch verwandte Substanzen des Wirkstoffscreenings.**

Darstellung der chemischen Strukturen von den drei neuen TRPV2-Inhibitoren IV2-1, IV2-2 und IV2-3 sowie von allen ebenfalls untersuchten Derivaten und chemisch verwandten Substanzen des Wirkstoffscreenings, die keine TRPV2-Aktivität aufzeigten.

Die  $IC_{50}$ -Werte befanden sich im einstelligen Mikromolar-Bereich, wobei IV2-1 TRPV2 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $6,3 \mu M$  am potentesten inhibierte (Abb. 4.1 B). Unter den etwa 5.500 untersuchten Substanzen befanden sich auch zahlreiche weitere Derivate und chemisch verwandte Substanzen der drei neuen TRPV2-Inhibitoren, welche die TRPV2-Aktivität nicht modulierten. Dieser Verlust der Bioaktivität gab in Kombination mit der jeweiligen chemischen Struktur erste Hinweise zur möglichen Bindungstasche (Abb. 4.2). So schien die Methylgruppe an Position 4 (**1**, **3**) durch eine etwas größere Isopropylgruppe (**2**) ausgetauscht werden zu können ohne einen großen Wirkverlust zu generieren. Das Weglassen der Methylgruppe (**4**, **5**) oder Ersetzen durch eine längere Butylgruppe (**6**) erzeugte jedoch einen Verlust der Bioaktivität. Demnach könnte diese Position wichtig für hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Bindungstasche sein, aber keine allzu großen Gruppen tolerieren. Auch dem Wirkverlust bei einer Verlängerung der aliphatischen Kette in Position 1 (**8**) könnte eine ähnliche Erklärung zu Grunde liegen. Dass drastisches Verkleinern (**11**, **13-16**) oder Hinzufügen von sterisch anspruchsvolleren Resten (**9**, **10**, **26**, **28**) ebenfalls zu einem Verlust der inhibierenden Eigenschaften führten, ist dabei weniger verwunderlich. Der Verlust von räumlicher Flexibilität des Moleküls (**19**) schien ebenfalls die Wahrscheinlichkeit der Bindung deutlich zu verringern. Weiterhin wurden einige Dithian-Derivate (**29 – 45**) mit ähnlichem Aufbau zu den drei aktiven Substanzen untersucht, die auch keine TRPV2-Aktivität aufwiesen. Daher könnte auch die Dithiolan-Struktur ein wichtiges Motiv für die Bindung sein. Als nächstes sollte die Selektivität der drei Inhibitoren innerhalb der TRPV-Unterfamilie untersucht werden.

Als repräsentatives Mitglied der TRPM-Unterfamilie wurde zusätzlich TRPM3 geprüft. Dafür wurden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen auf Basis von Verdünnungsreihen der drei Inhibitoren mit Fluo-4-beladenen HEK293-Zelllinien, welche stabil Ratten-TRPV1 (rTRPV1), rTRPV2, Maus-TRPV3 (mTRPV3), Maus-TRPV4 (mTRPV4) oder TRPM3α2 (TRPM3) exprimieren, und deren entsprechenden Aktivatoren Capsaicin (TRPV1), 2-APB (TRPV2, TRPV3), GSK1016790A (TRPV4) oder Pregnenolonsulfat (TRPM3) ermittelt (Abb. 4.3 A). Während die Inhibitoren bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  rTRPV2 signifikant inhibierten, zeigten sie keine Wirkung auf die anderen TRP Kanäle (Abb. 4.3 B).



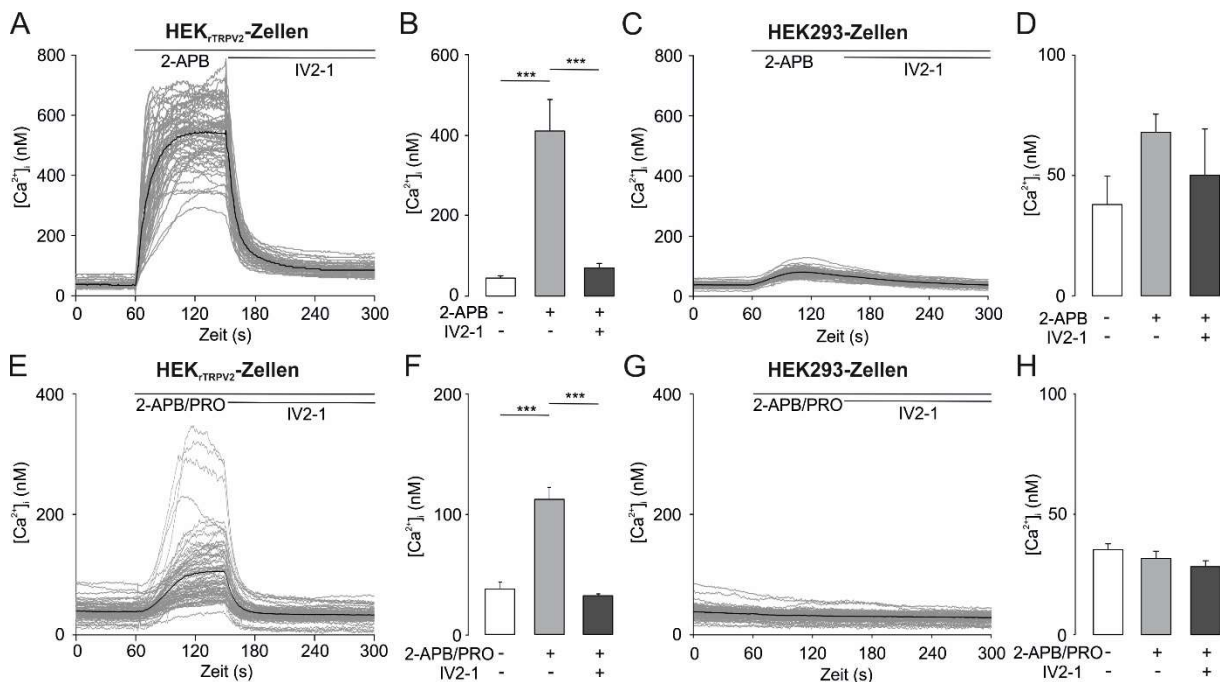
**Abb. 4.3: Untersuchungen zur Selektivität der drei neuen Inhibitoren.**

**(A)** Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der drei TRPV2-Inhibitoren IV2-1, IV2-2 und IV2-3 in Fluo-4-beladenen HEK293-Zellen, welche stabil rTRPV1, rTRPV3, mTRPV4 oder TRPM3 exprimieren, nach Stimulation mit den entsprechenden Aktivatoren 2  $\mu\text{M}$  Capsaicin (TRPV1), 300  $\mu\text{M}$  2-APB (rTRPV2), 100  $\mu\text{M}$  2-APB (TRPV3), 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A (TRPV4) oder 40  $\mu\text{M}$  Pregnenolonsulfat (TRPM3). Die Daten sind als MW  $\pm$  SD von  $n = 5$  unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung abgebildet (1 entspricht der Basalfluoreszenz). **(B)** Statistische Auswertung der Selektivitätsuntersuchung von **(A)** bei 25  $\mu\text{M}$  Konzentration der drei Inhibitoren.

#### 4.1.2 Funktionale Charakterisierung des neuen TRPV2-Inhibitors IV2-1

Zur weiteren funktionalen Charakterisierung konzentrierten sich die Arbeiten auf IV2-1 als potentesten der drei Inhibitoren. In kalibrierten Einzelzell- $\text{Ca}^{2+}$ -Analysen Fura-2-beladener  $\text{HEK}_{\text{rTRPV2}}$ -Zellen sollte bestätigt werden, dass IV2-1 den TRPV2-induzierten Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inhibiert. Zur Kontrolle eines TRPV2-vermittelten Effekts und zum Ausschluss unspezifischer Effekte wurden zusätzlich parentale HEK293-Zellen auf die gleiche Weise untersucht. So konnten 300  $\mu\text{M}$  2-APB einen deutlichen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in  $\text{HEK}_{\text{rTRPV2}}$ -Zellen induzieren, welcher durch Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  IV2-1 signifikant inhibiert wurde (Abb. 4.4 A, B). In parental HEK293-Zellen wurde nach Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  2-APB ein geringes unspezifisches Signal beobachtet, welches durch IV2-1 nicht beeinflusst werden konnte (Abb. 4.4 C, D). Wie kürzlich von unserer Arbeitsgruppe publiziert, hat die Kombination von 2-APB und Probenecid (PRO) einen superadditiven Effekt auf die TRPV2-Aktivierung [153]. Deshalb

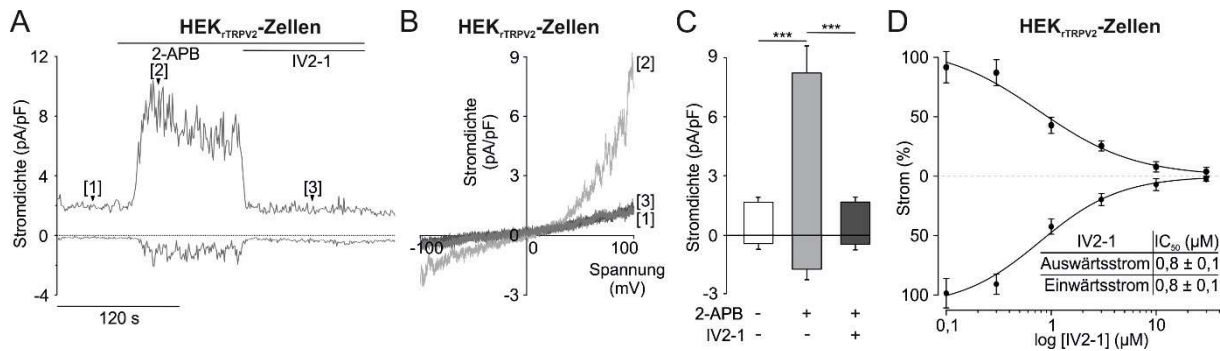
wurden 30  $\mu\text{M}$  2-APB zusammen mit 500  $\mu\text{M}$  Probenecid verwendet, was jeweils bei alleiniger Anwendung nicht zur Aktivierung von TRPV2 führt. Diese Kombination von 2-APB/Probenecid induzierte einen robusten Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , welcher durch Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  IV2-1 komplett inhibiert wurde (Abb. 4.4 E, F). In parental HEK293-Zellen konnte zudem kein unspezifischer Effekt durch die Agonisten-Kombination beobachtet werden (Abb. 4.4 G, H).



**Abb. 4.4: Inhibition des TRPV2-vermittelten Einstroms von  $\text{Ca}^{2+}$  durch IV2-1 in HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen.**

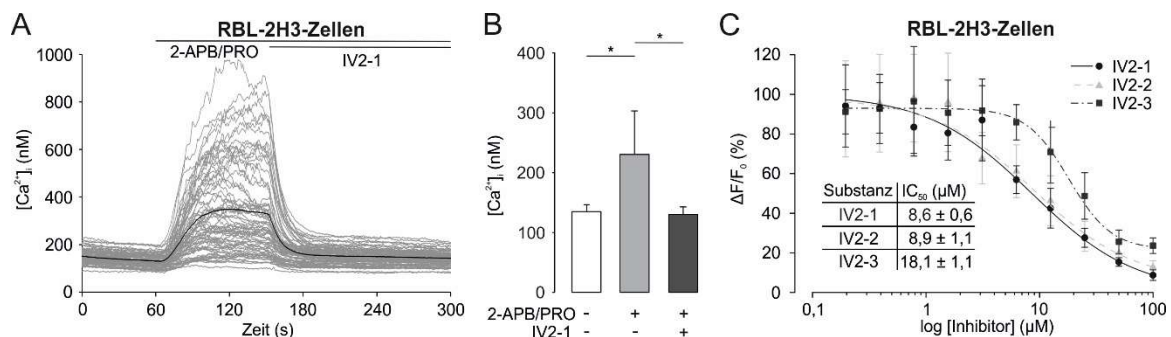
(A, B, E, F) Analyse der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in einzelnen Fura-2-beladenen HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen vor und nach Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  2-APB (A, B) bzw. 30  $\mu\text{M}$  2-APB/500  $\mu\text{M}$  PRO (E, F) und 20  $\mu\text{M}$  IV2-1. Dargestellt sind Beispielmessungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  im Zeitverlauf (A, E) sowie die statistische Auswertung der MW + SD von  $n = 5$  unabhängigen Messungen (B, F). (C, D, G, H) Einzelzell- $\text{Ca}^{2+}$ -Analysen in Fura-2-beladenen parental HEK293-Zellen bei Gabe von 300  $\mu\text{M}$  2-APB (C, D) bzw. 30  $\mu\text{M}$  2-APB/500  $\mu\text{M}$  PRO (G, H) und 20  $\mu\text{M}$  IV2-1. Abgebildet sind beispielhafte Messungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (C, G) sowie die statistische Auswertung der MW + SD von  $n = 5$  unabhängigen Messungen (D, H).

Weiterhin wurde die Funktionalität von IV2-1 mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen bestätigt. Dafür wurden Patch-Clamp-Messungen von HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen in der Ganzzelleableitung durchgeführt. Nach Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  2-APB konnte eine signifikante Zunahme des Ein- und Auswärtsstroms gemessen werden, welche durch 20  $\mu\text{M}$  IV2-1 komplett blockiert wurde (Abb. 4.5 A, C). Als typische Eigenschaften von TRPV2 konnten zusätzlich das Umkehrpotential nahe 0 mV bei Aktivierung durch 2-APB sowie ein auswärts gerichteter Strom beobachtet werden (Abb. 4.5 B). Zudem sollte der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der fluorometrisch ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Beziehung elektrophysiologisch bestätigt werden. Dafür wurden TRPV2-vermittelte Ströme in HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen mit 300  $\mu\text{M}$  2-APB induziert und die inhibierende Wirkung von IV2-1 in Verdünnungsreihen ermittelt (Abb. 4.5 D). Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte des Blocks von Ein- ( $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) und Auswärtsströmen ( $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) lagen hierbei im nanomolaren Bereich (Abb. 4.5 D). Somit konnte bestätigt werden, dass IV2-1 TRPV2-induzierte Ströme in HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen konzentrationsabhängig inhibiert.



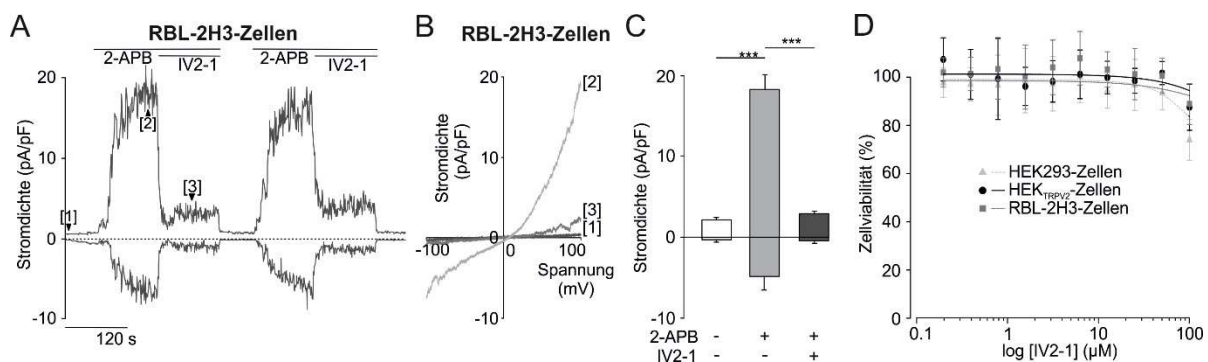
**Abb. 4.5: IV2-1 inhibiert 2-APB-induzierte TRPV2-Ströme in Ganzzellableitungen von HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen.** (A) Zeitverlauf der aus den Spannungsrampen extrahierten Stromdichten bei +100 mV (obere Kurve) und -100 mV (untere Kurve) vor und nach Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  2-APB und 20  $\mu\text{M}$  IV2-1 gemessen in der Ganzzellableitung von HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen. (B) I/V-Kurven von -100 bis +100 mV vor [1] und nach der Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  2-APB [2] sowie bei simultaner Applikation von 300  $\mu\text{M}$  2-APB und 20  $\mu\text{M}$  IV2-1 [3]. Die Zeitpunkte der dargestellten Einzelrampen [1], [2] und [3] lassen sich anhand der Pfeile in (A) erkennen. (C) Statistische Auswertung der ermittelten Stromdichten bei -100 bzw. +100 mV Haltespannung von n = 6 unabhängigen Messungen wie in (A). (D) Elektrophysiologisch ermittelte Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von IV2-1 in HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen nach Stimulation mit 300  $\mu\text{M}$  2-APB extrahiert aus Spannungsrampen wie in (B). Dargestellt sind MW  $\pm$  SD von n = 5 unabhängigen Messungen nach Subtraktion des basalen Stroms und Normierung auf einen Zeitpunkt der maximalen Aktivierung (0 entspricht dem basalen Strom) sowie die IC<sub>50</sub>-Werte von IV2-1 für Ein- (0,8  $\pm$  0,1  $\mu\text{M}$ ) und Auswärtsströme (0,8  $\pm$  0,1  $\mu\text{M}$ ).

Da HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen Überexpressionsartefakte wie z.B. Abweichungen in der Quartärstruktur des TRPV2-Ionenkanals aufweisen könnten [190], sollte die Wirkung von IV2-1 als nächstes im physiologischeren Kontext untersucht werden. Ein dafür geeignetes Modell stellen RBL-2H3-Zellen dar, die als immortalisierte Zelllinie basophiler Granulozyten TRPV2 endogen exprimieren [168]. Daher wurden kalibrierte Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Analysen von Fura-2-beladenen RBL-2H3-Zellen durchgeführt. Die Zugabe von 30  $\mu\text{M}$  2-APB/500  $\mu\text{M}$  Probenecid induzierte einen signifikanten Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, welcher durch 20  $\mu\text{M}$  IV2-1 komplett inhibiert werden konnte (Abb. 4.6 A, B). Dies bestätigt sowohl die endogene TRPV2-Expression als auch die biologische Aktivität von IV2-1. Als nächstes wurden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der drei neuen Inhibitoren mit Fluo-4-beladenen RBL-2H3-Zellen ermittelt. Nach Aktivierung von TRPV2 durch 30  $\mu\text{M}$  2-APB/500  $\mu\text{M}$  Probenecid lagen die IC<sub>50</sub>-Werte der drei Inhibitoren in einem ähnlichen Bereich wie zuvor in HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen (Abb. 4.6 C).



**Abb. 4.6: Inhibition des 2-APB/PRO-induzierten Einstroms von Ca<sup>2+</sup> durch IV2-1 in RBL-2H3-Zellen.** (A, B) Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Analysen Fura-2-beladener RBL-2H3-Zellen bei Zugabe von 30  $\mu\text{M}$  2-APB/500  $\mu\text{M}$  PRO und 20  $\mu\text{M}$  IV2-1. Dargestellt sind Beispielmessungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Abhängigkeit von der Zeit (A) sowie die statistische Auswertung der MW  $\pm$  SD von n = 5 unabhängigen Messungen (B). (C) Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von drei TRPV2-Inhibitoren IV2-1, IV2-2 und IV2-3 in Fluo-4-beladenen RBL-2H3-Zellsuspensionen nach Stimulation mit 30  $\mu\text{M}$  2-APB/500  $\mu\text{M}$  PRO. Die Basalfluoreszenz wurde subtrahiert und die Daten auf eine Kontrolle ohne Inhibitor normiert (0 entspricht der Basalfluoreszenz). Abgebildet sind MW  $\pm$  SD von n = 5 unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung. In der Tabelle sind die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte dargestellt.

Analog zu dem vorherigen Vorgehen wurde die inhibierende Wirkung von IV2-1 auf endogen exprimierte rTRPV2-Kanäle zusätzlich in elektrophysiologischen Messungen von RBL-2H3-Zellen untersucht. In der Ganzzelleableitung konnte dabei nach repetitiver Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  2-APB ein signifikanter Anstieg an TRPV2-Strömen ermittelt werden, welcher nach Applikation von 20  $\mu\text{M}$  IV2-1 reversibel blockiert wurde (Abb. 4.7 A, C). Ebenfalls konnte nach Aktivierung durch 2-APB ein Umkehrpotential nahe 0 mV sowie auswärts gerichteter Strom beobachtet werden (Abb. 4.7 B). Somit konnte die TRPV2-inhibierende Wirkung von IV2-1 in einem physiologischeren Modell bestätigt werden. Als nächstes sollten mögliche zytotoxische Effekte von IV2-1 ermittelt werden. Dafür wurde der Einfluss von IV2-1 auf die metabolische Aktivität und Proliferation von HEK293-, HEK<sub>rTRPV2</sub>- oder RBL-2H3-Zellen in MTT-Tests untersucht. Es konnten keine zytotoxischen Effekte von IV2-1 auf die entsprechenden Zellen bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  beobachtet werden (Abb. 4.8). Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass IV2-1 eine inhibierende Wirkung auf TRPV2 hat und dabei keine zytotoxischen Effekte verursacht. Folglich kann der neue TRPV2-Inhibitor als pharmakologischer Modulator zur Erforschung der physiologischen Funktion von TRPV2 in Immunzellen eingesetzt werden.

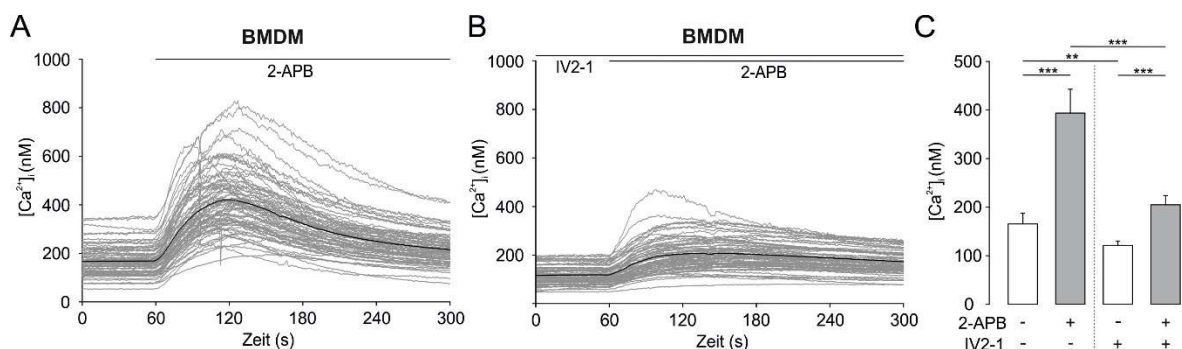


**Abb. 4.7: IV2-1 inhibiert endogene TRPV2-Ströme in basophilen RBL-2H3-Zellen und verursacht keine zytotoxischen Effekte bei Konzentrationen bis 50  $\mu\text{M}$ .**

(A) Zeitverlauf der Stromdichten bei +100 (obere Kurve) und -100 mV (untere Kurve) bei Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  2-APB und 20  $\mu\text{M}$  IV2-1 extrahiert aus den Spannungsrampen der Ganzzelleableitung von RBL-2H3-Zellen. (B) I/V-Kurven von -100 bis +100 mV vor [1] und nach Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  2-APB [2] sowie bei gleichzeitiger Applikation von 300  $\mu\text{M}$  2-APB und 20  $\mu\text{M}$  IV2-1 [3]. Die Zeitpunkte der Einzelrampen [1], [2] und [3] sind in (A) markiert. (C) Statistische Auswertung der Stromdichten bei -100 bzw. +100 mV Haltespannung von n = 6 unabhängige Messungen wie in (A). (D) Einfluss von IV2-1 auf die metabolische Aktivität und Proliferation von HEK293-, HEK<sub>rTRPV2</sub>- oder RBL-2H3-Zellen nach 24 Stunden, ermittelt als Zellviabilität mit MTT-Tests. Abgebildet sind die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen normiert auf entsprechende unbehandelte Zellen als MW  $\pm$  SD von n = 5 unabhängigen Messungen.

## 4.2 Physiologische Funktion von TRPV2 in primären Makrophagen

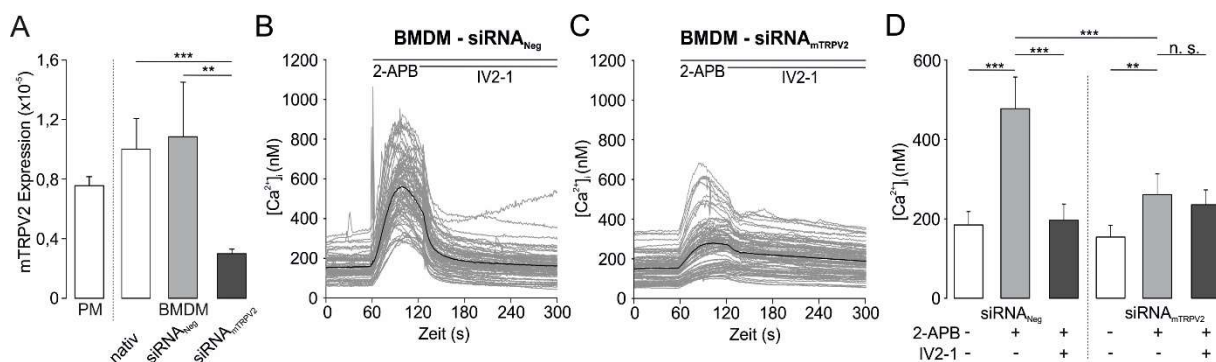
In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Makrophagen große Mengen an TRPV2 exprimieren [45,169,191]. Da neben Valdecoxib mit der Etablierung von IV2-1 ein weiterer strukturell unterschiedlicher TRPV2-Inhibitor zur Verfügung steht, sollte dieses Set an Modulatoren genutzt werden, um die TRPV2-Kanalaktivität in primären Makrophagen zu regulieren und folglich TRPV2-gesteuerte Mechanismen zu identifizieren.



