

Die Rolle von TRPV4 in der frühen Phase der Entstehung von COPD

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Jo Meister
aus Hannover

Gießen, 2026

Aus dem Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Cardio Pulmonary Institute (CPI)
Medizinische Klinik und Poliklinik II

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Gutachter: Prof. Dr. Khodr Tello

Tag der Disputation: 17.06.2026

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das JLU TRAINEE Programm des Fachbereichs
Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. COPD	1
1.1.1. Definition und Epidemiologie	1
1.1.2. Symptome	2
1.1.3. Komplikationen und Komorbiditäten der COPD	2
1.1.4. Diagnostik und Klassifikation	3
1.1.5. Risikofaktoren	5
1.1.6. Therapie und Prognose	7
1.1.6.1. Prognose	8
1.1.7. Pathophysiologie	9
1.1.7.1. Immunreaktion	9
1.1.7.2. Oxidativer Stress	11
1.1.7.3. Antiproteasen/Proteasen	12
1.2. Ca²⁺ Homöostase und TRP-Kanäle	13
1.2.1. Ca ²⁺ Homöostase in COPD	13
1.2.2. TRP-Superfamilie	14
1.2.3. TRPV4	14
1.2.3.1. TRPV4 in COPD	16
1.3. Zielsetzung dieser Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Material	18
2.2. Versuchstiere	29
2.2.1. B6.129X1-Trpv4 ^{tm1Ms/MszRbr}	29
2.2.2. Allgemeine Versuchstierhaltung	29
2.2.3. Versuchsaufbau der Rauchexposition	29
2.2.4. Zigarettenrauchexposition	30
2.2.5. Tierversuchsgenehmigung	31
2.3. Methoden	32

2.3.1. Mikrochip	32
2.3.2. Physiologische Messungen.....	32
2.3.2.1. Echokardiografie und μ CT-Analyse	32
2.3.2.2. Hämodynamik und Lungenfunktionsmessung	33
2.3.2.3. Organentnahme und Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	34
2.3.2.4. Blutgasanalyse und Plasmagewinnung	35
2.3.3. Histologische Aufbereitung und Untersuchung	36
2.3.3.1. Water Displacement Messung und Schneiden der linken Lunge in Agarose	36
2.3.3.2. Dehydrierung, Einbetten und Schneiden.....	37
2.3.3.3. Alveolare Morphometrie	39
2.3.3.4. Vaskuläre Histologie	40
2.3.3.5. Stereologie.....	43
2.4. Statistik.....	46
3. Ergebnisse	47
3.1. Kardiale und vaskuläre Veränderungen von TRPV4 WT und TRPV4 ^{-/-} Mäusen	47
3.2. Alveoläre Veränderungen von TRPV4 WT und TRPV4 ^{-/-} Mäusen	51
3.2.1. <i>in-vivo</i> Charakterisierung nach Rauchexposition	51
3.2.2. Einfluss von TRPV4 auf die Veränderungen des Lungenparenchyms nach Rauchexposition	55
4. Diskussion.....	59
4.1. Wahl von TRPV4 als möglicher Faktor der COPD-Entstehung	59
4.2. Wahl des Tiermodells.....	60
4.3. Deletion von TRPV4 führt zu einer verfrühten Ausprägung eines Emphysems im Vergleich zu WT-Mäusen	63
4.4. Ausblick.....	67
5. Zusammenfassung	68
6. Summary	70

7. Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis	72
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	72
7.2. Abbildungsverzeichnis	75
7.3. Tabellenverzeichnis	76
8. Literaturverzeichnis	77
9. Anhang	88
10. Erklärung zur Dissertation	89
11. Danksagung.....	90
12. Tabellarischer Lebenslauf	91

1. Einleitung

1.1. COPD

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Obstruktive Lungenerkrankungen sind charakterisiert durch einen verminderten expiratorischen Atemfluss. Gründe hierfür können intra- sowie extrathorakale Atemflussbehinderungen sein. Zu den intrathorakalen Gründen zählen die weltweit verbreiteten Erkrankungen *Asthma bronchiale* sowie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD). Diese beiden Erkrankungen unterscheiden sich in ihrer zugrundeliegenden Pathogenese sowie der Reversibilität der Obstruktion [40].

Die COPD stellt dabei ein Mischbild aus der Obstruktion der Atemwege aufgrund von chronischer Bronchitis und dem Verlust funktioneller Gasaustauschfläche (Emphysem) bei erhöhter Lungendehnbarkeit (*compliance*) dar [12]. Das Emphysem wird auf eine chronische Entzündung der kleinen Bronchien und den Verlust elastischer Fasern zurückgeführt [41]. Ebenfalls Teil des klinischen Bildes der COPD ist die chronische Bronchitis [103]. Als chronische Bronchitis wird eine anhaltende Husten- und Auswurf-Symptomatik für mindestens drei aufeinanderfolgende Monate pro Jahr über mindestens zwei aufeinanderfolgenden Jahren definiert [40].

Das Programm *Burden of Obstructive Lung Disease* (BOLD) hat seit 1990 standardisierte Fragebögen und apparative Diagnostik vereint, um die Prävalenz sowie die sozioökonomischen und umweltlichen Folgen von obstruktiven Lungenerkrankungen zu ergründen. Diese Daten wurden bereits von 29 Ländern erfasst [17]. Gemäß einer Analyse von 123 Studien ergab sich für 2015 eine weltweite Prävalenz der COPD von 14.3% für Männer und 7.6% für Frauen [1].

Die mit COPD-assoziierte Mortalität lag im Jahr 2019 weltweit bei 3,2 Millionen von 55 Millionen Todesfällen. Damit ist eine COPD die dritthäufigste globale Todesursache nach ischämischen Herzerkrankungen und zerebrovaskulären Erkrankungen [128]. Die *World Health Organization* (WHO) prognostiziert einen Anstieg der auf COPD zurückzuführenden, weltweiten, prozentualen Todesfälle von 5,3% (2016) auf 6,9% (2060). Gründe hierfür sind u. a. die steigende Prävalenz von Zigarettenkonsum in

Entwicklungsländern oder Exposition gegenüber z. B. Verbrennungsabgasen neben Autobahnen sowie die alternde Population in den Industrieländern [127, 93].

1.1.2. Symptome

Klinisch äußert sich eine ausgeprägte COPD durch Atemnot, Husten und Auswurf (sog. AHA-Symptomatik). Wichtigstes Leitsymptom ist die Atemnot (Dyspnoe), welche sich initial als Belastungsdyspnoe präsentiert und im Verlauf zu einer dauerhaften subjektiven Atemnot entwickelt [49]. Eine der frühen Beschwerden ist häufig eine chronische Bronchitis mit Symptomen wie Husten, der meistens in den Morgenstunden produktiv ist. Die zunächst noch reversible Bronchitis wandelt sich durch dauerhafte Inflammation und Umbauprozesse nach einiger Zeit in die nicht-reversible Form um [40].

Neben der Atemnot können zentrale sowie periphere Zyanosezeichen Hinweise auf eine COPD sein. Aufgrund des Emphysems kann eine Überblähung des Brustkorbes, ein sog. Fassthorax beobachtet werden [29]. Weiter äußert sich die COPD zudem mit systemischen Symptomen wie Gewichtsverlust, Kraftminderung der Atem- sowie Skelettmuskulatur und systemischer Inflammation [3].

Eine akute Verschlechterung der chronischen respiratorischen Insuffizienz stellt die akute Exazerbation der COPD (AECOPD) dar. Hierbei handelt es sich um einen, meist Infektbedingten, medizinischen Notfall, welcher sofortiger Behandlung bedarf. Eine ausgeprägte Zyanose und starke Atemnot kennzeichnen klinisch eine AECOPD [40, 17]. Meist erfolgt die ärztliche Vorstellung von COPD-Patienten¹ erst in einem fortgeschrittenen Stadium bei vorangegangener Exazerbation [40].

1.1.3. Komplikationen und Komorbiditäten der COPD

Bei der COPD kommt es zu verschiedenen Komplikationen, z. B. die AECOPD und das *Cor pulmonale*. Aber auch eine chronische respiratorische Insuffizienz mit ggf. respiratorischer Azidose sowie eine pulmonale Kachexie als Ausdruck der Grunderkrankung mit verändertem Metabolismus und verringerter körperlicher Aktivität aufgrund pulmonaler Leistungsrestriktion gehören zu den Komplikationen der COPD [91, 123].

Die chronische Entzündung der Atemwege erhöht die Anfälligkeit für eine bakterielle Infektion in COPD-Patienten. Hierbei wurde eine Infektion mit *Haemophilus influenzae*,

¹ Aufgrund der besseren Lesbarkeit wird im Text das generische Maskulin verwendet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

Moraxella catarrhalis oder *Streptococcus pneumoniae* bei bestehender COPD mit einem erhöhten Risiko einer Exazerbation in Verbindung gebracht [99]. Ebenso stellt eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* ein starkes Risiko einer Exazerbation dar [27].

Eine wichtige Komorbidität der COPD ist die Pulmonale Hypertonie (PH). Die PH wird anhand der Ätiologie in fünf Gruppen eingeteilt. In Folge von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie wird die PH aufgrund von COPD damit der Gruppe 3 zugeordnet. Andere Gruppen für die PH sind idiopathisch (1), aufgrund von Linksherzerkrankungen (2), chronisch thromboembolisch (4) und PH mit unklarer Genese (5) [32]. Die PH tritt bei ca. 30 bis 70% aller COPD-Patienten auf [96] und wird durch einen erhöhten mittleren Druck in den Pulmonalarterien (*mean pulmonary arterial pressure*, mPAP) von über 20 mmHg in Ruhe definiert [42]. COPD-Patienten manifestieren hierbei meist eine moderate PH mit einem mPAP zwischen 25 und 30 mmHg. Betroffen von dieser moderaten PH sind gehäuft Patienten mit starker COPD [135]. Ein geringer Anteil (<5%) der COPD-Patienten zeigen eine starke Erhöhung des mPAP auf über 35 bis 40 mmHg [67]. Eine Erhöhung des mittleren Drucks im pulmonalen Kreislauf erhöht die zu leistende mechanische Arbeit des rechten Herzens. Eine Druckbelastung führt im Herzmuskel zu konzentrischer Hypertrophie. Diese äußert sich mit einer Zunahme der Dicke der rechten Ventrikelwand mit Lumenverengung [77]. Dies kann zu Herzrhythmusstörungen aber auch einem erhöhten Infarktrisiko führen [85]. Ursächlich für den erhöhten Druck im Lungenkreislauf ist ein Umbau der pulmonalen Gefäße. Hierbei wird eine verstärkte Muskularisierung der Gefäßmedia beobachtet, welche unter anderem aufgrund von chronischer Hypoxie und anhaltender Vasokonstriktion induziert wird [116, 106]. Die Ursachen für diesen Umbau in PH assoziiert mit COPD sind noch unklar. Die Hypoxie wird als Auslöser diskutiert, da durch die reduzierte Gasaustauschfläche aufgrund des entzündlichen Abbaus der Alveolen eine verminderten Oxygenierung des Blutes vorliegt [18]. Die Hypoxie als alleinige Ursache der PH in COPD-Patienten ist allerdings umstritten, da in mehreren Modellen gezeigt wurde, dass bei Tabakrauchexposition eine PH bereits vor dem Emphysem beobachtet werden kann [129, 96].

1.1.4. Diagnostik und Klassifikation

Zur Diagnostik gehören neben der Erfassung der Symptome gezielte apparative Untersuchungen und die sorgfältige Anamneseerhebung. Zur Anamnese gehört die Beurteilung von Risikofaktoren, insbesondere das Rauchverhalten, die

Krankengeschichte sowie die Erfassung der Familien-, Sozial- und Medikamentenanamnese. Bei der körperlichen Untersuchung können Anzeichen wie Zyanosen, Ödeme oder eine Überblähung hinweisend für eine COPD sein [40, 123]. Aufgrund des Verlustes von Lungengewebe ist häufig ein hypersonorer Klopfschall und ein tiefstehendes Zwerchfell auffallend. Auch auskultatorische Atemgeräusche dienen der Diagnosestellung. Ein sogenanntes „Giemen“ gilt als Zeichen einer expiratorischen Verengung der Atemwege und weist auf obstruktive Erkrankungen wie *Asthma bronchiale* oder COPD hin [40, 4, 123]. Laborchemisch können Entzündungsmarker wie c-reaktives Protein (CRP) oder der Proteaseninhibitor *alpha-1-antitrypsin* zur Diagnosestellung hinzugezogen werden. Zur apparativen Diagnostik gehören u. a. Pulsoxymetrie, Blutgasanalyse und Röntgen-Thorax. Hierbei können eine Hypoxie, Hyperkapnie und ein tiefstehendes Zwerchfell auffällig sein [17]. Aufgrund der starken Assoziation von COPD mit dem Rauchverhalten sind erhöhte Werte von Kohlenstoffmonoxid in der Ausatemluft und ein gesteigerter Anteil an Carboxyhämoglobin im Blut häufige Nebenefunde [50]. Elementares Diagnostikum ist die Lungenfunktionsmessung. Bei der Lungenfunktion werden verschiedene Parameter wie Vitalkapazität (*vital capacity*, VC), *compliance* und *resistance* bestimmt. Die forcierte Expiration in einer Sekunde (*forced expiratory volume in one second*, FEV₁) und das Verhältnis von FEV₁ zu VC (Tiffeneau-Index) sind bei COPD erniedrigt, welches durch die Verlegung der Atemwege während der Expiration zustande kommt. Das Residualvolumen ist hierbei erhöht. Die Abgrenzung gegenüber *Asthma bronchiale* wird mittels Bronchospasmolyse-Tests durchgeführt. Hierfür wird unter Bronchospasmolyse, mit z. B. Salbutamol, nochmals die FEV₁ gemessen. Handelt es sich um eine asthmatische Erkrankung, sollten steigende Werte für den Tiffeneau-Index zu beobachten sein. Bei COPD sind normalerweise keine Steigerungen über ca. 10% unter Bronchospasmolyse zu erwarten [40, 17, 4, 123].

Bei der Klassifikation der COPD hat die alleinige Untersuchung mittels Spirometrie mittlerweile keinen hohen Stellenwert mehr, da eine hohe falsch-negativ-Rate bei jungen Patienten und eine hohe falsch-positiv-Rate für ältere Patienten die tatsächliche Diagnose überdecken können [47, 17]. Bei der Einteilung nach der *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) werden neben der Spirometrie auch die subjektiven Symptombeschwerden und die Anzahl der vorausgegangenen Exazerbationen berücksichtigt. Basis für die Einteilung in die Kategorien GOLD A, B und E sind zwei

Fragebögen, die *modified Medical Research Council* Dyspnoe-Skala (mMRC) und der *COPD assessment test* (CAT). Bei der mMRC stuft der Patient seine Beschwerden in fünf Schweregrade ein. Der Wert 0 steht hierbei für Atemnot nur unter stärkster körperlicher Aktivität und der Wert 4 für Beschwerden bei kleinster körperlicher Anstrengung oder in Ruhe. Der CAT dagegen besteht aus acht Fragen, die sich ebenso auf den Schweregrad der Beschwerden beziehen. Entsprechend der Werte erfolgt eine Zuordnung auf GOLD A, B oder E [121, 17]. (Tabelle 1)

Tabelle 1 Einordnung in GOLD A, B und E nach Symptomatik und Exazerbationen

GOLD	Charakteristika	AECOPD/Jahr	mMRC	CAT
A	Wenig symptomatisch	≤1 ambulante Behandlung	<2	<10
B	Stark symptomatisch	≤1 ambulante Behandlung	≥2	≥10
E	Unabhängig von Symptomen	≥2 ambulante Behandlung ≥1 stationäre Behandlung		

Verändert nach [17]

AECOPD: Akute Exazerbation der COPD mMRC: modified Medical Research Council, CAT: COPD assessment test.

1.1.5. Risikofaktoren

Zu den Risikofaktoren, die die Entstehung, Entwicklung oder Exazerbation von obstruktiven Lungenerkrankungen fördern, gehören unter anderem Tabakrauch, Luftverschmutzung, genetische und frühkindliche Faktoren sowie Infekte der Atemwege [23, 60, 109, 98].

Die Tabakrauch-Exposition ist einer der größten Risikofaktoren für die Entwicklung einer COPD [23]. Das Passiv-Rauchen stellt ebenfalls ein Risiko dar, an COPD zu erkranken [134]. Grundsätzlich gibt es unterschiedliche Methoden, Tabak zu konsumieren, hierzu zählen Kau- und Schnupftabak sowie die Verbrennung von Tabak in Bidis, Kreteks, Zigarren und Zigaretten. Die Verbrennung von Tabak stellt hierbei die am häufigsten angewandte Form des Konsums dar [118]. Bei der Verbrennung von Tabak, z. B. in einer Zigarette, enthält der Rauch ca. 7500 verschiedene chemische Verbindungen, von denen viele karzinogen sind bzw. unter Verbrennung karzinogen werden. Das entstehende Aerosol enthält, neben den Rauch- und Verbrennungspartikeln, hauptsächlich Stickstoff, Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid und Kohlenstoffmonoxid [117]. Ebenfalls wichtiger Bestandteil und einer der Gründe für die körperliche als auch psychische Abhängigkeit von Tabakkonsum ist das Nikotin [118]. Nikotin bindet im Körper an nikotinerge

Acetylcholinrezeptoren (nAChR), was zu einer zentralen Aktivierung mit Erhöhung des Sympathikotonus führt [77]. Werden nikotinhaltige Genussmittel länger konsumiert, erhöht sich die nAChR Rezeptordichte, welches zur körperlichen Abhängigkeit und Entzugssymptomen führen kann [77, 95].

Ein Maß der Quantifizierung von Zigarettenkonsum ist die Einheit *Pack-Years* (py). Hierbei wird ein Jahr, in welchem jeden Tag eine Packung Zigaretten geraucht wurde, als 1 py gezählt. Py können als Risikoabschätzung für die Entstehung, aber auch als Prognose einer bestehenden COPD genutzt werden. Allerdings scheint die Dauer des Zigarettenkonsums eine bessere Einschätzung des Krankheitsverlaufs zu ermöglichen als die Maße py oder Zigaretten pro Tag [15].

Neben Tabakrauch ist das Inhalieren von toxischen Substanzen bei der Produktion von Biokraftstoff oder Dieselpartikeln von Verbrennungsmotoren stark assoziiert mit COPD. Hierzu zählen vor allem große Mengen von Stickstoffdioxid, Stickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid [52, 60]. Diese Risikofaktoren werden in der wachsenden Bevölkerung mit erhöhtem Mobilitätsanspruch immer wichtiger. Neben der Entstehung sind diese inhalativen Noxen auch für den Verlauf einer bestehenden COPD entscheidend. Es konnte gezeigt werden, dass der Therapieerfolg für Tabakraucher mit COPD, die das Rauchen eingestellt haben, aber weiterhin Luftverschmutzung in Form von Gasen, Dämpfen und Rauch ausgesetzt waren, geringer war als für jene, die keiner Luftverschmutzung ausgesetzt waren [78].

Auch genetische Komponenten spielen in der Ätiologie der COPD eine Rolle. So führt ein *alpha-1-antitrypsin* Defizit zu einer Verschiebung des Protease/Antiproteasen Quotienten und somit zu einem erhöhten Risiko an einer Leberzirrhose sowie COPD zu erkranken [109]. Darüber hinaus konnte eine Assoziation von verschiedenen Polymorphismen z. B. des Vitamin D-bindenden Proteins [92] und dem *Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4* (TRPV4) [136] zu COPD festgestellt werden.

Weitere Risikofaktoren sind Infektionen der Atemwege während der Kindheit und Fehlentwicklungen während der Geburt [11]. Zudem konnte ein moderat-linearer Zusammenhang zwischen Gewicht bei Geburt und FEV₁ gezeigt werden [54].

1.1.6. Therapie und Prognose

Die Therapie einer COPD lässt sich in nichtmedikamentös und medikamentös einteilen. Die nichtmedikamentöse Therapie wird Patienten aller GOLD-Klassifikationen empfohlen und besteht in der Reduzierung der Exposition gegenüber jeglichen Noxen, insbesondere das Beenden des Tabakkonsums. Außerdem sollte die Identifikation von weiteren Risikofaktoren an Arbeitsplätzen sowie der persönlichen Umgebung erfolgen [123]. Eine regelmäßige Impfung, entsprechend der lokalen und aktuellen Empfehlungen, besonders gegenüber Pneumokokken, Influenzaviren und SARS-CoV-2 mindert das Risiko einer Exazerbation oder anderer Komplikationen [17, 4]. Mehrere Formen der Patientenschulung in Gebieten der Atemgymnastik, sogenannter „Lungensport“, und körperlicher Fitness sollen die kardiopulmonale Leistung erhöhen und einer respiratorischen Insuffizienz entgegenwirken [40, 123].