**Abb. 4.8: Inhibition des TRPV2-vermittelten Einstroms von  $Ca^{2+}$  durch IV2-1 in Makrophagen.** (A-C) Einzelzell- $Ca^{2+}$ -Analysen Fura-2-beladener BMDM bei Zugabe von 300  $\mu$ M 2-APB ohne (A) oder mit (B) vorheriger Inkubation von 20  $\mu$ M IV2-1. Dargestellt sind beispielhafte Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  im Zeitverlauf (A, B) sowie die statistische Auswertung der MW + SD von n = 5 unabhängigen Messungen (C).

#### 4.2.1 Expression und *knockdown* von TRPV2 in primären Makrophagen

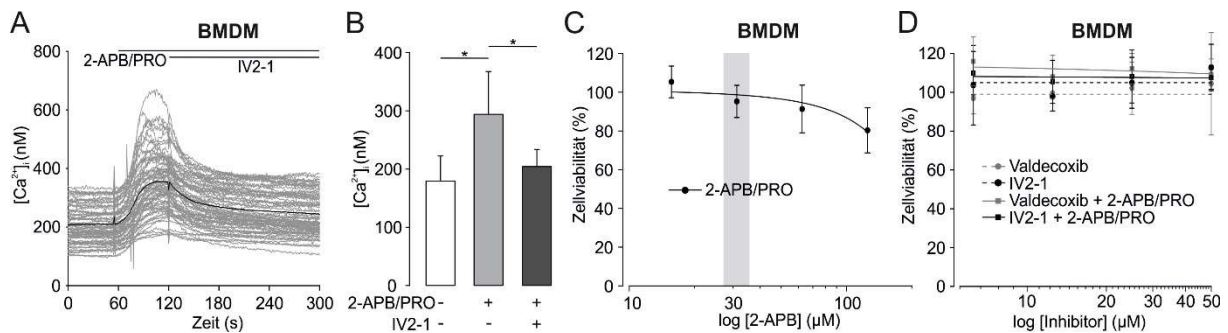
Zur Untersuchung des Einflusses von TRPV2-induzierten  $Ca^{2+}$ -Signalen in Makrophagen wurden zum einen mittels peritonealer Lavage von C57BL/6-Mäusen peritoneale Makrophagen (PM) isoliert und zum anderen aus dem Knochenmark der unteren Extremitäten von C57BL/6-Mäusen mittels M-CSF primäre Makrophagen (BMDM) differenziert (Abschnitt 3.2.2) [177]. In Einzelzell- $Ca^{2+}$ -Analysen von Fura-2-beladenen BMDM konnten nach Zugabe von 300  $\mu$ M 2-APB deutliche Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet werden, welche signifikant geringer waren, wenn die Zellen vorher mit 20  $\mu$ M IV2-1 behandelt wurden (Abb. 4.8 A-C). Diese Ergebnisse bestätigen sowohl die funktionelle Expression von TRPV2 in BMDM als auch die TRPV2-inhibierende Wirkung von IV2-1 in BMDM. Weiterhin sollte ein siRNA-vermittelter *knockdown* von TRPV2 in BMDM etabliert werden, um die Ergebnisse der TRPV2-Inhibition durch IV2-1 zu bestätigen. Dafür wurden BMDM mit siRNA<sub>mTRPV2</sub> bzw. siRNA<sub>Neg</sub> transfiziert und die Expression von TRPV2-mRNA mittels RT-qPCR untersucht. Die Daten der behandelten BMDM wurden mit unbehandelten BMDM sowie PM verglichen, wobei BMDM und PM ähnliche Mengen an TRPV2-mRNA exprimierten (Abb. 4.9 A).



**Abb. 4.9: Knockdown von TRPV2 mittels siRNA in BMDM.** (A) Statistische Auswertung der mittels RT-qPCR gemessenen Expression von TRPV2-mRNA in primären PM und BMDM sowie BMDM nach Transfektion mit siRNA<sub>mTRPV2</sub> oder siRNA<sub>Neg</sub>. Abgebildet sind die MW + SD von n = 5 unabhängigen Messungen. (B-D) Einzelzell- $Ca^{2+}$ -Analysen Fura-2-beladener BMDM, welche zuvor mit siRNA<sub>mTRPV2</sub> (B) oder siRNA<sub>Neg</sub> (C) transfiziert wurden, bei Zugabe von 300  $\mu$ M 2-APB und 20  $\mu$ M IV2-1. Dargestellt sind Beispielmessungen der  $[Ca^{2+}]_i$  in Abhängigkeit von der Zeit (B, C) sowie die statistische Auswertung der MW + SD von n = 5 unabhängigen Messungen (D).



Während siRNA<sub>Neg</sub> keinen signifikanten Effekt aufwies, konnte die Behandlung mit siRNA<sub>mTRPV2</sub> die Expression von mTRPV2 in BMDM um etwa 70 Prozent verringern (Abb. 4.9 A). Dementsprechend konnten in Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Analysen Fura-2-beladener BMDM, die zuvor mit siRNA<sub>Neg</sub> behandelt wurden, nach Zugabe von 300 µM 2-APB deutliche Anstiege der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> beobachtet werden, welche signifikant durch Applikation von 20 µM IV2-1 geblockt wurden (Abb. 4.9 B, D). Im Vergleich dazu zeigten siRNA<sub>mTRPV2</sub>-behandelte BMDM sowohl einen signifikant geringeren Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nach Zugabe von 300 µM 2-APB als auch eine niedrigere Inhibition durch IV2-1 (Abb. 4.9 C, D).



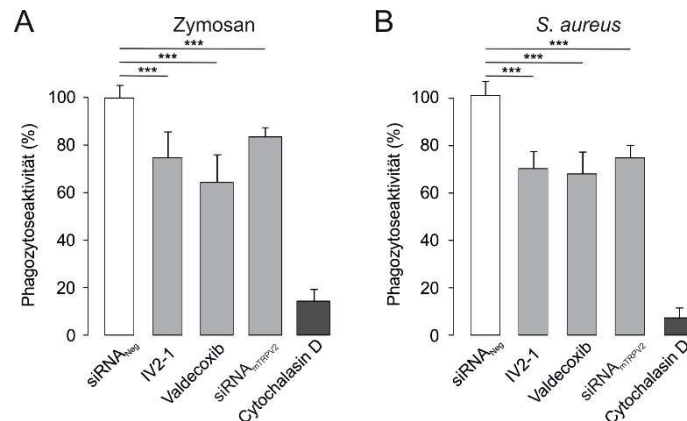
**Abb. 4.10: IV2-1 inhibiert 2-APB/PRO-induzierte Anstiege der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in BMDM ohne unspezifische Effekte.** (A, B) Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Analysen Fura-2-beladener BMDM bei Zugabe von 30 µM 2-APB/500 µM PRO und 20 µM IV2-1. Dargestellt sind beispielhafte Messungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (A) sowie die statistische Auswertung der MW + SD von n = 5 unabhängigen Messungen (B). (C, D) Einfluss von 2-APB/PRO, Valdecoxib oder IV2-1 auf die metabolische Aktivität und Proliferation von BMDM nach 24 Stunden, ermittelt als Zellviabilität mit MTT-Tests. Abgebildet sind die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von 2-APB bei konstanter Konzentration von 500 µM PRO (30 µM 2-APB/500 µM PRO grau markiert) (C) sowie von Valdecoxib oder IV2-1 mit und ohne 30 µM 2-APB/500 µM PRO (D) normiert auf unbehandelte BMDM als MW ± SD von n = 5 unabhängigen Messungen.

Da die Anwendung von hohen Konzentrationen an 2-APB nach 24 Stunden zu unspezifischen und zytotoxischen Effekten führt, eignet es sich nicht zur Langzeitapplikation im Rahmen von funktionalen Tests. Daher sollte die Kombination von 2-APB/Probenecid zur Aktivierung von TRPV2 in BMDM etabliert werden. In Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Analysen von Fura-2-beladenen BMDM konnten nach Zugabe von 30 µM 2-APB/500 µM Probenecid signifikante Anstiege der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> beobachtet werden, welche mit 20 µM IV2-1 inhibiert wurden (Abb. 4.10 A-B). Als nächstes wurden mögliche zytotoxische Effekte der Modulatoren auf BMDM nach 24 Stunden mittels MTT-Tests untersucht. Es konnten keine zytotoxischen Effekte der bisher verwendeten 30 µM 2-APB/500 µM Probenecid (Abb. 4.10 C, graue Markierung) sowie von bis zu 50 µM Valdecoxib oder IV2-1 mit oder ohne Anwesenheit von 30 µM 2-APB/500 µM Probenecid auf BMDM beobachtet werden (Abb. 4.10 D).

#### 4.2.2 TRPV2 in Phagozytose und Migration von primären Makrophagen

In TRPV2-defizienten Modellen konnte gezeigt werden, dass TRPV2 die Phagozytoseaktivität von Makrophagen beeinflusst [45]. Nun sollte untersucht werden, ob die akute Modulation von TRPV2 mit Hilfe niedermolekularer Inhibitoren ähnliche Effekte verursacht. Dafür wurden BMDM mit 20 µM IV2-1, 20 µM Valdecoxib oder siRNA inkubiert und die Phagozytose von pHrodo Green-markierten Zymosan- oder *S. aureus*-Biopartikeln gemessen (Abb. 4.11). Als

Blocker der Polymerisation von Aktin-Filamenten wurden 2  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D als Positivkontrolle verwendet. Während die Inkubation der BMDM mit  $\text{siRNA}_{\text{Neg}}$  die Phagozytose nicht beeinflusste, senkte die Inhibition von TRPV2 mittels IV2-1, Valdecoxib oder  $\text{siRNA}_{\text{mTRPV2}}$  die Phagozytose der Biopartikel auf etwa 70 Prozent im Vergleich mit unbehandelten BMDM. Folglich konnte mit Hilfe pharmakologischer Modulatoren gezeigt werden, dass TRPV2 in den Mechanismus der Phagozytose involviert ist.

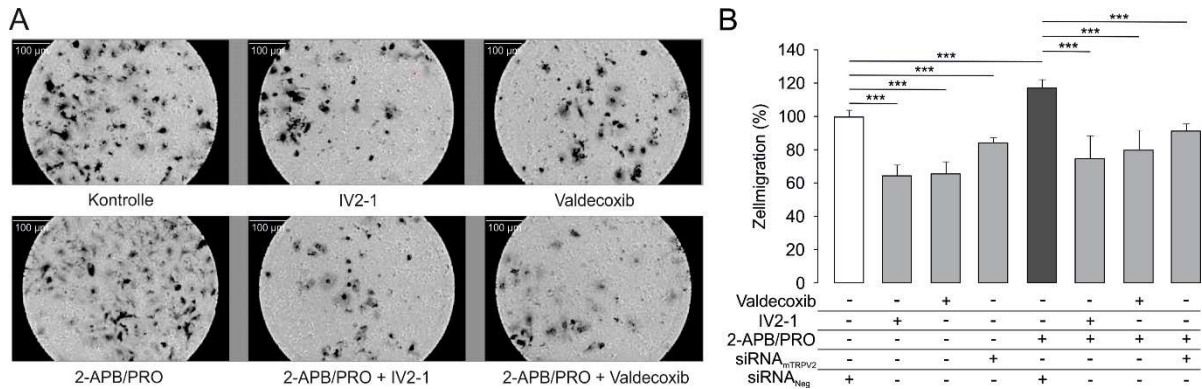


**Abb. 4.11: Inhibition von TRPV2 senkt die Phagozytoseaktivität von BMDM.**

(A, B) Statistische Auswertung des Einflusses von 20  $\mu\text{M}$  Valdecoxib, 20  $\mu\text{M}$  IV2-1, 2  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D (Positivkontrolle),  $\text{siRNA}_{\text{mTRPV2}}$  oder  $\text{siRNA}_{\text{Neg}}$  auf die Phagozytose von Zymosan- (A) oder *S. aureus*-Biopartikeln (B) durch BMDM. Dargestellt ist die Phagozytoseaktivität in % von entsprechend behandelten BMDM normiert auf eine unbehandelte Kontrolle als MW + SD von n = 5 unabhängigen Messungen.

Zusätzlich wird ein Einfluss von TRPV2 auf die Motilität von Makrophagen diskutiert [45,191]. Aus diesem Grund sollten die pharmakologischen Tools zur Untersuchung des Einflusses der TRPV2-Aktivität auf die Migration von BMDM genutzt werden. Dafür wurden zweidimensionale Transwell-Migrationsassays mit BMDM in einem LPS-Gradienten durchgeführt (Abb. 4.12 A). Während die vorherige Behandlung der BMDM mit  $\text{siRNA}_{\text{Neg}}$  keine Unterschiede im Migrationsverhalten induzierte, senkte der *knockdown* von TRPV2 mittels  $\text{siRNA}_{\text{mTRPV2}}$  die Anzahl migrierter BMDM im Vergleich zu unbehandelten BMDM (Abb. 4.12 B). Die Inhibition von TRPV2 mittels 20  $\mu\text{M}$  IV2-1 oder 20  $\mu\text{M}$  Valdecoxib verursachte ebenfalls eine signifikant verringerte Anzahl migrierter BMDM. Im Gegensatz dazu resultierte die Aktivierung von TRPV2 mit 30  $\mu\text{M}$  2-APB/500  $\mu\text{M}$  Probenecid in einer erhöhten Anzahl von migrierten BMDM. Dieser Effekt konnte durch gleichzeitige Applikation von  $\text{siRNA}_{\text{mTRPV2}}$ , 20  $\mu\text{M}$  IV2-1 oder 20  $\mu\text{M}$  Valdecoxib blockiert werden. Daraus lässt sich ableiten, dass TRPV2-Aktivität den Prozess der LPS-induzierte Migration von BMDM beeinflusst.

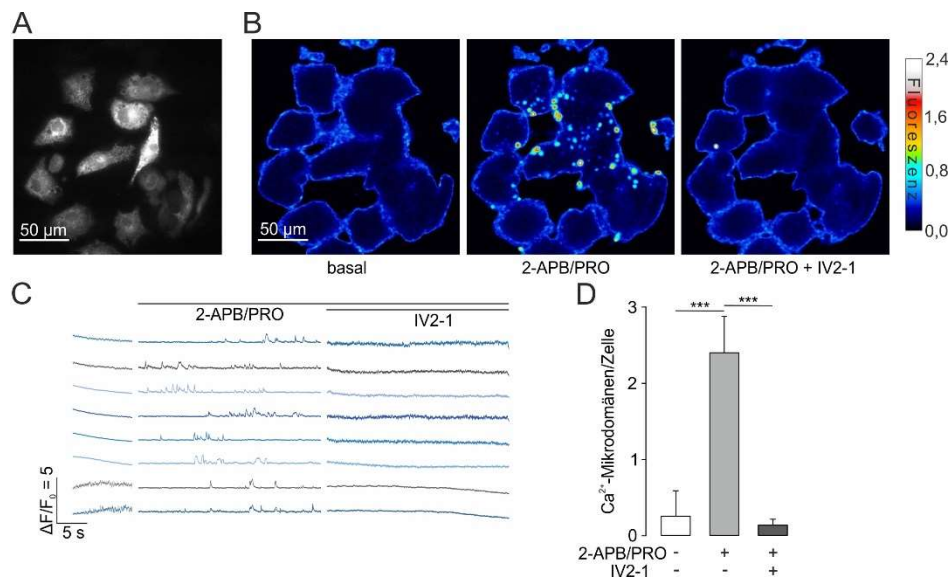
Im Rahmen der Migration können  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalkaskaden z.B. die Aktin-Polymerisation, die Umstrukturierung des Zytoskelettes oder zielgerichtete Prozesse induzieren [192]. Auf Grund der Involvierung des TRPV2-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in Phagozytose und Migration von Makrophagen sollte als nächstes untersucht werden, ob einzelne oder wenige TRPV2-Ionenkanäle räumlich und zeitlich koordinierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale verursachen und folglich  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen generieren.



**Abb. 4.12: Die Kanalaktivität von TRPV2 beeinflusst die Migration von BMDM.**

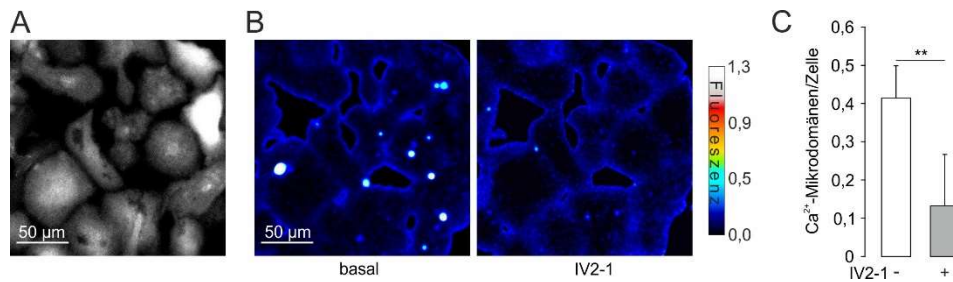
(A, B) Darstellung des Einflusses von 30 µM 2-APB/500 µM PRO, 20 µM Valdecoxib, 20 µM IV2-1, siRNA<sub>mTRPV2</sub> oder siRNA<sub>Neg</sub> auf die Migration von BMDM in Richtung eines 100 ng/ml LPS-Gradienten durch eine Filtermembran (Porengröße = 8 µm) von Transwell-Einsätzen über 14 Stunden. Abgebildet sind beispielhaft die mit Hilfe von Kristallviolett angefärbten BMDM auf der Unterseite der Filtermembranen (A) sowie die statistische Auswertung der Anzahl migrierter BMDM mit entsprechender Behandlung normiert auf eine unbehandelte Kontrolle als MW + SD von n = 6 unabhängigen Messungen (B).

Diese räumlich begrenzten Bereiche hoher Ca<sup>2+</sup>-Fluktuation in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran wurden mittels TIRFM und des niederaffinen Ca<sup>2+</sup>-Indikator Cal520ff/AM visualisiert. Nachdem 50 µM 2-APB/500 µM Probenecid zu Cal520ff-beladenen BMDM hinzugegeben wurde, konnten kurzzeitige sowie lokal begrenzte, hohe Ca<sup>2+</sup>-Fluktuationen vorrangig an den Rändern der BMDM beobachtet werden (Abb. 4.13 B, C). Die anschließende Applikation von 20 µM IV2-1 führt zur kompletten Inhibition dieser somit voraussichtlich TRPV2-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Signale (Abb. 4.13 B-D). Im letzten Schritt wurden ähnliche Versuche unter physiologischeren Bedingungen bei 37 °C und einer extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 1,8 mM wiederholt. Dabei konnten lokal begrenzte Ca<sup>2+</sup>-Signale von basal aktiven Ca<sup>2+</sup>-Mikrodomänen ohne Zugabe von Aktivatoren beobachtet werden (Abb. 4.14 A, B).



**Abb. 4.13: TRPV2 ist Bestandteil von Ca<sup>2+</sup> Mikrodomänen in BMDM.**

(A-D) Untersuchung von Ca<sup>2+</sup>-Fluktuationen in Cal520ff-beladenen BMDM mit Hilfe von TIRFM. Dargestellt sind beispielhaft ein Kontrollbild der Cal520ff-beladenen BMDM (A) sowie die Varianzanalysen der Fluoreszenzsignale über die Zeit vor und nach Zugabe von 50 µM 2-APB/500 µM PRO und 20 µM IV2-1 (B). Zur Auswertung konnten die Regionen der kurzlebigen und punktuellen Fluoreszenzsignale im Zeitverlauf aufgelöst werden (C) oder die Anzahl an visualisierten Ca<sup>2+</sup> Mikrodomänen auf die Zellzahl im Sichtfeld normiert als MW + SD von n = 5 unabhängigen Messungen dargestellt werden (D).



**Abb. 4.14: TRPV2 generiert basal aktive Ca<sup>2+</sup>-Mikrodomänen in BMDM.**

(A-B) TIRFM-Analyse von Ca<sup>2+</sup>-Fluktuationen in Cal520ff-beladenen BMDM bei 37 °C und 1,8 mM extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Abgebildet sind beispielhaft ein Kontrollbild der Cal520ff-beladenen BMDM (A) sowie die Varianzanalysen der Fluoreszenzsignale über die Zeit vor und nach Zugabe von 20 µM IV2-1 (B). (C) Statistische Auswertung der Anzahl an visualisierten Ca<sup>2+</sup> Mikrodomänen normiert auf die Zellzahl im Sichtfeld als MW + SD von n = 5 unabhängigen Messungen.

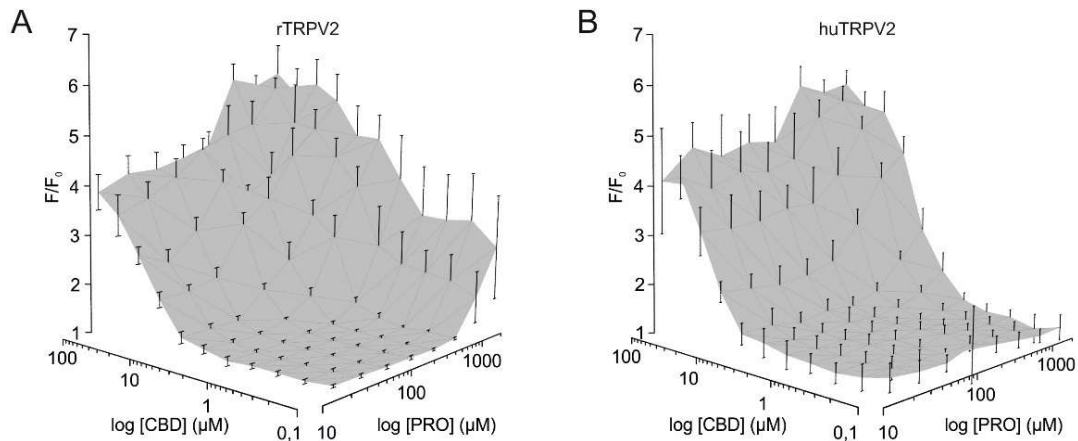
Die Anzahl basal aktiver Ca<sup>2+</sup>-Mikrodomänen konnten nach Applikation von 20 µM IV2-1 signifikant inhibiert werden. Dementsprechend scheint TRPV2 bei Wärme eine basale Aktivität aufzuzeigen und Ca<sup>2+</sup>-Mikrodomänen auszubilden, welche die Mechanismen von Phagozytose und Migration beeinflussen könnten.

### 4.3 Superadditiver Effekt von CBD und Probenecid auf die TRPV2-Aktivität

Bisher genutzte TRPV2-Aktivatoren wie 2-APB, Probenecid, THC oder CBD müssen in hohen Konzentrationen verwendet werden, wobei sie unspezifische sowie zytotoxische Effekte aufweisen. Aufgrund des kürzlich identifizierten superadditiven Effekts von 2-APB und Probenecid in Kombination konnte TRPV2 erstmals über längere Zeiträume ohne zytotoxische Effekte aktiviert werden. Allerdings zeigt 2-APB eine speziesabhängige Wirksamkeit. So werden zwar mTRPV2- oder rTRPV2-Ionenkanäle durch 2-APB aktiviert, huTRPV2 jedoch nicht [151]. Daher sollte untersucht werden, ob auch die Kombination von Probenecid mit einem Cannabinoid potenzierende Effekte aufweist.

#### 4.3.1 Identifizierung des potenzierenden Effekts von Probenecid und CBD

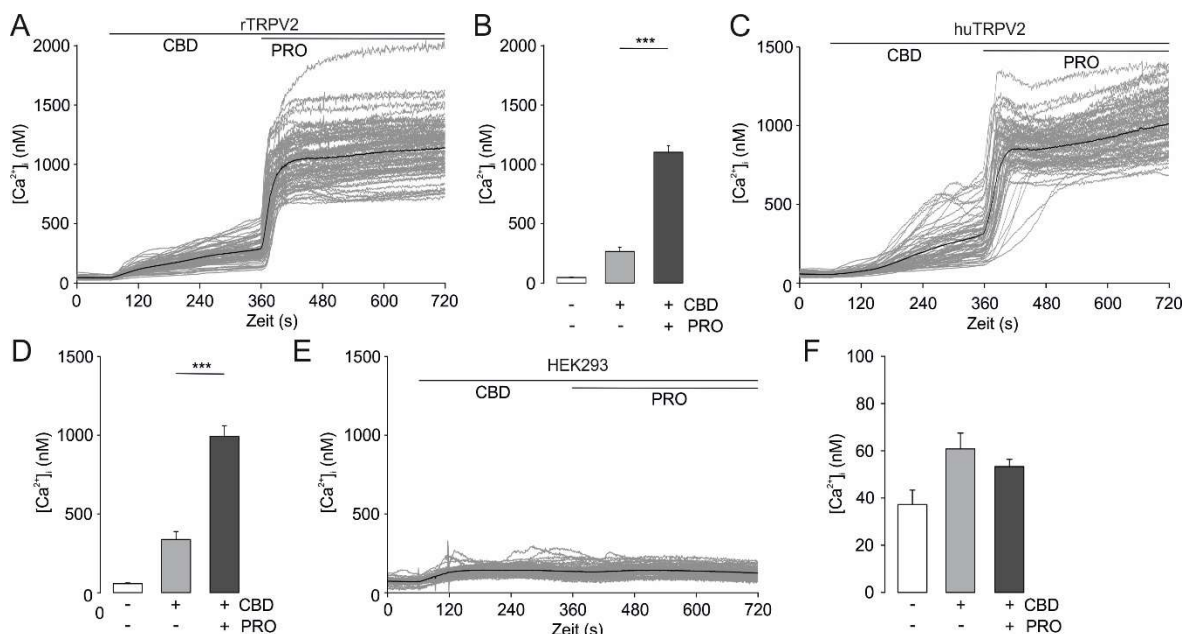
Da unter den publizierten Cannabinoiden mit TRPV2-Aktivität CBD die höchste Potenz aufweist [155], sollte die Kombination aus CBD und Probenecid bezüglich potenzierender Effekte untersucht werden. Als Zellmodelle wurden dafür HEK<sub>rTRPV2</sub>- sowie HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen verwendet und diese mit Fluo-4/AM beladen. Anschließend wurden in 96 Well-Mikrotiterplatten spaltenweise CBD sowie zeilenweise Probenecid verdünnt und nach Applikation dieser Verdünnungsreihen die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fluorometrisch analysiert. Folglich konnten zweidimensionale Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von CBD und Probenecid hinsichtlich potenzierender Effekte auf die TRPV2-Aktivität ermittelt werden (Abb. 4.15 A, B). Innerhalb dieser wurden Konzentrationen beider Substanzen beobachtet, welche bei simultaner Applikation eine superadditive Wirkung auf die Aktivierung von rTRPV2 sowie huTRPV2 aufwiesen.



**Abb. 4.15: Identifizierung des superadditiven Effekts von CBD und PRO auf die TRPV2-Aktivierung.**

(A, B) Zweidimensionale Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von CBD und PRO, ermittelt in Fluo-4-beladenen HEK<sub>rTRPV2</sub>- (A) oder HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellsuspensionen (B). Dargestellt sind MW ± SD von n = 5 unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung (1 entspricht der Basalfluoreszenz).

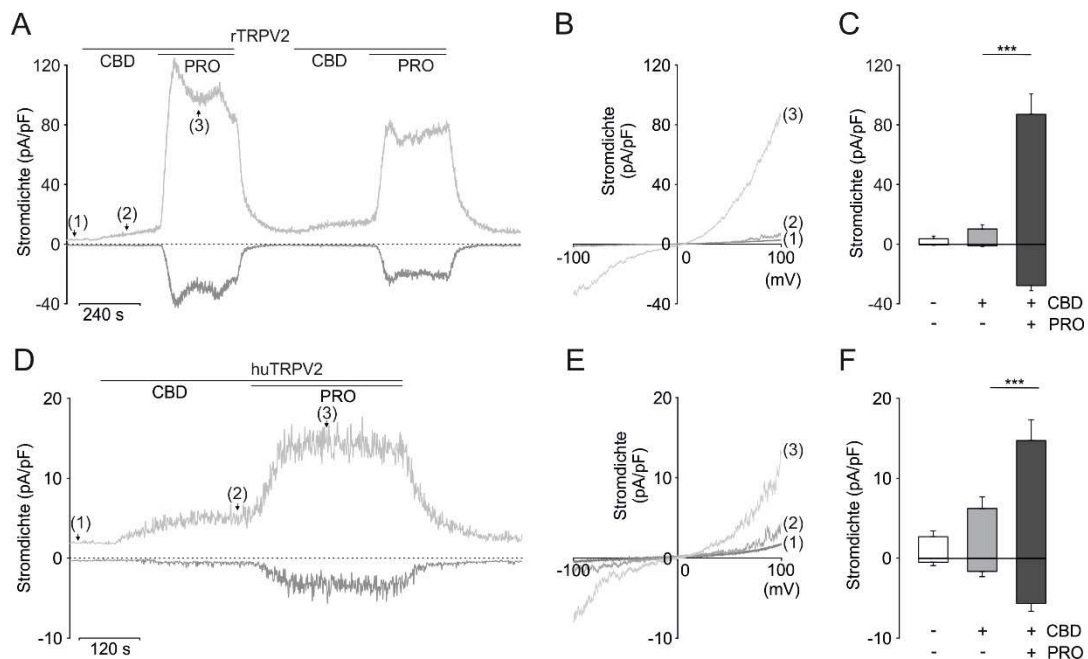
Anschließend sollte in Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Analysen Fura-2-beladener HEK<sub>rTRPV2</sub>- oder HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen der synergistische Effekt von CBD/Probenecid bestätigt werden. Die alleinige Zugabe von 25 μM CBD verursachte lediglich einen moderaten Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> von HEK<sub>rTRPV2</sub>- oder HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen (Abb. 4.16 A-D). Bei gleichzeitiger Applikation von 1000 μM Probenecid konnte hingegen ein sehr deutlicher Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in beiden Zelllinien ermittelt werden. Um unspezifische Erhöhungen der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auszuschließen, wurden zusätzlich parentale HEK293-Zellen auf die gleiche Weise untersucht. In diesen HEK293-Zellen konnte nach Zugabe von 25 μM CBD ein geringes unspezifisches Signal beobachtet werden, welches durch zusätzliche Applikation von 1000 μM Probenecid nicht weiter beeinflusst wurde (Abb. 4.16 E, F).



**Abb. 4.16: Potenzierende Wirkung von CBD und PRO auf den TRPV2-vermittelten Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.**

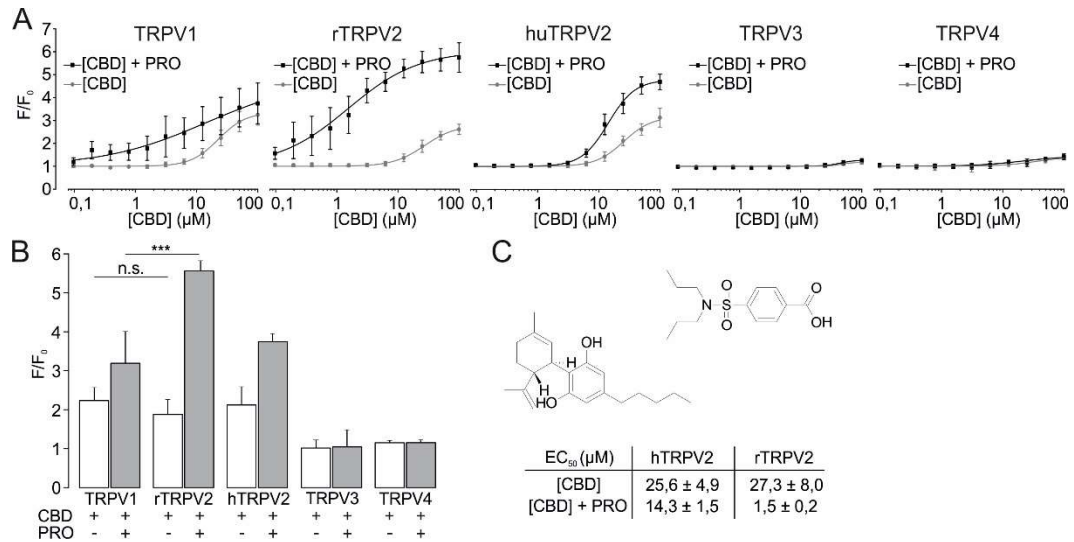
(A-F) Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Analysen Fura-2-beladener HEK<sub>rTRPV2</sub>-Zellen (A, B), HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen (C, D) oder parentaler HEK293-Zellen (E, F) vor und nach Zugabe von 25 μM CBD und 1000 μM PRO. Dargestellt sind beispielhafte Messungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> im Zeitverlauf (A, C, E) sowie die statistische Auswertung der MW + SD von n = 5 unabhängigen Messungen (B, D, F).

Zur weiteren Bestätigung wurden Patch-Clamp-Messungen von HEK<sub>rTRPV2</sub>- oder HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen in der Ganzzelleableitung durchgeführt. Nach Zugabe von 25 µM CBD konnten auch hier moderate Anstiege an rTRPV2- (Abb. 4.17 A, C) oder huTRPV2-vermittelten (Abb. 4.17 D, F) Einwärts- und Auswärtsströme gemessen werden, welche durch simultane Applikation von 1000 µM Probenecid deutlich potenziert werden konnten. Typischerweise lag das Umkehrpotential dabei nahe 0 mV und es konnten auswärts gleichrichtende Ströme beobachtet werden (Abb. 4.17 B, E).



**Abb. 4.17: Superadditiver Effekt von CBD und PRO auf TRPV2-Ströme in HEK<sub>rTRPV2</sub>- und HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen.** (A, D) Zeitverlauf der aus den Spannungsrampen extrahierten Stromdichten bei +100 mV (obere Kurve) und -100 mV (untere Kurve) bei Zugabe von 25 µM CBD und 1000 µM PRO gemessen in der Ganzzelleableitung von HEK<sub>rTRPV2</sub>- (A) oder HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen (D). (B, E) I/V-Kurven von -100 bis +100 mV vor [1] und nach der Zugabe von 25 µM CBD [2] sowie bei simultaner Applikation von 25 µM CBD und 1000 µM PRO [3] in HEK<sub>rTRPV2</sub>- (B) oder HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen (E). Die Zeitpunkte der Einzelrampen [1], [2] und [3] kann man (A) bzw. (D) entnehmen. (C, F) Statistische Auswertung der TRPV2-Ströme bei -100 bzw. +100 mV Haltespannung von n = 6 unabhängigen Messungen wie in (A) bzw. (D).

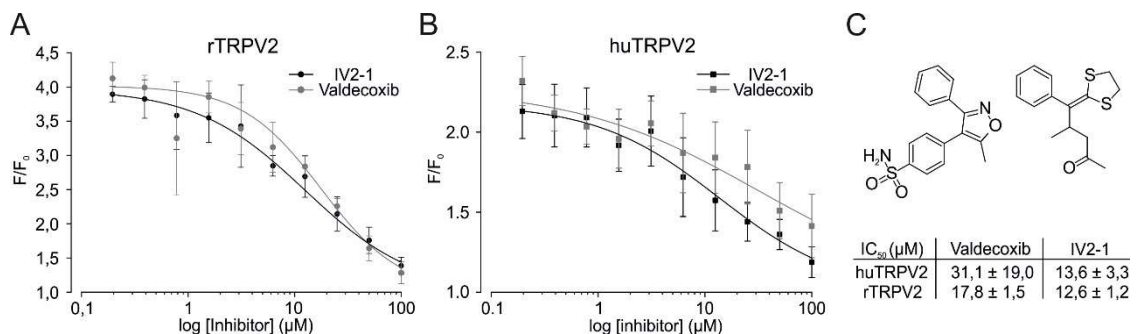
Da CBD ebenso TRPV1-aktivierende Eigenschaften besitzt [155], wurde als nächstes die Selektivität des superadditiven Effekts in der TRPV-Unterfamilie untersucht, indem Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von CBD mit oder ohne simultaner Applikation von 1000 µM Probenecid fluorometrisch ermittelt wurden. Als Zellmodelle wurden Fluo-4-beladene HEK293-Zellen verwendet, welche stabil rTRPV1, rTRPV2, huTRPV2, mTRPV3 oder mTRPV4 exprimieren (Abb. 4.18 A, B). Während TRPV3 und TRPV4 weder auf CBD noch auf CBD/Probenecid reagierten, führte die Applikation von CBD zur Aktivierung von TRPV1, rTRPV2 und huTRPV2, was in einer ähnlichen Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  resultierte. Bei gleichzeitiger Anwendung von 1000 µM Probenecid konnte ein starker zusätzlicher Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in HEK<sub>rTRPV2</sub>- und HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen beobachtet werden (Abb. 4.18 C). Die potenzierende Wirkung von CBD/Probenecid konnte überraschenderweise bei TRPV1 ebenso ermittelt werden, wenn auch im geringeren Umfang.



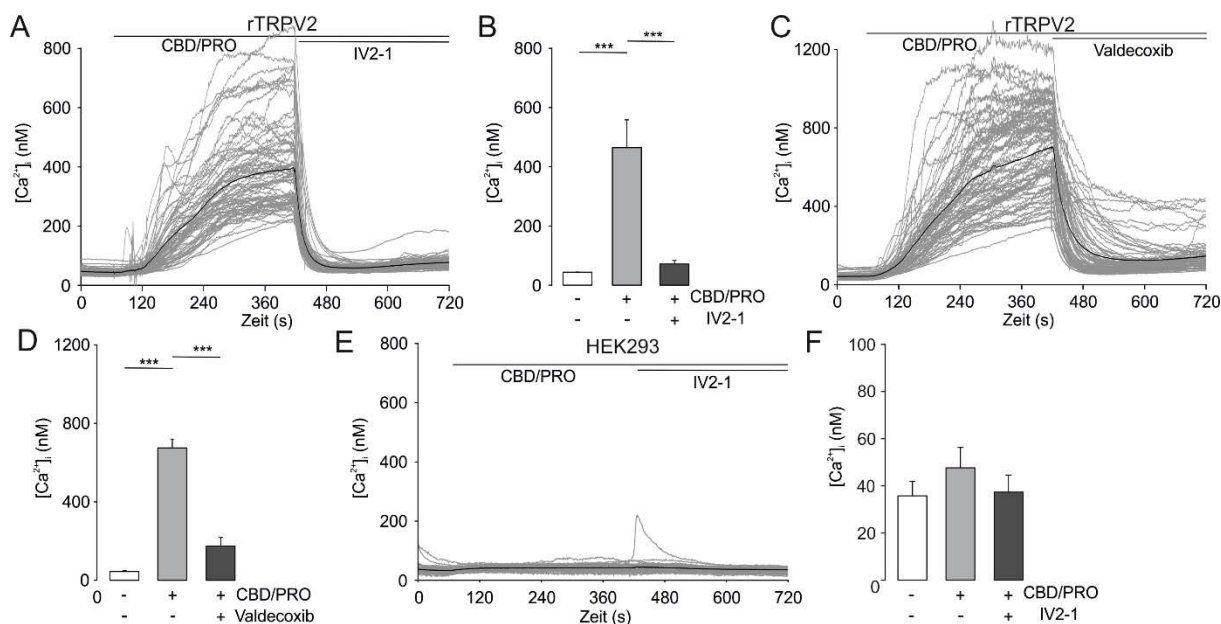
**Abb. 4.18: Untersuchungen zur Selektivität des aktivierenden Effekts von CBD und PRO.** (A) Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von CBD mit oder ohne 1000 μM PRO in Fluo-4-beladenen HEK293-Zellen, welche stabil rTRPV1, rTRPV2, huTRPV2, mTRPV3 oder mTRPV4 exprimieren. Abgebildet sind MW ± SD von jeweils n = 5 unabhängigen Messungen (1 entspricht der Basalfluoreszenz). (B) Statistische Auswertung der Selektivitätsuntersuchungen von (A) bei 25 μM CBD mit oder ohne 1000 μM PRO. (C) Darstellung der Strukturen von CBD und PRO sowie der EC<sub>50</sub>-Werte von CBD mit oder ohne 1000 μM PRO.

### 4.3.2 IV2-1 inhibiert TRPV2 nach Aktivierung mit CBD/Probenecid

Nach Identifizierung und Etablierung dieses superadditiven Effekts von CBD/Probenecid auf die Aktivierung von TRPV2 konnten für weitere Anwendungen die Konzentrationen beider TRPV2-Aktivatoren deutlich reduziert werden. Es wurden 6,25 μM CBD/500 μM Probenecid (rTRPV2) bzw. 12,5 μM CBD/500 μM Probenecid (huTRPV2) als Konzentrationen gewählt, da diese bei alleiniger Applikation keinen oder nur einen geringen Effekt zeigten aber in Kombination eine deutliche Aktivierung von TRPV2-induzierten (Abb. 4.15 A, B). Zusätzlich sollte die Anwendbarkeit der TRPV2-Inhibitoren IV2-1 und Valdecoxib überprüft werden. Dafür wurde die Inhibition des TRPV2-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in Fluo-4-beladene HEK<sub>rTRPV2</sub>- oder HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen nach Aktivierung mit 6,25 μM CBD/500 μM Probenecid bzw. 12,5 μM CBD/500 μM Probenecid mittels Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von IV2-1 oder Valdecoxib fluorimetrisch untersucht (Abb. 4.19 A, B).



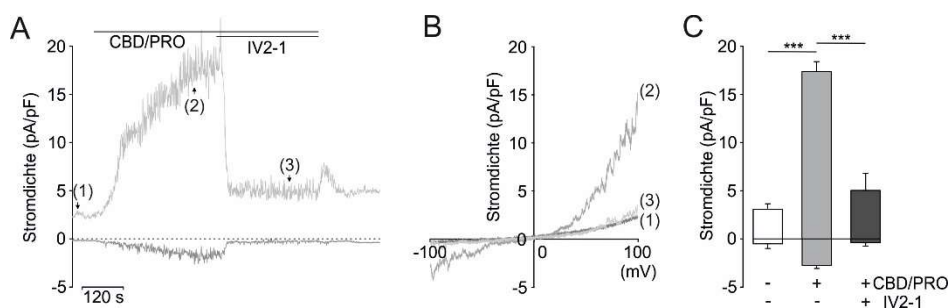
**Abb. 4.19: IV2-1 und Valdecoxib blockieren konzentrationsabhängig CBD/PRO-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom.** (A, B) Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von IV2-1 oder Valdecoxib in Fluo-4-beladenen HEK<sub>rTRPV2</sub>- (A) oder HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellsuspensionen (B) nach Stimulation mit 6,25 μM CBD/500 μM PRO (A) oder 12,5 μM CBD/500 μM PRO (B). Abgebildet sind MW ± SD von n = 4 (A) bzw. n = 5 (B) unabhängigen Messungen (1 entspricht der Basalfluoreszenz). (C) Darstellung von Valdecoxib oder IV2-1 mit chemischer Struktur und fluorimetrisch ermittelten IC<sub>50</sub>-Werten in HEK<sub>rTRPV2</sub>- oder HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen.



**Abb. 4.20: IV2-1 inhibiert den CBD/PRO-induzierten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in  $HEK_{rTRPV2}$ -Zellen.**

(A-D) Analyse der  $[Ca^{2+}]_i$  einzelner Fura-2-beladener  $HEK_{rTRPV2}$ -Zellen bei Zugabe von 6,25  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  PRO und 25  $\mu M$  IV2-1 (A, B) oder Valdecoxib (C, D). Dargestellt sind Beispielmessungen der  $[Ca^{2+}]_i$  im Zeitverlauf (A, C) sowie die statistische Auswertung der MW + SD von  $n = 5$  unabhängigen Messungen (B, D). (E, F) Einzelzell- $Ca^{2+}$ -Analysen Fura-2-beladener parentaler HEK293-Zellen bei Gabe von 6,25  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  PRO und 25  $\mu M$  IV2-1. Abgebildet sind beispielhafte Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  (E) sowie die statistische Auswertung der MW + SD von  $n = 5$  unabhängigen Messungen (F).

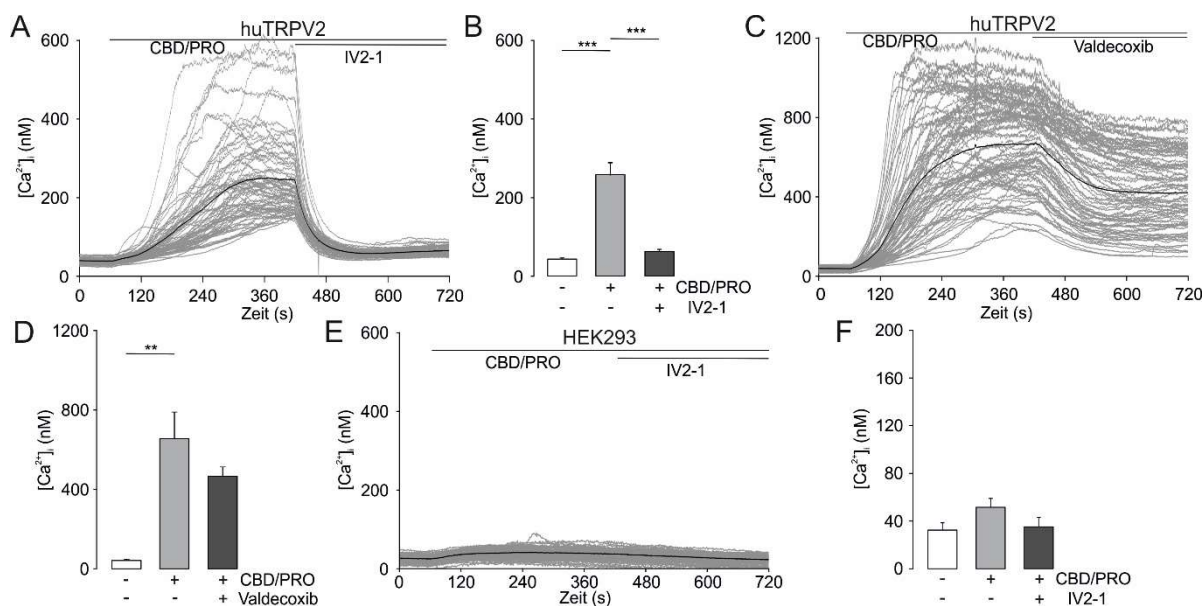
Während IV2-1 sowohl den  $Ca^{2+}$ -Einstrom von rTRPV2 als auch huTRPV2 inhibierte, blockierte Valdecoxib huTRPV2 nur partial. Die  $IC_{50}$ -Werte von IV2-1 ( $12,6 \pm 1,2 \mu M$ ) und Valdecoxib ( $17,8 \pm 1,5 \mu M$ ) für rTRPV2 lagen in einem vergleichbaren Bereich wie zuvor ermittelt nach Aktivierung durch 2-APB (Abb. 4.19 C). Weiterführend sollte die Inhibition von CBD/Probenecid-induzierter TRPV2-Aktivität in kalibrierten Einzelzell- $Ca^{2+}$ -Analysen von Fura-2-beladenen  $HEK_{rTRPV2}$ -Zellen sowie Patch-Clamp-Messungen bestätigt werden. Nach Zugabe von 6,25  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  Probenecid konnten signifikante Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 4.20 A-D) bzw. der TRPV2-Ströme (Abb. 4.21 A-C) beobachtet werden, welche durch Applikation von 25  $\mu M$  IV2-1 oder 25  $\mu M$  Valdecoxib inhibiert wurden. In parentalen HEK293-Zellen konnte nach Zugabe von 6,25  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  Probenecid und 25  $\mu M$  IV2-1 kein unspezifisches Signal beobachtet werden (Abb. 4.20 E, F).



**Abb. 4.21: IV2-1 blockiert CBD/PRO-vermittelte TRPV2-Ströme in  $HEK_{rTRPV2}$ -Zellen.**

(A) Zeitverlauf der Stromdichten bei +100 mV (obere Kurve) und -100 mV (untere Kurve) bei Zugabe von 6,25  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  PRO und 25  $\mu M$  IV2-1 gemessen in der Ganzzelleableitung von  $HEK_{rTRPV2}$ -Zellen. (B) I/V-Kurven von -100 bis +100 mV vor [1] und nach Zugabe von 6,25  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  PRO [2] sowie bei zusätzlicher Applikation von 25  $\mu M$  IV2-1 [3] (Zeitpunkte der Einzelrampen [1], [2] und [3] sind in (A) dargestellt). (C) Statistische Auswertung der TRPV2-Ströme bei -100 bzw. +100 mV Haltespannung von  $n = 5$  unabhängige Messungen wie in (A).