Mit der medikamentösen Therapie werden COPD-Patienten behandelt, deren Symptome mit nichtmedikamentösen Maßnahmen nicht ausreichend kontrolliert werden können. Die Wahl der Wirkstoffe richten sich nach der GOLD-Klassifikation [17]. Über Aktivierung des Sympathikus bzw. Inhibition des Parasympathikus durch z. B. die Blockade an cholinergen Rezeptoren wird eine Bronchodilatation verursacht, um einen besseren Atemfluss zu gewähren [77]. Unterschieden wird zwischen kurzwirksamen Beta2-Agonisten (*short-acting beta2-agonist*, SABA) und langwirksamen Beta2-Agonisten (*long-acting beta2-agonist*, LABA), sowie kurzwirksamen Muskarin-Antagonisten (*short-acting muscarinic antagonist*, SAMA) und langwirksamen Muskarin-Antagonisten (*long-acting muscarinic antagonists*, LAMA) (Tabelle 2). Zunächst wird die COPD mit LAMA therapiert und ggf. mit LABA kombiniert. Der Einsatz von SAMA und SABA wurde nach neuster GOLD-Empfehlung weitestgehend zurückgestellt. Ab GOLD E kann zusätzlich eine Therapie mit inhalativen Corticosteroiden (ICS) erfolgen. Bei schwerer COPD, die eine weitere Therapieeskalation erfordert, besteht die Option der Phosphodiesterase-4-Hemmern (PDE4-Hemmer) zur Minderung der Symptome und der Progression [17, 4]. Inhalative Corticosteroide und PDE4-Hemmer wirken anti-inflammatorisch und sollen das Entzündungsgeschehen in der Lunge reduzieren [123, 40]. Theophyllin wird aufgrund der geringen therapeutischen Breite und zahlreicher Nebenwirkungen nicht mehr in der akuten Therapie empfohlen [124]. Das genaue Schema der Therapie kann Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2 Therapieschema nach GOLD A, B und E

GOLD	Therapie
A	Ggf. LAMA oder LABA
B	LAMA und LABA
E	LAMA und LABA ICS bei Eosinophilie ($>300/\mu\text{l}$)

Verändert nach [17]

LAMA: long-acting muscarinic-antagonist, LABA: long-acting beta2-agonist, ICS: inhalative Corticosteroide

Wenn die nichtmedikamentösen als auch medikamentösen Therapieoptionen ausgeschöpft sind und die Symptome der Patienten weiterhin persistieren oder schlechter werden, stehen noch mehrere interventionelle oder operative Möglichkeiten zur Verfügung [17]. Hierbei muss zunächst das grundsätzliche Risiko einer großen Operation mit Vollnarkose und ggf. notwendiger intensivmedizinischer Betreuung abgewogen werden. Invasive Verfahren sind hier z. B. das Einsetzen von Ventilen, die die Abatmung erleichtern und weniger Luft im Thorax einschließen sollen, oder die Entfernung von bullösen Lungenanteilen über eine atypische Keilresektion meist aus dem apikalen Oberlappen [40]. Die Ultima Ratio stellt weiterhin die Lungentransplantation dar. Diese kann als Einzel- sowie Doppel-Lungentransplantation erfolgen. Die Indikation und Eignung eines Patienten zur Transplantation hängt zunächst davon ab, ob alle weiteren Therapieoptionen ausgeschöpft sind. Weiterhin sind andere Komorbiditäten, Tabakabstinenz sowie sozioökonomische und motivationale Eigenschaften des Patienten ausschlaggebend über die Eignung und den Erfolg einer Transplantation [17, 70].

1.1.6.1. Prognose

Die Diagnose COPD wird bei vielen Patienten erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt. Die Anwendung von Sauerstoff und der Verzicht auf Rauchen bzw. Feinstaubbelastung können die Lebenserwartung etwas verlängern. Trotzdem gibt es einige Faktoren, die den Verlauf negativ beeinflussen. Dazu gehören unter anderem häufige Exazerbationen, chronische Hyperkapnie und hohes Alter. Die COPD ist bis heute nicht kausal therapierbar und die Letalität einer AECOPD liegt bei etwa 10% (Stand 2020) [40].

1.1.7. Pathophysiologie

Die respiratorische Insuffizienz bei COPD-Patienten ist Ausdruck einer chronisch-entzündlichen Reaktion auf exogene Substanzen, wie Tabakrauch oder andere inhalative Partikel. Diese Reaktion kann allerdings endogen auch aufgrund von Proteasenüberfluss oder oxidativem Stress hervorgerufen werden. Durch den stetigen Umbau und Verlust elastischer Fasern kommt es in den Bronchiolen zu einem Kollaps und somit zu einer expiratorischen Atemflussbehinderung [121]. Die chronische Entzündung, verursacht durch z. B. Zigarettenrauch [130], führt zur Expression von proinflammatorischen Cytokinen und infolge gesteigerter Makrophagenaktivität zum Verlust elastischer Fasern [51]. Dieser Verlust bildet sich klinisch als Emphysem ab [100]. Die sinkenden elastischen Rückstellkräfte des Lungengewebes führen zu gesteigertem Residualvolumen. Die hierbei im Thorax verbleibende Luft nimmt nur noch zu geringen Maßen am Gasaustausch teil und führt so zu vermehrter Totraumventilation mit klinischen Symptomen wie Atemnot und geringerer Belastbarkeit [40].

Zusätzlich wurden Veränderungen der Körpermassenzusammensetzung sowie genereller Gewichtsverlust bei Patienten mit COPD beobachtet. Hiervon scheint der Verlust der Muskelmasse verhältnismäßig am stärksten betroffen zu sein [94]. Mögliche Ursache könnte eine erhöhte basale metabolische Rate bei gleichbleibender kalorischer Zufuhr sein. Gründe für einen erhöhten Energiebedarf sind anhaltende inflammatorische Reaktionen im Körper, ein erhöhter Einsatz und Anstrengung von Atem- sowie Atemhilfsmuskulatur, aber auch der durch Dyspnoe entstehende Stress bzw. die damit einhergehende muskuläre Anspannung. Der natürliche Alterungsprozess, endokrinologische Gründe sowie Veränderungen im Lebensstil werden als weitere Ursachen der veränderten Körpermassenzusammensetzung diskutiert [13].

1.1.7.1. Immunreaktion

Das menschliche Immunsystem hat die Aufgabe, den Körper vor Fremdmaterial- und Organismen zu schützen, und besteht aus einer adaptiven sowie einer angeborenen Immunantwort. Gleichzeitig lässt sich eine Immunantwort in eine zelluläre (z. B. T-Zellen) und eine humorale Antwort (z. B. die Produktion von Antikörpern) einteilen. Entscheidend hierbei ist eine adäquate Reaktion ohne Destruktion von körpereigenem Gewebe mit ausreichender z. B. antibakterieller Wirkung. Zur Feinregulation des Immunsystems dienen eine weite Kaskade an Immun- und Chemotaxinen sowie Cytokine als auch intrazelluläre Mechanismen der Leukozyten [62].

Makrophagen bilden einen großen Teil des phagozytären Systems im Menschen, welches über Phagozytose von Fremdkörpern eine adäquate Immunantwort auslöst. Makrophagen machen ca. 6% der gesamten Leukozyten aus und sind im Blut und im Gewebe der Organe verteilt. Sie interagieren mit Granulozyten sowie Lymphozyten und sind somit Teil der adaptiven als auch angeborenen Immunantwort. Die Aktivierung durch andere Leukozyten oder der Kontakt mit Antigenen führt zur Freisetzung von Cytokinen und fördern die Entstehung einer lokalen Entzündung [62]. Im Zusammenhang mit der COPD wurde eine erhöhte Atemflussbehinderung in Lungenbiopsaten mit einer erhöhten Anzahl an Makrophagen im Blut festgestellt [25]. Einige Proteasen, z. B. die *matrix-metalloprotease* (MMP)-9 und *macrophage metalloelastase* (MME), werden von Makrophagen gebildet und können elastische Fasern sowie Basalmembranen des Lungenparenchyms zerstören und auf diese Weise die Dehnbarkeit (*compliance*) der Lunge erhöhen [69, 35, 97]. So ist die basale Expression von MMP-9 in bronchoalveolärer Lavage (BAL) von Emphysepatienten erhöht [30]. Ebenso konnte eine erhöhte Konzentration von MMP-12 in COPD-Patienten gegenüber gesunden Probanden gemessen werden [6]. Zusätzlich produzieren die Makrophagen Protease-Inhibitoren, z. B. *tissue inhibitors of metalloproteinase-1* (TIMP-1), um eine überschießende proteolytische Wirkung zu vermindern. So geht aus Studien hervor, dass TIMP-1 in Gewebeproben von COPD-Patienten gegenüber MMP-9 erniedrigt ist [56]. Dieses Ungleichgewicht führt zur Destruktion des Parenchyms durch eine übermäßige Proteasenaktivität. Auch Interleukine (IL), wie IL-10, inhibieren MMP-9 indirekt durch eine Induktion der Expression von TIMP-1 [53, 59].

Auf zellulärer Ebene sind Granulozyten über Aggravation der lokalen Entzündungsreaktion ebenfalls an der Lungendestruktion beteiligt. 60% aller Granulozyten im menschlichen Körper sind neutrophile Granulozyten (Neutrophile) und Teil der angeborenen Immunantwort. Sie gehören ebenfalls zum phagozytären System und sind mit der Phagozytose von entzündetem Gewebe und Mikroorganismen Teil einer komplexen Immunkaskade. Nach intrazellulärem Einschluss von Gewebe oder Mikroorganismen setzen die Neutrophilen über einen *respiratory burst* reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) frei und tragen hierbei zur lokalen Entzündung bei [8]. Diese lokale Entzündung äußert sich in der Lunge mit Ödembildung, Schwellung der Atemwege und erhöhter Mukusproduktion [2]. Gleichzeitig migrieren weitere Leukozyten an den Ort der Entzündung. Durch *granulocyte colony stimulating*

factor (G-CSF) wird in den Atemwegen die Entwicklung von Granulozyten, speziell von Neutrophilen gefördert [19]. Unter Rauchexposition kommt es zu einer erhöhten Serumkonzentration von G-CSF [113]. So konnte im Sputum von COPD-Patienten eine erhöhte Anzahl an Neutrophilen nachgewiesen werden [10].

Ein weiterer Mechanismus, welcher zur lokalen Entzündung beiträgt, ist die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) über *nitric oxide synthases* (NOS). Die Expression verschiedener Formen dieses Enzyms ist in COPD-Patienten erhöht [46]. Die induzierbare NOS (iNOS) wurde als maßgebender Bestandteil der strukturellen Veränderungen als Reaktion auf Tabakrauch identifiziert. Die Inhibition von iNOS führte zur Wiederherstellung des physiologischen Lungenparenchyms von Zigarettenrauch induzierten Schäden im Mausmodell [96]. Die NOS-Aktivität wird über Zytokine kontrolliert, z. B. bewirkt IL-10 in Makrophagen die Senkung der Aktivität von NOS [20].

1.1.7.2. Oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist definiert als eine Stoffwechsellage mit einem Überangebot an ROS und damit Neigung zur Azidose, Inflammation und Zelluntergang. ROS tragen zur normalen Stoffwechselaktivität bei, sind allerdings in hohen Konzentrationen zytotoxisch. Die Entstehung von ROS durch freie Radikale begünstigt Konformationsänderungen an Proteinen und kann zu genetischen als auch epigenetischen Veränderungen führen. Über Induktion von Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) tragen ROS auch zu einer vermehrten Entzündungsreaktion bei [84]. Ebenso werden durch die Freisetzung von Chemotaxinen weitere Entzündungszellen rekrutiert. Somit spielt oxidativer Stress bei der Zerstörung von Lungengewebe eine wichtige Rolle und ist u. a. an der verstärkten Mukusproduktion beteiligt [2]. Ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien kann zum einen durch exogene Substanzen aber auch durch körpereigene ROS entstehen. Der Rauch einer Zigarette enthält neben ROS auch andere freie Radikale, die zu der Bildung von ROS beitragen [86]. Beteiligt an dem Prozess der endogenen ROS-Produktion ist z. B. das iNOS-System oder die *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH)-Oxidase [119]. Letztere reduziert elementaren Sauerstoff zu Superoxidanionen (O_2^-) und erhöht somit den oxidativen Stress. So zeigen Lungengewebe von Rauchern mit COPD eine erhöhte Expression von iNOS im Vergleich zu gesundem Gewebe [96]. Neben der erhöhten Konzentration von oxidativen Noxen ist

die herabregulierte antioxidative Abwehr ebenfalls entscheidend in der Pathogenese von COPD [86]. Antioxidative Systeme sind körpereigene Moleküle oder Enzyme mit der Funktion, die Zellen vor ROS-induzierten Schäden zu schützen und ROS kontrolliert in einen weniger reaktiven Zustand zu reduzieren. Eines dieser Systeme ist das Glutathion-System. Zigarettenrauch verhindert eine ausreichend antioxidative Wirkung über die Modifikationen am Glutathion-System [104, 88]. Ebenso inhibiert Zigarettenrauch Transkriptionsfaktoren, die Teil des antioxidativen Systems in Alveolarmakrophagen sind [16].

1.1.7.3. Antiproteasen/Proteasen

Das physiologische Gleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen wirkt einem übermäßigen Abbau von Parenchym entgegen. Wird das Gleichgewicht in Richtung der Proteasen verschoben, überwiegt die Proteolyse und es kommt zum Abbau von Gewebe [76]. So kommt es durch Proteasen der Alveolarmakrophagen, z. B. MMP-9, MMP-12 und MME, zum Abbau elastischer Fasern, Verlust der Basalmembranen und Umbau der Extrazellulärmatrix [69, 35, 76]. Der somit entstandene Strukturverlust äußert sich in einem emphysemartigen Umbau der Lunge [76]. Wenn die Produktion der Proteasen-Inhibitoren durch genetische Defekte, Modifikation durch Toxine oder oxidativen Stress gestört ist, kann der proteolytischen Wirkung nicht entgegengewirkt werden. Dies ist z. B. bei *Alpha-1-antitrypsin* der Fall, welches sowohl direkt als auch indirekt viele Proteasen inhibiert (z. B. neutrophile Elastase, Cathepsin G und neutrophilen-Serin-Protease-4) [79]. So stellt die hereditäre *alpha-1-antitrypsin* Defizienz ein erhebliches Risiko eines Emphysems dar. Weitere Inhibitoren der neutrophilen Elastase sind *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI) und Elafin, welche von respiratorischen Epithelzellen produziert werden [115]. Neben den Proteasen und Elastasen spielen auch Kollagenasen eine Rolle bei der Emphysementstehung [31]. So konnte in Mäusen nachgewiesen werden, dass ein Überschuss der humanen Kollagenase (MMP-1) ein spontanes Emphysem hervorrufen kann [21].

1.2. Ca^{2+} Homöostase und TRP-Kanäle

1.2.1. Ca^{2+} Homöostase in COPD

Die Gesamtkonzentration von Kalzium im Blutserum des menschlichen Körpers beträgt ca. 2,2 bis 2,65 mmol/L. Davon liegt die Hälfte ionisiert (Ca^{2+}) vor und ist biologisch aktiv [77]. Intrazellulär beträgt die Ca^{2+} -Konzentration ca. 10^{-7} mol/L. Im Ruhezustand werden Ca^{2+} -Ionen im endoplasmatischen Retikulum sowie den Mitochondrien gespeichert. Unter Stimulation folgen Ca^{2+} -Ionen ihrem Gradienten und strömen durch unselektive oder selektive Ionen-Kanäle ins Zytoplasma [7].

Ein Ungleichgewicht im Ca^{2+} -Haushalts kann Ursache als auch Symptom von verschiedenen Krankheiten sein. So können Hyperkalzämien von über 2,65 mmol/L zu starker Exsikkose, Herzrhythmusstörungen und Pankreatitiden führen [72]. Hypokalzämien können ebenso zu Herzrhythmusstörungen, aber auch zu epileptischen Anfällen und psychischen Veränderungen führen [40].

Auch in der Pathogenese der COPD spielt Kalzium eine Rolle. In einem Rauch-induzierten COPD-Mausmodell konnte ein reduziertes Ca^{2+} -Aktionspotenzial in der Atem- und Skelettmuskulatur festgestellt werden. Die beobachtete muskuläre Dysfunktion könnte die auftretende Schwäche in Atem- sowie Skelettmuskulatur bei COPD-Patienten erklären [90]. Ebenso konnte eine starke Assoziation von Osteoporose, ein pathologischer Verlust mineralisierter Knochensubstanz, und COPD festgestellt werden [55]. Weiterhin konnte in COPD-Patienten eine gesteigerte Expression von Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Ionenkanälen (CLCA) beobachtet werden. Diese Überexpression von CLCA geht mit gesteigerter Mukusproduktion einher [44]. In Epithelzellen von COPD-Patienten und in mit Rauch exponierten Epithelzellen gesunder Kontrollen konnte ein verringerter Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran und ein gestörter Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum beobachtet werden [80].

Die Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentrationen finden hierbei über verschiedene Membranpumpen und Kanäle statt. Zudem gibt es unterschiedliche Möglichkeiten der Aktivierung bzw. Öffnung der Kanäle. Zu den spannungsgesteuerten Kanälen gehört z. B. der Dihydropyridin-Kanal in Muskelzellen [77]. Formen des aktiven Transports sind z. B. ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher oder die *sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium-transporting ATPase* (SERCA) [7]. Der Ryanodinrezeptor gehört zu den ligandengesteuerten Kanälen [77]. Kanäle aus der TRP-Superfamilie stellen eine heterogene Gruppe an Kationenkanälen dar, die ebenfalls durchlässig für Ca^{2+} sind [75].

1.2.2. TRP-Superfamilie

Die TRP-Superfamilie ist eine Gruppe von Kationenkanälen, die an sensorischen und regulatorischen Prozessen beteiligt sind [75]. Die TRP-Kanäle lassen sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in 7 Untergruppen einteilen. Zu diesen Untergruppen gehören *classical*-TRP (TRPC), *vanilloid*-TRP (TRPV), *melastatin*-TRP (TRPM), *no mechanoreceptor C*-TRP (TRPN), *ankyrin*-TRP (TRPA), *mucolipin*-TRP (TRPML) und *Polycystin*-TRP (TRPP) [114]. Ein TRP-Protein besteht aus 6 Transmembrandomänen, wobei sich zwischen der fünften und sechsten Domäne eine Pore-Region befindet, welche am Aufbau der Pore für die Kationen beteiligt ist [26]. Carboxy (C)- und Amino (N)-Terminus sind intrazellulär gelegen [75]. Ein funktioneller Kanal ist aus vier TRP-Proteinen aufgebaut. Neben der Zusammensetzung aus 4 gleichen TRP-Proteinen (Homotetramer) sind auch Heterotetramere mit Zusammensetzungen unterschiedlicher TRP-Proteine zu einem Kanal bekannt [120].

Eine Veränderung der Permeabilität der Kanäle kann durch physikalische und osmotische Reize sowie Veränderungen des pH-Werts und Bindung von Liganden erfolgen [75]. Zudem unterscheidet sich die Aktivierungsform der Kanäle je nach Stoffwechselhaushalt der jeweiligen Zelle. So modulieren Proteininteraktionen und auch Phosphorylierungsgrad die Aktivierungsform der Kanäle. Die genaue Zusammensetzung von heterotetrameren TRP-Kanälen hat ebenfalls Einfluss auf die Aktivierbarkeit und Funktion [120].

1.2.3. TRPV4

Der TRPV4-Kanal gehört zu der Untergruppe der *vanilloiden* TRP-Kanäle. Mit der ursprünglich entdeckten Funktion der Osmoregulation bekam er zunächst den Namen *vanilloid receptor-related osmotically activated channel* (VR-OAC) und wurde später der TRP-Familie zugeordnet [57]. Das TRPV4-Gen wird im Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 12 an Position 24.1 kodiert [22].

Der membrangebundene Teil von TRPV4 gleicht dem Aufbau aller TRP-Proteine. C- und N-Terminus ragen dabei ins Zytoplasma [101]. Am N-Terminus liegen sechs *Ankyrin-Repeats*, die an der Interaktion mit anderen Proteinen, z. B. weitere TRP-Proteine, beteiligt sind [126]. Zusätzlich liegen N-Terminal eine OS-9 und *proline-rich-domain*, welche den Transport der Proteine innerhalb des endoplasmatischen Retikulums und der Zellmembran beeinflussen [87]. Am C-Terminus befindet sich eine TRP-Box, die Teil der Interaktion mit Liganden und dem Verschluss der Pore-Region ist. Zudem befinden

sich C-Terminal eine Bindungsstelle für Calmodulin sowie die im menschlichen Genom weit verbreitete PDZ-Domäne (Abbildung 1) [126, 43]. Der TRPV4-Kanal liegt in häufigster Form als Homotetramer aus vier TRPV4-Proteinen vor. Zudem wurden auch Kanäle bestehend aus TRPV4/TRPC1 und TRPV4/TRPP2 nachgewiesen [63, 108].

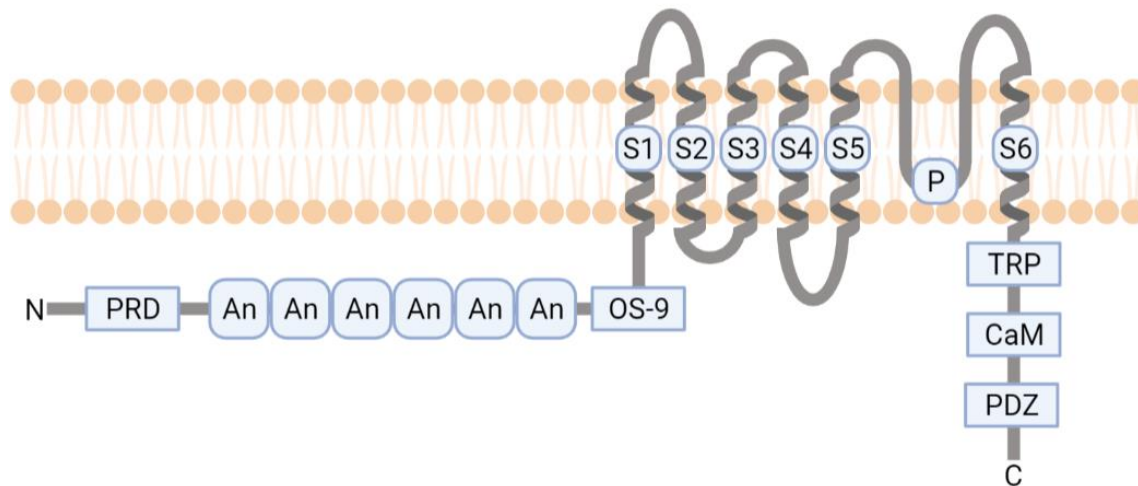


Abbildung 1 Schematischer Aufbau von TRPV4

Schematische Darstellung von TRPV4. Über 6 Transmembrandomänen (S) ist TRPV4 in der Zellmembran verankert. Zwischen S5 und S6 befindet sich die Pore-Region. C- und N-Terminus tragen weitere funktionelle Abschnitte und ragen dabei ins Zytoplasma. Verändert nach: [126, 87] N: Amino-Terminus, PRD: Proline-rich-domain, An: Ankyrin Repeats, C: Carboxy-Terminus, CaM: Calmodulin Bindungsstelle, TRP: TRP-Box, PDZ: PDZ Bindedomäne, S1-S6: Transmembrandomänen 1 bis 6, P: Pore Region (erstellt mit BioRender.com).