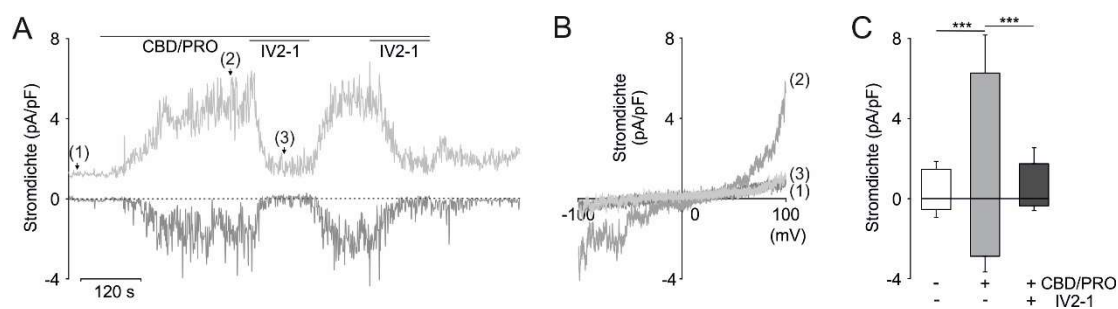




**Abb. 4.22: IV2-1 inhibiert den CBD/PRO-induzierten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in  $HEK_{huTRPV2}$ .**

(A-D) Einzelzell- $Ca^{2+}$ -Analysen Fura-2-beladener  $HEK_{huTRPV2}$ -Zellen vor und nach Gabe von 12,5  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  PRO und 25  $\mu M$  IV2-1 (A, B) oder Valdecoxib (C, D). Dargestellt sind beispielhafte Zeitverläufe der  $[Ca^{2+}]_i$  (A, C) sowie die statistische Auswertung der MW + SD von n = 5 (B) bzw. n = 3 (D) unabhängigen Messungen. (E, F) Analyse der  $[Ca^{2+}]_i$  einzelner Fura-2-beladener parentaler HEK293-Zellen bei Zugabe von 12,5  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  PRO und 25  $\mu M$  IV2-1. Abgebildet sind Beispielmessungen der  $[Ca^{2+}]_i$  (E) sowie die statistische Auswertung der MW + SD von n = 5 unabhängigen Messungen (F).

In Einzelzell- $Ca^{2+}$ -Analysen Fura-2-beladener  $HEK_{huTRPV2}$ -Zellen wurde die Inhibition von humanen TRPV2-Kanälen durch IV2-1 sowie Valdecoxib untersucht. Die Zugabe von 12,5  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  Probenecid induzierte einen signifikanten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , welcher durch Applikation von 25  $\mu M$  IV2-1 inhibiert werden konnte (Abb. 4.22 A, B). Im Gegensatz dazu konnte Valdecoxib den CBD/Probenecid-vermittelten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  lediglich partial inhibieren (Abb. 4.22 C, D), was einen speziesabhängigen Effekt von Valdecoxib auf TRPV2 nahelegt. In parental HEK293-Zellen fiel nach Zugabe von 12,5  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  Probenecid und 25  $\mu M$  IV2-1 kein unspezifisches Signal auf (Abb. 4.22 E, F). Mittels Patch-Clamp-Messungen von  $HEK_{huTRPV2}$ -Zellen in der Ganzzelleableitung konnte nach Zugabe von 12,5  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  Probenecid ein signifikanter Anstieg der TRPV2-Ströme ermittelt werden, welcher durch Applikation von 25  $\mu M$  IV2-1 reversibel inhibiert wurde (Abb. 4.23).



**Abb. 4.23: IV2-1 blockiert CBD/PRO-vermittelte TRPV2-Ströme in  $HEK_{huTRPV2}$ -Zellen.**

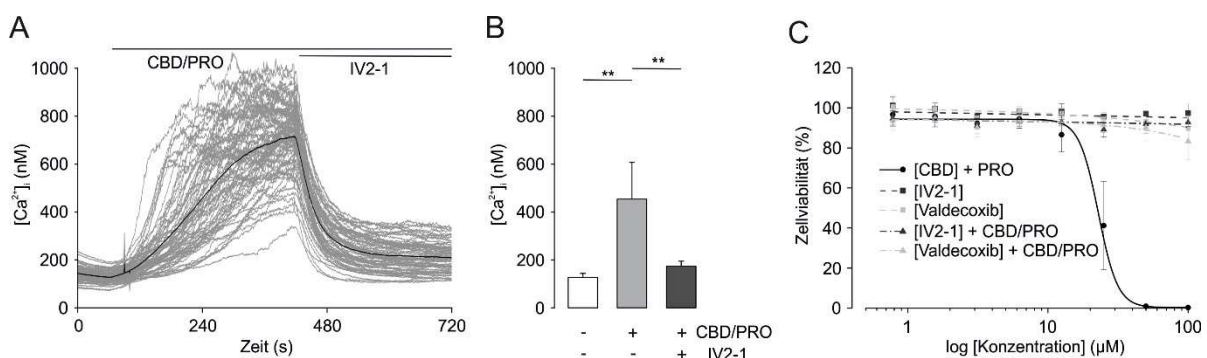
(A) Zeitverlauf der Stromdichten bei +100 mV (obere Kurve) und -100 mV (untere Kurve) bei Zugabe von 12,5  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  PRO und 25  $\mu M$  IV2-1 gemessen in der Ganzzelleableitung von  $HEK_{huTRPV2}$ -Zellen. (B) I/V-Kurven von -100 bis +100 mV vor [1] und nach der Zugabe von 12,5  $\mu M$  CBD/500  $\mu M$  PRO [2] und bei zusätzlicher Gabe von 25  $\mu M$  IV2-1 [3] (Zeitpunkte der Einzelrampen [1], [2] und [3] sind in (A) verdeutlicht). (C) Statistische Auswertung der TRPV2-Ströme bei -100 bzw. +100 mV Haltespannung von n = 5 unabhängige Messungen wie in (A).

#### 4.4 TRPV2 in der Physiologie von primären Mastzellen

Nachdem die akute Modulation von TRPV2 mit den niedermolekularen Substanzen IV2-1 und CBD/Probenecid etabliert und validiert werden konnte, sollten diese pharmakologischen Werkzeuge zur weiterführenden Untersuchung der physiologischen Funktion von TRPV2 in der Degranulation von Mastzellen genutzt werden. In murinen Zellen kann Valdecoxib zusätzlich als TRPV2-Inhibitor verwendet werden.

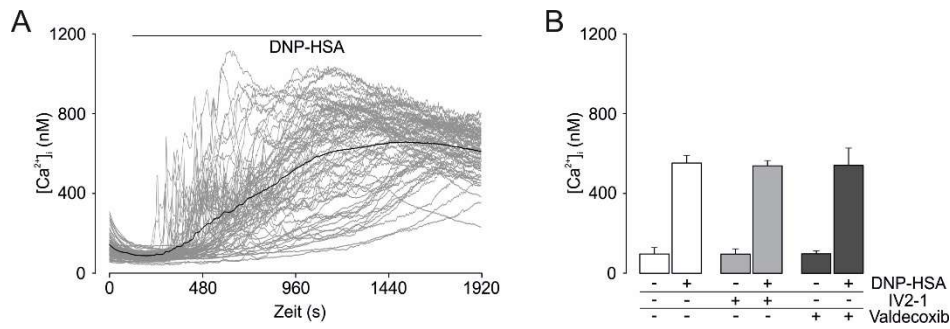
##### 4.4.1 TRPV2-vermittelte Mediatorfreisetzung in basophilen RBL-2H3-Zellen

Da basophile RBL-2H3-Zellen die Fähigkeit zur Degranulation besitzen, können sie als Modell für Mastzellen zur Untersuchung von allergischen Reaktionen eingesetzt werden [193]. Zudem exprimieren RBL-2H3-Zellen endogen TRPV2 [168]. In kalibrierten Einzelzell- $\text{Ca}^{2+}$ -Analysen Fura-2-beladener RBL-2H3-Zellen führte die Zugabe von 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  Probenecid demnach zu einem signifikanten TRPV2-vermittelten Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , welcher durch Applikation von 25  $\mu\text{M}$  IV2-1 komplett inhibiert werden konnte (Abb. 4.24 A, B). Außerdem wurden mögliche zytotoxische Effekte von CBD/Probenecid, IV2-1 oder Valdecoxib auf RBL-2H3-Zellen untersucht. Dafür wurde die metabolische Aktivität und Proliferation der Zellen nach 24-stündiger Applikation der Substanzen in MTT-Tests untersucht. Es konnten keine zytotoxischen Effekte von bis zu 50  $\mu\text{M}$  Valdecoxib oder 100  $\mu\text{M}$  IV2-1 mit und ohne Applikation von 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  Probenecid beobachtet werden (Abb. 4.24 C). Bei konstanter Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  Probenecid wies CBD bis 6,25  $\mu\text{M}$  keine zytotoxischen Effekte in RBL-2H3-Zellen auf. Erst ab einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  induzierte CBD geringe konzentrationsabhängige zytotoxische Effekte. Da  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom einen wesentlichen Anteil der IgE-Signalkaskade im Rahmen der Mastzelldegranulation ausmacht, sollte mittels Analyse der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  einzelner Fura-2-beladener RBL-2H3-Zellen der Einfluss von TRPV2-Inhibition auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während der IgE-vermittelten Degranulation untersucht werden.



**Abb. 4.24: IV2-1 inhibiert den CBD/PRO-induzierten Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in RBL-2H3-Zellen.**

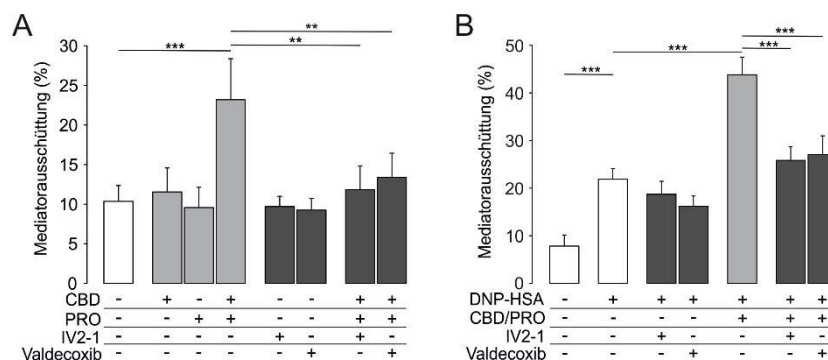
(A, B) Einzelzell- $\text{Ca}^{2+}$ -Analysen Fura-2-beladener RBL-2H3-Zellen bei Zugabe von 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  PRO und 25  $\mu\text{M}$  IV2-1. Abgebildet sind Beispielmessungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  im Zeitverlauf (A) sowie die statistische Auswertung der MW + SD von  $n = 5$  unabhängigen Messungen (B). (C) Einfluss von CBD/PRO, Valdecoxib oder IV2-1 auf die metabolische Aktivität und Proliferation von RBL-2H3-Zellen nach 24 Stunden, dargestellt als Zellviabilität mit Hilfe von MTT-Tests. Abgebildet sind die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von CBD bei konstanter Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  PRO sowie von IV2-1 oder Valdecoxib mit und ohne 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  PRO normiert auf unbehandelte Kontrollzellen als MW  $\pm$  SD von  $n = 5$  unabhängigen Messungen.



**Abb. 4.25: TRPV2 hat keinen Einfluss auf den IgE-vermittelten Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in RBL-2H3-Zellen.**

(A, B) Analyse der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> einzelner 200 ng/ml anti-DNP-IgE-inkubierter und Fura-2-beladener RBL-2H3-Zellen bei Zugabe von 400 ng/ml DNP-HSA mit oder ohne vorheriger Applikation von 25 µM IV2-1 oder 25 µM Valdecoxib. Dargestellt sind beispielhafte Messungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ohne IV2-1 oder Valdecoxib in Abhängigkeit von der Zeit (A) sowie die statistische Auswertung der entsprechenden MW + SD von jeweils n = 5 unabhängigen Messungen (B).

Nach Inkubation der RBL-2H3-Zellen mit 200 ng/ml anti-DNP-IgE induzierte die Zugabe von 400 ng/ml DNP-HSA einen deutlichen Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, welcher durch vorherige Applikation von 25 µM IV2-1 oder 25 µM Valdecoxib nicht inhibiert wurde (Abb. 4.25 A, B). Dementsprechend scheint TRPV2 nicht in die IgE-vermittelte Signalkaskade zur Ausschüttung von Mediatoren involviert zu sein. Um als nächstes den Einfluss eines TRPV2-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms auf die Freisetzung von allergischen und inflammatorischen Mediatoren zu untersuchen, wurde die TRPV2-Aktivität akut moduliert und gleichzeitig die Ausschüttung von β-Hexosaminidase aus RBL-2H3-Zellen gemessen (Abb. 4.26 A). Während die alleinige Applikation von 6,25 µM CBD oder 500 µM Probenecid im Vergleich zu unbehandelten BMMC keine erhöhte Mediatorausschüttung ergab, konnte nach TRPV2-Aktivierung mit 6,25 µM CBD/500 µM Probenecid die Ausschüttung von β-Hexosaminidase signifikant erhöht werden, was durch zusätzliche Applikation von 25 µM der TRPV2-Inhibitoren IV2-1 oder Valdecoxib inhibiert wurde. Zur Untersuchung dieses Effekts im physiologischen Kontext sollte der Versuch bei gleichzeitiger Stimulation der IgE-Signalkaskade wiederholt werden. Dafür wurden RBL-2H3-Zellen mit 200 ng/ml anti-DNP-IgE inkubiert und anschließend mit 400 ng/ml DNP-HSA, 6,25 µM CBD/500 µM Probenecid, 25 µM IV2-1 oder 25 µM Valdecoxib stimuliert (Abb. 4.26 B). Diese Messungen ergaben, dass DNP-HSA die Freisetzung von β-Hexosaminidase in einem ähnlichen Ausmaß erhöhte wie zuvor CBD/Probenecid.



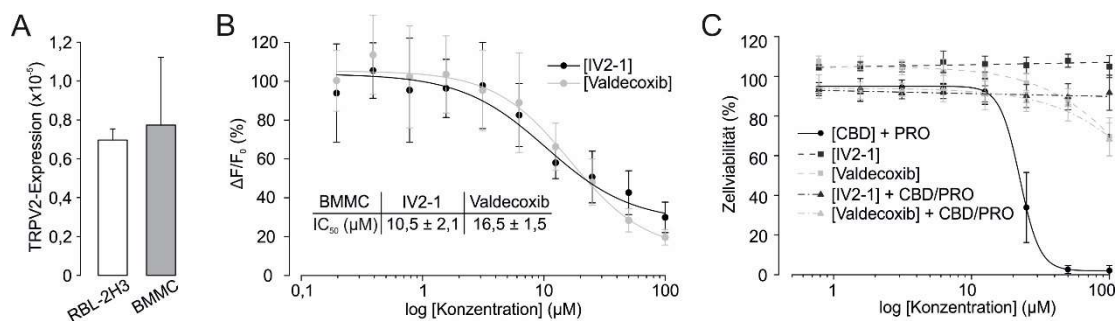
**Abb. 4.26: TRPV2-Aktivität steigert die Freisetzung von β-Hexosaminidase aus RBL-2H3-Zellen.**

(A, B) Statistische Auswertung des Einflusses von 400 ng/ml DNP-HSA, 6,25 µM CBD, 500 µM PRO, 25 µM Valdecoxib oder 25 µM IV2-1 auf die Freisetzung des Mediators β-Hexosaminidase aus RBL-2H3-Zellen (A) bzw. 200 ng/ml anti-DNP-IgE-inkubierten RBL-2H3-Zellen (B). Dargestellt ist die Ausschüttung des gespeicherten Mediators in % als MW + SD von n = 5 unabhängigen Messungen.

Eine Kombination von DNP-HSA und CBD/Probenecid führte zu einer kumulativ gesteigerten Ausschüttung des Mediators, wobei die zusätzliche Applikation von IV2-1 oder Valdecoxib den TRPV2-induzierten Effekt inhibieren konnte. Diese Ergebnisse implizieren, dass TRPV2-Aktivität die Mediatorausschüttung aus RBL-2H3-Zellen unabhängig von der IgE-Signalkaskade steigern kann.

#### 4.4.2 Einfluss von TRPV2 auf die Degranulation von Mastzellen

Diese gewonnenen Erkenntnisse sollten nun auf primäre Mastzellen übertragen werden. Dafür wurden Mastzellen aus dem Knochenmark von Mäusen (BMMC) mit Hilfe von IL-3 differenziert (Abschnitt 3.2.2) [178]. Zunächst wurde die endogene Expression von TRPV2-mRNA in BMMC mittels RT-qPCR untersucht und mit der von RBL-2H3-Zellen verglichen. Beide Zelltypen exprimierten TRPV2-mRNA in ähnlichem Umfang (Abb. 4.27 A). Mittels Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von IV2-1 oder Valdecoxib in Fluo-4-beladenen BMMC wurde nach Aktivierung mit 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  Probenecid die Inhibition von TRPV2 und damit die funktionelle Expression fluorometrisch bestätigt (Abb. 4.27 B). Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte von IV2-1 (10,5  $\mu\text{M}$ ) und Valdecoxib (16,5  $\mu\text{M}$ ) für die mTRPV2-Inhibition in BMMC stimmten mit den bisherigen Werten überein. Zur Untersuchung zytotoxischer Effekte der Modulatoren auf BMMC wurden wie zuvor MTT-Tests durchgeführt. Es konnten bis zu 12,5  $\mu\text{M}$  CBD mit 500  $\mu\text{M}$  Probenecid bzw. bis zu 25  $\mu\text{M}$  Valdecoxib oder 100  $\mu\text{M}$  IV2-1 mit 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  Probenecid genutzt werden, ohne zytotoxische Effekte zu induzieren (Abb. 4.27 C).

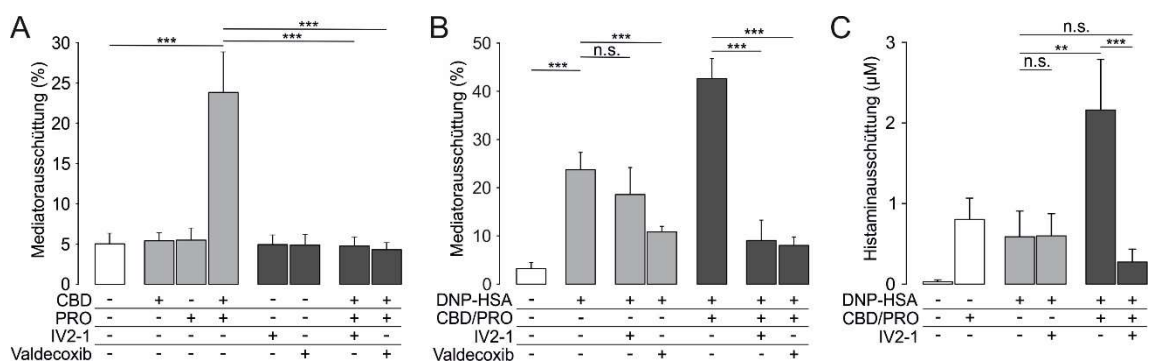


**Abb. 4.27: IV2-1 und Valdecoxib blockieren den CBD/PRO-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom.**

(A) Statistische Auswertung der Expression von TRPV2-mRNA in RBL-2H3-Zellen und BMMC. Dargestellt sind die MW + SD von n = 5 unabhängigen RT-qPCR-Messungen. (B) Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von IV2-1 und Valdecoxib in Fluo-4-beladenen BMMC-Zellsuspensionen nach Stimulation mit 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  PRO. Abgebildet sind die MW  $\pm$  SD von n = 5 unabhängigen Messungen (0 entspricht der Basalfluoreszenz) und die  $\text{IC}_{50}$ -Werte. (C) Einfluss von CBD/PRO, Valdecoxib oder IV2-1 auf die metabolische Aktivität und Proliferation von BMMC nach 24 Stunden, ermittelt als Zellviabilität mit Hilfe von MTT-Tests. Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von CBD mit 500  $\mu\text{M}$  PRO sowie von IV2-1 oder Valdecoxib mit und ohne 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  PRO normiert auf unbehandelte BMMC als MW  $\pm$  SD von n = 5 unabhängigen Messungen.

Analog zu den Experimenten mit den RBL-2H3-Zellen wurde der Einfluss von einer TRPV2-Aktivität auf die Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase aus BMMC untersucht (Abb. 4.28 A). Die alleinige Stimulation von BMMC mit 6,25  $\mu\text{M}$  CBD oder 500  $\mu\text{M}$  Probenecid zeigte auch hier keine gesteigerte Mediatorausschüttung, was sowohl den superadditiven Effekt der Kombination unterstreicht als auch das Auftreten substanzspezifischer *off-target*-Effekte

ausschließt. Die Koapplikation von 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  Probenecid verursachte hingegen eine signifikant erhöhte Ausschüttung des Mediators, welche durch zusätzliche Anwendung von 25  $\mu\text{M}$  IV2-1 oder 25  $\mu\text{M}$  Valdecoxib inhibiert werden konnte. Ebenso wurde die akute Modulation der TRPV2-Aktivität im Kontext der IgE-Signalkaskade in BMMC analysiert. Dafür wurden BMMC mit 200 ng/ml anti-DNP-IgE inkubiert und anschließend mit 100 ng/ml DNP-HSA, 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  Probenecid, 25  $\mu\text{M}$  IV2-1 oder 25  $\mu\text{M}$  Valdecoxib behandelt (Abb. 4.28 B). Während die Anwesenheit von DNP-HSA die Ausschüttung des Mediators in einem vergleichbaren Ausmaß wie CBD/Probenecid steigerte, induzierte eine Koapplikation von DNP-HSA und CBD/Probenecid eine kumulativ gesteigerte Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase. Die TRPV2-vermittelte Mediatorausschüttung durch CBD/Probenecid konnte durch Applikation von IV2-1 oder Valdecoxib inhibiert werden. Obwohl IV2-1 wie erwartet keinen inhibierenden Effekt auf die IgE-vermittelten Ausschüttung ausübte, scheint Valdecoxib in BMMC einen unspezifischen Effekt zu verursachen. Als einer der wichtigsten allergischen Mediatoren sollte der Effekt der TRPV2-Aktivität zusätzlich auf die Ausschüttung von Histamin aus BMMC ermittelt werden. Nach der Inkubation mit 200 ng/ml anti-DNP-IgE wurden die BMMC mit 100 ng/ml DNP-HSA oder 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  Probenecid in An- und Abwesenheit von 25  $\mu\text{M}$  IV2-1 stimuliert. Die ausgeschüttete Menge an Histamin konnte mit Hilfe eines Histamin-ELISA quantifiziert werden (Abb. 4.28 C). Die Applikation von CBD/Probenecid sorgte für eine vergleichbare Ausschüttung von Histamin wie DNP-HSA, wobei die Kombination beider Stimuli eine kumulativ gesteigerte Mediatorausschüttung verursachte. Der TRPV2-vermittelte Effekt von CBD/Probenecid konnte durch zusätzliche Anwendung von IV2-1 inhibiert werden, wobei der TRPV2-Inhibitor das IgE-induzierte Signal nicht beeinflusste. Im Kontext der Mastzelledegranulation scheint die Aktivierung von TRPV2 also die Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase oder Histamin aus BMMC unabhängig von der IgE-vermittelten Signalkaskade zu induzieren bzw. zu steigern.



**Abb. 4.28: TRPV2-Aktivität induziert die Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase und Histamin aus BMMC.** (A, B) Statistische Auswertung des Einflusses von 100 ng/ml DNP-HSA, 6,25  $\mu\text{M}$  CBD, 500  $\mu\text{M}$  PRO, 25  $\mu\text{M}$  Valdecoxib oder 25  $\mu\text{M}$  IV2-1 auf die Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase aus BMMC (A) bzw. 200 ng/ml anti-DNP-IgE-inkubierte BMMC (B). Dargestellt ist die Ausschüttung des gespeicherten Mediators in % als MW + SD von n = 6 (A) bzw. n = 5 (B) unabhängigen Messungen. (C) Statistische Auswertung des Einflusses von 100 ng/ml DNP-HSA, 6,25  $\mu\text{M}$  CBD/500  $\mu\text{M}$  PRO oder 25  $\mu\text{M}$  IV2-1 auf die Histaminausschüttung aus 200 ng/ml anti-DNP-IgE-inkubierten BMMC. Dargestellt ist die Histaminausschüttung aus 50.000 BMMC in 100  $\mu\text{l}$  Puffer als MW + SD von n = 5 unabhängigen Messungen mittels Histamin-ELISA.

## 5. Diskussion

### 5.1 Der synergistische Effekt von 2-APB bzw. CBD und Probenecid auf TRPV2

Über die physiologische bzw. pathophysiologische Funktion von TRPV2 ist bisher wenig bekannt. Aufgrund fehlender spezifischer Modulatoren für TRPV2 werden häufig unspezifisch wirksame Aktivatoren wie 2-APB, Probenecid, CBD oder THC genutzt [144,152,155]. Um jedoch TRPV2 damit aktivieren zu können, müssen aufgrund geringer Potenzen sehr hohe Konzentrationen dieser Substanzen eingesetzt werden, was zu unspezifischen Wirkungen führt und das Risiko zytotoxischer Effekte deutlich erhöht. Neben einer Modulation der Cannabinoid-Rezeptoren 1 und 2 aktiviert THC zusätzlich TRPA1 und CBD TRPV1 [154,155]. Während Probenecid organische Anionentransporter, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulators* oder schwellungsaktivierte Anionenkanäle blockiert [194,195], inhibiert 2-APB speicherabhängige Kanäle, Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren und SERCA-Pumpen [148]. Außerdem blockiert 2-APB die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus Mitochondrien und induziert das unspezifische Ausströmen von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern [148,196]. Im Kontext der TRP-Ionenkanäle aktiviert 2-APB TRPV1 sowie TRPV3 und blockiert sowohl TRPM2 als auch einige Kanäle der TRPC Unterfamilie [144,197]. Aus diesem Grund kann TRPV2 zwar in Überexpressionsmodellen mit diesen Modulatoren für kurze Zeit akut aktiviert werden, aber in primären Zellen oder länger andauernden Untersuchungen aufgrund der unspezifischen Effekte und Zytotoxizität nicht ohne weiteres moduliert werden. Nachdem bereits ein potenzierender Effekt von Protonen auf die 2-APB-induzierte Aktivierung von TRPV2 entdeckt wurde [198], gelang unserer Arbeitsgruppe kürzlich mit der Entdeckung eines superadditiven Effekts auf die TRPV2-Aktivität bei simultaner Applikation von 2-APB und Probenecid ein Fortschritt [153]. Diese potenzierende Wirkung ermöglichte nun die Reduktion der Konzentrationen auf bis zu ein Zehntel beider Substanzen bei robuster Aktivierung von TRPV2 in HEK<sub>TRPV2</sub>-Zellen oder primären BMDM. So konnte mit der simultanen Anwendung von 30-50  $\mu\text{M}$  2-APB und 500  $\mu\text{M}$  Probenecid die pharmakologische Untersuchung einer akuten Modulation von TRPV2 in primären Zellen ermöglicht und gleichzeitig das Risiko zytotoxischer Effekte auch in länger andauernden Experimenten minimiert werden.

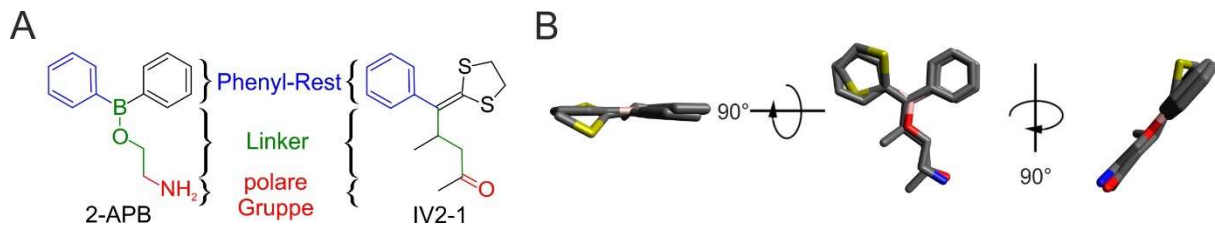
Allerdings zeigt 2-APB eine speziesabhängige Wirkung auf TRPV2, wodurch bisher huTRPV2 nicht durch 2-APB oder 2-APB/Probenecid, sondern lediglich durch hohe Konzentration von Cannabinoiden wie THC oder CBD aktiviert werden konnte [151,155]. Diese können jedoch deutliche unspezifische Effekte verursachen. Als Ergebnis konnten bspw. für CBD bereits ab einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  über 24 Stunden zytotoxische Effekte beobachtet werden, was gerade einmal dem Bereich des  $\text{EC}_{50}$ -Werts für die Aktivierung von rTRPV2 und huTRPV2 entspräche (Abb. 4.18). Folglich bedarf es neuer speziesunabhängiger Möglichkeiten zur

akuten TRPV2-Aktivierung. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun ein potenzierender Effekt der Kombination von CBD und Probenecid mit superadditiver Wirkung auf die Aktivierung von rTRPV2 und hTRPV2 identifiziert werden. Dieser superadditive Effekt ermöglichte eine robuste TRPV2-Aktivierung durch moderate Konzentrationen von 6,25-12,5  $\mu\text{M}$  CBD und 500  $\mu\text{M}$  Probenecid, die innerhalb von 24 Stunden keine zytotoxischen Effekte verursachte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der neuartige TRPV2-Inhibitor IV2-1 eine CBD/Probenecid-induzierte TRPV2-Aktivität unabhängig von der Spezies blockiert. Dadurch kann die Aktivität von TRPV2 moduliert und TRPV2-vermittelte Effekte identifiziert werden. Als zusätzlicher strukturell unterschiedlicher Blocker inhibierte auch Valdecoxib die CBD/Probenecid-induzierte Aktivität von mTRPV2 und rTRPV2, wohingegen huTRPV2 nach Aktivierung durch CBD/Probenecid nur partial blockiert wurde. Diese Ergebnisse deuten an, dass es speziesabhängige Unterschiede in der Aminosäuresequenz des bindenden Bereichs für Valdecoxib zu geben scheint. Insgesamt konnte das Set an TRPV2-Modulatoren mit der Kombination von CBD/Probenecid um eine speziesunabhängige nicht zytotoxische TRPV2-Aktivierungsmöglichkeit erweitert werden, welche durch IV2-1 inhibiert werden kann.

## **5.2 Der neue TRPV2 Blocker IV2-1**

Häufig verwendete TRPV2-Inhibitoren wie Ruthenium Rot, Tranilast oder SKF96365 zeigen neben einer Inhibition von TRPV2 ebenfalls unspezifische Effekte auf andere Ionenkanäle und weisen eine unspezifische Zytotoxizität auf [146,156,159]. Vor kurzem konnte unsere Arbeitsgruppe den COX-2-Inhibitor Valdecoxib als neuen Inhibitor von rTRPV2-Kanälen charakterisieren, welcher innerhalb der TRPV-Unterfamilie eine Selektivität für rTRPV2 aufweist [153]. Allerdings zeigen COX-2-Inhibitoren wie Valdecoxib neben der Inhibition von COX-2 weitere Effekte auf diverse andere Ionenkanäle [188,189]. Dementsprechend eignet sich Valdecoxib lediglich als unterstützendes pharmakologisches Werkzeug zur Erforschung der physiologischen Funktion von TRPV2 in Immunzellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir das Dithiolan IV2-1 als neuen TRPV2-Inhibitor identifizieren und mit Hilfe verschiedener fluorometrischer und elektrophysiologischer Messungen validieren. Während IV2-1 die Aktivität von TRPV2-Kanäle komplett inhibiert, ohne dabei zytotoxische Effekte zu induzieren, wurde keine Wirkung auf TRPV1-, TRPV3-, TRPV4- oder TRPM3-Kanäle beobachtet. Der fluorometrisch ermittelte  $\text{IC}_{50}$ -Wert für die TRPV2-Inhibition lag im einstelligen mikromolaren Bereich ( $6,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ) und unterschied sich damit deutlich vom elektrophysiologisch gemessenen Wert ( $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ). Diese Diskrepanz könnte sich durch maßgebliche Veränderungen auf zellulärer Ebene in Patch-Clamp-Experimenten erklären: So könnten mechanischer Stress, Änderungen innerhalb der Zusammensetzung der Zellmembran oder die stark gepufferte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  einen direkten Einfluss auf die Aktivität oder Sensitivität von TRPV2 haben. Strukturchemisch weist IV2-1 deutliche Unterschiede im Vergleich mit anderen TRPV2-Inhibitoren wie z.B. Valdecoxib auf. Allerdings besteht eine strukturelle Ähnlichkeit mit 2-APB

(Abb. 5.1). Beide Moleküle besitzen, im Kern eine 4-atomige räumlich ähnliche Linker-Struktur sowie endständig einen aromatischen Phenylrest und eine polare funktionelle Gruppe. Als Schlüsselemente der Bindung an TRPV2 könnten die endständigen polaren Gruppen als Protonen-Akzeptoren Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und der Phenylrest ein Teil von  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen sein. Im Gegensatz dazu könnten die beiden zusätzlichen hydrophoben Methylgruppen an der Linker-Struktur von IV2-1 und der Dithiolan-Ring anstatt eines weiteren planaren Phenylrests bei 2-APB den Unterschied zwischen Aktivierung oder Inhibition von TRPV2 ausmachen.



**Abb. 5.1: Strukturelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede von 2-APB und IV2-1.**

(A) Darstellung der chemischen Strukturen von 2-APB und IV2-1 mit farbiger Unterlegung der Gemeinsamkeiten des endständigen Phenylrests (blau), der Linker-Struktur (grün) und der endständigen polaren Gruppe (rot). (B) Direkter Vergleich der räumlichen Darstellung von 2-APB und IV2-1 in drei verschiedenen Ansichten (C in grau, N in blau, O in rot, B in hellrot, S in gelb).

Die zwei aktiven Derivate von IV2-1 (IV2-2, IV2-3) sowie die zahlreichen inaktiven Derivate des Screenings ermöglichen zusätzlich erste Aussagen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung (Abb. 4.2). Diese untermauern die Notwendigkeit des Dithiolan-Rings und der richtigen Länge der Linker-Struktur. Außerdem wird die Wichtigkeit der räumlichen Ausrichtung des Ketons und des Ausmaßes der hydrophoben Seitenkette an Position 4 verdeutlicht. Abschließend lässt sich beurteilen, dass nach der Aktivierung von TRPV2 mit der superadditiven Kombination aus 2-APB und Probenecid die Inhibition mit den zwei strukturell unterschiedlichen Blockern IV2-1 und Valdecoxib die akute Modulation von TRPV2 in primären Immunzellen bei gleichzeitiger Reduzierung des Risikos von unspezifischen *off-target*-Effekten ermöglicht. Somit stellt IV2-1 einen vielversprechenden Inhibitor für weitere *in vitro*- oder *in vivo*-Untersuchungen der physiologischen Funktion von TRPV2 dar.

### 5.3 TRPV2 in Makrophagen

Wie bereits publiziert wurde, zeigen Makrophagen eine hohe TRPV2-Expression [45,191]. In der RAW264-Makrophagenzelllinie kommt TRPV2 sogar als einziger Vertreter der TRPV-Unterfamilie vor [169]. Hinsichtlich der physiologischen Funktion wird eine Beteiligung von TRPV2 in der Migration, der Partikelbindung und der Phagozytose diskutiert [191,199]. Da bakterielle Infektion von TRPV2-defizienten Mäusen in einer reduzierten bakteriellen Eliminierung und einer gesteigerter Sterblichkeit resultierten, könnte die Rekrutierung von TRPV2 zu naszierenden Phagosomen gefolgt von Cluster-Bildung von Fc $\gamma$ -Rezeptoren und Depolarisation der Membran Bestandteil der Partikelbindung und Phagozytose sein [45]. Im Kontext der Mukoviszidose weisen humane Makrophagen nicht nur eine deutlich schlechtere



Phagozytoseaktivität, sondern auch eine geringere TRPV2-Expression als gesunde Makrophagen auf [200], was auf einen direkten Zusammenhang zwischen der TRPV2-Aktivität und der Phagozytose in Makrophagen hinweist [201]. Allerdings beruhen die meisten dieser Ergebnisse auf TRPV2-defizienten Mäusen bzw. Zellen oder einem siRNA-vermittelten *knockdown* von TRPV2, was Risiken genetischer Kompensationsmechanismen birgt. Die Verwendung von spezifischen pharmakologischen Aktivatoren und Inhibitoren würde nicht nur die Validierung dieser Ergebnisse durch eine akute Kanalmodulation erlauben, sondern ebenso eine Übertragung auf weitere Spezies ermöglichen. Mit Hilfe der von uns identifizierten TRPV2-Modulatoren konnten wir zunächst die funktionelle Expression von TRPV2 in primären Makrophagen der Maus durch spezifische Modulation mittels 2-APB oder 2-APB/Probenecid und IV2-1 sowie durch siRNA-vermittelten knockdown von TRPV2 bestätigen. Außerdem konnte die physiologische Involvierung von TRPV2 in die Phagozytose von *S. aureus*- und Zymosan-Biopartikeln durch BMDM mittels akuter Inhibition des Kanals verdeutlicht werden. Da sowohl Zymosan als auch pathogene Strukturen von *S. aureus* durch bspw. TLR2 erkannt werden [202,203], könnte TRPV2 durch Bestandteile der TLR-Signalkaskade aktiviert werden. Zum anderen gibt es erste Evidenz, dass TRPV2 eine basale Kanalaktivität aufweist [45,200], welche ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Phagozytose einnehmen könnte. Fortlaufend könnte ein TRPV2-vermittelter Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  die Aktin-Polymerisation beeinflussen, was für die Phagozytose essentielle Änderungen innerhalb des Zytoskelettes zur Folge hätte. Gleichzeitig könnte eine veränderte Dynamik der Aktin-Polymerisation auch einen Effekt auf die Motilität und Migration von Makrophagen haben [45,191,199]. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Aktivierung von TRPV2 durch 2-APB/Probenecid die Migration von BMDM entlang eines LPS-Gradienten beschleunigt, während die TRPV2-Inhibition zu einer verminderten Anzahl chemotaktisch migrierter BMDM führte. Dies unterstreicht eine physiologische Involvierung von TRPV2 in die Migration von Makrophagen. Zudem könnte die verminderte Migration nach TRPV2-Inhibition auf eine LPS- oder TLR-Signalkaskade-induzierte TRPV2-Aktivität hinweisen oder die Relevanz einer basalen Kanalaktivität verdeutlichen.

Für zielgerichtete Prozesse wie Phagozytose und Migration ist nicht nur eine Aktivität von TRPV2 per se relevant, sondern auch die entsprechende Lokalisierung des Ionenkanals [200]. Insbesondere Makrophagen durchlaufen nach Stimulation durch bspw. LPS oder Zymosan einen strukturierten Wandel der Membranordnung zur Vorbereitung auf Phagozytose oder Migration [204]. In diesem Zusammenhang könnte TRPV2 in Sterol- und Sphingolipid-angereicherten Mikrodomänen der Zellmembran organisiert vorkommen, was eine basale TRPV2-Aktivität durch bspw. erhöhte Oberflächenexpression oder räumliche Nähe zu phosphorylierenden bzw. regulierenden Strukturen direkt beeinflussen würde [205–207]. Unabhängig davon könnten einzelne oder wenige TRPV2-Kanäle  $Ca^{2+}$ -Mikrodomänen

ausbilden und sowohl stark fluktuierende als auch lokal begrenzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale induzieren [192,208], welche zielgerichtete Prozesse einleiten oder regulieren könnten. Solche subplasmalemmalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen können mittels Verwendung von TIRFM und einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator mit niedriger Affinität lokalisiert werden [209]. Tatsächlich konnten vorrangig an für Phagozytose und Migration strategisch wichtigen Randregionen von BMDM hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale einzelner oder weniger TRPV2-Ionenkanäle als Teil von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen räumlich-zeitlich aufgelöst werden. In der chemotaktisch induzierten Migration könnten solche lokal begrenzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluktuationen die Dynamik der Aktin-Polymerisation durch veränderte Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Kinase zielgerichtet statt global beeinflussen [192,210]. Hingegen könnte eine TRPV2-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung der Proteinkinase C eine Phosphorylierung verschiedener Zielstrukturen fördern, was sowohl auf die Phagozytose als auch auf die Migration von Makrophagen einen Einfluss hätte [210]. Eine weitere Möglichkeit innerhalb von Lipid-Mikrodomänen wäre, dass ein lokaler Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kolokalisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kalium-Kanäle mit großer Leitfähigkeit (BK) aktivieren und über eine weiterführende Stimulation von Protonenkanälen ( $\text{H}_v1$ ) den oxidativen Burst als Bestandteil der Phagozytose beeinflussen könnte [211,212]. Unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C und einer extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 1,8 mM konnten wir zudem die spontane Ausbildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen beobachten, deren Anzahl durch Inhibition von TRPV2 signifikant reduziert wurde. Eine Basalaktivität von TRPV2-generierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen in Makrophagen könnte sowohl die Phagozytose als auch Migration beeinflussen, was die zuvor beobachteten Effekte einer akuten TRPV2-Inhibition auf beide Prozesse erklärt. Somit konnte gezeigt werden, dass TRPV2 in Makrophagen basal aktive  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen generieren kann.

#### **5.4 TRPV2 in Mastzellen**

Aufgrund der hohen Expression in Makrophagen und Mastzellen könnte TRPV2 eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie von allergischen Reaktionen, Asthma bronchiale oder COPD einnehmen [77,191]. Während bereits Evidenz für eine Beteiligung von TRPV2 bei der Abwehr von Pathogenen oder bei der Ausschüttung von Mediatoren erbracht werden konnte [45,169], zeigten Masubuchi et al. kürzlich in einem Mausmodell, dass die verminderte Expression von TRPV2 in alveolaren Makrophagen eine verschlechterte Phagozytoseaktivität und folglich COPD verursachen kann [213]. Diese Resultate werden durch bisherige Publikationen sowie die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu Makrophagen und der Involvierung von TRPV2 in die Phagozytose, Partikelbindung und Migration bestätigt [45,140,200]. In Mastzellen können immunologische Signalkaskaden aber auch sekretagoge oder physikalische Stimuli die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Ausschüttung von Mediatoren induzieren und somit allergische sowie inflammatorische Reaktionen verursachen [214]. Weiterhin wurde durch Tanaka et al. diskutiert, dass ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auch eine Transglutaminase-

vermittelte Histaminierung von G-Proteinen sowie eine Reifung der Granula verursachen kann [215], was mit einer gesteigerten Ausschüttung von Mediatoren verbunden sein könnte. Dementsprechend könnte auch ein TRPV2-vermittelter Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ähnliche Effekte verursachen und die Mediatorausschüttung steigern. Neben Leukotrienen, Prostaglandinen und vor allem Histamin ist die  $\beta$ -Hexosaminidase einer der wichtigsten Mediatoren, welcher bei der Degranulation von Mastzellen ausgeschüttet wird [216]. In diesem Kontext konnten wir die funktionelle TRPV2-Expression in basophilen RBL-2H3-Zellen und primären BMMC bestätigen, sowie einen direkten Zusammenhang zwischen TRPV2-Aktivität und der Ausschüttung von  $\beta$ -Hexosaminidase aus RBL-2H3-Zellen und BMMC demonstrieren. Folglich scheint eine TRPV2-Aktivierung die Degranulation von Mastzellen zu induzieren. Jedoch konnte die physiologische IgE-vermittelte Mastzelldegranulation zur Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase nicht durch Inhibition von TRPV2 beeinflusst werden, was die Involvierung von TRPV2 in die IgE-Signalkaskade sowie die mechanistische Beteiligung einer basalen TRPV2-Aktivität auszuschließen scheint. Die simultane Aktivierung der IgE-Signalkaskade und der TRPV2-Aktivität führte zu einer zusätzlich gesteigerten Degranulation, die auf unabhängigen Mechanismen zu beruhen scheint. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten Huang et al. nachweisen, dass eine mechanische Stimulation von TRPV2 in Mastzellen die Histaminausschüttung signifikant erhöhte [217]. Infolgedessen wurde der Effekt einer akuten TRPV2-Modulation auf die Freisetzung von Histamin als einen enorm wichtigen Mediator innerhalb von allergischen und inflammatorischen Reaktionen untersucht [218]. Die Aktivierung von TRPV2 steigerte die Ausschüttung von Histamin ähnlich wie die IgE-Signalkaskade, wobei die Kombination beider Stimuli einen kumulativen Effekt verursachte. Somit konnte gezeigt werden, dass die akute Modulation der TRPV2-Aktivität in Mastzellen die Mediatorausschüttung unabhängig von der klassischen IgE-Signalkaskade beeinflusst. Ähnlich wie der G-Protein-gekoppelte Rezeptor MRGPRX2, welcher in Mastzellen ebenfalls einen IgE-unabhängigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  verursacht und die Mediatorausschüttung steigert [219,220], könnte eine Aktivierung, Sensitivierung oder Deregulierung von TRPV2 die Pathogenese inflammatorischer, pseudoallergischer oder allergischer Erkrankungen fördern.

## **5.5 Ausblick**

### **5.5.1 Pharmakologische Modulation von TRPV2**

Nachdem der superadditive Effekt der simultanen Applikation von 2-APB und Probenecid auf die TRPV2-Aktivität identifiziert wurde [153], konnte innerhalb dieser Arbeit eine weitere Kombinationsmöglichkeit etabliert, der superadditive Effekt weiter charakterisiert sowie TRPV2 damit in physiologischen Untersuchungen primärer Makrophagen und Mastzellen ohne zytotoxische Effekte moduliert werden. Im nächsten Schritt könnte eine mögliche Steigerung dieses Effektes durch Kombination der drei bekannten TRPV2-Aktivatoren untersucht werden. Dieser Cocktail aus 2-APB, CBD und Probenecid könnte die Potenz zur

Aktivierung von TRPV2 weiter steigern und somit sowohl die benötigten Konzentrationen der Substanzen als auch die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Effekte weiter reduzieren. Nichtsdestotrotz sollten weitere Substanzbibliotheken auf potente und spezifische TRPV2-Aktivatoren untersucht werden.

Die Identifizierung und Etablierung des neuen TRPV2-spezifischen Inhibitors IV2-1 ermöglicht nicht nur die akute pharmakologische Modulation der TRPV2-Aktivität unabhängig von der Spezies, sondern auch eine eindeutige Isolierung von TRPV2-Signalen innerhalb der TRPV-Unterfamilie. Damit stellt IV2-1 bereits zum jetzigen Zeitpunkt ein wertvolles Tool zur Untersuchung der physiologischen Funktion von TRPV2 dar. Als nächstes könnten die ermittelten Daten der Struktur-Wirkungs-Beziehung zur chemischen Optimierung der Leitstruktur genutzt werden. Ziel wäre zum einen die Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften wie Löslichkeit oder Stabilität. Zum anderen könnte eine verbesserte Interaktion mit der Zielstruktur die Potenz steigern und die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Effekte reduzieren. Zum Beispiel könnte man den Phenylrest von IV2-1 durch eine ebenfalls aromatische Pyridin-Struktur ersetzen, welche sterisch vergleichbar aber deutlich polarer ist und für eine bessere Löslichkeit sorgen könnte. Die endständige Ketongruppe könnte ebenfalls durch eine weniger reaktive polare funktionelle Gruppe ersetzt werden, was unter Umständen die Stabilität erhöhen und die unerwünschte Interaktion mit anderen Strukturen verringern könnte. Weiterhin müssten umfangreichere Selektivitätsuntersuchen der Wirkung von IV2-1 auf Ionenkanäle der TRP-Familie und andere bekannte Strukturen wie bspw. dem hERG-Kanal durchgeführt werden, bevor der TRPV2-Inhibitor schließlich zur Untersuchung von TRPV2 in potentiellen *in vivo*-Experimenten eingesetzt werden kann.

### **5.5.2 Die physiologische Aktivierung von TRPV2**

Die Involvierung von TRPV2 in die Prozesse der Partikelbindung, Phagozytose und Migration von Makrophagen konnte in TRPV2-defizienten Modellen ermittelt und innerhalb dieser Arbeit durch akute pharmakologische Modulation bestätigt werden [45]. Obwohl bereits Möglichkeiten zur zielgerichteten pharmakologischen Modulation gefunden werden konnten, ist der endogene Mechanismus einer Aktivierung weitestgehend ungeklärt. Nachdem erste Befunde einer möglichen basalen Aktivität von TRPV2 existieren [45,138], konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine basale Aktivität von TRPV2 in Makrophagen festgestellt werden. Dennoch muss weiter untersucht werden, inwieweit die physiologische Funktion des TRPV2-Kanals lediglich einer gewissen basalen Aktivität zu Grunde liegt oder zusätzlich endogene Möglichkeiten der Aktivierung existieren. Während verschiedene Endocannabinoide keine oder nur eine sehr geringe TRPV2-Aktivität induzieren [155,221], könnte eine räumliche Nähe zu oxidierenden Substanzen oder anderen Rezeptoren und deren Signalkaskaden TRPV2 sensitivieren oder sogar aktivieren [140,141]. In Makrophagen wäre z.B. eine Modulation der TRPV2-Aktivität durch Bestandteile der TLR-Signalkaskade denkbar, da sowohl Zymosan als

auch pathogene Strukturen von *Staphylococcus aureus* durch TLR2 erkannt werden [202,203]. Dementsprechend könnten durch die strukturierte Untersuchung der TLR2-Signalkaskade möglicherweise endogene Aktivierungsmöglichkeiten von TRPV2 identifiziert werden. Ebenso können bakterielle Strukturen wie LPS Makrophagen nicht nur stimulieren und polarisieren [222], sondern gleichzeitig an TLR4 binden und die NADPH-Oxidase-vermittelte Produktion von ROS induzieren [223,224], was eine Oxidation und Sensitivierung von TRPV2 zur Folge haben könnte [140]. Da Makrophagen vorrangig pathogene Strukturen und Organismen mit Hilfe von *pattern recognition receptors* wie z.B. TLR erkennen und anschließend phagozytieren [225], scheint eine Verbindung von TRPV2-Aktivität und der TLR-Signalkaskade insbesondere im Kontext der Phagozytose logisch. Sollten endogene Aktivierungsmöglichkeiten insbesondere im Zusammenhang mit TLR-induzierten Signalen oder ROS identifiziert werden können, würde das ergänzend zur schwachen basalen Aktivität von TRPV2 den beobachteten Effekt einer reduzierten Phagozytoseaktivität und Migration von Makrophagen nach TRPV2-Inhibition erklären. Allerdings könnten auch körperfremde Strukturen selbst als exogene TRPV2-Aktivatoren fungieren und sowohl die Partikelbindung als auch Phagozytose fördern. Wenn hingegen keine endogenen oder exogenen Möglichkeiten zur Aktivierung von TRPV2 gefunden werden könnten, würde das die basale Kanalaktivität verstärkt in den Vordergrund rücken.