TRPV4 wird in vielen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert, hierzu zählen Lunge, Niere, Fettgewebe und das zentrale Nervensystem [58]. In diesen Geweben ist TRPV4 an vielen physiologischen Vorgängen beteiligt. Signalwege, die über TRPV4 laufen, beeinflussen z. B. die nozizeptive Schmerzwahrnehmung [5], Insulinregulation [105] oder Blut-Hirn-Schranke [71]. Im Gefäßsystem ist TRPV4 über Expression in Endothelzellen (*endothelial cells*, EC) sowie glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) der Arterien an der Blutdruckregulation [132] und Proliferation von Kapillarendothelzellen beteiligt [39]. In pulmonalarteriellen SMCs konnte nach Hypoxie-Exposition eine erhöhte Expression von TRPV4 sowie in Endothelzellen ein gestörter ROS-vermittelter Kalziumeinstrom bei TRPV4 Inhibition beobachtet werden [131, 111]. Ebenso ist TRPV4 Teil der Signalkaskade zur Vasodilatation bei erhöhtem intravasalem Druck sowie erhöhtem Scherstress [45, 38].

In den Atemwegen wurde eine durch TRPV4 vermittelte erhöhte Permeabilität der

Gefäße nachgewiesen, welches zu einem Lungenödem führte [36]. Ebenso induziert TRPV4 über eine vermehrte Expression von Cysteinyl-Leukotrienen eine Bronchokonstriktion [66].

1.2.3.1. TRPV4 in COPD

Unterschiedliche zelluläre Prozesse tragen zur Pathogenese und dem klinischen Erscheinungsbild der COPD bei (siehe 1.1.7. Pathophysiologie). Die Exposition gegenüber chemischen Noxen und die ausgelöste inflammatorische Reaktion stellen hierbei eine zentrale Rolle dar [23]. In TRPV4-Knockout (KO) Mäusen sowie mittels Gabe von TRPV4-Inhibitoren (GSK2337429A und GSK2220691) konnte eine verminderte inflammatorische Reaktion sowie eine verbesserte Lungenfunktion und Histologie in Lungengewebe nach Chlorgasinhalation beobachtet werden [9]. Ebenso konnte eine herabregulierte Aktivierung von Neutrophilen und somit verminderte Produktion von ROS in TRPV4^{-/-} Mäusen auf, durch intratracheale Säureapplikation induzierte, Lungengewebsschäden beobachtet werden [133].

Inhalative Noxen und Partikel, welche zu Gewebedestruktion in der Lunge führen können, werden physiologisch über das Flimmerepithel der Bronchien aus den Atemwegen zurücktransportiert. Dieser Abtransport wird als mukoziliäre *clearance* bezeichnet und könnte die Kontaktzeit sowie das Risiko einer Entzündung oder Infektion reduzieren [62]. In Epithelzellen von TRPV4^{-/-} Mäusen konnte eine gestörte Frequenz des Ziliarschlags des Flimmerepithels gezeigt werden [61].

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Pathogenese der COPD ist eine vermehrte Aktivierung der Proteasen im Lungengewebe, z. B. MMP-2 und MMP-9 [76]. TRPV4 konnte hierbei als zentraler Teil der Aktivierungskaskade von MMP-2 und MMP-9 identifiziert werden. Zugleich konnte eine vermehrte Expression dieser Proteasen auf Aktivierung von TRPV4 mittels GSK-1016790A beobachtet werden [122]. Damit einhergehend ist die basale Expression von TRPV4 in Lungengewebe von COPD-Patienten erhöht [14].

1.3. Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Rolle des Kationen-Kanals TRPV4 in der Frühentstehung von COPD mittels einer Knockout Mauslinie untersucht werden. Als Modell wurde das etablierte Mausmodell der Zigarettenrauchexposition genutzt [96, 82]. Hierfür wurden die Mäuse für 3 Monate Zigarettenrauch (*smoke exposure*, SE) ausgesetzt. Als Kontrollen wurden TRPV4^{-/-} sowie Wildtypmäuse (WT) bei Raumluft (*room air*, RA) gehalten.

Die Erfassung und Quantifizierung einschlägiger Parameter erfolgt nach Beendigung der Rauchexposition. Hierzu gehören die Erhebung von *in vivo* Daten aus Hämodynamik, Echokardiographie und Lungenfunktion. Die hämodynamischen und echokardiografischen Messungen der Rechtsherzbelastung dienen der Beurteilung der PH assoziiert mit COPD sowie die Lungenfunktion als Maß für die Entwicklung der COPD mit oder ohne Emphysem. Die histologische Aufarbeitung des gewonnenen Lungengewebes wurde zur Beurteilung des vaskulären Umbauprozesses sowie Quantifizierung der alveolären Veränderungen herangezogen.

Nach aktuellem Stand der Literatur sind folgende Fragen im Laufe dieser Arbeit zu beantworten:

1. Inwieweit hat der TRPV4-Knockout Einfluss auf die Entstehung einer PH im Rahmen der Rauchexposition?
2. Inwieweit hat der TRPV4-Knockout Einfluss auf die Pumpleistung des Herzens im Rahmen der Rauchexposition?
3. Inwieweit hat der TRPV4-Knockout Einfluss auf die Entstehung und Schweregrad einer COPD im Rahmen der Rauchexposition?

2. Material und Methoden

2.1. Material

Tabelle 3 Material Versuchstierhaltung und Rauchmodell

Beschreibung	Herstellername	Hersteller
Futter	Haltungsdiät – Ratten/Mäuse 1324 - 10 mm Pellets	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG Lage, Deutschland
Gebläseeinheit	Smart Flow	TECNIPLAST® S.p.A. Buguggiate VA, Italien
Gestellsystem	IVC-System Gestell LN54	TECNIPLAST® S.p.A. Buguggiate VA, Italien
Gitterdeckel	Durchgehende Gitterdeckel Serie -016/-116/-015/115	TECNIPLAST® S.p.A. Buguggiate VA, Italien
IVC-Käfige	Blue Line – SEALSAFE® NEXT 1285L – TYP 2	TECNIPLAST® S.p.A. Buguggiate VA, Italien
Kopfhaube	BARRIER® Nurse Cap, Extra Comfort	Mölnycke® Health Care GmbH Düsseldorf, Deutschland
Luftfilter	Fluosorber Filter Canister	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH March-Hugstetten, Deutschland
Mäusehaus		TECNIPLAST® S.p.A. Buguggiate VA, Italien
Mundschutz	Disposable Medical Face Masks	Jiangsu Zhiyu Medical Instrument Co., Ltd. Jiangsu, China
Nistmaterial	Pehazell® Clean	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Peristaltikpumpen Schlauch	Masterflex L/S® Tygon E- Lebensmittelschlauch (B- 44-4X), L/S 16 HV-06418-16	Cole-Parmer GmbH Wertheim, Deutschland
Pumpenantrieb	Masterflex® L/S® Präzisions- Konsolenantriebe mit variabler Drehzahl HV-07528-10	Cole-Parmer GmbH Wertheim, Deutschland
Pumpenkopf	Masterflex L/S® Easy- Load® II-Kopf für Hochleistungsschläuche, PPS/Edelstahl HV-77200-62	Cole-Parmer GmbH Wertheim, Deutschland

Rauchkäfige	Green Line – SEALSAFE® PLUS GM500	TECNIPLAST® S.p.A. Buguggiate VA, Italien
Rauchkammer		
Rauchmaschine		Burghart Messtechnik GmbH Holm, Deutschland
Schuhschutz	CPE – Leicht – 15 - Schuhschutz	finnimport® Hamburg, Deutschland
Tischwaage	CTS-3 Tischwaage	VOLTCRAFT® Conrad Electronic AG Wollerau, Deutschland
Wasserflaschen	Tränkeflaschen – 300 mL Tränkkappe - ACCP6521	TECNIPLAST® S.p.A. Buguggiate VA, Italien
Zigaretten für den Experimentalbereich	3R4F Reference Cigarettes	Center for Tobacco Reference Products (CTRP) Lexington, Kentucky, U.S.A.

Tabelle 4 Material Geräte und Software

Beschreibung	Herstellername	Hersteller
µCT Analyse	Analyze Pro Software	Analyze Direct, Inc. Kansas, U.S.A.
µCT Gerät	Quantum GX® microCT Imaging System	PerkinElmer Inc. Waltham, U.S.A.
Alveoläre Morphometrie, Muskularisierungsgrad	Q-Win V.3	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Analysewaage	AB104-S-Analysewaage	Mettler-Toledo GmbH Gießen, Deutschland
Becherglas, 1000 mL	Becherglas DURAN®	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Becherglas, 250 mL	Becherglas DURAN®	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Blutgasanalysegerät	Rapidlab™ 348 Blutgasanalysesystem	Siemens Healthcare GmbH Erlangen, Deutschland
Cutterklinge		
Druckaufnehmer	APT 300	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH March-Hugstetten, Deutschland
Feinwaage	PL303	Mettler-Toledo GmbH Gießen, Deutschland

flexiVent	flexiVent™ FX2	SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc. Montreal, Kanada
Flowmeter	Model P Single <i>flow tube meter</i>	Aalborg Instruments & Controls, Inc. Orangeburg, U.S.A.
Gefäßclip	Biemer Gefäßclip	Aesculab AG Tuttlingen, Deutschland
Graphische Darstellung	BioRender App	BioRender Toronto, Canada
Graphische Darstellung	Adobe Illustrator ®	Adobe Systems Software Ireland Limited Dublin, Irland
Hämodynamik	Pulmodyn W Data Acquisition Software for Respiratory Studies for Windows	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH March-Hugstetten, Deutschland
Hämodynamik	PowerLab system & LabChart 7.0	ADInstruments Oxford, England
Höhenanreißgerät	HOLEX® Höhenanreißgerät 300 mm	Contorion GmbH Berlin, Deutschland
Induktionskammer		Harvard Apparatus Holliston, MA, U.S.A.
Inverses Labormikroskop	Leica DM IL LED	Leica Wetzlar, Deutschland
Isofluran Vernebler	Matrx™ VIP 3000®	Midmark Dayton, Ohio, U.S.A.
Kaltlichtquelle	KL200	Schott AG Mainz, Deutschland
Laborstativ mit Klemmen und Muffen	Stativ zur Befestigung der Spritzen	
LED-Ringlicht	Leica LED3000 RL, 58 mm	Leica Wetzlar, Deutschland
Lesegerät für Mikrochips	PLANET ID®	Datamars GmbH Essen, Deutschland
Luftfilter	VaporGuard™ Activated Charcoal Filter	VetEquip Inc. Livermore, CA, U.S.A.
Lungenfunktionsmessung	FlexiWare v. 7.2 für Windows	SCIREQ® Scientific Respiratory Equipment Inc. Montreal, Kanada
Mechanische Einkanalpipette mit einstellbarem Volumen, 100 bis 1000 µL	Eppendorf Research® plus 100-1000 µL	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Messschieber	Digital ABS AOS Messschieber 0 bis 150 mm, Tiefenmessstange	Mitutoyo Neuss, Deutschland

Mikrowelle	Typ 7873	SEVERIN Elektrogeräte GmbH Sundern, Deutschland
Mikrozentrifuge	Hettich Zentrifuge Mikro 200R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland
Millar-Katheter	MICRO-TIP® Catheter Transducer Model SPR-671 Pressure Catheter	Millar Instruments Inc. Huston, U.S.A.
Nadelelektroden	Needle Electrodes for Animal Bio Amp	ADInstruments Oxford, England
Narkose-System	RC ²⁺ Rodent Circuit Controller PLUS	VetEquip, Inc. Livermore, U.S.A.
Pin zur Anhebung der Arterie	Gefertigt aus BD Microlance™ 3 (30 ½ G)	Becton & Dickinson & Co. Ltd. Drogheda, Irland
Präparationsbesteck Pinzette, gerade	Graefe Forceps 11050-10	Fine Science Tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Präparationsbesteck Pinzette, gebogen	Graefe Forceps 11052-10	Fine Science Tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Präparationsbesteck Schere	Surgical Scissors - Blunt 14000-12	Fine Science Tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Präparationsbesteck Springschere, groß	Spring Scissors 15024-10	Fine Science Tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Präparationsbesteck Springschere, klein	Vannas Spring Scissors 15000-10	Fine Science Tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Präzisionswaage	EMB 100-3	KERN & SOHN GmbH Balingen-Frommern, Deutschland
Pulmonalarterienkatheter	Sonderanfertigung	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH March-Hugstetten, Deutschland
Schermaschine	AESCU LAP® Isis	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Schneidequader		
Skalpell, 10er Klinge	Feather® Disposable Scalpel	Pfm medical AG Köln, Deutschland
Statistik	Microsoft® Excel®	Microsoft Corporation Redmond, U.S.A.
Statistik, Graphische Darstellung	GraphPad Prism version 6.07 für Windows	GraphPad Software San Diego, U.S.A.
Stecknadeln	Landkartennadeln 626	ALCO-Albert GmbH & Co. KG Arnsbach, Deutschland
Stereologie	newCAST	Visiopharm Aarhus, Dänemark
Stereomikroskop	Stereomikroskop Leica M50	Leica Wetzlar, Deutschland

Teesieb	Teesieb mit Klappgriff	Fackelmann Hersbruck, Deutschland
Transponder Pistole		Planet-ID Essen, Deutschland
Ultraschallgerät	Vevo® 3100	FUJIFILM Visualsonics, Inc. Toronto, Kanada
Ventilator	MidiVent Type 849	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH March-Hugstetten, Deutschland
Verstärker (EKG)	Power Lab 8/30	ADInstruments Oxford, England
Verstärker (EKG)	Animal Bio Amp ML 136	ADInstruments Oxford, England
Verstärker (Katheter)	MPVS Ultra™ Pressure- Volume-Loop-System	Millar Instruments Inc. Huston, U.S.A.
Waage	PT 1200	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Wärmematte mit Sonde	Physitemp TCAT-2LV (Low-Voltage Animal Temperature Controller)	Physitemp Instruments, LLC, Clifton, U.S.A.
Zentrifuge groß	Hettich Zentrifuge Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 5 Material Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Herstellername	Hersteller
Dreiwegehahn	Discofix® C-3SC	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einbettkassette, groß	Einbettkassetten Macrosette™	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Einbettkassette, klein	Einbettkassetten ROTILABO®	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Einbettungsschwamm	<i>Tissue embedding sponge</i>	Kartell Noviglio, Italien
Einmalhandschuhe	MICRO-TOUCH® NITRA-TEX™	Ansell Europe Brüssel, Belgien
Faden	Mercifil Faden, No. 12, 100 m	Amann Bönnigheim, Deutschland
Faden	5/0 Faden Polyester, Silicone coated	Ashaway RI, U.S.A.
Fusselfreie Tücher	Kosmetiktücher Brozell Universal Boxen „extra saugstark“	Brod Hanau, Deutschland

Haarentfernungs-Crème	Veet Silky Fresh	Reckitt Benckiser Deutschland GmbH Heidelberg, Deutschland
Infusionsverlängerung	Extension Line Type Heidelberger	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Kanüle 26G	Sterican® Einmal- Injektions-Kanüle	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Kryoschraubröhrchen, 2,4 mL	CRYO.S™	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, Österreich
Objektträger	Objektträger geschnitten mit Mattrand 03-0004	R. Langenbrinck GmbH Emmendingen, Deutschland
Pipette, 10 mL	CELLSTAR® Serologische Pipette	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitze, transparent, 1000 µL	Biosphere® plus	Sarstedt GmbH Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß, 1,5 mL	SafeSeal transparent Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt GmbH Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Schlauchmaterial, verschiedene Durchmesser und Längen	Tygon S3™-Schlauch E- 3603 Flexible Plastic Tubing	PROLIQUID GmbH Überlingen, Deutschland
Schlauchverbin- dungsstücke	Small Barbed Fittings Kit	Cole-Parmer GmbH Wertheim, Deutschland
Sicherheitsvenenverweilka- theter	Vasofix® Safety 20G	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Spritze, 1 mL	Injekt®-F, Luer Solo	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Spritze, 10 mL	Injekt®, Luer Solo	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Spritze, 50 mL	Original Perfusor® Syringe Luer Lock	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Sterile Transponder mit Kanüle	ISO 11784 FDX-B Transponder	Planet-ID Essen, Deutschland
Ultraschallgel	Aquasonic® Clear® Ultrasound Gel	Parker Laboratories, Inc. Fairfield, U.S.A.
Wasserlösliches Gleitgel	Aquagel® Lubricating Gel	Parker Laboratories, Inc. Fairfield, U.S.A.
Zellstofftupfer (4 × 5 cm)	Pur-Zellin®	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Zellulose-Handtücher		Tork Mannheim, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, konischer Boden, 15 mL, 50 mL	Cellstar® Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, Österreich

Tabelle 6 Material Lösungen, Puffer und Chemikalien

Beschreibung	Herstellername	Hersteller
Agarose Standart	Rot®garose für DNA/RNA-Elektrophorese	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Desinfektionsmittel, 50% 2-Propanol und 1% Providonjod-Lösung	Braunoderm®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM), (1×)	Gibco™ DMEM, hoher Glukosegehalt, Pyruvat 11995073	Fisher Scientific GmbH Schwerte, Deutschland
Fetales Rinderserum	Fötales Rinderserum, F0804	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Formaldehyd	Formaldehyd-Lösung 3,5 bis 3,7% gepuffert	Otto Fischar GmbH & Co. KG Saarbrücken, Deutschland
Isofluran	Isofluran Baxter®	Baxter Deutschland GmbH Unterschleißheim, Deutschland
Isotonische Natriumchloridlösung	NaCl 0,9% Braun	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland

Tabelle 7 Material Eigenherstellung Puffer und Lösungen

Beschreibung	Substanz	Menge/Konzentration
20 ×PBS	NaCl	2,7 M
	KCl	0,05 M
	Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	0,13 M
	KH ₂ PO ₄	0,03 M
	Aqua dest.	1 L
Einfriermedium	FBS	90%
	DMSO	10%
3% Agaroselösung	Agarose Standart	3%
	1×PBS	97%
2% Säurefuchsin	Säurefuchsin	2%
	Aqua dest.	98%
1% Essigsäure	Essigsäure	1%
	Aqua dest.	99%
Van-Gieson Lösung	Pikrinsäure	95,2%
	2% Säurefuchsin	3,2%
	1% Essigsäure	1,6%

Tabelle 8 Material Histologie Geräte

Beschreibung	Herstellername	Hersteller
Automatisiertes, aufrechtes Mikroskop-System	Leica DM6000B	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Digitalkamera	Digital Color Camera Leica DFC310 FX	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Feinwaage	PL303-Analysewaage	Mettler-Toledo GmbH Gießen, Deutschland
Geschlossener Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat	Leica ASP300S Gewebeinfiltrationsautomat	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kassetten-Drucker	Sakura IDent™ Cassette Printer	Sakura Finetek USA, Inc. Torrance, U.S.A.
Kassetten-Drucker	Manueller Kassetten- Drucker VCP 4001	VOGEL med. Technik & Elektronik GmbH & Co. KG Fernwald, Deutschland
Kühlplatte	EG-1150 C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Magnetrührer	IKA® RH basic 2	
Mechanische Einkanalpipette mit einstellbarem Volumen, 1 bis 10 µL	Eppendorf Research® plus 1-10 µL	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Mechanische Einkanalpipette mit einstellbarem Volumen, 10 bis 100 µL	Eppendorf Research® plus 10-100 µL	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Mechanische Einkanalpipette mit einstellbarem Volumen, 100 bis 1000 µL	Eppendorf Research® plus 100-1000 µL	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Mikrotom Vollautomatisch	Rotationsmikrotom RM 2165	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Minizentrifuge	Mini-Zentrifuge LLG- uniCFUGE 2	Lab Logistics Group GmbH Meckenheim, Deutschland
Paraffinausgießstation	Beheizte Paraffineinbettstation EG-1140H	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	Wasserbad für Paraffinschnitte HI-1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
pH-Meter	Labor-pH-Meter 766 Climatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG Berlin, Deutschland

Schüttler	IKA® VIBRAX VXR basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG Staufen, Deutschland
Ultrareinstwasser-Aufbereitungsanlage	Milli-Q Advantage A10 Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland
Vortex-Gerät	Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc. Bohemia, U.S.A.
Wärmeinkubator		Memmert GmbH & Co. KG Schwabach, Deutschland
Wärmeplatte	Glättetisch für klinische Histopathologie HI-1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