### **5.5.3 TRPV2 in der Pathophysiologie Immunsystem-assoziiertes Erkrankungen**

Nachdem eine verringerte TRPV2-Aktivität in Makrophagen bereits mit Mukoviszidose und COPD in Verbindung gebracht werden konnte [200,201,213], bieten die Ergebnisse dieser Arbeit sowohl die Perspektive einer relevanten basalen Kanalaktivität als auch eines möglichen physiologischen Aktivierungsmechanismus von TRPV2 im Kontext der TLR-Signalkaskade. Darauf aufbauend könnte eine pharmakologische TRPV2-Aktivierung in Makrophagen die Phagozytose von Erregern sowie die Antigenpräsentation steigern und als Therapieansatz zur Behandlung von Infektionskrankheiten genutzt werden. Unabhängig davon könnte eine akute TRPV2-Modulation in Makrophagen die Pathogenese von Arteriosklerose oder akuten Myokardinfarkten beeinflussen [226,227]. In Mastzellen könnte hingegen eine TRPV2-vermittelte gesteigerte Freisetzung von Mediatoren wie  $\beta$ -Hexosaminidase oder Histamin in weitreichende Prozesse involviert sein. Eine vermehrte Histaminausschüttung könnte über die Bindung an H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>-Rezeptoren nicht nur pseudoallergische Reaktionen induzieren oder allergische Reaktionen verstärken, sondern auch entzündliche Prozesse initiieren und durch Freisetzung von IL-16 weitere Immunzellen wie Makrophagen und T-Zellen rekrutieren [228–230]. Somit könnte insbesondere beim allergischen Asthma eine pharmakologische Modulation der TRPV2-Aktivität einen neuen Ansatz zur Therapie liefern und müsste in entsprechenden Krankheitsmodellen *in vivo* z.B. mit Hilfe von IV2-1 weiter untersucht werden.

## 6. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat.

**Titel:** Physiologische Funktion und Modulation des TRPV2-Ionenkanals in Zellen des angeborenen Immunsystems

**eingereicht von:** Rick Paul Raudszus  
geboren am 15.07.1993 in Schwedt/Oder

**angefertigt an / in:** Universität Leipzig, Medizinische Fakultät  
Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie

**betreut von:** Prof. Dr. Michael Schaefer  
PD Dr. Kerstin Hill

Juni 2022

### 6.1 Identifizierung des neuen TRPV2-Inhibitors IV2-1

Obwohl der  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanal TRPV2 in zahlreichen Immunzellen exprimiert wird, ist wenig über seine physiologische Funktion bekannt. Bisherige Studien verließen sich größtenteils auf die Anwendung von unspezifischen Modulatoren, TRPV2-defizienten Mäusen oder siRNA-vermittelten TRPV2-*knockdown*. Weder zelluläre Kompensationsmechanismen noch unspezifische Effekte können dabei ausgeschlossen werden. Trotz der Identifizierung von Valdecoxib als TRPV2-Blocker und einer synergistischen Wirkung von Probenecid und 2-APB als TRPV2-Aktivatoren mangelt es weiterhin an spezifischen Modulatoren. Daher haben wir eine etwa 5.500 Substanzen umfassende Substanzbibliothek (Auszug des Molekülarchivs vom Karlsruher Institut für Technologie) auf niedermolekulare Modulatoren mit einer TRPV2-Aktivität untersucht. Mittels Fluoreszenz-basiertem Mediumdurchsatz-Screening und HEK293-Zellen, die stabil Ratten-TRPV2-Ionenkanäle exprimieren ( $\text{HEK}_{\text{TRPV2}}$ ), konnten 3 strukturchemisch verwandte neuartige Inhibitoren ermittelt werden (IV2-1, IV2-2, IV2-3). Selektivitätsuntersuchen mit HEK293-Zellen, die stabil Ratten-TRPV1, Ratten-TRPV2, Maus-TRPV3, Maus-TRPV4 oder Maus-TRPM3 exprimieren, zeigten, dass alle drei Substanzen eine TRPV2-Selektivität aufwiesen. Aufgrund des besseren  $\text{IC}_{50}$ -Wertes wurde

IV2-1 ( $IC_{50} = 6,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ) als Leitstruktur ausgewählt und für weitere Untersuchungen verwendet. In Fluoreszenz-basierten Einzelzell- $\text{Ca}^{2+}$ -Assays von  $\text{HEK}_{\text{TRPV2-}}$  und RBL-2H3-Zellen, welche TRPV2 endogen exprimieren, blockierte IV2-1 durch 2-APB oder 2-APB/Probenecid induzierte TRPV2-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme. In elektrophysiologischen Patch-Clamp-Messungen konnten 2-APB-verursachte Ein- und Auswärtsströme des TRPV2-Kanals in  $\text{HEK}_{\text{TRPV2-}}$  und RBL-2H3-Zellen durch IV2-1 reversibel blockiert werden. MTT-Assays zur Ermittlung zytotoxischer Effekte von IV2-1 auf HEK293-,  $\text{HEK}_{\text{TRPV2-}}$  und RBL-2H3-Zellen ergaben keine Minderung der Zellviabilität bis zu einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$ . Somit konnte IV2-1 als neuer, nicht toxischer TRPV2-Inhibitor validiert werden, welcher zukünftig für *in vitro*- sowie *in vivo*-Untersuchen von TRPV2 genutzt werden kann. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer strukturellen Optimierung von IV2-1, um die physikochemischen und pharmakologischen Eigenschaften wie Löslichkeit, Stabilität oder Potenz zu verbessern.

## 6.2 Physiologische Funktion von TRPV2 in primären Makrophagen

In Zellen des angeborenen Immunsystems wie z.B. Makrophagen könnten TRPV2-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wichtige Mechanismen wie Phagozytose und Migration beeinflussen. Um den physiologischen Einfluss von TRPV2 in primären Makrophagen zu untersuchen, wurden aus Stammzellen des Knochenmarks von Mäusen primäre Makrophagen (BMDM) differenziert. Als Bestätigung der funktionellen Expression von TRPV2-Kanälen in BMDM konnten in Fluoreszenz-basierten Einzelzell-Analysen mittels 2-APB  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme ermittelt werden, welche durch Zugabe von IV2-1 blockiert wurden. Weiterhin wurde ein siRNA-vermittelter *knockdown* von TRPV2 in BMDM etabliert. Mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) konnte sowohl die Expression von TRPV2-mRNA als auch der *knockdown* um etwa 70 Prozent in BMDM beobachtet werden. Zudem konnte mit Hilfe von MTT-Assays keine Minderung der Zellviabilität durch Valdecoxib oder IV2-1 bis zu einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  ermittelt werden. Die Kombination 2-APB/Probenecid induzierte auch in moderaten Konzentrationen einen TRPV2-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in BMDM, ohne zytotoxische Effekte zu verursachen. Die Verwendung der strukturell unterschiedlichen Inhibitoren Valdecoxib und IV2-1 bzw. der TRPV2-siRNA verringerte die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Ergebnissen durch *off-target*-Effekte.

Als nächstes sollte in BMDM der Einfluss der TRPV2-Aktivität auf die Phagozytose von Zymosan- und *Staphylococcus aureus*-Biopartikeln untersucht werden, welche mit einem pH-sensitiven Fluoreszenzindikator gekoppelt waren. Sowohl siRNA-vermittelter *knockdown* von TRPV2 als auch TRPV2-Inhibition durch IV2-1 oder Valdecoxib reduzierten die Phagozytoseaktivität der BMDM auf etwa 70 Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Diese Ergebnisse bestätigen eine Beteiligung von TRPV2 bei der Phagozytose,

wobei TRPV2-Aktivität die Partikelbindung durch Depolarisation des Membranpotenzials ebenso beeinflussen könnte wie die Bildung des frühen Phagosoms durch Veränderung der Aktin-Polymerisation. Solch eine veränderte Dynamik der Polymerisation von Aktin könnte zusätzlich die Migration von Makrophagen beeinflussen. Deshalb wurden als nächstes Transwell-Migrationsassays von BMDM in einem Gradienten aus Lipopolysacchariden (LPS) durchgeführt. Während die TRPV2-Inhibitorin mit IV2-1, Valdecoxib oder ein TRPV2-*knockdown* die LPS-induzierte Migration von BMDM signifikant verringerte, steigerte die TRPV2-Aktivierung durch 2-APB/Probenecid die Anzahl migrierter BMDM im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen signifikant. Somit konnte ebenso eine TRPV2-Beteiligung bei der Migration von Makrophagen gezeigt werden. Da Phagozytose und Migration zielgerichtete Prozesse darstellen, sollten auch die  $Ca^{2+}$ -Signale räumlich und zeitlich koordiniert auftreten. Solche lokal begrenzten, kurzen  $Ca^{2+}$ -Fluktuationen können durch  $Ca^{2+}$ -Mikrodomänen verursacht werden, welche der Aktivität einzelner oder weniger Kanäle entsprechen. Mittels TIRF-Mikroskopie und eines niederaffinen  $Ca^{2+}$ -Indikators können hohe  $Ca^{2+}$ -Fluktuationen in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran selektiv detektiert und somit potenzielle durch TRPV2 generierte  $Ca^{2+}$ -Mikrodomänen in Makrophagen untersucht werden. Nach der TRPV2-Aktivierung mit 2-APB/Probenecid konnten punktuelle, hohe  $Ca^{2+}$ -Fluktuationen in BMDM ermittelt werden, welche nach Zugabe von IV2-1 inhibiert wurden. Unter physiologischeren Bedingungen wurden zudem basal aktive  $Ca^{2+}$ -Mikrodomänen beobachtet, welche durch IV2-1 inhibiert wurden. Dementsprechend scheint TRPV2 in BMDM basal aktive  $Ca^{2+}$ -Mikrodomänen ausbilden zu können. Inwieweit diese TRPV2-generierten  $Ca^{2+}$ -Mikrodomänen tatsächlich in physiologische Prozesse von Makrophagen involviert sind, bleibt hingegen unklar. Da jedoch eine TRPV2-Inhibition die Phagozytose von Zymosan- und *S. aureus*-Biopartikeln sowie die LPS-induzierte Migration von Makrophagen verringerte, könnten sowohl basal aktive  $Ca^{2+}$ -Mikrodomänen als auch ein physiologischer Aktivierungsmechanismus von TRPV2 innerhalb der TLR-Signalkaskade relevant sein. Sollte demnach die Applikation von bspw. LPS oder Zymosan TRPV2 aktivieren, könnte die systematische Untersuchung der TLR-Signalkaskade im Zusammenhang mit der TRPV2-Aktivität einen endogenen Aktivierungsmechanismus von TRPV2 in Makrophagen aufklären. Zusätzlich müsste eine direkte Beteiligung sowie die akute Modulierbarkeit der TRPV2-Aktivität bei der Phagozytose und Migration von Makrophagen nach physiologischen Reizen bspw. in Infektionsmodellen weiter untersucht werden.

### **6.3 Superadditiver Effekt von CBD und Probenecid auf die TRPV2-Aktivität**

Bisher konnte nur die Kombination aus 2-APB und Probenecid in moderaten Konzentrationen genutzt werden, um TRPV2-Ionenkanäle ohne zytotoxische Effekte durch hohe Konzentrationen der Einzelsubstanzen zu aktivieren. Allerdings zeigt 2-APB keine Wirkung auf humane TRPV2-Kanäle, weshalb neue Möglichkeiten der TRPV2-Aktivierung essentiell sind.



Um weitere potenzierende Effekte zu untersuchen, wurde Cannabidiol (CBD) als potentester TRPV2-Aktivator aus der Gruppe der Cannabinoide in Kombination mit Probenecid untersucht. In einer zweidimensionalen Analyse von CBD- und Probenecid-Verdünnungsreihen konnte eine potenzierende Wirkung der Kombination festgestellt werden, die sowohl humane als auch Ratten-TRPV2-Kanäle superadditiv aktivierte. Mittels Fluoreszenz-basierten Einzelzell-Analysen sowie elektrophysiologischen Patch-Clamp-Messungen von HEK<sub>rTRPV2</sub>- und HEK<sub>huTRPV2</sub>-Zellen konnte dieser superadditive Effekt von CBD/Probenecid bestätigt werden. Die CBD/Probenecid-induzierte Aktivität humaner oder Ratten-TRPV2-Kanäle konnte durch IV2-1 inhibiert werden, wohingegen Valdecoxib zwar Ratten-TRPV2 blockierte, jedoch humanen TRPV2 nicht vollständig inhibieren konnte. Eine mögliche Ursache könnten Sequenzunterschiede zwischen humanen und Ratten-TRPV2 im Bindungsbereich von Valdecoxib darstellen. Im nächsten Schritt könnten alle drei Aktivatoren 2-APB, Probenecid und CBD miteinander kombiniert werden, um eine weitere Reduzierung der Konzentrationen zu erreichen. Gleichzeitig sollten weitere Screenings zur Identifizierung von neuartigen TRPV2-Aktivatoren durchgeführt werden.

#### **6.4 TRPV2 in der Physiologie von primären Mastzellen**

Mastzellen sind maßgeblich an der Freisetzung von allergischen und inflammatorischen Mediatoren beteiligt und stellen somit einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar. Während die Ausschüttung von Leukotrienen,  $\beta$ -Hexosaminidase oder Histamin größtenteils IgE-vermittelt stattfindet, können davon unabhängig auch andere Signalkaskaden, wie z.B. durch MRGPRX2-vermittelt, die Degranulation von Mastzellen induzieren. Da Mastzellen ebenfalls TRPV2-Ionenkanäle exprimieren, könnte ein TRPV2-vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom die Freisetzung von Mediatoren beeinflussen. Mit Hilfe der neuen TRPV2-Modulatoren und Fluoreszenz-basierten Einzelzell- $\text{Ca}^{2+}$ -Analysen wurde zunächst die endogene TRPV2-Expression in basophilen RBL-2H3-Zellen als alternatives Zellmodell zu Mastzellen bestätigt. Zudem konnten keine zytotoxischen Effekte bis zu Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  IV2-1 oder Valdecoxib sowie einer Kombination aus 12.5  $\mu\text{M}$  CBD und 500  $\mu\text{M}$  Probenecid festgestellt werden. In Fluoreszenz-basierten Einzelzell- $\text{Ca}^{2+}$ -Analysen konnte nach physiologischer Stimulation der  $\text{Fc}\epsilon$ -Rezeptoren ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemessen werden, der durch TRPV2-Inhibition mit IV2-1 oder Valdecoxib nicht blockiert wurde. In Untersuchungen zur Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase steigerte die Kombination CBD/Probenecid die Mediatorausschüttung hingegen deutlich. Dieser Effekt konnte durch TRPV2-Inhibition mit IV2-1 oder Valdecoxib inhibiert werden. Eine Kombination des TRPV2-vermittelten sowie des IgE-induzierten Stimulus führte zu einer additiv gesteigerten Freisetzung. Somit könnte TRPV2 unabhängig von der IgE-Signalkaskade eine wichtige physiologische Funktion bei der Degranulation von Mastzellen spielen.

Daher wurden im nächsten Schritt primäre Mastzellen aus dem Knochenmark von Mäusen differenziert (BMMC) und die mRNA- sowie funktionelle Expression von TRPV2 durch qPCR und Fluoreszenz-basierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Assays bestätigt. Die verwendeten Modulatoren induzierten auch in BMMC in gleichen Konzentrationen wie in RBL-2H3-Zellen keine zytotoxischen Effekte. Die vorherigen Ergebnisse des Einflusses der TRPV2-Aktivität auf die Ausschüttung von  $\beta$ -Hexosaminidase konnten mit BMMC ebenso bestätigt werden. Mittels ELISA wurde zuletzt ein TRPV2-vermittelter Effekt auf die Histaminfreisetzung aus BMMC untersucht. Demnach steigerte die Kombination CBD/Probenecid die Histaminausschüttung deutlich, was durch TRPV2-Inhibition mit IV2-1 blockiert werden konnte. Auch hier hatte IV2-1 keinen Effekt auf die IgE-induzierte Histaminfreisetzung. Die simultane Stimulation der  $\text{Fc}\epsilon$ -Rezeptoren und der TRPV2-Kanäle resultierte in einer additiv gesteigerten Histaminausschüttung. Folglich scheint TRPV2-Aktivität die Freisetzung von Mediatoren wie Histamin oder  $\beta$ -Hexosaminidase unabhängig von der klassischen IgE-vermittelten Signalkaskade zu beeinflussen, was TRPV2 zu einer vielversprechenden Zielstruktur zur weiteren Erforschung im pathophysiologischen Kontext von entzündlichen und allergischen Reaktionen macht. Da jedoch die Ursachen (patho-)physiologischer TRPV2-Aktivität nach wie vor ungeklärt sind, rückt zusätzlich die Aufklärung möglicher endogener oder exogener Aktivierungsmechanismen von TRPV2 in den Vordergrund.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1997) 3–25. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).
- [2] C. Walsh, Where will new antibiotics come from?, *Nat. Rev. Microbiol.* 1 (2003) 65–70. <https://doi.org/10.1038/nrmicro727>.
- [3] R.D. Firn, C.G. Jones, Natural products--a simple model to explain chemical diversity, *Nat. Prod. Rep.* 20 (2003) 382–391. <https://doi.org/10.1039/b208815k>.
- [4] D.J. Newman, G.M. Cragg, K.M. Snader, Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002, *J. Nat. Prod.* 66 (2003) 1022–1037. <https://doi.org/10.1021/np030096l>.
- [5] F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival?, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 45 (2006) 5072–5129. <https://doi.org/10.1002/anie.200600350>.
- [6] K.M. Yip, N. Fischer, E. Paknia, A. Chari, H. Stark, Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM, *Nature* 587 (2020) 157–161. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2833-4>.
- [7] N. Jones, Crystallography: Atomic secrets, *Nature* 505 (2014) 602–603. <https://doi.org/10.1038/505602a>.
- [8] S. Kortagere, M. Lill, J. Kerrigan, Role of computational methods in pharmaceutical sciences, *Methods Mol. Biol.* 929 (2012) 21–48. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-050-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-050-2_3).
- [9] R. Vanella, G. Kovacevic, V. Doffini, J. Fernández de Santaella, M.A. Nash, High-throughput screening, next generation sequencing and machine learning: advanced methods in enzyme engineering, *Chem. Commun. (Camb)* 58 (2022) 2455–2467. <https://doi.org/10.1039/d1cc04635g>.
- [10] C. Borgarelli, Y.E. Klingl, A. Escamilla-Ayala, S. Munck, L. van den Bosch, W.M. de Borggraave, E. Ismalaj, Lighting Up the Plasma Membrane: Development and Applications of Fluorescent Ligands for Transmembrane Proteins, *Chemistry* 27 (2021) 8605–8641. <https://doi.org/10.1002/chem.202100296>.

- [11] Y.K. Sunkari, V.K. Siripuram, T.-L. Nguyen, M. Flajolet, High-power screening (HPS) empowered by DNA-encoded libraries, *Trends Pharmacol. Sci.* 43 (2022) 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.10.008>.
- [12] X. Zhang, X. Zhang, H. Gao, G. Qing, Phage display derived peptides for Alzheimer's disease therapy and diagnosis, *Theranostics* 12 (2022) 2041–2062. <https://doi.org/10.7150/thno.68636>.
- [13] S. Pushpakom, F. Iorio, P.A. Eyers, K.J. Escott, S. Hopper, A. Wells, A. Doig, T. Guilliams, J. Latimer, C. McNamee, A. Norris, P. Sanseau, D. Cavalla, M. Pirmohamed, Drug repurposing: progress, challenges and recommendations, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2019) 41–58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>.
- [14] M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman, The versatility and universality of calcium signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>.
- [15] O.H. Petersen, M. Michalak, A. Verkhratsky, Calcium signalling: past, present and future, *Cell Calcium* 38 (2005) 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.023>.
- [16] D.E. Clapham, Calcium signaling, *Cell* 131 (2007) 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>.
- [17] N. Demaurex, P. Nunes, The role of STIM and ORAI proteins in phagocytic immune cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 310 (2016) C496–508. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00360.2015>.
- [18] V. Parpura, A. Verkhratsky, Homeostatic function of astrocytes: Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> signalling, *Transl. Neurosci.* 3 (2012) 334–344. <https://doi.org/10.2478/s13380-012-0040-y>.
- [19] M.J. Berridge, Calcium microdomains: organization and function, *Cell Calcium* 40 (2006) 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.09.002>.
- [20] G. Thiel, T. Schmidt, O.G. Rössler, Ca<sup>2+</sup> Microdomains, Calcineurin and the Regulation of Gene Transcription, *Cells* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/cells10040875>.
- [21] M. Oheim, F. Kirchhoff, W. Stühmer, Calcium microdomains in regulated exocytosis, *Cell Calcium* 40 (2006) 423–439. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.007>.
- [22] K. Simons, G. van Meer, Lipid sorting in epithelial cells, *Biochemistry* 27 (1988) 6197–6202. <https://doi.org/10.1021/bi00417a001>.
- [23] G. van Meer, K. Simons, Lipid polarity and sorting in epithelial cells, *J. Cell. Biochem.* 36 (1988) 51–58. <https://doi.org/10.1002/jcb.240360106>.

- [24] B. Pani, B.B. Singh, Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling, *Cell Calcium* 45 (2009) 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.02.009>.
- [25] A. Rietveld, K. Simons, The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts, *Biochim. Biophys. Acta* 1376 (1998) 467–479. [https://doi.org/10.1016/s0304-4157\(98\)00019-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4157(98)00019-7).
- [26] H.H. Patel, F. Murray, P.A. Insel, Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48 (2008) 359–391. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.121506.124841>.
- [27] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 31–39. <https://doi.org/10.1038/35036052>.
- [28] T. Harder, Lipid raft domains and protein networks in T-cell receptor signal transduction, *Curr. Opin. Immunol.* 16 (2004) 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.03.013>.
- [29] R.J. Eddy, L.M. Pierini, F. Matsumura, F.R. Maxfield, Ca<sup>2+</sup>-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration, *J. Cell Sci.* 113 (Pt 7) (2000) 1287–1298. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.7.1287>.
- [30] O. Nüsse, L. Serrander, D.P. Lew, K.H. Krause, Ca<sup>2+</sup>-induced exocytosis in individual human neutrophils: high- and low-affinity granule populations and submaximal responses, *EMBO J.* 17 (1998) 1279–1288. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1279>.
- [31] L. Zhao, X. Yang, Cross Talk Between Natural Killer T and Dendritic Cells and Its Impact on T Cell Responses in Infections, *Front. Immunol.* 13 (2022) 837767. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.837767>.
- [32] E.M. Gallo, K. Canté-Barrett, G.R. Crabtree, Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus, *NATURE IMMUNOLOGY* 7 (2006) 25–32. <https://doi.org/10.1038/ni1295>.
- [33] L.L. Nohara, S.R. Stanwood, K.D. Omilusik, W.A. Jefferies, Tweeters, Woofers and Horns: The Complex Orchestration of Calcium Currents in T Lymphocytes, *Front. Immunol.* 6 (2015) 234. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00234>.
- [34] U.H. Koszinowski, M.J. Reddehase, S. Jonjic, The role of CD4 and CD8 T cells in viral infections, *Curr. Opin. Immunol.* 3 (1991) 471–475. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(91\)90005-l](https://doi.org/10.1016/0952-7915(91)90005-l).
- [35] W.W. Schamel, M. Reth, Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor, *Immunity* 13 (2000) 5–14. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)00003-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00003-0).