Tabelle 9 Material Histologie Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Herstellername	Hersteller
Adhäsionsobjektträger	Superfrost Plus® Gold	Gerhard Menzel GmbH Braunschweig, Deutschland
Deckgläser	AUTOMAT-STAR Deckgläser 24× 50 mm	Engelbrecht GmbH Edermünde, Deutschland
Handschuhe	MICROFLEX® Long Cuff	Ansell Healthcare Europe NV Brüssel, Belgien
Labor-Verpackungsfolie	Bemis™ Curwood Parafilm™ M	Fisher Scientific GmbH Schwerte, Deutschland
Mikrotomklingen	MS33	MICROS Produktions- & Handelsges.m.b.H. St. Veit/Glan, Österreich
Paraffin	Paraplast Plus®	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Pipettenspitze, transparent, 10 µl, 200 µl, 1000 µL	Biosphere ® plus	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß, 1,5 ml	SafeSeal transparent Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Skalpell, 10er Klinge	Feather® Disposable Scalpel	Pfm medical AG Köln, Deutschland
Xylol-lösliches Eindeckmedium	Pertex®	Medite GmbH Burgdorf, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, konischer Boden, 15 mL, 50 mL	Cellstar® Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH Frickenhäusen, Deutschland

Tabelle 10 Material Histologie Färbemittel und Lösungen

Beschreibung	Herstellername	Hersteller
2-Propanol 99,8%	2-Propanol puriss. P.a., ECS reagent, reag. ISO, reag. Ph. Eur., $\geq 99,8\%$	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Albumin bovine Fraction V (BSA)	Albumin bovine Fraction V, protease-free	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Alpha-Actin Antikörper	Anti-alpha-smooth muscle Actin; Clone 1A4; Mouse, monoklonal (A2547)	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Antibody Diluent		Zytomed Berlin, Deutschland
DAB-Substrat Kit, Peroxidase	SK-4100	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, U.S.A.
Di- Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Di- Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, for analysis EMSURE ®	Merck Darmstadt, Deutschland
Eosin	Shandon Eosin Y, alkoholisch	Thermo shandon Limited Runcorn, England
Essigsäure	Essigsäure ROTIPURAN ®100%, p.a.	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	70%, 96%, 99,6% mit Ethylmethylketon vergällt	Fischer Saarbrücken, Deutschland
Hämalaun-Lösung	Hämalaun-Lösung, sauer nach Mayer	Waldeck GmbH & Co. KG Münster, Deutschland
Hämatoxylin A	Ferric – Hematoxylin A Weigert (2E-032)	Waldeck GmbH & Co. KG Münster, Deutschland
Hämatoxylin B	Ferric – Hematoxylin B Weigert (2E-052)	Waldeck GmbH & Co. KG Münster, Deutschland
ImmPRESS® Horse Anti- Rabbit IgG Polymer Kit, Peroxidase	MP-7401	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, U.S.A.
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid $\geq 99,5\%$, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Kaliumhydrogenphosphat, EMSURE ® ISO zur Analyse, Supelco ®	Merck Darmstadt, Deutschland
Methylgrün	Vector® Methyl Green	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, U.S.A.
MM HRP-Polymer Kit	MM510L	Zytomed Berlin, Deutschland

Natriumchlorid	Natriumchlorid $\geq 99,5\%$, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Natronlauge 2 mol/L EMPROVE® EXPERT	Merck Darmstadt, Deutschland
PBS	Eigenherstellung	
Pikrinsäure	Pikrinsäure – Lösung 1,2% <i>BioChemica</i>	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Proteinkinase K	Novocastra™ Enzyme Proteinkinase K (IHC)	Leica Biosystems New Castle, England
Resorcin – Fuchsin	Resorcin – Fuchsin nach Weigert (2E-030)	Waldeck GmbH & Co. KG Münster, Deutschland
Salzsäure	Salzsäure 1 mol/L – 1 N, Maßlösung	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Säurefuchsin	Acid fuchsin (C.I. 42685)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Vector VIP® Substrat Kit	Peroxidase Substrate Kit SK-4600	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, U.S.A.
von-Willebrand-Faktor Antikörper	Anti-von Willebrand Faktor; Rabbit, polyklonal (A0082)	Dako Cytomation Hamburg, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Perhydrol TM zur Analyse EMSURE® ISO 30%	Merck Darmstadt, Deutschland
Xylol	Xylol (Isomere) $\geq 97\%$, rein, für Histologie	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland

2.2. Versuchstiere

2.2.1. B6.129X1-Trpv4^{tm1MsZ/MsZRbrC}

Die B6.129X1-Trpv4^{tm1MsZ/MsZRbrC} Mauslinie wurde von Prof. Alexander Dietrich, LMU München, Walther-Straub Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Goethestraße 33, 80336 München, zur Verfügung gestellt.

Die TRPV4^{-/-} Mäuse dieser Linie weisen ein globales Fehlen des TRPV4-Proteins in allen Zellen des Körpers auf. In muriner 129/SV DNA wurde mittels homologer Rekombination die Transkriptionsfähigkeit des TRPV4-Gens aufgehoben und mit den flankierenden DNA-Regionen herausgeschnitten. Eine zugefügte phosphoglycerate kinase I-neoKassette ermöglichte die spätere Selektion der erfolgreichen Integration mittels G418-Sulfat (GeneticinTM). Der gewonnene Vektor wurde mittels Elektroporation in embryonische Stammzellen im Blastozystenstadium eingebracht. Die entstandenen Chimären wurden in weiblichen C57BL/6J-Mäusen ausgetragen [68]. Heterozygote Mäuse wurden miteinander verpaart, um homozygote Mäuse mit globalem Knockout zu generieren. Die Mäuse wurden auf den Hintergrund C57BL/6J über 10 Generationen zurückgezüchtet [125].

Während der heterozygoten Züchtung der Mauslinie wurden TRPV4^{+/+} (WT) Wurfgeschwister in einer eigenen Kolonie homozygot weiter gezüchtet und als WT-Kontrollen verwendet.

2.2.2. Allgemeine Versuchstierhaltung

Die Versuchsmäuse waren zu Beginn der Rauchexposition mindestens 12 Wochen alt und wurden in *individually ventilated cages* (IVC) in kleinen Gruppen von bis zu fünf Mäusen gehalten. Nur bei Revierkämpfen, bei denen es möglicherweise zu Verletzungen kommen kann, wurden Mäuse vereinzelt gehalten. Die Käfige wurden mit Nageholz, Versteckmöglichkeiten sowie Nist- und Einstreumaterial ausgestattet. Die Versuchsmäuse wurden bei einer Umgebungstemperatur von 22 +/-2 °C, einer Luftfeuchtigkeit zwischen 45 und 65% und einem Tag-Nachtrhythmus von 14 zu 10 Stunden (Std.) gehalten.

2.2.3. Versuchsaufbau der Rauchexposition

Die Versuchsmäuse wurden insgesamt für 3 Monate Zigarettenrauch exponiert. Alle Mäuse wurden eine Woche vor Beginn der Zigarettenrauchexposition mittels Mikrochip markiert. Außerdem wurden die Mäuse vor Beginn, sowie vor Beendigung der

Rauchexposition in einer echokardiografischen Untersuchung und einer mikro-Computer Tomografie gestützten (μ CT) Untersuchung beurteilt. Nach 3-monatiger Rauchexposition oder Haltung bei Raumluft erfolgte die hämodynamische Messung, Lungenfunktionsmessung und Entnahme von Herz und Lunge. Die Lungen und Herzen wurden nach der Fixierung entwässert und in Paraffin eingebettet (Abbildung 2).

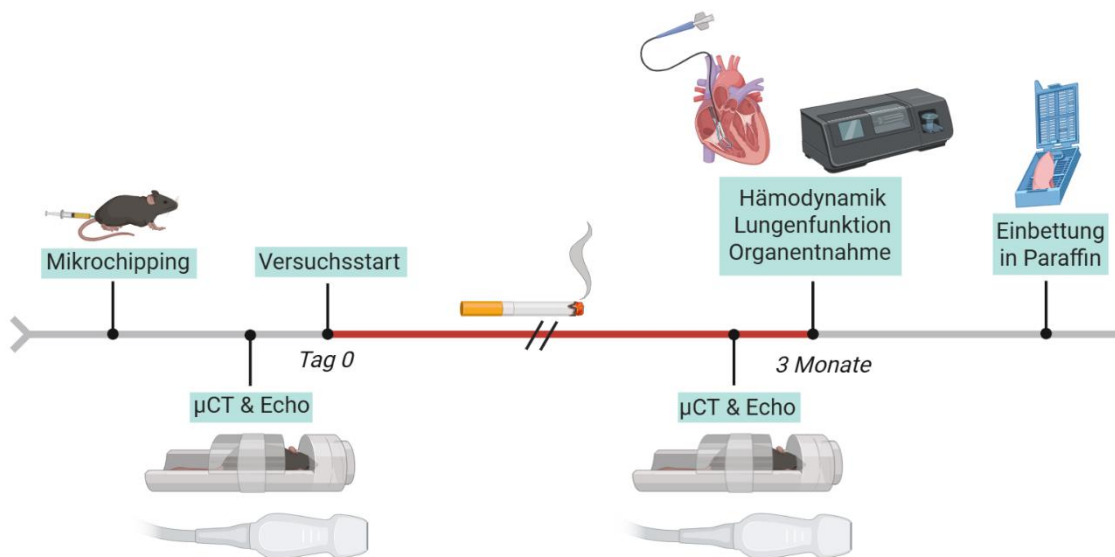


Abbildung 2 Versuchsaufbau Rauchexposition über drei Monate

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus über drei Monate. Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse mittels Mikrochip markiert. Vor Versuchsbeginn erfolgte eine μ CT-Analyse und echokardiografische Untersuchung. Am Versuchsbeginn (Tag 0) begann die Zigarettenrauchexposition, während die Kontrollgruppe weiterhin bei Raumluft gehalten wurde. Vor Versuchsende wurde eine weitere μ CT-Analyse und echokardiografische Untersuchung durchgeführt. Nach drei Monaten erfolgte die hämodynamische Messung, Lungenfunktionstestung sowie Organentnahme. Die gewonnenen Proben der Lunge wurden in Paraffin eingebettet. μ CT: Mikro Computertomografie, Echo: Echokardiografie, (erstellt mit BioRender.com).

2.2.4. Zigarettenrauchexposition

Die Zigarettenrauchexposition wurde innerhalb einer Rauchkammer für 6 Std. am Tag über 5 Tage pro Woche durchgeführt. Zur Zigarettenrauchgenerierung wurden Kentucky 3R4F Zigaretten in einem kommerziellen Rauchgenerator verbrannt und mit Raumluft verdünnt. Die Aufzeichnung von Kohlenstoffmonoxid und Rauchkonzentration erfolgte über die maschinenintegrierten Sensoren und Software. Hierbei wurde eine durchschnittliche Partikel-Konzentration von ca. 200 mg/m^3 erzeugt. Die SE-Gruppen

wurden außerhalb der Rauchexposition, sowie die Kontrollgruppe während der gesamten Versuchsdauer im Tierstall bei Raumluft gehalten. Die Überwachung der Mäuse während der Versuchsdauer erfolgte mit Unterstützung von Dr. Monika Brosien.

Bei der Generierung des Zigarettenrauches wird zwischen *sidestream* und *mainstream smoke* unterschieden [28]. Beim *mainstream smoke* wird das Zigarettenrauchkonzentrat aus dem nicht brennenden Teil der Zigarette gezogen, welches üblicherweise mit einem Filter ausgestattet ist. Der *sidestream smoke* besteht dagegen aus dem Rauch, der durch das brennende Ende der Zigarette generiert wird [28]. Im vorliegenden Modell wurde *mainstream smoke* verwendet, da es sich hierbei um die gleiche Form wie bei herkömmlichem Zigarettenkonsum handelt. Im Unterschied zur humanen Zigarettenrauchinhalation kommt es im vorliegenden Modell allerdings zur Ganzkörperexposition. Die rein inhalative Exposition würde bei Mäusen eine Fixierung und maschinelle Beatmung notwendig machen. Um die zusätzliche starke Belastung durch Fixierung und Beatmung der Mäuse zu verhindern und eine vergleichbare Haltung zu RA-Kontrollmäusen zu schaffen, wurde die Ganzkörperexposition durchgeführt.

2.2.5. Tierversuchsgenehmigung

Die beschriebenen Experimente wurden gemäß des deutschen Tierschutzrechtes sowie der EU-Richtlinie 2010/63/EU „zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere“ durchgeführt. Das Versuchsvorhaben „Rolle von TRPV4 und TRPA1 bei COPD“ wurde am 15.10.2019 vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt und läuft unter dem Aktenzeichen G_66/2019.

2.3. Methoden

2.3.1. Mikrochip

Die Markierung der Mäuse erfolgte maximal 7 Tage vor Beginn der Rauchexposition mittels Mikrochip. Die Narkose wurde zunächst mittels Narkosekammer (3 bis 5 Vol.-% Isofluran; 3 L/Min., O₂) eingeleitet und nach Erreichen der vollständigen Immobilität und Ausfall des Zwischenzehenreflexes über eine Atemmaske erhalten (1,5 bis 2,5 Vol.-% Isofluran; 1 L/Min. O₂). Nach Hautdesinfektion wurde der Mikrochip (Transponder) subkutan in eine Hautfalte am linken Hinterbein injiziert. Die Lage des Mikrochips wurde durch Abtasten kontrolliert und die Chip-ID mittels Lesegerät erfasst.

2.3.2. Physiologische Messungen

2.3.2.1. Echokardiografie und μ CT-Analyse

Vor Versuchsbeginn und Versuchsende wurde die Maus wie bereits beschrieben betäubt (3 bis 5 Vol.-% Isofluran; 1 L/Min., O₂). Nach Erreichen der vollständigen Immobilität und Ausfall des Zwischenzehenreflexes wurde die Maus aus der Kammer entnommen und in Rückenlage auf einer Wärmeplatte mit integrierten EKG-Elektroden fixiert. Die Maus wurde mithilfe einer Atemmaske mit isofluranhaltiger Luft (1,5 bis 2,5 Vol.-% Isofluran; 1 L/Min. O₂) ventiliert. Die Wärmeplatte wurde über einen rektal platzierten Temperaturfühler gesteuert. Anschließend wurde der Brustkorb mittels Haarentfernungscreme enthaart und mit Ultraschallgel bedeckt. In der zweidimensionalen Standardeinstellung wurden nun die Parameter zur Links- und Rechtsherzuntersuchung erfasst. Hierbei wurde das Herzminutenvolumen (*Cardiac Output*, CO) sowie die maximal zurückgelegte Strecke des Trikuspidalklappenrings in der Systole (*tricuspid annular plane systolic excursion*, TAPSE) bestimmt. Zur weiteren Untersuchung der rechtsventrikulären Pumpleistung erfolgte die Bestimmung der Zeit zum Erreichen der Maximalgeschwindigkeit in der Pulmonalarterie (*pulmonary acceleration time*, PAT) sowie die Gesamtdauer der rechtsventrikulären Systole (*pulmonary ejection time*, PET). Anschließend wurde die narkotisierte Maus in das Quantum GX microCT ImagingSystem überführt und ein Scan des Thorax durchgeführt. Anhand der Rekonstruktion des Scans wurde bildmorphologisch das Lungenvolumen, die Dichte des Lungenparenchyms, sowie die Relation von Gewebe zu Luft als auch die Funktionelle Residualkapazität mittels der *Analyze Pro* Software (Analyze Direct, Mayo

Clinic, MN) bestimmt. Die echokardiographische Messung wurden mithilfe von Dr. Simone Kraut und die μ CT-Analyse mithilfe Dr. Baktybek Kojonazarov durchgeführt.

2.3.2.2. Hämodynamik und Lungenfunktionsmessung

Die hämodynamische Messung und Lungenfunktionstestung wurden am Versuchsende durchgeführt. Zunächst wurde die Maus in einer Narkosekammer betäubt (3 bis 5 Vol.-% Isofluran; 1 L/Min., O₂). Beim Erreichen der vollständigen Immobilität und Ausfall des Zwischenzehenreflexes wurde die Maus aus der Kammer entnommen und wie bereits beschrieben in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert. Mittels Stechelektroden erfolgte über die Extremitäten eine EKG-Ableitung. Nach Desinfektion der Haut wurde diese über dem Hals eingeschnitten und das Gewebe um die Trachea freipräpariert. Durch einen Schnitt in der Trachea wurde die Maus endotracheal intubiert und über das Lungenfunktionsmessgerät (FlexiVent™) mit einer Atemfrequenz von 150 Atemzügen /Min., einem Atemzugvolumen von 5 μ L/g Körpergewicht und einem positiv Endexpiratorischer Druck (*positive end-expiratory pressure*, PEEP) von 3 cmH₂O beatmet. Die Narkose wurde mittels isofluranhaltiger Luft weitergeführt (1,5 bis 2,5 Vol.-% Isofluran; 1 L/Min. O₂). Über das angeschlossene FlexiVent™-System und die entsprechende Software (FlexiWare) wurden die herstellereigenen Protokolle *Deep Inflation*, *Snapshot*, *Quickprime* und *Pressure Volume Loops* zur Messung der PV-Loops, *compliance*, *resistance* sowie der Lungenvolumina durchgeführt. Zur weiteren Analyse wurden nur Messungen eingeschlossen mit einem Bestimmtheitsmaß (*coefficient of determination*, COD) von >0,95. Der COD ist eine vom System bestimmte Kontrollgröße zu jeder Messung, der die Wahrscheinlichkeit einer ungenauen Messung durch äußere Einflüsse oder Systemstörungen abbildet. Zur Messung des zentralen Venendrucks wurde die *V. jugularis* freipräpariert, über einen Einschnitt der Millar-Katheter eingeführt und mit einer Ligatur fixiert. Über diesen erfolgte die Druckaufnahme im rechten Ventrikel. Analog erfolgte die Präparation der *A. carotis* für die Messung der arteriellen Drücke in der Aorta und im linken Ventrikel. Final wurde die *A. Carotis* eingeschnitten und das austretende Blut für weitere Analysen abgenommen. Die Maus verstarb hierbei durch Entbluten unter tiefer Isoflurannarkose (5 Vol.-% Isofluran; 1 L/Min O₂). Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte der durchgeführten Anzahl an Messungen dargestellt. Die Anästhesie wurde durch Dr. Monika Brosien überwacht.

2.3.2.3. Organentnahme und Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Im Anschluss an die Lungenfunktion und hämodynamische Messung wurden die Mäuse über die eröffnete Trachea bei einer Ventilation von 120 Atemzügen /Min. und einem Atemzugvolumen von 5 $\mu\text{L/g}$ Körpergewicht mit Raumluft weiter beatmet. Zunächst wurde durch einen horizontalen Hautschnitt der Bauchraum eröffnet. Das Zwerchfell wurde vorsichtig vom Brustkorb gelöst und der Thorax entlang des Sternums mittig eröffnet und seitlich fixiert. Für die Entnahme der BAL wurde die Ventilation kurzzeitig unterbrochen und mit einer 20G Kanüle dreimal 800 μL 1 $\times$ phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) in die Lunge instilliert und dreimal auf- und abgezogen (Abbildung 3A). Die gewonnene BAL wurde bei 4 °C mit 400 g für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment in 1 mL Einfriermedium suspendiert. Überstand und Zellsediment wurden bei -80 °C eingefroren (Abbildung 3B). Anschließend wurde die Lunge mit einem Druck von 22 cm Wassersäule mit 0,9% NaCl-Lösung blutleer gespült. Hierzu wurde ein Spülkatheter über ein kleines Loch im rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie eingeführt und fixiert. Über eine Stichinzision im linken Ventrikel wurde die physiologische 0,9% NaCl-Lösung wieder abgeleitet (Abbildung 3A). Zur Entnahme der rechten Lunge wurde zunächst der Spülkatheter aus der Pulmonalarterie entfernt und das Atemzugvolumen auf 70 μL reduziert. Nun wurde die rechte Lunge am Hilus abgebunden und herauspräpariert. Die Lungenlappen wurden jeweils in zwei Teile halbiert und in separaten Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert. Nach der Entnahme der rechten Lunge wurde die linke Lunge mit 3,5% Formaldehyd fixiert. Hierfür wurden die Alveolen mit einem Druck von 12 cm Wassersäule und die Lungengefäße mit einem Druck von 22 cm Wassersäule aufgefüllt. Nach 15 Min. Fixierung wurde zunächst das Herz und anschließend die linke Lunge entnommen. Das Herz wurde zur Bestimmung der Hypertrophie in linken (LV) und rechten Ventrikel (RV), sowie Septum (S) geteilt und anschließend gewogen. Die Berechnung der Rechtsherzhypertrophie (Fulton Index) erfolgte mit folgender Formel: $\text{RV}/(\text{LV}+\text{S})$. Anschließend wurde die linke Lunge sowie der rechte und linke Ventrikel in Einbettkassetten für 24 Stdn. in 3,5% Formaldehyd gelagert und anschließend täglich mit 1 $\times$ PBS gewaschen (Abbildung 3C). Final erfolgte die Entnahme und Abmessung der Tibia.

2.3.2.4. Blutgasanalyse und Plasmagewinnung

Während der hämodynamischen Messung wurde im letzten Schritt eine Blutprobe entnommen. Mit dieser Probe wurde eine Blutgasanalyse durchgeführt. Zur Plasmagewinnung wurde das restliche Blut bei 4 °C und 2500 g für 10 Min. zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert (Abbildung 3B).

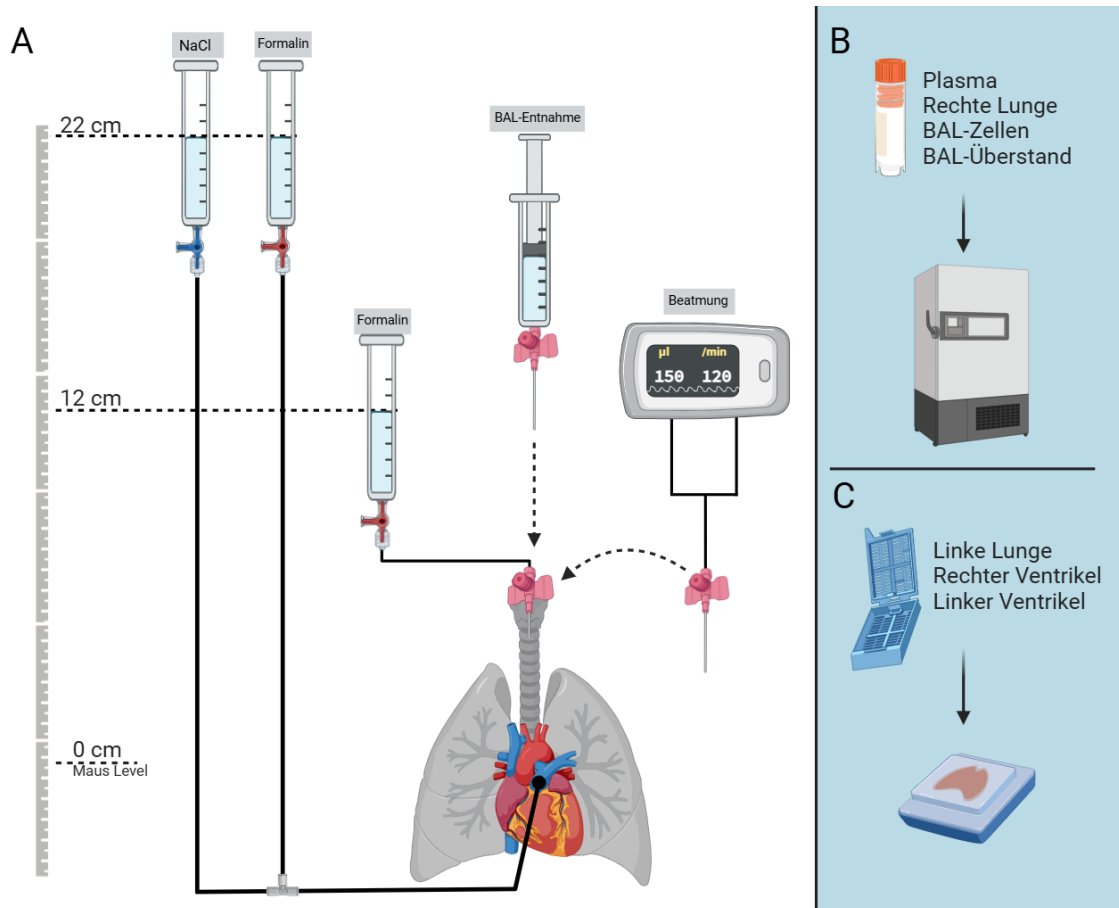


Abbildung 3 Versuchsaufbau Organ- und BAL-Entnahme

Schematische Darstellung der Organ- und BAL-Entnahme. Über die dargestellten Spritzen mit angeschlossenen Drei-Wege-Hähnen und Schlauchsystem erfolgte die Perfusion der Lunge zunächst mit 0,9% NaCl und anschließend mit Formalin. Während der Perfusion wurde die Lunge über ein Beatmungsgerät weiter ventiliert. Der Perfusionsdruck wurde über die Abmessung der Höhe der Flüssigkeitsspiegel mit Mauslevel als Nullpunkt kontrolliert. Die perfundierte linke Lunge und das Herz wurden in Formalin fixiert, entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Plasma, rechte Lunge und BAL wurden ggf. weiter aufbereitet und anschließend bei -80 °C gelagert. BAL: Bronchoalveoläre Lavage, NaCl: Natriumchlorid-Lösung (erstellt mit BioRender.com).

2.3.3. Histologische Aufbereitung und Untersuchung

2.3.3.1. *Water Displacement* Messung und Schneiden der linken Lunge in Agarose

Zur Messung des Trockengewichts wurde die Lunge mit dem Hilus nach unten auf Zellstoff gelegt, bis kein weiterer Austritt von PBS auf dem Zellstoff beobachtet wurde. Mittels Feinwaage wurde das Gewicht ermittelt.

Das Volumen wurde mittels des Verdrängungsprinzips in PBS gemessen. Hierfür wurde ein Kugelsieb in ein Becherglas mit $1\times$ PBS auf eine festgelegte Höhe eingestellt und die Waage in Nullstellung gebracht (Abbildung 4A). Anschließend wurde die Lunge eingelegt und das verdrängte Volumen an der Waage abgelesen (Abbildung 4B).

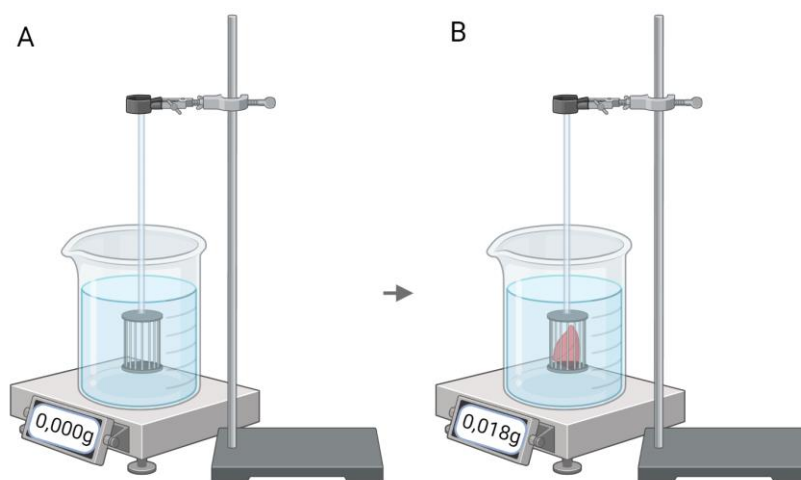


Abbildung 4 Versuchsaufbau Water Displacement Messung

Ein Kugelsieb wurde freihängend in ein Becherglas mit PBS platziert, sodass es vollständig eingetaucht war (A). Anschließend wurde die Waage in Nullstellung gebracht und die Lunge eingelegt. Das verdrängte Volumen konnte an der Waage abgelesen werden (B) (erstellt mit BioRender.com).

Zur Maximierung der zu untersuchenden Oberfläche wurden die Lungen in ca. 5 parallele Stücke geschnitten. Hierzu wurde ein Quader ca. 1 cm hoch mit 3%iger Agaroselösung befüllt und anschließend die Lungen in horizontaler Ausrichtung platziert (Abbildung 5A). Nun wurden die Quader mit Agarose aufgefüllt (Abbildung 5B). Nach Aushärten der Agarose wurden die Blöcke aus den Quadern gelöst und zum Schneiden in einen weiteren Quader transferiert. Entlang der Schnittführungen wurde der Agaroseblock in ca. 3 mm dicke Scheiben geschnitten (Abbildung 5C). Zuletzt wurden die Lungenstücke entnommen und in Einbettkassetten in $1\times$ PBS überführt (Abbildung 5D).

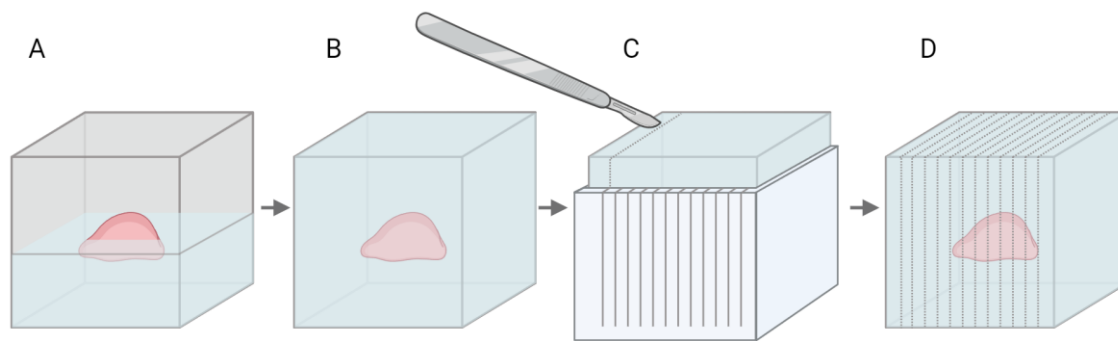


Abbildung 5 Versuchsaufbau Schneiden der linken Lunge in Agarose

Zunächst wurde eine 3%ige Agaroselösung in einem Quader vorgelegt und die linke Lunge in horizontaler Ausrichtung platziert (A). Nachdem die Agarose angehärtet war, wurde der Quader mit Agarose aufgefüllt (B). Sobald die Agarose vollständig ausgehärtet war, wurden die Blöcke in einen Schneidequader transferiert und entlang der vorgegeben Schnittführung in parallele Scheiben geschnitten (C). Zuletzt wurden die Lungenstücke aus der Agarose entfernt (D) (erstellt mit BioRender.com).

2.3.3.2. Dehydrierung, Einbetten und Schneiden

Nach Lagerung in 1× PBS wurden die Lungen und Herzen für 2 Stdn. in 50%iges Ethanol transferiert und anschließend in einem automatischen Gewebeeinfiltrationsautomat nach gewebespezifischen Protokollen für Herzen (Tabelle 11) oder Lungen (Tabelle 12) dehydriert.

Tabelle 11 Protokoll Entwässerung der Herzen

NR.	Reagenz	Dauer (Stdn.)	Temperatur (°C)
1	Ethanol 70%	1	55
2	Ethanol 70%	1	55
3	Ethanol 70%	1,5	55
4	Ethanol 96%	1	35
5	Ethanol 99,6%	1	35
6	Ethanol 99,6%	1	35
7	Isopropanol 99,8%	1	35
8	Isopropanol 99,8%	1,5	35
9	Xylol	1	35
10	Xylol	1,5	35
11	Paraffin	1	60
12	Paraffin	1,5	60
13	Paraffin	1,5	60

Tabelle 12 Protokoll Entwässerung der Lungen

NR.	Reagenz	Dauer (Std.n.)	Temperatur (°C)
1	Ethanol 70%	1	55
2	Ethanol 70%	1	55
3	Ethanol 70%	1,5	55
4	Ethanol 96%	1	35
5	Ethanol 99,6%	1	35
6	Ethanol 99,6%	1	35
7	Isopropanol 99,8%	1,5	35
8	Isopropanol 99,8%	1,5	35
9	Xylol	1	35
10	Xylol	1,5	35
11	Paraffin	1	60
12	Paraffin	1,5	60
13	Paraffin	1,5	60

Zum Einbetten wurde eine geringe Menge flüssiges Paraffin vorgelegt und die Lungenstücke hineinplatziert. Unter leichtem Druck wurde das Gewebe am Boden fixiert. Anschließend wurde die Einbettform mit Paraffin aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Hierbei können sowohl die Formalinfixierung als auch die Einbettung in Paraffin zu Schrumpffartefakten am Lungengewebe führen [74]. Da bei allen Proben dasselbe Protokoll zur Anwendung kam, kann von einem ähnlichen Effekt über alle Proben hinweg ausgegangen werden.

Zur histologischen Untersuchung wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 3 µm angefertigt, in ein Wasserband transferiert und mit einem Objektträger aufgezogen. Für die alveolare Morphometrie und vaskuläre Histologie wurde jeweils ein Gewebeschnitt pro Objektträger aufgezogen. Für die Stereologie wurden fortlaufende Schnitte mit einem Abstand von 3 µm nebeneinander in gleicher Orientierung auf einen Objektträger platziert. Der Schnittverschub zwischen den nebeneinander liegenden Gewebeschnitten betrug somit 6 µm. Alle Gewebeschnitte wurden für 24 Std.n. bei 37 °C getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

2.3.3.3. Alveolare Morphometrie

Für die alveolare Morphometrie wurden die Lungenschnitte zunächst mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) nach folgendem Protokoll (Tabelle 13) angefärbt:

Tabelle 13 Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin

NR.	Reagenz	Dauer (Min.)	Anmerkung
1	Inkubator	60	58 °C
2	Xylol	10	
3	Xylol	10	
4	Xylol	10	
5	Ethanol absolut 99,6%	5	
6	Ethanol absolut 99,6%	5	
7	Ethanol 96%	5	
8	Ethanol 70%	5	
9	Hämalaun nach Mayer, sauer	20	
10	Fließendes Leitungswasser	5	
11	Ethanol 96%	1	
12	Eosin-y-alkoholisch	4	
13	Aqua dest.	10 Sek.	
14	Ethanol 96%	2	
15	Ethanol 96%	2	
16	Ethanol absolut 99,6%	5	
17	Isopropylalkohol 99,8%	5	
18	Xylol	5	
19	Xylol	5	
20	Xylol	5	
21	Eindecken mit Pertex		

Die HE-gefärbten Gewebeschnitte wurden mittels Qwin Software (Leica, Wetzlar, Deutschland) analysiert. Es wurden der mittlere linearer Schnittpunkt (*mean linear intercept*, MLI), Luftanteil (*airspace*) und die Septendicke (*septal wall thickness*, SWT) ermittelt.

Zunächst wurde eine Übersichtsaufnahme der gesamten Lunge angefertigt. Anhand dieser wurden Regionen markiert, die homogenes Lungengewebe und nur wenige große Gefäße sowie Bronchien enthielten (Abbildung 6A). Anhand der gespeicherten Markierungen wurden die entsprechenden Positionen durch die automatisierte Tischsteuerung aufgesucht (Abbildung 6B). Vor der Analyse wurden manuell größere Gefäße oder Bronchien sowie Anteile jenseits der natürlichen Lungengrenze ausgeschlossen (Abbildung 6C).

Als *airspace* wurden nicht gefärbte und extraparenchymal gelegene Flächen definiert. Für die Ermittlung des MLI wurden automatisiert horizontale Linien mit Abstand von 40 μm über den Schnitt gelegt. Die Gesamtlänge der horizontalen Linien wurde durch die Anzahl an Septen geteilt, durch welche diese horizontalen Linien laufen. Große Gefäße oder Luftwege wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die vertikalen Linien wurden analog hierzu analysiert. Der MLI ergab sich aus dem Mittelwert zwischen vertikal und horizontal ermittelten Werten. SWT wurde als mittlere Länge der Strecke orthogonal zum Septum gemessen.

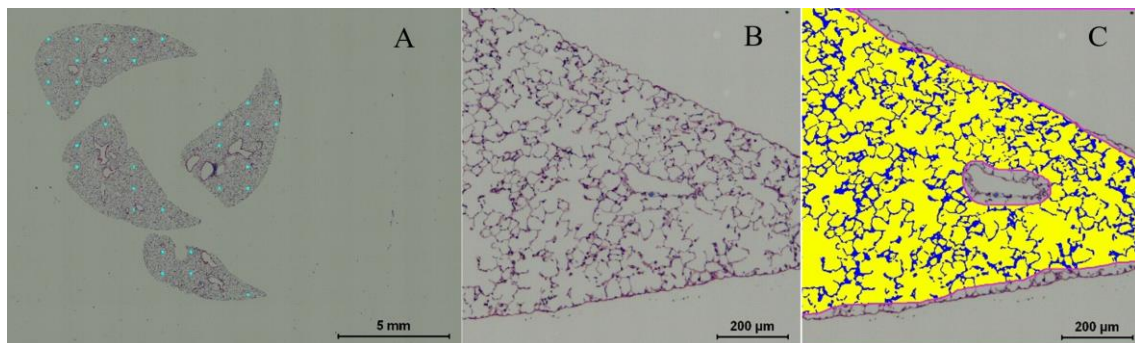


Abbildung 6 Alveolar Morphometrie

Repräsentative histologische Bilder einer formalinfixierten Lunge in HE-Färbung. Zusammengefügt: Übersichtsscan der Lungenstücke mit blau ausgewählten Bereichen der Analyse (A), exemplarisches Bild eines analysierten Bereiches (B), Analysebereich nach Ausschluss großer Gefäße und luftleitenden Wegen sowie Bildanteile jenseits der natürlichen Lungengrenze (C). Skalierung 200 μm .

2.3.3.4. Vaskuläre Histologie

Zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung auf α -Aktin (Muskelschicht) und von-Willebrand-Faktor (vWF; Endothelschicht) mithilfe des *Vektor Vip Substrat Kit* und *ImmPRESS Kit* durchgeführt (Tabelle 14).

Tabelle 14 Färbeprotokoll Doppelfärbung α -Aktin und von-Willebrand-Faktor

NR.	Reagenz	Dauer	Anmerkung
1	Inkubator	10 bis 24 Stdn.	37 °C
2	Inkubator	60 Min.	60 °C
3	Xylol	10 Min.	3×
4	Ethanol absolut 99,6%	5 Min.	2×
5	Ethanol 96%	5 Min.	
6	Ethanol 70%	5 Min.	
7	1:10 H ₂ O ₂ 30%/Methanol Lösung	20 Min.	
8	Aqua dest.	5 Min.	2×
9	1:150 Proteinkinase K/ <i>Diluent</i> Ca. 200 μ L pro Objektträger	5 Min.	
10	Aqua dest.	1 Min.	
11	1× PBS	5 Min.	4×
12	10% BSA	20 Min.	
13	1× PBS	5 Min.	4×
14	Rodent Block M <i>MM HRP Polymer Kit</i>	30 Min.	
15	1× PBS	5 Min.	4×
16	anti- α -Aktin 1:700 <i>Antibody/Renaissance</i> <i>Diluent</i>	30 Min.	
17	1× PBS	5 Min.	4×
18	MM HRP Polymer	5 Min.	
19	1× PBS	5 Min.	4×
20	<i>Vektor Vip. Substrat Kit</i>	30 Sek. – 4 Min.	
21	H ₂ O	5 Min.	
22	1× PBS	5 Min.	
23	10% BSA	15 Min.	
24	1× PBS	5 Min.	2×
25	2,5% Normal Horse Serum	20 Min.	

26	anti-vWF 1:2.000 <i>Antibody/Renaissance</i> <i>Diluent</i>	30 Min.	37 °C
27	1× PBS	5 Min.	4×
28	Sekundärantikörper <i>Anti Rabbit Ig Peroxidase</i>	30 Min.	
29	1× PBS	5 Min.	4×
30	DAB <i>Vector Laboratories</i>	4 Sek. – 5 Min.	
31	H ₂ O	Spülen	
32	Methylgrün	3 Min.	60 °C
33	Aqua dest.	1 Min.	
34	Ethanol 96%	2 Min.	2×
35	Isopropylalkohol 99,8%	5 Min.	2×
36	Xylol	5 Min.	3×
37	Eindecken in Pertex		

Nach Färbung der Muskelschicht (violett), Endothelschicht (braun) und Gegenfärbung von Mitochondrien und Zellkernen mit Methylgrün erfolgte die Analyse des Muskularisierungsgrades mittels *Qwin* Software (Leica, Wetzlar, Deutschland). Zur Auszählung wurden mindestens zwei vollständig angeschnittene Lungenstücke analysiert. Zunächst wurde das Gefäß ausgewählt und markiert. Das Lumen wurde über die Software erkannt und die Gefäßwände gekennzeichnet. Mittels farbspektrometrischer Messung wurde zwischen braun gefärbtem Endothel und violett gefärbter Muskulatur der Gefäßmedia unterschieden. Der Anteil der violett gefärbten Muskelschicht des Gefäßes wurde berechnet. Zur Kategorisierung in nicht-, teil- und voll-muskularisiert wurden folgende Einteilung gewählt:

1. nicht-muskularisiert: $\leq 5\%$ violett gefärbtes alpha-Aktin
2. teil-muskularisiert: $> 5\% \leq 75\%$ violett gefärbtes alpha-Aktin
3. voll-muskularisiert: $> 75\%$ violett gefärbtes alpha-Aktin

Zusätzlich erfolgte eine Einteilung in kleine ($>20 \leq 70 \mu\text{m}$) Gefäße anhand des Durchmessers.

2.3.3.5. Stereologie

Für die stereologische Untersuchung wurden die Lungenschnitte zunächst mit einer van-Gieson-Färbung nach folgendem Protokoll angefärbt (Tabelle 15).