- [36] S. Casola, K.L. Otipoby, M. Alimzhanov, S. Humme, N. Uyttersprot, J.L. Kutok, M.C. Carroll, K. Rajewsky, B cell receptor signal strength determines B cell fate, *NATURE IMMUNOLOGY* 5 (2004) 317–327. <https://doi.org/10.1038/ni1036>.
- [37] M.C. Carroll, The complement system in regulation of adaptive immunity, *NATURE IMMUNOLOGY* 5 (2004) 981–986. <https://doi.org/10.1038/ni1113>.
- [38] C.A. Dinarello, Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 519–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
- [39] M. Haseeb, M.A. Anwar, S. Choi, Molecular Interactions Between Innate and Adaptive Immune Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia and Their Therapeutic Implications, *Front. Immunol.* 9 (2018) 2720. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02720>.
- [40] H. Morita, H. Saito, K. Matsumoto, S. Nakae, Regulatory roles of mast cells in immune responses, *Semin. Immunopathol.* 38 (2016) 623–629. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0566-0>.
- [41] J. Bi, Z. Tian, NK Cell Exhaustion, *Front. Immunol.* 8 (2017) 760. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00760>.
- [42] J.C. Ryan, E.C. Niemi, M.C. Nakamura, W.E. Seaman, NKR-P1A is a target-specific receptor that activates natural killer cell cytotoxicity, *J. Exp. Med.* 181 (1995) 1911–1915. <https://doi.org/10.1084/jem.181.5.1911>.
- [43] A. Maul-Pavicic, S.C.C. Chiang, A. Rensing-Ehl, B. Jessen, C. Fauriat, S.M. Wood, S. Sjöqvist, M. Hufnagel, I. Schulze, T. Bass, W.W. Schamel, S. Fuchs, H. Pircher, C.-A. McCarl, K. Mikoshiba, K. Schwarz, S. Feske, Y.T. Bryceson, S. Ehl, ORAI1-mediated calcium influx is required for human cytotoxic lymphocyte degranulation and target cell lysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 3324–3329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013285108>.
- [44] J.T. Mandeville, F.R. Maxfield, Calcium and signal transduction in granulocytes, *Curr. Opin. Hematol.* 3 (1996) 63–70. <https://doi.org/10.1097/00062752-199603010-00010>.
- [45] T.M. Link, U. Park, B.M. Vonakis, D.M. Raben, M.J. Soloski, M.J. Caterina, TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis, *NATURE IMMUNOLOGY* 11 (2010) 232–239. <https://doi.org/10.1038/ni.1842>.
- [46] S. Hsu, P.J. O'Connell, V.A. Klyachko, M.N. Badminton, A.W. Thomson, M.B. Jackson, D.E. Clapham, G.P. Ahern, Fundamental Ca<sup>2+</sup> signaling mechanisms in mouse dendritic cells: CRAC is the major Ca<sup>2+</sup> entry pathway, *J. Immunol.* 166 (2001) 6126–6133. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.10.6126>.

- [47] S.F. Connolly, D.J. Kusner, The regulation of dendritic cell function by calcium-signaling and its inhibition by microbial pathogens, *Immunol. Res.* 39 (2007) 115–127. <https://doi.org/10.1007/s12026-007-0076-1>.
- [48] S.J. Galli, New concepts about the mast cell, *N. Engl. J. Med.* 328 (1993) 257–265. <https://doi.org/10.1056/NEJM199301283280408>.
- [49] M. Vig, W.I. DeHaven, G.S. Bird, J.M. Billingsley, H. Wang, P.E. Rao, A.B. Hutchings, M.-H. Jouvin, J.W. Putney, J.-P. Kinet, Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels, *NATURE IMMUNOLOGY* 9 (2008) 89–96. <https://doi.org/10.1038/ni1550>.
- [50] G. Peng, X. Shi, T. Kadowaki, Evolution of TRP channels inferred by their classification in diverse animal species, *Mol. Phylogenet. Evol.* 84 (2015) 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.06.016>.
- [51] B. Martinac, Y. Saimi, C. Kung, Ion channels in microbes, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 1449–1490. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2008>.
- [52] B. Nilius, G. Owsianik, The transient receptor potential family of ion channels, *Genome Biol.* 12 (2011) 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>.
- [53] P.D. Wes, J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten, C. Montell, TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 9652–9656. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9652>.
- [54] D.J. Cosens, A. Manning, Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant, *Nature* 224 (1969) 285–287. <https://doi.org/10.1038/224285a0>.
- [55] B. Minke, C. Wu, W.L. Pak, Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant, *Nature* 258 (1975) 84–87. <https://doi.org/10.1038/258084a0>.
- [56] C. Montell, K. Jones, E. Hafen, G. Rubin, Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation, *Science* 230 (1985) 1040–1043. <https://doi.org/10.1126/science.3933112>.
- [57] R.C. Hardie, B. Minke, The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors, *Neuron* 8 (1992) 643–651. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90086-s](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90086-s).
- [58] B. Minke, Z. Selinger, The roles of *trp* and calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila*, *Curr. Opin. Neurobiol.* 6 (1996) 459–466. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(96\)80050-x](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(96)80050-x).

- [59] L.-J. Wu, T.-B. Sweet, D.E. Clapham, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family, *Pharmacol. Rev.* 62 (2010) 381–404. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002725>.
- [60] V. Negin, L. Tsiokas, TRPC1, *Handb. Exp. Pharmacol.* 222 (2014) 15–51. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_2).
- [61] M. Malczyk, A. Erb, C. Veith, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, T. Gudermann, A. Dietrich, N. Weissmann, A. Sydykov, The Role of Transient Receptor Potential Channel 6 Channels in the Pulmonary Vasculature, *Front. Immunol.* 8 (2017) 707. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00707>.
- [62] D. Krout, A. Schaar, Y. Sun, P. Sukumaran, J.N. Roemmich, B.B. Singh, K.J. Claycombe-Larson, The TRPC1 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel inhibits exercise-induced protection against high-fat diet-induced obesity and type II diabetes, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 20799–20807. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.809954>.
- [63] V.V. Tsvilovskyy, A.V. Zholos, T. Aberle, S.E. Philipp, A. Dietrich, M.X. Zhu, L. Birnbaumer, M. Freichel, V. Flockerzi, Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo, *Gastroenterology* 137 (2009) 1415–1424. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.06.046>.
- [64] Y. Karashima, K. Talavera, W. Everaerts, A. Janssens, K.Y. Kwan, R. Vennekens, B. Nilius, T. Voets, TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 1273–1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808487106>.
- [65] P.M. Zygmunt, E.D. Högestätt, TRPA1, *Handb. Exp. Pharmacol.* 222 (2014) 583–630. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2\\_23](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_23).
- [66] M.M. van Genderen, M.M.C. Bijveld, Y.B. Claassen, R.J. Florijn, J.N. Pearing, F.M. Meire, M.A. McCall, F.C.C. Riemsdag, R.G. Gregg, A.A.B. Bergen, M. Kamermans, Mutations in TRPM1 are a common cause of complete congenital stationary night blindness, *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2009) 730–736. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.10.012>.
- [67] L.M. Duncan, J. Deeds, J. Hunter, J. Shao, L.M. Holmgren, E.A. Woolf, R.I. Tepper, A.W. Shyjan, Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis, *Cancer Res.* 58 (1998) 1515–1520.
- [68] Y. Zhang, M.A. Hoon, J. Chandrashekar, K.L. Mueller, B. Cook, D. Wu, C.S. Zuker, N.J.P. Ryba, Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways, *Cell* 112 (2003) 293–301. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00071-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00071-0).



- [69] D.D. McKemy, W.M. Neuhausser, D. Julius, Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation, *Nature* 416 (2002) 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature719>.
- [70] S. Di Paola, A. Scotto-Rosato, D.L. Medina, TRPML1: The Ca(2+)retaker of the lysosome, *Cell Calcium* 69 (2018) 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.006>.
- [71] W. Wang, X. Zhang, Q. Gao, H. Xu, TRPML1: an ion channel in the lysosome, *Handb. Exp. Pharmacol.* 222 (2014) 631–645. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_24).
- [72] M. Sun, E. Goldin, S. Stahl, J.L. Falardeau, J.C. Kennedy, J.S. Acierno, C. Bove, C.R. Kaneski, J. Nagle, M.C. Bromley, M. Colman, R. Schiffmann, S.A. Slaugenhaupt, Mucopolidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 2471–2478. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.17.2471>.
- [73] T. Mochizuki, G. Wu, T. Hayashi, S.L. Xenophontos, B. Veldhuisen, J.J. Saris, D.M. Reynolds, Y. Cai, P.A. Gabow, A. Pierides, W.J. Kimberling, M.H. Breuning, C.C. Deltas, D.J. Peters, S. Somlo, PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein, *Science* 272 (1996) 1339–1342. <https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1339>.
- [74] M. Semmo, M. Köttgen, A. Hofherr, The TRPP subfamily and polycystin-1 proteins, *Handb. Exp. Pharmacol.* 222 (2014) 675–711. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2\\_27](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_27).
- [75] A. Jara-Oseguera, S.A. Simon, T. Rosenbaum, TRPV1: on the road to pain relief, *Curr. Mol. Pharmacol.* 1 (2008) 255–269. <https://doi.org/10.2174/1874467210801030255>.
- [76] Y. Wang, H. Li, C. Xue, H. Chen, Y. Xue, F. Zhao, M.X. Zhu, Z. Cao, TRPV3 enhances skin keratinocyte proliferation through EGFR-dependent signaling pathways, *Cell Biol. Toxicol.* 37 (2021) 313–330. <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09536-2>.
- [77] G. Santoni, V. Farfariello, S. Liberati, M.B. Morelli, M. Nabissi, M. Santoni, C. Amantini, The role of transient receptor potential vanilloid type-2 ion channels in innate and adaptive immune responses, *Front. Immunol.* 4 (2013) 34. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00034>.
- [78] T. Hofmann, M. Schaefer, G. Schultz, T. Gudermann, Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 7461–7466. <https://doi.org/10.1073/pnas.102596199>.
- [79] G. Owsianik, D. D'hoedt, T. Voets, B. Nilius, Structure-function relationship of the TRP channel superfamily, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 156 (2006) 61–90.

- [80] T. Voets, A. Janssens, G. Droogmans, B. Nilius, Outer pore architecture of a Ca<sup>2+</sup>-selective TRP channel, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 15223–15230. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312076200>.
- [81] V. Flockerzi, B. Nilius, TRPs: truly remarkable proteins, *Handb. Exp. Pharmacol.* 222 (2014) 1–12. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_1).
- [82] E. Ladrón-de-Guevara, L. Dominguez, G.E. Rangel-Yescas, D.A. Fernández-Velasco, A. Torres-Larios, T. Rosenbaum, L.D. Islas, The Contribution of the Ankyrin Repeat Domain of TRPV1 as a Thermal Module, *Biophys. J.* 118 (2020) 836–845. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.041>.
- [83] R. Gaudet, TRP channels entering the structural era, *J. Physiol.* 586 (2008) 3565–3575. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.155812>.
- [84] R. Gaudet, A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond, *Mol. Biosyst.* 4 (2008) 372–379. <https://doi.org/10.1039/b801481g>.
- [85] X. Jin, J. Touhey, R. Gaudet, Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 25006–25010. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600153200>.
- [86] P.V. Lishko, E. Procko, X. Jin, C.B. Phelps, R. Gaudet, The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity, *Neuron* 54 (2007) 905–918. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.027>.
- [87] C.J. McCleverty, E. Koesema, A. Patapoutian, S.A. Lesley, A. Kreuzsch, Crystal structure of the human TRPV2 channel ankyrin repeat domain, *Protein Sci.* 15 (2006) 2201–2206. <https://doi.org/10.1110/ps.062357206>.
- [88] C.B. Phelps, R.J. Huang, P.V. Lishko, R.R. Wang, R. Gaudet, Structural analyses of the ankyrin repeat domain of TRPV6 and related TRPV ion channels, *Biochemistry* 47 (2008) 2476–2484. <https://doi.org/10.1021/bi702109w>.
- [89] M.J. Caterina, M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature* 389 (1997) 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>.
- [90] R. Latorre, I. Díaz-Franulic, Profile of David Julius and Ardem Patapoutian: 2021 Nobel Laureates in Physiology or Medicine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119 (2022). <https://doi.org/10.1073/pnas.2121015119>.
- [91] D.M. Tóth, E. Szoke, K. Bölcskei, K. Kvell, B. Bender, Z. Bosze, J. Szolcsányi, Z. Sándor, Nociception, neurogenic inflammation and thermoregulation in TRPV1 knockdown

- transgenic mice, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 2589–2601. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0569-2>.
- [92] A. Charrua, C.D. Cruz, S. Narayanan, L. Gharat, S. Gullapalli, F. Cruz, A. Avelino, GRC-6211, a new oral specific TRPV1 antagonist, decreases bladder overactivity and noxious bladder input in cystitis animal models, *J. Urol.* 181 (2009) 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.08.121>.
- [93] T. Kark, Z. Bagi, E. Lizanecz, E.T. Pásztor, N. Erdei, A. Czikora, Z. Papp, I. Edes, R. Pórszász, A. Tóth, Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1, *Mol. Pharmacol.* 73 (2008) 1405–1412. <https://doi.org/10.1124/mol.107.043323>.
- [94] C.J. Bohlen, A. Priel, S. Zhou, D. King, J. Siemens, D. Julius, A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain, *Cell* 141 (2010) 834–845. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.052>.
- [95] K. Uchida, K. Dezaki, T. Yoneshiro, T. Watanabe, J. Yamazaki, M. Saito, T. Yada, M. Tominaga, Y. Iwasaki, Involvement of thermosensitive TRP channels in energy metabolism, *J. Physiol. Sci.* 67 (2017) 549–560. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0552-x>.
- [96] B. Liu, J. Yao, M.X. Zhu, F. Qin, Hysteresis of gating underlines sensitization of TRPV3 channels, *J. Gen. Physiol.* 138 (2011) 509–520. <https://doi.org/10.1085/jgp.201110689>.
- [97] G. Bhave, W. Zhu, H. Wang, D.J. Brasier, G.S. Oxford, R.W. Gereau, cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation, *Neuron* 35 (2002) 721–731. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00802-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00802-4).
- [98] R. Xiao, J. Tang, C. Wang, C.K. Colton, J. Tian, M.X. Zhu, Calcium plays a central role in the sensitization of TRPV3 channel to repetitive stimulations, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 6162–6174. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706535200>.
- [99] M. Bischof, S. Olthoff, C. Glas, O. Thorn-Seshold, M. Schaefer, K. Hill, TRPV3 endogenously expressed in murine colonic epithelial cells is inhibited by the novel TRPV3 blocker 26E01, *Cell Calcium* 92 (2020) 102310. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102310>.
- [100] T. Ishibashi, M. Takumida, N. Akagi, K. Hirakawa, M. Anniko, Expression of transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1, 2, 3, and 4 in mouse inner ear, *Acta Otolaryngol.* 128 (2008) 1286–1293. <https://doi.org/10.1080/00016480801938958>.

- [101] X. Cheng, J. Jin, L. Hu, D. Shen, X.-P. Dong, M.A. Samie, J. Knoff, B. Eisinger, M.-L. Liu, S.M. Huang, M.J. Caterina, P. Dempsey, L.E. Michael, A.A. Dlugosz, N.C. Andrews, D.E. Clapham, H. Xu, TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation, *Cell* 141 (2010) 331–343. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.013>.
- [102] S.M. Huang, H. Lee, M.-K. Chung, U. Park, Y.Y. Yu, H.B. Bradshaw, P.A. Coulombe, J.M. Walker, M.J. Caterina, Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E2, *J. Neurosci.* 28 (2008) 13727–13737. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5741-07.2008>.
- [103] M. Naziroğlu, N. Braidy, Thermo-Sensitive TRP Channels: Novel Targets for Treating Chemotherapy-Induced Peripheral Pain, *Front. Physiol.* 8 (2017) 1040. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01040>.
- [104] W. Everaerts, B. Nilius, G. Owsianik, The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 103 (2010) 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2009.10.002>.
- [105] A. Garcia-Elias, S. Mrkonjić, C. Jung, C. Pardo-Pastor, R. Vicente, M.A. Valverde, The TRPV4 channel, *Handb. Exp. Pharmacol.* 222 (2014) 293–319. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_12).
- [106] K.S. Thorneloe, A.C. Sulpizio, Z. Lin, D.J. Figueroa, A.K. Clouse, G.P. McCafferty, T.P. Chendrimada, E.S.R. Lashinger, E. Gordon, L. Evans, B.A. Misajet, D.J. Demarini, J.H. Nation, L.N. Casillas, R.W. Marquis, B.J. Votta, S.A. Sheardown, X. Xu, D.P. Brooks, N.J. Laping, T.D. Westfall, N-((1S)-1-{4-((2S)-2-((2,4-dichlorophenyl)sulfonylamino)-3-hydroxypropanoyl)-1-piperazinylcarbonyl}-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, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326 (2008) 432–442. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.139295>.
- [107] R.N. Willette, W. Bao, S. Nerurkar, T.-L. Yue, C.P. Doe, G. Stankus, G.H. Turner, H. Ju, H. Thomas, C.E. Fishman, A. Sulpizio, D.J. Behm, S. Hoffman, Z. Lin, I. Lozinskaya, L.N. Casillas, M. Lin, R.E.L. Trout, B.J. Votta, K. Thorneloe, E.S.R. Lashinger, D.J. Figueroa, R. Marquis, X. Xu, Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse: Part 2, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326 (2008) 443–452. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.134551>.
- [108] T. Na, J.-B. Peng, TRPV5: a Ca(2+) channel for the fine-tuning of Ca(2+) reabsorption, *Handb. Exp. Pharmacol.* 222 (2014) 321–357. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_13).

- [109] J.G. Hoenderop, A.W. van der Kemp, A. Hartog, S.F. van de Graaf, C.H. van Os, P.H. Willems, R.J. Bindels, Molecular identification of the apical Ca<sup>2+</sup> channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-responsive epithelia, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8375–8378. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8375>.
- [110] N.Y. Loh, L. Bentley, H. Dimke, S. Verkaart, P. Tammaro, C.M. Gorvin, M.J. Stechman, B.N. Ahmad, F.M. Hannan, S.E. Piret, H. Evans, I. Bellantuono, T.A. Hough, W.D. Fraser, J.G.J. Hoenderop, F.M. Ashcroft, S.D.M. Brown, R.J.M. Bindels, R.D. Cox, R.V. Thakker, Autosomal dominant hypercalciuria in a mouse model due to a mutation of the epithelial calcium channel, TRPV5, *PLoS One* 8 (2013) e55412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055412>.
- [111] J.G.J. Hoenderop, D. Müller, A.W.C.M. van der Kemp, A. Hartog, M. Suzuki, K. Ishibashi, M. Imai, F. Sweep, P.H.G.M. Willems, C.H. van Os, R.J.M. Bindels, Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney, *J. Am. Soc. Nephrol.* 12 (2001) 1342–1349. <https://doi.org/10.1681/ASN.V1271342>.
- [112] M. van Abel, J.G.J. Hoenderop, O. Dardenne, R. St Arnaud, C.H. van Os, H.J.P.T.M. van Leeuwen, R.J.M. Bindels, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of ECaC1 in the kidney, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 2102–2109. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000022423.34922.2a>.
- [113] M. van Abel, J.G.J. Hoenderop, A.W.C.M. van der Kemp, M.M. Friedlaender, J.P.T.M. van Leeuwen, R.J.M. Bindels, Coordinated control of renal Ca<sup>2+</sup> transport proteins by parathyroid hormone, *Kidney Int.* 68 (2005) 1708–1721. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00587.x>.
- [114] B.A. Niemeyer, C. Bergs, U. Wissenbach, V. Flockerzi, C. Trost, Competitive regulation of Ca<sup>T</sup>-like-mediated Ca<sup>2+</sup> entry by protein kinase C and calmodulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 3600–3605. <https://doi.org/10.1073/pnas.051511398>.
- [115] C. Cao, E. Zakharian, I. Borbiri, T. Rohacs, Interplay between calmodulin and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in Ca<sup>2+</sup>-induced inactivation of transient receptor potential vanilloid 6 channels, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 5278–5290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.409482>.
- [116] J.B. Peng, X.Z. Chen, U.V. Berger, S. Weremowicz, C.C. Morton, P.M. Vassilev, E.M. Brown, M.A. Hediger, Human calcium transport protein Ca<sup>T</sup>1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278 (2000) 326–332. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3716>.
- [117] L. Zhuang, J.-B. Peng, L. Tou, H. Takanaga, R.M. Adam, M.A. Hediger, M.R. Freeman, Calcium-selective ion channel, Ca<sup>T</sup>1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia

- and is aberrantly expressed in human malignancies, *Lab. Invest.* 82 (2002) 1755–1764. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000043910.41414.e7>.
- [118] P. Weissgerber, U. Kriebs, V. Tsvilovskyy, J. Olausson, O. Kretz, C. Stoerger, R. Vennekens, U. Wissenbach, R. Middendorff, V. Flockerzi, M. Freichel, Male fertility depends on Ca<sup>2+</sup> absorption by TRPV6 in epididymal epithelia, *Sci. Signal.* 4 (2011) ra27. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001791>.
- [119] K.S. Park, B. Pang, S.J. Park, Y.-G. Lee, J.-Y. Bae, S. Park, I. Kim, S.J. Kim, Identification and functional characterization of ion channels in CD34(+) hematopoietic stem cells from human peripheral blood, *Mol. Cells* 32 (2011) 181–188. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0068-9>.
- [120] M.J. Caterina, T.A. Rosen, M. Tominaga, A.J. Brake, D. Julius, A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat, *Nature* 398 (1999) 436–441. <https://doi.org/10.1038/18906>.
- [121] I. Kojima, M. Nagasawa, TRPV2, *Handb. Exp. Pharmacol.* 222 (2014) 247–272. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_10).
- [122] M. Kanzaki, Y.Q. Zhang, H. Mashima, L. Li, H. Shibata, I. Kojima, Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I, *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 165–170. <https://doi.org/10.1038/11086>.
- [123] T. Kowase, Y. Nakazato, H. Yoko-O, A. Morikawa, I. Kojima, Immunohistochemical localization of growth factor-regulated channel (GRC) in human tissues, *Endocr. J.* 49 (2002) 349–355. <https://doi.org/10.1507/endocrj.49.349>.
- [124] S. Cordeiro, S. Seyler, J. Stindl, V.M. Milenkovic, O. Strauss, Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51 (2010) 6001–6008. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4720>.
- [125] E. Hisanaga, M. Nagasawa, K. Ueki, R.N. Kulkarni, M. Mori, I. Kojima, Regulation of calcium-permeable TRPV2 channel by insulin in pancreatic beta-cells, *Diabetes* 58 (2009) 174–184. <https://doi.org/10.2337/db08-0862>.
- [126] L. Zubcevic, M.A. Herzik, B.C. Chung, Z. Liu, G.C. Lander, S.-Y. Lee, Cryo-electron microscopy structure of the TRPV2 ion channel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23 (2016) 180–186. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3159>.
- [127] L. Zubcevic, S. Le, H. Yang, S.-Y. Lee, Conformational plasticity in the selectivity filter of the TRPV2 ion channel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25 (2018) 405–415. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0059-z>.

- [128] M. Nabissi, M.B. Morelli, M. Santoni, G. Santoni, Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents, *Carcinogenesis* 34 (2013) 48–57. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs328>.
- [129] H. Neumann-Raizel, A. Shilo, S. Lev, M. Mogilevsky, B. Katz, D. Shneur, Y.D. Shaul, A. Leffler, A. Gabizon, R. Karni, A. Honigman, A.M. Binshtok, 2-APB and CBD-Mediated Targeting of Charged Cytotoxic Compounds Into Tumor Cells Suggests the Involvement of TRPV2 Channels, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 1198. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01198>.
- [130] B. Holakovska, L. Grycova, J. Bily, J. Teisinger, Characterization of calmodulin binding domains in TRPV2 and TRPV5 C-tails, *Amino Acids* 40 (2011) 741–748. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0712-2>.
- [131] J. Mercado, A. Gordon-Shaag, W.N. Zagotta, S.E. Gordon, Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization of TRPV2 channels is mediated by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *J. Neurosci.* 30 (2010) 13338–13347. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2108-10.2010>.
- [132] N. García-Sanz, A. Fernández-Carvajal, C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, E. Fajardo-Sánchez, G. Fernández-Ballester, A. Ferrer-Montiel, Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor, *J. Neurosci.* 24 (2004) 5307–5314. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0202-04.2004>.
- [133] J. Yao, B. Liu, F. Qin, Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 11109–11114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105196108>.
- [134] U. Park, N. Vastani, Y. Guan, S.N. Raja, M. Koltzenburg, M.J. Caterina, TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception, *J. Neurosci.* 31 (2011) 11425–11436. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1384-09.2011>.
- [135] H. Ichikawa, T. Sugimoto, VR1-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion, *Brain Res.* 890 (2001) 184–188. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03253-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03253-4).
- [136] K. Muraki, Y. Iwata, Y. Katanosaka, T. Ito, S. Ohya, M. Shigekawa, Y. Imaizumi, TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes, *Circ. Res.* 93 (2003) 829–838. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000097263.10220.0C>.
- [137] A. Belkacemi, C.F. Trost, R. Tinschert, D. Flormann, M. Malihpour, C. Wagner, M.R. Meyer, A. Beck, V. Flockerzi, The TRPV2 channel mediates Ca<sup>2+</sup> influx and the  $\Delta^9$ -THC-

- dependent decrease in osmotic fragility in red blood cells, *Haematologica* 106 (2021) 2246–2250. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.274951>.
- [138] M. Nagasawa, Y. Nakagawa, S. Tanaka, I. Kojima, Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages, *J. Cell. Physiol.* 210 (2007) 692–702. <https://doi.org/10.1002/jcp.20883>.
- [139] M. Saito, P.I. Hanson, P. Schlesinger, Luminal chloride-dependent activation of endosome calcium channels: patch clamp study of enlarged endosomes, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 27327–27333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702557200>.
- [140] T.C. Fricke, F. Echtermeyer, J. Zielke, J. de La Roche, M.R. Filipovic, S. Claverol, C. Herzog, M. Tominaga, R.A. Pumroy, V.Y. Moiseenkova-Bell, P.M. Zygmunt, A. Leffler, M.J. Eberhardt, Oxidation of methionine residues activates the high-threshold heat-sensitive ion channel TRPV2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (2019) 24359–24365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904332116>.
- [141] M. Oda, Y. Fujiwara, Y. Ishizaki, K. Shibasaki, Oxidation sensitizes TRPV2 to chemical and heat stimuli, but not mechanical stimulation, *Biochem. Biophys. Rep.* 28 (2021) 101173. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101173>.
- [142] H.S. Park, H.Y. Jung, E.Y. Park, J. Kim, W.J. Lee, Y.S. Bae, Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B, *J. Immunol.* 173 (2004) 3589–3593. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3589>.
- [143] T. Maruyama, T. Kanaji, S. Nakade, T. Kanno, K. Mikoshiba, 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release, *J. Biochem.* 122 (1997) 498–505. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021780>.
- [144] C.K. Colton, M.X. Zhu, 2-Aminoethoxydiphenyl borate as a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 channels, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2007) 173–187. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7_10).
- [145] D.E. Clapham, L.W. Runnels, C. Strübing, The TRP ion channel family, *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (2001) 387–396. <https://doi.org/10.1038/35077544>.
- [146] H.-Z. Hu, Q. Gu, C. Wang, C.K. Colton, J. Tang, M. Kinoshita-Kawada, L.-Y. Lee, J.D. Wood, M.X. Zhu, 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 35741–35748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404164200>.