Tabelle 15 Färbeprotokoll van-Gieson

NR.	Reagenz	Dauer (Min.)	Anmerkung
1	Inkubator	60	58 °C
2	Xylol	10	
3	Xylol	10	
4	Xylol	10	
5	Ethanol absolut 99,6%	5	
6	Ethanol absolut 99,6%	5	
7	Ethanol 96%	5	
8	Ethanol 70%	5	
9	Resorcin – Fuchsin	10 – 24 Std.	
10	Fließendes Leitungswasser	15	
11	Aqua dest.	abspülen	
12	Hämatoxylin nach Weigert (A+B, 1:1)	5	
13	Aqua dest.	abspülen	
14	Fließendes Leitungswasser	15	
15	Aqua dest.	abspülen	
16	Van-Gieson Lösung	10	
17	Aqua dest.	abspülen	
18	Ethanol 96%	2	
19	Ethanol 96%	2	
20	Ethanol absolut 99,6%	5	
21	Isopropylalkohol 99,8%	5	
22	Xylol	5	
23	Xylol	5	
24	Xylol	5	
25	Eindecken mit Pertex		

Nach der van-Gieson-Färbung wurde ein vollständiger Scan beider Lungenschnitte am Lichtmikroskop mit der *Visiopharm newCAST* Software (Visiopharm A/S, Aarhus, Dänemark) durchgeführt. Die Analyse erfolgte an zufällig ausgewählten Abschnitten. Hierfür wurden die entsprechenden Areale beider Schnitte einander zugeordnet und nebeneinandergelegt. Als sogenannte *Bridge* wurde eine Morphologie gezählt bei der, in einem Bild, die Alveolarwand vollständig verschlossen war und in dem korrespondierenden Schnitt diese teilweise offen angeschnitten war (Abbildung 7) [73]. Die Alveolardichte (10^6 Alveolen/cm³) wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet (Formel 1):

$$\text{Alveolardichte} = \frac{\text{Bridges}}{\text{Anzahl Areale} \times \text{Größe des Areals} \times \text{Schnittvershub (6 } \mu\text{m)}}$$

Formel 1: Berechnung Alveolardichte

Anhand des Lungenvolumens und der Alveolardichte wurde die Gesamtzahl der Alveolen berechnet (Formel 2).

$$\text{Gesamtanzahl} = \text{Alveolardichte} \times \text{Lungenvolumen}$$

Formel 2: Berechnung Gesamtzahl der Alveolen

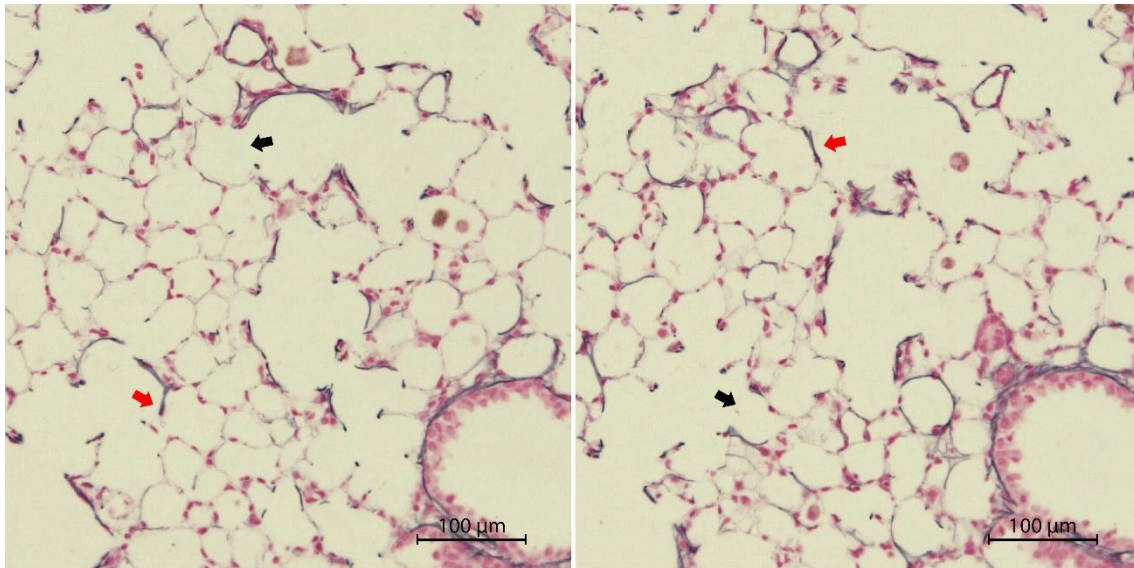


Abbildung 7 Stereologie

Repräsentatives histologisches Bild des Alveolarparenchyms in van-Gieson-Färbung. Aufeinander folgende Gewebeschnitte mit einem Schnittvershub von 6 μm . Schwarze Pfeile: nicht vollständig geschlossene Alveole, Rote Pfeile: Bridge. Skalierung: 100 μm .

2.4. Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte (MW) $\pm$ Standardfehler (SEM) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPad Prism 10 verwendet. Signifikanzen wurden mit * markiert. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als signifikant definiert. Die weitere Einteilung kann Tabelle 16 entnommen werden. Die Anzahl der Mäuse (n-Zahl) wurde in der Abbildungsbeschreibung gekennzeichnet. Auf das Vorliegen einer Normalverteilung wurde getestet. Wenn nicht anders angegeben, wurde beim Vergleich verschiedener Gruppen von mehreren Stichproben und zwei Variablen (Rauchexposition und Genotyp) eine statistische Auswertung über eine *two-way* ANOVA sowie ein Fisher's LSD Test durchgeführt.

Tabelle 16 Differenzierung der Signifikanzen

p-Wert	Symbol
$>0,05$	ns
$<0,05$	*
$<0,01$	**
$<0,001$	***
$<0,0001$	****

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden GraphPad Prism 10 und Adobe Illustrator CS6 genutzt.

3. Ergebnisse

Die Erforschung der Pathogenese der COPD wird häufig an Patienten oder Proben von Patienten mit bereits manifester COPD durchgeführt. Die Untersuchung von Lungengewebe z. B. nach Lungentransplantation oder Lungenvolumenreduktion aufgrund einer COPD in fortgeschrittenem Stadium spiegelt hier nur den Endpunkt ab und erlaubt keine Schlüsse auf die Frühentstehung sowie Entwicklung der Erkrankung. Die vorliegende Arbeit soll die Frühentstehung der COPD im Hinblick auf TRPV4 als potenziellen Teil der Frühpathogenese unter Rauchexposition untersuchen.

3.1. Kardiale und vaskuläre Veränderungen von TRPV4 WT und TRPV4^{-/-} Mäusen

Zur Beurteilung des Vorliegens einer PH wurden hämodynamische und echokardiografische Untersuchungen durchgeführt, sowie histologisch eine Analyse des Muskularisierungsgrades.

Während der hämodynamischen Messung wurden die rechtsventrikulären (*right ventricular systolic pressure*, RVSP) und linksventrikulären (*left ventricular systolic pressure*, LVSP) systolischen Drücke am Versuchsende gemessen. Bei isoliert-pulmonaler Hypertonie kann ein Anstieg des RVSP beobachtet werden.

Sowohl im RVSP (Abbildung 8A) als auch LVSP (Abbildung 8B) konnten keine Unterschiede der Gruppen untereinander sowie nach 3-monatiger Rauchexposition festgestellt werden.

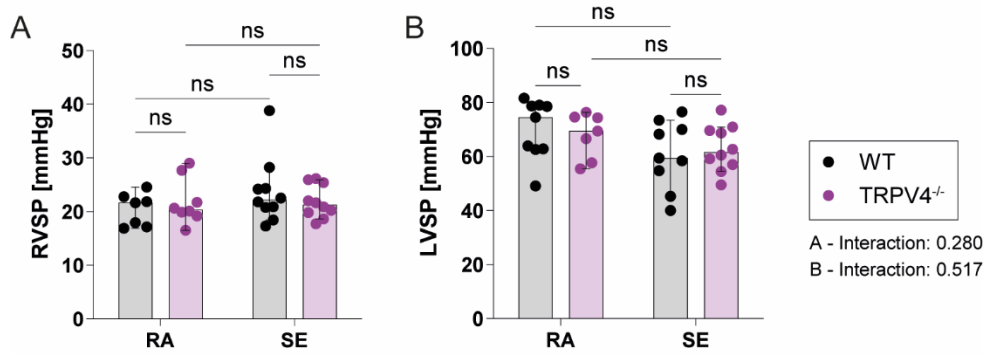


Abbildung 8 Ergebnisse Hämodynamik: RVSP und LVSP

Right ventricular systolic pressure (RVSP) (A) gemessen in mmHg und left ventricular systolic pressure (LVSP) (B) gemessen in mmHg für Wildtyp (WT) und TRPV4^{-/-} Mäuse in Raumluft (room air, RA) sowie Rauchexposition (smoke exposure, SE) nach 3 Monaten; n=7-10. Schwarze Punkte: WT, Violette Punkte: TRPV4^{-/-}. Signifikanzen bei * mit * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$, ns: nicht signifikant.

Um die Ergebnisse der hämodynamischen Messung zu bestätigen, wurden zusätzlich echokardiografische Messungen durchgeführt. Das erhobene Herzminutenvolumen (cardiac output, CO) wurde als Herzindex (cardiac index, CI) zusätzlich in Relation zum Körpergewicht gesetzt. Somit konnte das Gewicht der Mäuse als Einflussfaktor auf Veränderungen der Herzfunktion ausgeschlossen werden. Weiterhin erfolgte die Berechnung des pulmonalen Gefäßwiderstandes (pulmonary vascular resistance, PVR) aus $(80/3) \cdot \text{RVSP}/\text{CO}$.

Unter Raumluft konnte für WT und TRPV4^{-/-} Mäuse keine Veränderung von CO (WT RA: 13 mL/min, TRPV4^{-/-} RA: 15 mL/min) sowie CI (WT RA: 0,47 mL/min/g, TRPV4^{-/-} RA: 0,49 mL/min/g) beobachtet werden. Nach 3-monatiger Rauchexposition ist in WT-Mäusen ein Anstieg des CO (WT SE: 17 mL/min, Abbildung 9A) und CI (WT SE: 0,62 mL/min/g, Abbildung 9B) gegenüber RA-Kontrollmäusen zu beobachten. Ein Unterschied zwischen WT und TRPV4^{-/-} Mäusen konnte weder in Raumluft noch nach Rauchexposition beobachtet werden. Die Auswertung des PVR ergab keine Veränderung zwischen WT und TRPV4^{-/-} Mäusen unter Raumluft oder nach Rauchexposition (Abbildung 9C).

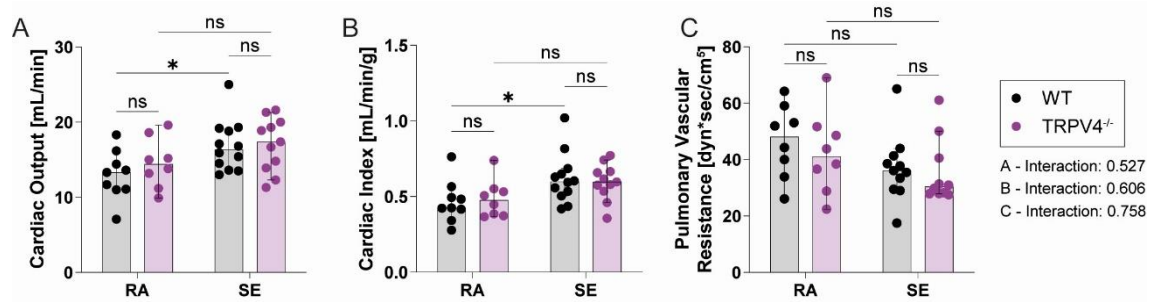


Abbildung 9 Ergebnisse Echokardiografie: cardiac output, cardiac index und pulmonary vascular resistance

Cardiac output (CO) (A) gemessen in mL/min, cardiac index (CI) (B) gemessen in mL/min/g und pulmonary vascular resistance (PVR) (C) gemessen in dyn*sec/cm⁵ für Wildtyp (WT) und TRPV4^{-/-} Mäuse in Raumluft (room air, RA) sowie Rauchexposition (smoke exposure, SE) nach 3 Monaten; n=8-12. Schwarze Punkte: WT, Violette Punkte: TRPV4^{-/-}. Signifikanzen bei * mit * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, **** < 0,0001, ns: nicht signifikant.

Die TAPSE ist ein Maß der rechtsventrikulären Pumpfunktion. Die Analyse PAT/PET diente ebenfalls der Beurteilung der rechtsventrikulären Pumpfunktion. Hierbei konnten weder ein Unterschied in der TAPSE zwischen WT und TRPV4^{-/-} Mäusen unter Raumluft noch nach Rauchexposition festgestellt werden (Abbildung 10A).

In WT-Mäusen lässt sich ein Abfall von PAT/PET nach 3-monatiger Rauchexposition beobachten (WT RA: 0,38, WT SE: 0,33). Ein Unterschied zwischen WT und TRPV4^{-/-} (TRPV4^{-/-} RA: 0,35, TRPV4^{-/-} SE: 0,33) konnte weder in Raumluftkontrollen noch nach Rauchexposition beobachtet werden (Abbildung 10B).

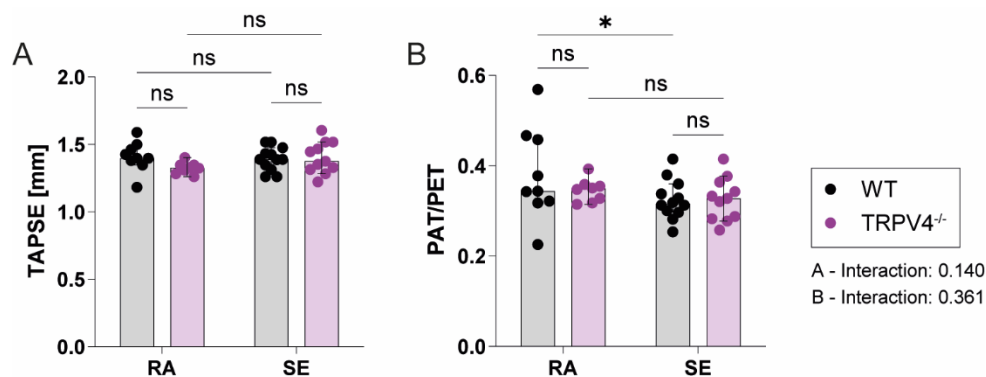


Abbildung 10 Ergebnisse Echokardiografie: TAPSE und PAT/PET

Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) (A) gemessen in mm und pulmonary acceleration time (PAT)/ pulmonary ejection time (PET) (B) für Wildtyp (WT) und TRPV4^{-/-} Mäuse in Raumluft (room air, RA) sowie Rauchexposition (smoke exposure, SE) nach 3 Monaten; n=8-12. Schwarze Punkte: WT, Violette Punkte: TRPV4^{-/-}. Signifikanzen bei * mit * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, **** < 0,0001, ns: nicht signifikant.

Um die mit PH-assoziierte Hypertrophie des rechten Ventrikels zu untersuchen, wurden die gewonnenen Herzen in den linken Ventrikel (LV), rechten Ventrikel (RV) und das Septum (S) getrennt. Das Gewicht des RV wurde in Relation zur Länge der Tibia gesetzt. Zusätzlich wurde aus den Gewichten von LV, RV und S die Rechtsherzhypertrophie (Fulton Index) bestimmt, welche den Anteil des rechten Ventrikels am gesamten Herzen beschreibt und bei PH steigt.

Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede sowohl in der Ratio von RV/Tibia (Abbildung 11A) als auch der Rechtsherzhypertrophie (Abbildung 11B) zwischen WT und TRPV4^{-/-} Mäusen in Raumluft als auch nach Rauchexposition beobachtet werden.

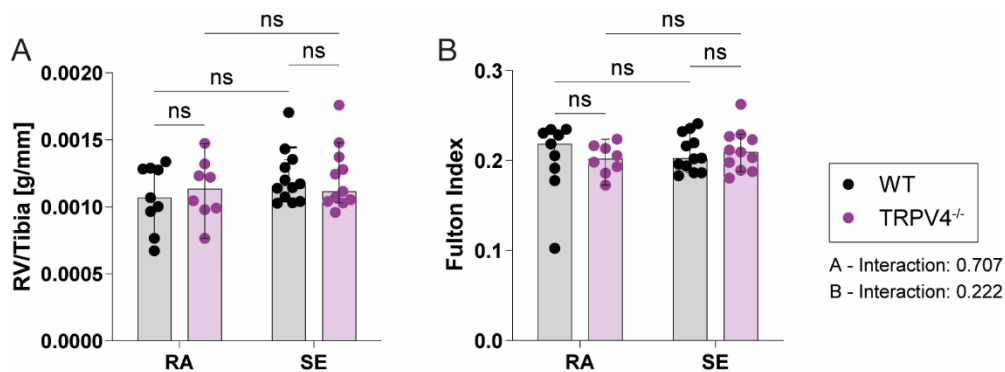


Abbildung 11 Ergebnisse Hämodynamik: RV/Tibia und Fulton Index

Gewicht rechter Ventrikel/Tibialänge (RV/Tibia) (A) gemessen in g/mm und Fulton Index (B) für Wildtyp (WT) und TRPV4^{-/-} Mäuse in Raumluft (room air, RA) sowie Rauchexposition (smoke exposure, SE) nach 3 Monaten; n=8-12. Schwarze Punkte: WT, Violette Punkte: TRPV4^{-/-}. Signifikanzen bei * mit $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns: nicht signifikant.

Zur histologischen Untersuchung der vaskulären Veränderungen wurde an Gewebeschnitten der Lunge der Muskularisierungsgrad bestimmt. Bei PH ist ein anteiliger Anstieg der teil- / vollmuskularisierten Gefäße zu beobachten.

In der vaskulären Histologie konnten ebenso keine Veränderungen der anteiligen Muskularisierung nach Rauchexposition in WT und TRPV4^{-/-} Mäusen beobachtet werden (Abbildung 12).

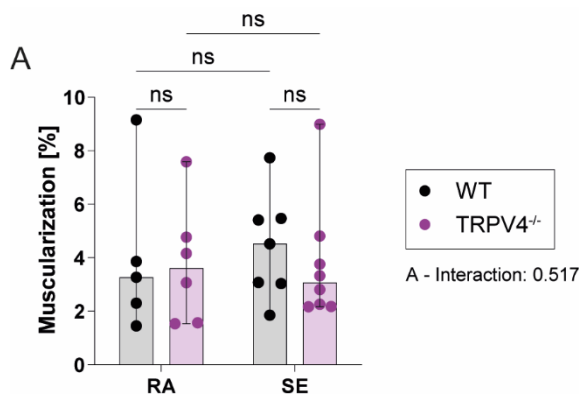


Abbildung 12 Ergebnisse Histologie: muscularization

Muskularisierungsgrad (%) für Wildtyp (WT) und TRPV4^{-/-} Mäuse in Raumluft (room air, RA) sowie Rauchexposition (smoke exposure, SE) nach 3 Monaten; n=8-12. Schwarze Punkte: WT, Violette Punkte: TRPV4^{-/-}. Signifikanzen bei * mit * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$, ns: nicht signifikant.

Zusammenfassend konnten keine Veränderungen von TAPSE, Fulton Index, RV/Tibia, LVSP und RVSP festgestellt werden. Ebenso ließen sich keine Veränderungen der Muskularisierung beobachten. In WT SE Mäusen konnte nach 3 Monaten ein Abfall von PAT/PET beobachtet werden. Somit sind nach 3 Monaten Rauchexposition keine Veränderungen im Hinblick auf das Vorliegen einer PH zu beobachten.

3.2. Alveoläre Veränderungen von TRPV4 WT und TRPV4^{-/-} Mäusen

3.2.1. *in-vivo* Charakterisierung nach Rauchexposition

Nach Versuchsende wurde mittels Lungenfunktion und μ CT die Atemdynamik gemessen. Die erhobenen Parameter dienen der Charakterisierung des alveolären Parenchyms, der luftleitenden Wege sowie der Lungenvolumina. Die inspiratorische Kapazität (*inspiratory capacity, IC*) stellt das maximale Volumen einer tiefen Einatmung aus Atemruhelage dar und steigt bei Patienten mit Emphysem an. *Lung volume/ Tibia* (Lungenvolumen/Tibia) wurde mittels μ CT erhoben und gibt das Lungenvolumen in

Relation zur Tibiallänge der Mäuse an. Beim Emphysem steigt das intrathorakale Volumen und führt zu einem Anstieg von Lungenvolumen/Tibia.

Bei WT-Mäusen ließen sich keine Veränderungen der IC nach 3 Monaten der Rauchexposition beobachten (WT RA: 0,89 mL, WT SE: 0,93 mL). Die TRPV4^{-/-} Mäuse wiesen in RA ähnliche Volumina für die IC auf, wie WT-Mäuse (TRPV4^{-/-} RA: 0,91 mL). Nach Rauchexposition konnte in TRPV4^{-/-} Mäusen ein signifikanter Anstieg der IC beobachtet werden (TRPV4^{-/-} SE: 1,09 mL, Abbildung 13A).

Ähnlich zur IC ließen sich keine Veränderungen von Lungenvolumen/Tibia nach 3-monatiger Rauchexposition in WT-Mäusen beobachten (WT RA: 29 mm³/mm, WT SE: 33 mm³/mm). In TRPV4^{-/-} Mäusen konnte im Vergleich zu den WT-Kontrollen nach Rauchexposition ein Anstieg vom Lungenvolumen/Tibia beobachten (TRPV4^{-/-} RA: 31 mm³/min, TRPV4^{-/-} SE: 37 mm³/min, Abbildung 13B).

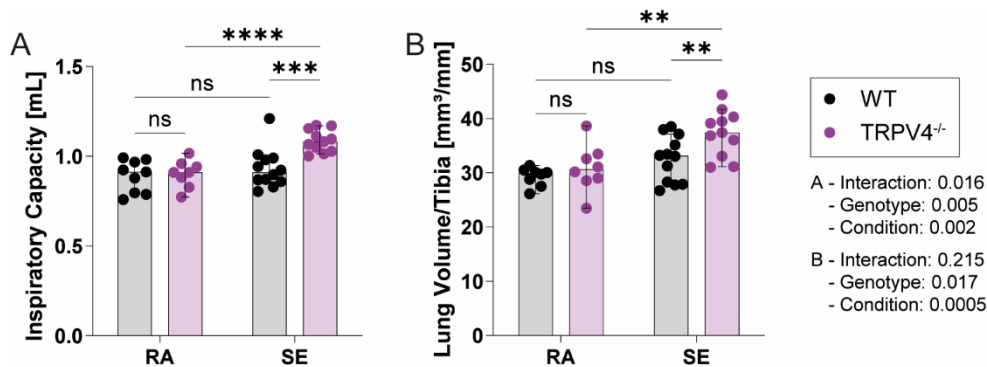


Abbildung 13 Ergebnisse Lungenfunktion und μ CT: Inspiratory capacity und lung volume/tibia

Inspiratory Capacity (IC) (A) gemessen in ml und Lung Volumen/Tibia (B) gemessen in mm³/mm für Wildtyp (WT) und TRPV4^{-/-} Mäuse in Raumlucht (room air, RA) sowie Rauchexposition (smoke exposure, SE) nach 3 Monaten; n=8-12. Schwarze Punkte: WT, Violette Punkte: TRPV4^{-/-}. Signifikanzen bei * mit * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, **** < 0,0001, ns: nicht signifikant.

Die Parameter *elastance* und *compliance* beschreiben die Elastizität und Rückstellkraft der Lunge.

In WT-Mäusen konnte keine Veränderung der *compliance* nach Rauchexposition festgestellt werden (WT RA: 0,048 mL/cmH₂O, WT SE: 0,047 mL/cmH₂O). Die TRPV4^{-/-} Mäuse hingegen zeigten unter Rauchexposition einen signifikanten Anstieg der *compliance* gegenüber den rauchexponierten WT-Mäusen, sowie den in Raumlucht gehaltenen TRPV4^{-/-} Mäusen (TRPV4^{-/-} RA: 0,051 mL/cmH₂O, TRPV4^{-/-} SE: 0,058 mL/cmH₂O Abbildung 14A). Als Kehrwert der *compliance* spiegeln sich diese

Ergebnisse mit einem signifikanten Abfall der *elastance* in TRPV4^{-/-} Mäusen gegenüber WT-Kontrollen unter Rauchexposition wider (WT SE: 22 cmH₂O/mL, TRPV4^{-/-} SE: 18 cmH₂O/mL, Abbildung 14B).

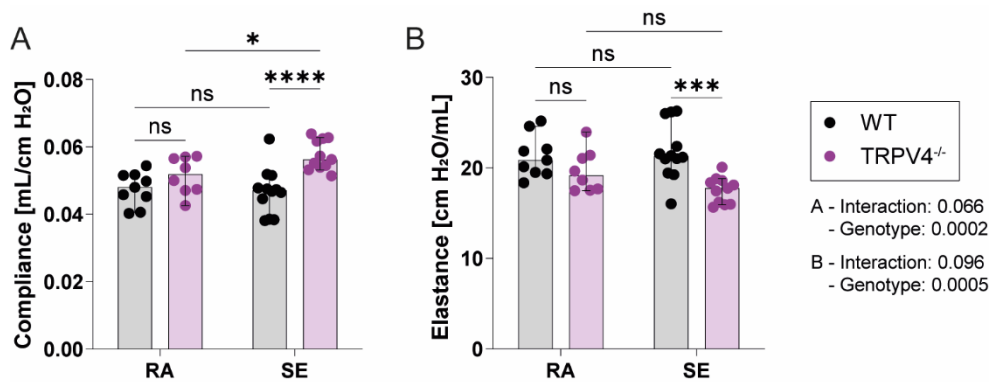


Abbildung 14 Ergebnisse Lungenfunktion: compliance und elastance

Compliance (A) gemessen in mL/cmH₂O und elastance (B) gemessen in cmH₂O/mL für Wildtyp (WT) und TRPV4^{-/-} Mäuse in Raumluft (room air, RA) sowie Rauchexposition (smoke exposure, SE) nach 3 Monaten; n=8-12. Schwarze Punkte: WT, Violette Punkte: TRPV4^{-/-}. Signifikanzen bei * mit * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, **** < 0,0001, ns: nicht signifikant.

Zur weiteren Differenzierung der Veränderungen im alveolären Parenchym wurden mittels Lungenfunktion die *tissue elasticity* (H), *hysteresis* und *tissue damping resistance* (G) erhoben. *Tissue elasticity* gibt hierbei die gespeicherte Energie des Alveolarparenchyms und die Fähigkeit der Rückstellung an. *Hysteresis* beschreibt die Differenz der elastischen Rückstellkräfte zwischen Ein- und Ausatmung. Die *tissue damping resistance* beschreibt den Energieverlust bei Ventilation durch Reibung und Erwärmung. Damit bildet G die Energie ab, welche in den leitenden Atemwegen oder dem Alveolarparenchym nicht zur Expansion führt.

Für die *tissue elasticity* ergaben sich keine Veränderungen in WT-Mäusen (WT RA: 20 cmH₂O/mL, WT SE: 20 cmH₂O/mL). Die TRPV4^{-/-} Mäuse zeigten hingegen einen signifikanten Abfall (TRPV4^{-/-} RA: 18 cmH₂O/mL, TRPV4^{-/-} SE: 16 cmH₂O/mL) zwischen Raumluft und Rauchexposition sowie gegenüber der WT-Kontrollen unter Rauchexposition (Abbildung 15A).

In der *hysteresis* konnten keine signifikanten Veränderungen in WT-Mäusen nach Rauchexposition beobachtet werden (WT RA: 1,9, WT SE: 2). TRPV4^{-/-} RA Mäuse wiesen eine ähnliche *hysteresis* wie die WT-Kontrollgruppe auf (TRPV4^{-/-} RA: 1,9). In TRPV4^{-/-} Mäusen konnte ein signifikanter Anstieg der *hysteresis* nach 3-monatiger Rauchexposition gegenüber Raumluftkontrollen sowie WT-Mäuse unter

Rauchexposition gemessen werden (TRPV4^{-/-} SE: 2,5) (Abbildung 15B).

In WT-Mäusen konnte keine Differenz von *G* zwischen den Konditionen beobachtet werden (WT RA: 3,87 cmH₂O/mL, WT SE: 3,97 cmH₂O/mL). Nach 3-monatiger Rauchexposition wiesen die TRPV4^{-/-} Mäuse signifikant verminderte Werte für *G* auf (TRPV4^{-/-} SE: 3,56 cmH₂O/mL). Unterschiede zwischen TRPV4^{-/-} RA und TRPV4^{-/-} SE konnten nicht beobachtet werden (TRPV4^{-/-} RA: 3,53 cmH₂O/mL, Abbildung 15C).

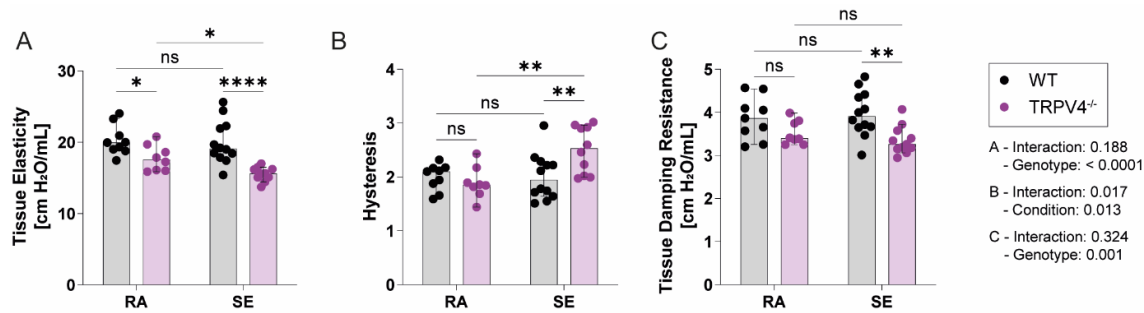


Abbildung 15 Ergebnisse Lungenfunktion: tissue elasticity, hysteresis und tissue damping resistance

Tissue elasticity(A) gemessen in cmH₂O/ml, *hysteresis* (B) und *tissue damping resistance* (C) gemessen in cmH₂O/ml für Wildtyp (WT) und TRPV4^{-/-} Mäuse in Raumluft (room air, RA) sowie Rauchexposition (smoke exposure, SE) nach 3 Monaten; n=8-12. Schwarze Punkte: WT, Violette Punkte: TRPV4^{-/-}. Signifikanzen bei * mit * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, **** < 0,0001, ns: nicht signifikant.

Um die strukturellen Unterschiede der Lunge dynamisch darzustellen, wurden *Pressure-Volume* (PV) Loops erhoben. Das ermittelte Lungenvolumen lässt sich in Abhängigkeit des Drucks auftragen. Um eine Differenzierung zwischen Ein- und Ausatmung in dieser Darstellung vornehmen zu können, wurden die Ergebnisse hier ebenfalls in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Der Kurvenverlauf ist das Produkt aus den vorherig beschriebenen Parametern und bildet diese im Zusammenspiel miteinander ab. Dabei ist die Steigung im ersten Drittel oder linearen Teil der PV-Loops Ausdruck der *compliance*. Das maximale erreichte Volumen ist Resultat der *compliance* sowie IC. Ebenfalls aus den PV-Loops gewonnen ist der Parameter *hysteresis* als Fläche zwischen dem Verlauf der Inspiration und Expiration [89].

Die Daten wurden als Mittelwerte der gemessenen Druckpunkte aufgetragen und stellen nicht die tatsächlich gemessenen Werte dar. Vielmehr geben sie eine Interpolation der untersuchten Gruppen wieder.

Unterschiede in den PV-Loops ließen sich bei TRPV4^{-/-} SE Mäusen beobachten. Hierbei ist das maximal erreichte Volumen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 13).

Zusätzlich konnte bei TRPV4^{-/-} SE eine erhöhte Steigung des linearen Teils der PV-Loops beobachtet werden (Abbildung 14). Als Ausdruck der *hysteresis* konnte eine erhöhte Volumendifferenz zwischen Inspiration und Expiration bei TRPV4^{-/-} SE Mäusen beobachtet werden (Abbildung 16).

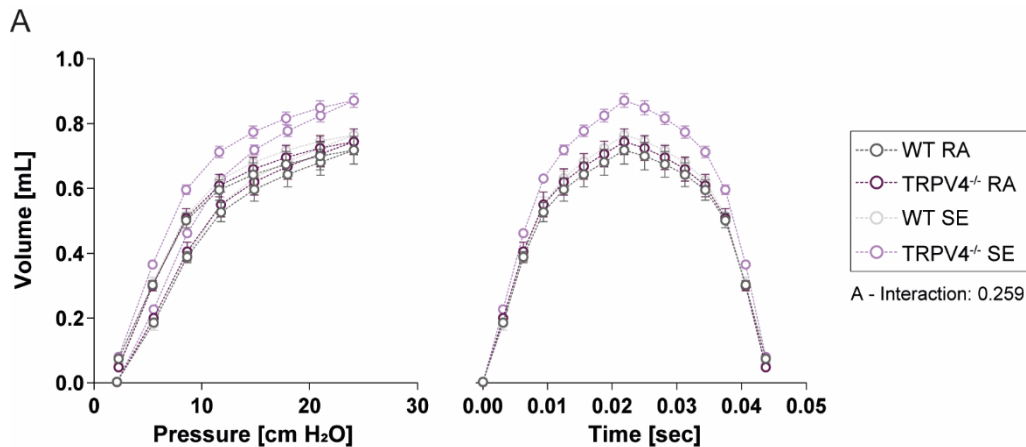


Abbildung 16 Ergebnisse Lungenfunktion: Pressure Volume Loops

Pressure-Volume-Loops gemessen in ml/cm H₂O (links) und mL/sek (rechts) für Wildtyp (WT) und TRPV4^{-/-} Mäuse in Raumluft (room air, RA) sowie Rauchexposition (smoke exposure, SE) nach 3 Monaten; n=8-12.

Zusammenfassend kam es in TRPV4^{-/-} Mäusen nach Rauchexposition zu einer stärkeren Ausprägung emphysemartiger Veränderungen der Atemdynamik im Vergleich zu den rauchexponierten WT- sowie beider RA-Kontrollgruppen. Hierbei war ein signifikanter Anstieg der IC, Lungenvolumen/Tibia, *compliance* sowie *hysteresis* in TRPV4^{-/-} SE Mäusen zu beobachten. Gleichzeitig zeigte sich ein Abfall von *elastance*, *tissue elasticity* sowie *tissue damping resistance*.

3.2.2. Einfluss von TRPV4 auf die Veränderungen des Lungenparenchyms nach Rauchexposition

Zur zweidimensionalen Charakterisierung des alveolären Parenchyms wurde an HE gefärbte Gewebeschnitten die alveoläre Morphometrie durchgeführt. Mittels μ CT-Untersuchung wurde ebenso das Verhältnis von Luft zu Lungengewebe (*air/tissue*) bestimmt sowie die Dichte des Lungenparenchyms (*lung density*) in Hounsfield-Einheiten (*hounsfield units*, HU) ermittelt. *Septal wall thickness* beschreibt die mittlere Dicke der Gewebebrücken des analysierten Gewebes in μ m. MLI beschreibt den horizontalen und vertikalen Abstand zwischen den Gewebebrücken des analysierten

Gewebes in μm . Zuletzt wurde bei der stereologischen Analyse mittels zwei Gewebeschnitten, mit bekanntem Abstand, eine Analyse des dreidimensionalen Alveolarparenchyms durchgeführt. Hierbei wurde die Dichte der Alveolen in 10^6 Alveolen/ cm^3 ermittelt.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede des *airspace* zwischen WT und TRPV4^{-/-} Mäusen in Raumluft sowie auch nach Rauchexposition beobachtet werden (Abbildung 17A).

Die μCT -Analyse zeigte einen Anstieg von *air/tissue* in TRPV4^{-/-} Mäusen nach Rauchexposition (TRPV4^{-/-} SE: 1,41) im Vergleich zu rauchexponierten WT-Kontrollen (WT SE: 1,24) sowie TRPV4^{-/-} Mäusen unter Raumluftbedingungen (TRPV4^{-/-} RA: 1,23) (Abbildung 17B).

Analog hierzu konnte in TRPV4^{-/-} Mäusen ein Abfall der Lungendichte nach Rauchexposition (TRPV4^{-/-} SE: -557 HU) gegenüber WT-Mäusen (WT SE: -530 HU) beobachtet werden. Unterschiede in WT-Mäusen konnten nicht erhoben werden (WT RA: -528 HU, TRPV4^{-/-} RA: -540 HU, Abbildung 17C).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in *septal wall thickness* (Abbildung 17D) sowie MLI (Abbildung 17E) zwischen WT und TRPV4^{-/-} Mäusen in Raumluft als auch nach Rauchexposition beobachtet werden.

In TRPV4^{-/-} Mäusen konnte nach Rauchexposition im Vergleich zu RA-Kontrollen eine verminderte Alveolardichte beobachtet werden (TRPV4^{-/-} RA: $11,34 \cdot 10^6$ Alveolen/ cm^3 , TRPV4^{-/-} SE: $9,36 \cdot 10^6$ Alveolen/ cm^3). Unterschiede in WT-Mäusen konnten nicht erhoben werden (Abbildung 17F).

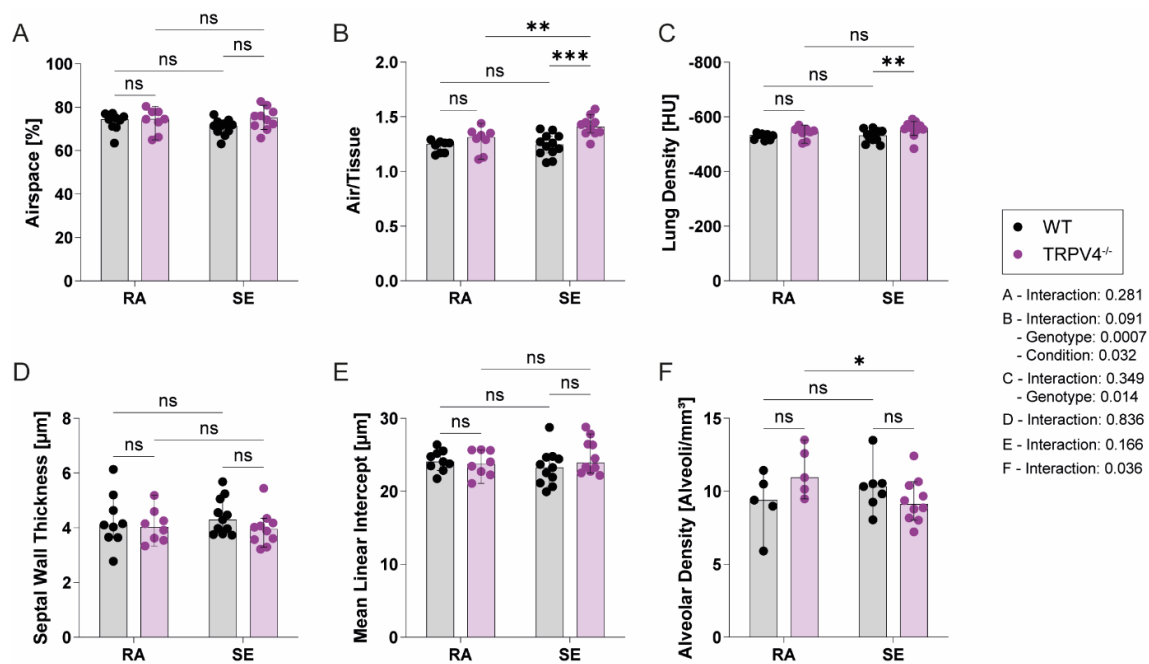


Abbildung 17 Ergebnisse Histologie und μ CT: airspace, air/tissue, lung density, septal wall thickness, MLI und alveolar density

Airspace (A) gemessen in %, air/tissue (B), lung density (C) gemessen in HU, septal wall thickness (D) gemessen in μ m, mean linear intercept (MLI) (E) gemessen in μ m und alveolar density (F) gemessen in 10^6 Alveolen/cm³ für Wildtyp (WT) und TRPV4^{-/-} Mäuse in Raumluft (room air, RA) sowie Rauchexposition (smoke exposure, SE) nach 3 Monaten; n=8-12. Schwarze Punkte: WT Violette Punkte: TRPV4^{-/-}. Signifikanzen bei * mit $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$, ns: nicht signifikant.

Zusammenfassend konnte in TRPV4^{-/-} Mäusen nach 3-monatiger Rauchexposition eine stärkere Ausprägung emphysemartiger Veränderungen des Lungenparenchyms im Vergleich zu WT- sowie RA-Kontrollen beobachtet werden. Konkret kam es zu einem Abfall der Alveolar- und Lungendichte sowie zum Anstieg des air/tissue Verhältnis. Abbildung 18 stellt repräsentativ die Veränderungen in den rauchexponierten TRPV4^{-/-} (Abbildung 18B) gegenüber WT-Mäusen, die in Raumluft gehalten wurden (Abbildung 18A), dar. Zu beobachten ist eine verminderte Dichte des Parenchyms in TRPV4^{-/-} Mäusen nach Rauchexposition.

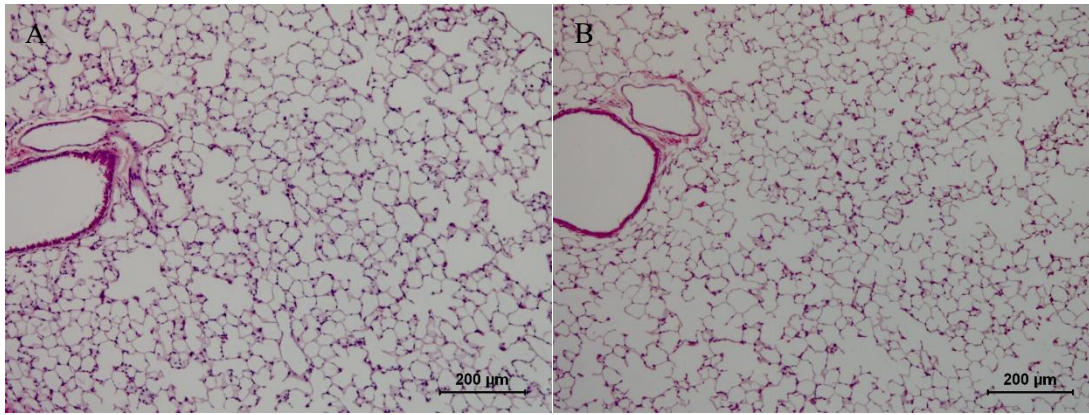


Abbildung 18 Histologisches Ergebnis nach Rauchexposition in HE-Färbung

Repräsentatives histologisches Bild einer formalinfixierten Lunge in HE-Färbung. Alveoläres Parenchym mit linksseitig gelegenem Bronchus sowie begleitendes Gefäß. WT RA (A), TRPV4^{-/-} SE (B). Skalierung: 200µm.

4. Diskussion

Die COPD ist eine stark verbreitete Erkrankung und eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Die zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen sind bis heute nicht vollständig geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von TRPV4 im Mausmodell der Zigarettenrauchexposition untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei den TRPV4^{-/-} Mäusen

- 1.) die Lungenfunktion/Morphologie unter Raumluft nach 3 Monaten schon leichtgradig verändert war und
- 2.) diese Veränderungen nach 3-monatiger Rauchexposition bereits zur Entwicklung eines Emphysems voranschreiten, wohingegen die WT-Kontrollen noch keine Veränderungen zeigten.