- [147] D. Bai, C. del Corso, M. Srinivas, D.C. Spray, Block of specific gap junction channel subtypes by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319 (2006) 1452–1458. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.112045>.
- [148] M.D. Bootman, T.J. Collins, L. Mackenzie, H.L. Roderick, M.J. Berridge, C.M. Peppiatt, 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry but an inconsistent inhibitor of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release, *FASEB J.* 16 (2002) 1145–1150. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0037rev>.
- [149] M. Prakriya, R.S. Lewis, Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors, *J. Physiol.* 536 (2001) 3–19. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00003.x>.
- [150] J. Zheng, F. Liu, S. Du, M. Li, T. Wu, X. Tan, W. Cheng, Mechanism for Regulation of Melanoma Cell Death via Activation of Thermo-TRPV4 and TRPV2, *J. Oncol.* 2019 (2019) 7362875. <https://doi.org/10.1155/2019/7362875>.
- [151] M.P. Neeper, Y. Liu, T.L. Hutchinson, Y. Wang, C.M. Flores, N. Qin, Activation properties of heterologously expressed mammalian TRPV2: evidence for species dependence, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 15894–15902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608287200>.
- [152] S. Bang, K.Y. Kim, S. Yoo, S.-H. Lee, S.W. Hwang, Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid, *Neurosci. Lett.* 425 (2007) 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.08.035>.
- [153] Y. Bluhm, R. Raudszus, A. Wagner, N. Urban, M. Schaefer, K. Hill, Valdecoxib blocks rat TRPV2 channels, *Eur. J. Pharmacol.* 915 (2022) 174702. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174702>.
- [154] S.-E. Jordt, D.M. Bautista, H.-H. Chuang, D.D. McKemy, P.M. Zygmunt, E.D. Högestätt, I.D. Meng, D. Julius, Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1, *Nature* 427 (2004) 260–265. <https://doi.org/10.1038/nature02282>.
- [155] N. Qin, M.P. Neeper, Y. Liu, T.L. Hutchinson, M.L. Lubin, C.M. Flores, TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons, *J. Neurosci.* 28 (2008) 6231–6238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0504-08.2008>.
- [156] S. Darakhshan, A.B. Pour, Tranilast: a review of its therapeutic applications, *Pharmacol. Res.* 91 (2015) 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.10.009>.

- [157] L. Nie, Y. Oishi, I. Doi, H. Shibata, I. Kojima, Inhibition of proliferation of MCF-7 breast cancer cells by a blocker of Ca(2+)-permeable channel, *Cell Calcium* 22 (1997) 75–82. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(97\)90107-x](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(97)90107-x).
- [158] J.E. Merritt, W.P. Armstrong, C.D. Benham, T.J. Hallam, R. Jacob, A. Jaxa-Chamiec, B.K. Leigh, S.A. McCarthy, K.E. Moores, T.J. Rink, SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry, *Biochem. J.* 271 (1990) 515–522. <https://doi.org/10.1042/bj2710515>.
- [159] A. Singh, M.E. Hildebrand, E. Garcia, T.P. Snutch, The transient receptor potential channel antagonist SKF96365 is a potent blocker of low-voltage-activated T-type calcium channels, *Br. J. Pharmacol.* 160 (2010) 1464–1475. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00786.x>.
- [160] V. Juvin, A. Penna, J. Chemin, Y.-L. Lin, F.-A. Rassendren, Pharmacological characterization and molecular determinants of the activation of transient receptor potential V2 channel orthologs by 2-aminoethoxydiphenyl borate, *Mol. Pharmacol.* 72 (2007) 1258–1268. <https://doi.org/10.1124/mol.107.037044>.
- [161] K. Sauer, T.J. Jegla, Methods for identifying t cell activation-modulating compounds (2006).
- [162] K. Sauer, T. J. Jegla, Methods for identifying T cell activation modulating compounds, Patent Application WO/2006/065613 (2006).
- [163] I. Pottosin, I. Delgado-Enciso, E. Bonales-Alatorre, M.G. Nieto-Pescador, E.G. Moreno-Galindo, O. Dobrovinskaya, Mechanosensitive Ca<sup>2+</sup>-permeable channels in human leukemic cells: pharmacological and molecular evidence for TRPV2, *Biochim. Biophys. Acta* 1848 (2015) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2014.09.008>.
- [164] S. Bertin, E. Raz, Transient Receptor Potential (TRP) channels in T cells, *Semin. Immunopathol.* 38 (2016) 309–319. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0535-z>.
- [165] B. Ignatowska-Jankowska, M. Jankowski, W. Glac, A.H. Swiergel, Cannabidiol-induced lymphopenia does not involve NKT and NK cells, *J. Physiol. Pharmacol.* 60 Suppl 3 (2009) 99–103.
- [166] A.I. Su, T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K.A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M.P. Cooke, J.R. Walker, J.B. Hogenesch, A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 6062–6067. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400782101>.

- [167] I. Heiner, J. Eisfeld, A. Lückhoff, Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes, *Cell Calcium* 33 (2003) 533–540. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(03\)00058-7](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(03)00058-7).
- [168] A.J. Stokes, L.M.N. Shimoda, M. Koblan-Huberson, C.N. Adra, H. Turner, A TRPV2-PKA signaling module for transduction of physical stimuli in mast cells, *J. Exp. Med.* 200 (2004) 137–147. <https://doi.org/10.1084/jem.20032082>.
- [169] K. Yamashiro, T. Sasano, K. Tojo, I. Namekata, J. Kurokawa, N. Sawada, T. Suganami, Y. Kamei, H. Tanaka, N. Tajima, K. Utsunomiya, Y. Ogawa, T. Furukawa, Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398 (2010) 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.082>.
- [170] C.-S. Kim, T. Kawada, B.-S. Kim, I.-S. Han, S.-Y. Choe, T. Kurata, R. Yu, Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages, *Cell. Signal.* 15 (2003) 299–306. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(02\)00086-4](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00086-4).
- [171] H. Kajiya, F. Okamoto, T. Nemoto, K. Kimachi, K. Toh-Goto, S. Nakayama, K. Okabe, RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations, *Cell Calcium* 48 (2010) 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.09.010>.
- [172] M. Freichel, J. Almering, V. Tsvilovskyy, The Role of TRP Proteins in Mast Cells, *Front. Immunol.* 3 (2012) 150. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00150>.
- [173] D. Zhang, A. Spielmann, L. Wang, G. Ding, F. Huang, Q. Gu, W. Schwarz, Mast-cell degranulation induced by physical stimuli involves the activation of transient-receptor-potential channel TRPV2, *Physiol. Res.* 61 (2012) 113–124. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932053>.
- [174] A. Solís-López, U. Kriebs, A. Marx, S. Mannebach, W.B. Liedtke, M.J. Caterina, M. Freichel, V.V. Tsvilovskyy, Analysis of TRPV channel activation by stimulation of FC $\epsilon$ RI and MRGPR receptors in mouse peritoneal mast cells, *PLoS One* 12 (2017) e0171366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171366>.
- [175] N. Urban, K. Hill, L. Wang, W.M. Kuebler, M. Schaefer, Novel pharmacological TRPC inhibitors block hypoxia-induced vasoconstriction, *Cell Calcium* 51 (2012) 194–206. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.01.001>.
- [176] J. Frühwald, J. Camacho Londoño, S. Dembla, S. Mannebach, A. Lis, A. Drews, U. Wissenbach, J. Oberwinkler, S.E. Philipp, Alternative splicing of a protein domain indispensable for function of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) ion

- channels, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 36663–36672. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.396663>.
- [177] X. Zhang, R. Goncalves, D.M. Mosser, The isolation and characterization of murine macrophages, *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 14 (2008) Unit 14.1. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1401s83>.
- [178] S.K. Meurer, M. Neß, S. Weiskirchen, P. Kim, C.G. Tag, M. Kauffmann, M. Huber, R. Weiskirchen, Isolation of Mature (Peritoneum-Derived) Mast Cells and Immature (Bone Marrow-Derived) Mast Cell Precursors from Mice, *PLoS One* 11 (2016) e0158104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158104>.
- [179] X. Li, I. Llorente, M. Brasch, Improvements in live cell analysis of G protein coupled receptors using second generation BD calcium assay kits, *Curr. Chem. Genomics* 2 (2008) 10–15. <https://doi.org/10.2174/1875397300802010010>.
- [180] N. Urban, L. Wang, S. Kwiek, J. Rademann, W.M. Kuebler, M. Schaefer, Identification and Validation of Larixyl Acetate as a Potent TRPC6 Inhibitor, *Mol. Pharmacol.* 89 (2016) 197–213. <https://doi.org/10.1124/mol.115.100792>.
- [181] A. Edelstein, N. Amodaj, K. Hoover, R. Vale, N. Stuurman, Computer control of microscopes using  $\mu$ Manager, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 14 (2010) Unit14.20. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1420s92>.
- [182] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- [183] J.C. Lenz, H.P. Reusch, N. Albrecht, G. Schultz, M. Schaefer, Ca<sup>2+</sup>-controlled competitive diacylglycerol binding of protein kinase C isoenzymes in living cells, *JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 159 (2002) 291–301. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203048>.
- [184] A. Kogel, H. Kalwa, N. Urban, M. Schaefer, Artifact-free objective-type multicolor total internal reflection fluorescence microscopy with light-emitting diode light sources-Part I, *J. Biophotonics* 12 (2019) e201900033. <https://doi.org/10.1002/jbio.201900033>.
- [185] E. Neher, B. Sakmann, Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, *Nature* 260 (1976) 799–802. <https://doi.org/10.1038/260799a0>.
- [186] T. Sawatani, Y.K. Kaneko, I. Doutsu, A. Ogawa, T. Ishikawa, TRPV2 channels mediate insulin secretion induced by cell swelling in mouse pancreatic  $\beta$ -cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 316 (2019) C434–C443. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00210.2017>.

- [187] H.S. Kuehn, M. Radinger, A.M. Gilfillan, Measuring mast cell mediator release, *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 7 (2010) Unit7.38. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0738s91>.
- [188] R.V. Frolov, S. Singh, Celecoxib and ion channels: a story of unexpected discoveries, *Eur. J. Pharmacol.* 730 (2014) 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.02.032>.
- [189] S. Spyra, A. Meisner, M. Schaefer, K. Hill, COX-2-selective inhibitors celecoxib and deracoxib modulate transient receptor potential vanilloid 3 channels, *Br. J. Pharmacol.* 174 (2017) 2696–2705. <https://doi.org/10.1111/bph.13893>.
- [190] I. Moore, A. Murphy, Validating the location of fluorescent protein fusions in the endomembrane system, *Plant Cell* 21 (2009) 1632–1636. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068668>.
- [191] M. Entin-Meer, G. Keren, Potential roles in cardiac physiology and pathology of the cation channel TRPV2 expressed in cardiac cells and cardiac macrophages: a mini-review, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 318 (2020) H181-H188. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00491.2019>.
- [192] C. Wei, X. Wang, M. Chen, K. Ouyang, L.-S. Song, H. Cheng, Calcium flickers steer cell migration, *Nature* 457 (2009) 901–905. <https://doi.org/10.1038/nature07577>.
- [193] F.H. Falcone, D. Wan, N. Barwary, R. Sagi-Eisenberg, RBL cells as models for in vitro studies of mast cells and basophils, *Immunol. Rev.* 282 (2018) 47–57. <https://doi.org/10.1111/imr.12628>.
- [194] M. Darby, J.B. Kuzmiski, W. Panenka, D. Feighan, B.A. MacVicar, ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels, *J. Neurophysiol.* 89 (2003) 1870–1877. <https://doi.org/10.1152/jn.00510.2002>.
- [195] T. Diena, R. Melani, E. Caci, N. Pedemonte, E. Sondo, O. Zegarra-Moran, L.J.V. Galletta, Block of CFTR-dependent chloride currents by inhibitors of multidrug resistance-associated proteins, *Eur. J. Pharmacol.* 560 (2007) 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.01.051>.
- [196] L. Missiaen, G. Callewaert, H. de Smedt, J.B. Parys, 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca<sup>2+</sup> pump and the non-specific Ca<sup>2+</sup> leak from the non-mitochondrial Ca<sup>2+</sup> stores in permeabilized A7r5 cells, *Cell Calcium* 29 (2001) 111–116. <https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0163>.
- [197] M. Nazıroğlu, C. Özgül, Ö. Çelik, B. Çiğ, E. Sözbir, Aminoethoxydiphenyl borate and flufenamic acid inhibit Ca<sup>2+</sup> influx through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion

- neurons activated by ADP-ribose and rotenone, *J. Membr. Biol.* 241 (2011) 69–75. <https://doi.org/10.1007/s00232-011-9363-9>.
- [198] L. Gao, P. Yang, P. Qin, Y. Lu, X. Li, Q. Tian, Y. Li, C. Xie, J.-b. Tian, C. Zhang, C. Tian, M.X. Zhu, J. Yao, Selective potentiation of 2-APB-induced activation of TRPV1-3 channels by acid, *Sci. Rep.* 6 (2016) 20791. <https://doi.org/10.1038/srep20791>.
- [199] S. Koyasu, Vanilloid flavor for a good appetite?, *NATURE IMMUNOLOGY* 11 (2010) 187–189. <https://doi.org/10.1038/ni0310-187>.
- [200] M. Lévêque, A. Penna, S. Le Trionnaire, C. Belleguic, B. Desrues, G. Brinchault, S. Jouneau, D. Lagadic-Gossmann, C. Martin-Chouly, Phagocytosis depends on TRPV2-mediated calcium influx and requires TRPV2 in lipids rafts: alteration in macrophages from patients with cystic fibrosis, *Sci. Rep.* 8 (2018) 4310. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22558-5>.
- [201] C. Grebert, F. Becq, C. Vandebrouck, Focus on TRP channels in cystic fibrosis, *Cell Calcium* 81 (2019) 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.05.007>.
- [202] G. Pietrocola, C.R. Arciola, S. Rindi, A. Di Poto, A. Missineo, L. Montanaro, P. Speziale, Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Artif. Organs* 34 (2011) 799–810. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000030>.
- [203] M. Sato, H. Sano, D. Iwaki, K. Kudo, M. Konishi, H. Takahashi, T. Takahashi, H. Imaizumi, Y. Asai, Y. Kuroki, Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A, *J. Immunol.* 171 (2003) 417–425. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.417>.
- [204] A. Magenau, C. Benzing, N. Proschogo, A.S. Don, L. Hejazi, D. Karunakaran, W. Jessup, K. Gaus, Phagocytosis of IgG-coated polystyrene beads by macrophages induces and requires high membrane order, *Traffic* 12 (2011) 1730–1743. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01272.x>.
- [205] D. Bobkov, S. Semenova, Impact of lipid rafts on transient receptor potential channel activities, *J. Cell. Physiol.* (2022). <https://doi.org/10.1002/jcp.30679>.
- [206] É. Sághy, É. Szőke, M. Payrits, Z. Helyes, R. Börzsei, J. Erostyák, T.Z. Jánosi, G. Sétáló, J. Szolcsányi, Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca<sup>2+</sup>-gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals, *Pharmacol. Res.* 100 (2015) 101–116. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.028>.

- [207] B. Svobodova, K. Groschner, Mechanisms of lipid regulation and lipid gating in TRPC channels, *Cell Calcium* 59 (2016) 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.03.012>.
- [208] R.A. Brundage, K.E. Fogarty, R.A. Tuft, F.S. Fay, Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils, *Science* 254 (1991) 703–706. <https://doi.org/10.1126/science.1948048>.
- [209] J.T. Lock, I. Parker, I.F. Smith, A comparison of fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicators for imaging local Ca<sup>2+</sup> signals in cultured cells, *Cell Calcium* 58 (2015) 638–648. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.10.003>.
- [210] R. Levin, S. Grinstein, J. Canton, The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution, *Immunol. Rev.* 273 (2016) 156–179. <https://doi.org/10.1111/imr.12439>.
- [211] F.J. Morera, J. Saravia, J.P. Pontigo, L. Vargas-Chacoff, G.F. Contreras, A. Pupo, Y. Lorenzo, K. Castillo, C. Tilegenova, L.G. Cuello, C. Gonzalez, Voltage-dependent BK and Hv1 channels expressed in non-excitable tissues: New therapeutics opportunities as targets in human diseases, *Pharmacol. Res.* 101 (2015) 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.011>.
- [212] X. Sun, M. Xu, Q. Cao, P. Huang, X. Zhu, X.-P. Dong, A lysosomal K<sup>+</sup> channel regulates large particle phagocytosis by facilitating lysosome Ca<sup>2+</sup> release, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1038. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57874-2>.
- [213] H. Masubuchi, M. Ueno, T. Maeno, K. Yamaguchi, K. Hara, H. Sunaga, H. Matsui, M. Nagasawa, I. Kojima, Y. Iwata, S. Wakabayashi, M. Kurabayashi, Reduced transient receptor potential vanilloid 2 expression in alveolar macrophages causes COPD in mice through impaired phagocytic activity, *BMC Pulm. Med.* 19 (2019) 70. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0821-y>.
- [214] H. Turner, K.A. del Carmen, A. Stokes, Link between TRPV channels and mast cell function, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2007) 457–471. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7\\_27](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7_27).
- [215] S. Tanaka, K. Furuta, Roles of IgE and Histamine in Mast Cell Maturation, *Cells* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/cells10082170>.
- [216] S. Kumar, A.K. Verma, M. Das, P.D. Dwivedi, Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy, *Int. Immunopharmacol.* 13 (2012) 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.05.018>.
- [217] M. Huang, X. Wang, B. Xing, H. Yang, Z. Sa, Di Zhang, W. Yao, N. Yin, Y. Xia, G. Ding, Critical roles of TRPV2 channels, histamine H1 and adenosine A1 receptors in the

- initiation of acupoint signals for acupuncture analgesia, *Sci. Rep.* 8 (2018) 6523. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24654-y>.
- [218] E.B. Thangam, E.A. Jemima, H. Singh, M.S. Baig, M. Khan, C.B. Mathias, M.K. Church, R. Saluja, The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1873. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01873>.
- [219] K. Tatemoto, Y. Nozaki, R. Tsuda, S. Konno, K. Tomura, M. Furuno, H. Ogasawara, K. Edamura, H. Takagi, H. Iwamura, M. Noguchi, T. Naito, Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349 (2006) 1322–1328. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.177>.
- [220] H. Subramanian, K. Gupta, H. Ali, Roles of Mas-related G protein-coupled receptor X2 on mast cell-mediated host defense, pseudoallergic drug reactions, and chronic inflammatory diseases, *J. Allergy Clin. Immunol.* 138 (2016) 700–710. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.051>.
- [221] C. Muller, P. Morales, P.H. Reggio, Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels, *Front. Mol. Neurosci.* 11 (2018) 487. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00487>.
- [222] M. Orecchioni, Y. Ghosheh, A.B. Pramod, K. Ley, Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>.
- [223] S.-Y. Kim, J.-G. Lee, W.-S. Cho, K.-H. Cho, J. Sakong, J.-R. Kim, B.-R. Chin, S.-H. Baek, Role of NADPH oxidase-2 in lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase expression and cell migration, *Immunol. Cell Biol.* 88 (2010) 197–204. <https://doi.org/10.1038/icb.2009.87>.
- [224] Y.-C. Lu, W.-C. Yeh, P.S. Ohashi, LPS/TLR4 signal transduction pathway, *Cytokine* 42 (2008) 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>.
- [225] S. Gordon, Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response, *Cell* 111 (2002) 927–930. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01201-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01201-1).
- [226] M. Entin-Meer, L. Cohen, E. Hertzberg-Bigelman, R. Levy, J. Ben-Shoshan, G. Keren, TRPV2 knockout mice demonstrate an improved cardiac performance following myocardial infarction due to attenuated activity of peri-infarct macrophages, *PLoS One* 12 (2017) e0177132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177132>.



- [227] J.-Y.K. Tano, R.H. Lee, G. Vazquez, Macrophage function in atherosclerosis: potential roles of TRP channels, *Channels (Austin)* 6 (2012) 141–148. <https://doi.org/10.4161/chan.20292>.
- [228] E.B. Thangam, E.A. Jemima, H. Singh, M.S. Baig, M. Khan, C.B. Mathias, M.K. Church, R. Saluja, The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1873. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01873>.
- [229] E.A. Jemima, A. Prema, E.B. Thangam, Functional characterization of histamine H4 receptor on human mast cells, *Mol. Immunol.* 62 (2014) 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.05.007>.
- [230] N.L. Mathy, W. Scheuer, M. Lanzendörfer, K. Honold, D. Ambrosius, S. Norley, R. Kurth, Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes, *Immunology* 100 (2000) 63–69. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00997.x>.

## **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....

Datum

.....

Unterschrift

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Name: Rick Paul Raudszus  
Geburt: 15.07.1993 in Schwedt/Oder  
E-Mail: n. a.  
Telefon: n. a.

## **Akademischer & beruflicher Werdegang**

n. a.

## **Wissenschaftler Werdegang**

n. a.

## **Sprachkenntnisse**

n. a.

# Liste der Publikationen

## Publikationen

Raudszus R, Nowotny R, Gertzen CGW, Schöler A, Krizsan A, Gockel I, Kalwa H, Gohlke H, Thieme R, Hansen FK. Fluorescent analogs of peptoid-based HDAC inhibitors: Synthesis, biological activity and cellular uptake kinetics. *Bioorg Med Chem*. 2019 Oct 1;27(19):115039.

Bluhm Y, Raudszus R, Wagner A, Urban N, Schaefer M, Hill K. Valdecoxib blocks rat TRPV2 channels. *Eur J Pharmacol*. 2022 Jan;15;915:174702.

Raudszus R, Urban N, Deckers A, Gräßle S, Vanderheiden S, Jung N, Bräse S, Schaefer M, Hill K. Pharmacological inhibition of TRPV2 attenuates phagocytosis and lipopolysaccharide-induced migration of primary macrophages. Eingereicht bei *British Journal of Pharmacology*.

Raudszus R, Schaefer M, Hill K. Superadditive combination of cannabidiol and probenecid induces TRPV2-mediated mast cell degranulation. In Vorbereitung.

## Vorträge

Raudszus R, Schaefer M, Hill K. The novel TRPV2-selective blocker X10056 inhibits phagocytosis and lipopolysaccharide-induced migration of primary macrophages. 6<sup>th</sup> German Pharm-Tox Summit and 87<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT), Bonn, 03/2021. **Young Scientist Award 2021**

## Poster

Raudszus R, Nowotny R, Gertzen CGW, Schöler A, Gockel I, Gohlke H, Thieme R, Hansen FK. Synthese und Charakterisierung von neuartigen fluoreszierenden Histon-Deacetylase-Inhibitoren. 17. Sächsischer Apothekertag, Chemnitz, 04/2019. **Diplomandenförderpreis**

Raudszus R, Schaefer M, Hill K. The dithiolane X10056 inhibits TRPV2 channels endogenously expressed in primary macrophages. 16<sup>th</sup> Research Festival for Life Sciences 2020, Leipzig, 01/2020.

Raudszus R, Deckers A, Bräse S, Schaefer M, Hill K. The dithiolane X10056 inhibits TRPV2 channels endogenously expressed in primary Macrophages. 5<sup>th</sup> German Pharm-Tox Summit and 86<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT), Leipzig, 03/2020. **Best Poster Award 2020**

Raudszus R, Schaefer M, Hill K. Superadditive TRPV2 activation by cannabidiol and probenecid induces mast cell degranulation. 7<sup>th</sup> German Pharm-Tox Summit and 88<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT), Bonn, 03/2022.

# Danksagung

n. a.