4.1. Wahl von TRPV4 als möglicher Faktor der COPD-Entstehung

TRPV4 ist an verschiedenen zellulären Abläufen und Interaktionen beteiligt [5, 105, 71, 36, 66]. Eine Fehlfunktion oder der Knockout von TRPV4 kann somit zu verschiedenen Pathologien und klinischen Symptomen führen. So konnte in COPD-Patienten eine erhöhte basale Expression der TRPV4 mRNA nachgewiesen werden [14]. Ebenso konnte TRPV4 als Teil der Immunantwort auf inhalative Noxen identifiziert werden und eine protektive Wirkung im Hinblick auf die zellvermittelte Immunantwort auf chemisch induzierte Lungenparenchymschäden mit vorheriger TRPV4-Inhibitor Behandlung beobachtet werden [9, 133]. Unter Aktivierung von TRPV4 mittels Agonist (GSK-1016790A) konnte eine gesteigerte Aktivierung von MMP2 und MMP9 sowie erhöhte Lungenparenchymschäden anhand von Trocken- Nassgewichtverhältnissen beobachtet werden [122]. Ursächlich für eine COPD sind in den häufigsten Fällen inhalative Noxen, meist Partikel der Verbrennung von Tabak. Der Abtransport dieser inhalativen Partikel erfordert physiologisch eine ausreichende Funktion des Flimmerepithels. In TRPV4^{-/-} Mäusen wurde bereits ein gestörter Zilienschlag beobachtet [61].

Bezugnehmend auf die Ergebnisse vorausgegangener Untersuchungen von TRPV4 wurde in dieser Arbeit die Rolle von TRPV4 in der Beteiligung der Pathophysiologie der COPD untersucht. Die Literatur beschreibt für TRPV4 eine Rolle in sowohl der immunvermittelten Reaktion auf inhalative Noxen als auch für sich anschließende Prozesse des Umbaus und Destruktion des Lungenparenchyms mittels Aktivierung von

Proteasen, wie z. B. MMP9. Für die Untersuchungen wurden TRPV4^{-/-} und WT-Mäuse in einem Rauch-induzierten COPD-Modell verwendet und 3 Monate Zigarettenrauch exponiert.

4.2. Wahl des Tiermodells

Die COPD ist eine primär pulmonale Erkrankung, die dennoch zu systemischen Veränderungen der Physiologie und zu ganzkörperlichen Symptomen führen kann. Um mögliche Interaktionen und extrapulmonale Befunde erheben zu können, wurde die Analyse am gesamten Tier verwendet. Um die Beteiligung von TRPV4 an der Pathogenese der COPD beurteilen zu können, wurden TRPV4^{-/-} und WT-Mäuse verwendet.

Das Auslösen einer COPD in Tieren kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Zum einen gibt es verschiedene Modelle der Inhalation von Noxen (Zigarettenrauch, Stickstoffdioxid und Schwefeldioxid) aber auch die Inhalation oxidativer Substanzen wie z. B. Ozon. Weiterhin kann die intrapulmonale Applikation von z. B. neutrophiler Elastase zu emphysemartigen Veränderungen der Lunge führen [34]. Diese unterschiedlichen Modelle der COPD bilden dabei verschiedene Aspekte der Erkrankung ab.

Zigarettenrauchexposition ist im Menschen weiterhin Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer COPD [23]. Das verwendete Modell kommt der Zigarettenrauchexposition des Menschen am nächsten. Hierbei wurden die Mäuse an 5 Tagen für 6 Stunden Zigarettenrauch exponiert. In Mäusen kommt es nach 8 bis 12 Wochen zur Ausprägung klassischer COPD-Merkmale in Lungenfunktion und Histologie, wie z. B. Anstieg der *compliance* und IC, sowie Verminderung von *lung-* und *alveolar density* [96, 48]. Das Rauchmodell und die anschließende Methodik wurden in zahlreichen Untersuchungen analysiert und basieren auf etablierten Verfahren [48, 33, 82]. Änderungen in Dauer, Intervall und Intensität der Zigarettenrauchexposition können dabei zu veränderter Ausprägung der Befunde führen. Auch wenn es, aufgrund verschiedener Immunantwort und Anatomie, Unterschiede in der Stärke und Verteilung der Symptome von Mausmodell zu Menschen gibt [48], ist dies ein geeignetes und reproduzierbares Modell, um die Auswirkungen der Deletion von TRPV4 zu untersuchen.

4.3. Deletion von TRPV4 beeinflusst nicht die Entstehung einer PH in Mäusen nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition

Die PH ist in Menschen eine Erkrankung, die vermehrt an Bedeutung gewinnt und im klinischen Alltag früher als Differentialdiagnose in Betracht gezogen wird. Als potenziell tödlich verlaufende Erkrankung stellt sie für Patienten eine lebensverändernde Diagnose dar [42]. Einen großen Zuwachs erfährt zuletzt auch die Erforschung der Ätiologie, Diagnostik und Therapie der PH. Die zur Untersuchung häufig herangezogenen Tiermodelle bilden dabei viele Modalitäten der Erkrankung ab.

Eines der am häufigsten verwendete Modelle für die PH ist die Exposition gegenüber chronischer Hypoxie. Die Mäuse werden dabei für 28 Tage in Hypoxie (10% O₂) gehalten [64]. Ein weiteres Modell der PH stellt die Monocrotalin-Exposition dar. In Ratten konnte hierbei bislang ein am besten reproduzierbares Modell etabliert werden [107].

Hinzu kommen eine Reihe an Kombinationen verschiedener Modellen sowie genetischen Manipulation und chirurgische Verfahren, um in Versuchstieren eine PH und Rechtsherzversagen auszulösen [107, 65].

Zuletzt wird die PH auch als Komorbidität anderer Erkrankungen, wie z. B. der COPD, betrachtet und untersucht. So können erhöhte pulmonale Gefäßwiderstände und eine verringerte Rechtsherzfunktion auch in Mausmodellen der COPD beobachtet werden [82]. Die Ausprägung und Stärke der PH ist hierbei sehr variabel und korreliert nicht zwangsläufig mit der Stärke der COPD [135, 67]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die ersten Anzeichen einer PH frühestens nach ca. 3 Monaten Zigarettenrauchexposition zu beobachten waren [96]. Konkret kam es zu einem geringen Anstieg des RVSP. In längeren Zeiträumen der Zigarettenrauchexposition (6 und 8 Monate) konnte ein weiterer Anstieg des RVPS sowie weitere definitive Merkmale der PH, z. B. ein Anstieg des Fulton Index sowie eine verstärkte Muskularisierung der kleinen Lungengefäße beobachtet werden [96]. Gredic et al. zeigten 2022 ebenfalls einen geringen Anstieg des RVSP und keine Veränderungen des Fulton Index nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition. Zusätzlich wurde ein Abfall der TAPSE beobachtet. Auch hier konnte eine stärkere Ausprägung der PH nach längerer Zigarettenrauchexposition beobachtet werden. So sind analog erst nach 8-monatiger Rauchexposition die vollständigen Merkmale der PH ersichtlich [33]. Diese Ergebnisse decken sich zum Großteil mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten. So konnten hier nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition in WT- sowie TRPV4^{-/-} Mäusen keine Veränderungen des

Fulton Index, RV/Tibia, RVSP sowie PAT und TAPSE beobachtet werden. Im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten konnten keine Veränderungen der Muskularisierung nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition beobachtet werden. Der Umbau und die Zunahme der Gefäßmedia ist einer der Gründe für einen Anstieg des RVSP und führt zur Rechtsherzbelastung und Hypertrophie [106, 116]. Aber auch andere Ursachen neben dem vaskulären Umbau sind für eine PH beschrieben z. B. der Rückstau bei Linksherzinsuffizienz oder chronisch thromboembolische Verlegungen der Pulmonalarterien.

Eine Veränderung des LVSP konnte ebenso nicht beobachtet werden. Dieser ist in der Literatur nicht als Merkmal der PH beschrieben und diente der Negativkontrolle bzw. Erfassung möglicher Nebenfunde. Der Abfall von PAT/PET in WT-Mäusen nach Rauchexposition lässt sich am ehesten durch die breite Verteilung der Daten erläutern und hat keine klinische Relevanz. Weiterhin wäre eine Möglichkeit der Ursache, dass eine beginnende und sehr leichte PH durch die sensitivere Methode der Echokardiografie vorzeitig detektiert wird.

Um die Auswirkungen und Veränderungen auf die Herzleistung zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Parameter CO und CI erhoben. Veränderungen im Herzminutenvolumen können verschiedenste Ursachen haben und zu unterschiedlichen Symptomen führen. So kann ein akutes Geschehen, z. B. Myokardinfarkt, die Herzleistung massiv beeinflussen [40], aber auch chronische Prozesse wie z. B. die hypertensive Kardiomyopathie oder Klappenvitien die Herzleistung über einen längeren Zeitraum verringern [77]. In der PH führt die Zunahme des pulmonalen Gefäßwiderstandes zu einer chronischen Druckbelastung des rechten Herzens und kann so zur Hypertrophie und Dilatation des rechten Ventrikels führen. Dies führt zu einer Verringerung des CO. Eine Veränderung des pulmonalen Gefäßwiderstandes konnte in dieser Arbeit ebenso nicht beobachtet werden und bestätigt die Ergebnisse der Erhebung der Muskularisierung. Ultimativ ist das Rechtsherzversagen für die meisten Patienten die führende Pathologie [42]. In dieser Arbeit konnten keine Veränderungen von CO und CI in TRPV4^{-/-} Mäusen nach Rauchexposition erhoben werden. Der Anstieg von CO und CI in WT-Mäusen nach Rauchexposition lässt sich am ehesten durch eine gesteigerte Inotropie durch die Nikotinwirkung der Rauchexposition erklären [77]. Wie in diesen Untersuchungen gezeigt, konnten nach 3-monatiger Rauchexposition keine Merkmale der PH nachgewiesen werden. Somit würde eine Veränderung der Herzleistung auf andere

Gründe zurückgeführt werden müssen, da keine chronische Druckbelastung auf dem rechten Herzen erhoben werden konnte, welche zum Abfall von CO und CI führen könnte. Diese Ergebnisse decken sich mit Studien, in denen ein Abfall des CO erst nach einer Rauchexposition von 32 Wochen beobachtet werden konnte [112].

Im Überblick ergibt sich für die vaskulären Veränderungen nach Rauchexposition für den TRPV4 KO eine weniger stark ausgeprägte PH als in der Literatur beschrieben. Nichtsdestotrotz entspricht dieses Resultat der aktuellen Studienlage. Obwohl in einigen Studien bereits erste Anzeichen einer PH nach 3-monatiger Rauchexposition beobachten werden konnten, wurde dies in dieser Arbeit nicht bestätigt. Jedoch ist zu beachten, dass für einen eindeutigen Druckanstieg und somit eine volle Ausprägung der PH ein Zeitraum ab 6 bis 8 Monaten der Rauchexposition notwendig ist [96, 33]. Da in dieser Arbeit weder ein erhöhter RVSP noch eine Änderung der Muskularisierung oder PVR beobachtet werden konnte, ist anzunehmen, dass in diesem Versuch 3 Monate der Zigarettenrauchexposition nicht ausreichend waren, um eine relevante Veränderung dieser Parameter hervorzurufen.

4.3. Deletion von TRPV4 führt zu einer verfrühten Ausprägung eines Emphysems im Vergleich zu WT-Mäusen

Während der 3-monatigen Rauchexposition entwickelten die TRPV4^{-/-} Mäuse charakteristische Merkmale der COPD. So konnte in anderen Studien nach 8-monatiger Rauchexposition erst ein Anstieg der *compliance* sowie eine erniedrigte *resistance* beobachtet werden [33, 81]. Ebenso sind die histologischen Veränderungen der COPD, mit erhöhtem *airspace* und MLI sowie erniedrigte SWT und Alveolaranzahl zu beobachten. Erste Veränderungen nach Zigarettenrauchexposition sind bereits nach 6-monatiger Exposition nachgewiesen worden [96]. Im Einklang mit der Literatur wurden auch in dieser Arbeit nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition von WT-Mäusen keine Veränderungen in der Lungenfunktion sowie Histologie beobachtet. In TRPV4^{-/-} Mäusen hingegen konnten bereits erste Veränderungen des Lungenparenchyms nach 3 Monaten Exposition nachgewiesen werden. Genauer kam es zu einem Anstieg der IC und des *lung volume*. Diese Veränderungen sind Befunde, welche auf eine überblähte Lunge hinweisen.

Um die elastischen Rückstellkräfte der Lunge zu untersuchen, wurden Messungen der

compliance und *elastance* durchgeführt. Hier kam es in TRPV4^{-/-} Mäusen zu einem Anstieg der *compliance* und einem Abfall der *elastance* unter Zigarettenrauchexposition. In der Literatur werden verschiedenen Zeiträume der Rauchexposition beschrieben, um Veränderungen der *compliance* zu erreichen. So ist in einigen Studien schon nach 10 Wochen Zigarettenrauchexposition ein Anstieg der *compliance* zu beobachten [102], in anderen erst nach 3-monatiger Exposition [96]. Eine fibrotische Veränderung der Lunge wurde aufgrund der erniedrigten *elastance* ausgeschlossen. Eine Lungenfibrose kann ebenfalls durch inhalative Noxen ausgelöst werden, gehört allerdings zu den restriktiven Lungenerkrankungen, welche mit erniedrigter Vitalkapazität und FEV1 einhergeht [40]. Die Ergebnisse der *compliance* weisen auf einen Verlust elastischer Fasern der TRPV4^{-/-} Mäuse hin und stehen im Einklang mit dem erhöhten intrathorakalen Volumen (IC, *lung volume*).

Weiterhin wurde in TRPV4^{-/-} Mäusen nach Zigarettenrauchexposition eine verringerte *tissue elasticity* gegenüber WT-Kontrollen beobachtet. Hierbei handelt es sich am ehesten um eine Alterierung des Lungengerüsts in TRPV4^{-/-} Mäusen, welche eine verstärkte Reaktion auf SE unterstützen oder ursächlich hierfür sein könnte. In der Literatur werden für Elastase-Emphysemmodelle an Mäusen ebenfalls sinkende Werte der *tissue elasticity* beschrieben [24]. Allerdings waren die Werte in dieser Arbeit bereits unter RA leicht erniedrigt. Eine erniedrigte *tissue damping resistance* und damit ein erhöhter Energieverlust durch Reibung in TRPV4^{-/-} SE Mäusen weist ebenso auf strukturelle Unterschiede des Lungenparenchyms hin [37]. Auch für die *tissue damping resistance* wurden in Elastase-Emphysemmodellen an Mäusen verringerte Werte beschrieben. Erhöhte Werte für *tissue elasticity* sowie *tissue damping resistance* konnten z. B. in einem Bleomycin-Fibrosemodell erhoben werden [24].

Das dynamische Zusammenspiel der Veränderungen in den erhobenen Parametern wurde in den PV-Loops dargestellt. Ein stärkerer Anstieg im ersten Drittel der PV-Loops zeigt eine erhöhte *compliance* [89]. Dies wurde besonders in TRPV4^{-/-} SE Mäusen beobachtet. Somit führt ein identischer Druck auf den Atemwegen in TRPV4^{-/-} SE Mäusen zu einem höheren Volumen der Lunge. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass das maximal erreichte Volumen nach Inspiration in TRPV4^{-/-} SE Mäusen erhöht war. Dies ist Resultat der erhöhten IC, des Verhältnisses Lungenvolumen/Tibia sowie der *compliance*. Die Unterschiede des Volumens zwischen In- und Expiration sind ebenso in den PV-Loops ersichtlich und zusätzlich als *hysteresis* dargestellt. Auch hier konnte in TRPV4^{-/-} SE Mäusen eine erhöhte *hysteresis* gemessen werden. Dies deutet auf den Kollaps von

Alveolen hin, da zur Inspiration ein höherer Druck notwendig ist, als bei gleichem Volumen in der Expiration gemessen wurde [110]. Der Kollaps von Alveolen bei Expiration erfordert ein höheren Atemaufwand und kann zu Atelektasen sowie Emphysembullae führen [83, 121].

Die Veränderungen der Lungenfunktion unter Zigarettenrauchexposition schließen auf einen Umbau des Lungenparenchyms, weshalb die Lungen histologisch und radiologisch weiter beurteilt wurden. In WT-Mäusen konnte gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg von *airspace* und MLI sowie einer erniedrigten SWT erst nach 6 bzw. 8-monatiger Rauchexposition kommt. Nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition konnten keine Veränderungen von *airspace*, MLI sowie SWT erhoben werden. [81, 96]. In dieser Arbeit konnten nach 3 Monaten Zigarettenrauchexposition ebenso keine Veränderungen von *airspace*, MLI und SWT beobachtet werden. Allerdings war nach 3-monatiger Rauchexposition bereits ein erhöhtes Verhältnis von *air/tissue* in TRPV4^{-/-} SE Mäusen zu beobachten. Zusätzlich kam es zu einer Verringerung der Alveolardichte sowie der *lung density* in TRPV4^{-/-} SE Mäusen. Diese Daten deuten darauf hin, dass es zu einem initialen Verlust von Alveolen in TRPV4^{-/-} Mäusen nach 3-monatiger Rauchexposition kommt, welcher wiederum zu einer Verringerung der Dichte des Lungenparenchyms und somit zu Anstieg des Verhältnis *air/tissue* führt.

Im Überblick zeigt sich die Ausprägung von typischen Veränderungen des Emphysems in TRPV4^{-/-} Mäusen schon nach 3-monatiger Rauchexposition. Die Lungenfunktion und μ CT-Untersuchungen zeigten Änderungen in der elastischen Funktionsweise sowie der Lungenvolumina auf. Histologisch ließ sich eine verringerte Alveolardichte beobachten. Diese Veränderungen entsprechen dem pathologischen Umbau des Parenchyms beim Emphysem. Allerdings konnten keine Veränderungen von *airspace*, MLI sowie SWT beobachtet werden. Da es sich hierbei um eine separate histologische Methode handelt, könnte eine geringere Sensibilität dieser dazu geführt haben, dass noch keine Veränderungen detektiert werden konnten. Ebenso war in anderen Studien eine Rauchexposition von mindestens 6 Monaten notwendig, um Veränderungen dieser Parameter beobachten zu können. Somit ist davon auszugehen, dass in Lungenfunktion und μ CT eine höhere Sensibilität liegt, um Veränderungen nach Rauchexposition frühzeitig zu erfassen.

TRPV4^{-/-} Mäusen scheinen eine höhere Anfälligkeit der Lunge gegenüber Rauchexposition zu haben. TRPV4 könnte demnach eine schützende Funktion haben. Nach 3-monatiger Zigarettenrauchexposition sind in TRPV4^{-/-} Mäusen eindeutige Zeichen eines Emphysems zu beobachten. Im Rahmen der Rauchexposition führt der Knockout von TRPV4 somit zu einer früheren Manifestation des Emphysems. Im Laufe des Lebens erfolgt natürlicherweise Kontakt zu inhalativen Partikeln und Schadstoffen, sodass bei der Entwicklung eines Emphysems auch eine relevante Alterskomponente zum Tragen kommt. Schlussfolgernd ist davon auszugehen, dass TRPV4 im Frühkontakt zu Noxen eine wichtige Rolle spielt. Die protektive Wirkung von TRPV4 im Kontakt zu inhalativen Noxen wird unterstützt durch Untersuchungen, in denen eine erhöhte Expression von TRPV4 in Lungenhomogenat von COPD-Patienten beobachtet wurde [14]. Aber auch in eigenen Studien wurde gezeigt, dass TRPV4 sowohl auf mRNA- und Proteinebene in COPD-Patienten erhöht ist. Interessanterweise ist TRPV4 auf Proteinebene auch in Rauchern ohne COPD erhöht (unpublizierte Daten, persönliche Mitteilung Julia Uhl, ECCPS, JLU). Durch eine Beteiligung von TRPV4 am zellulären Prozess des Zilienschlags und der mukoziliären *clearance* ist der Abtransport von inhalativen Partikeln bei TRPV4^{-/-} Mäusen gestört [61]. Der gestörte Abtransport könnte zu einem längeren Verbleib dieser Noxen in den Atemwegen und somit zu einer verfrühten Inflammation führen. Die Inflammation und Gewebedestruktion würde somit schon bei kumulativ geringerer Noxenlast beginnen. Im klinischen Alltag könnte somit eine Alteration des TRPV4 Gens bei COPD-Patienten mit vergleichsweise niedrigerer Anzahl an Pack-Years von Bedeutung sein. Da es zu keiner stärkeren Ausprägung nach längerer Rauchexposition kommt, ist TRPV4 allerdings nicht alleinstehend für die Reaktion auf Noxen und Destruktion des Lungenparenchyms verantwortlich, da ansonsten die pathologischen Veränderungen weiter voranschreiten würden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TRPV4 in der frühen Manifestation der COPD sowie Emphysementstehung ohne weitere Noxen eine große Rolle zukommt. Da der Knockout zu einer verfrühten Ausprägung des Emphysems führte, ist davon auszugehen, dass TRPV4 bei Rauchexposition zunächst protektiv wirkt.

4.4. Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine Beteiligung von TRPV4 an der Frühreaktion auf Zigarettenrauch bzw. an der normalen Aufrechterhaltung der Funktion des Lungenparenchyms gezeigt werden. In weiteren Untersuchungen, auch nach 8-monatiger Rauchexposition, sollte die Ausprägung und Stärke des Emphysems untersucht werden. Falls die protektive Rolle von TRPV4 nur im frühen Kontakt zu Noxen eine Bedeutung zukommt, würde die Stärke des Emphysems sich im Zeitverlauf nicht verändern, sondern es nur zu einer verfrühten Ausprägung kommen. Die genaue Rolle des Kanals in der Pathophysiologie der COPD ist allerdings weiterhin ungeklärt. Ein wichtiger Bestandteil der COPD-Entstehung ist hierbei die immunvermittelte Destruktion des Alveolarparenchyms durch Protease von hauptsächlich neutrophilen Granulozyten. Um die potenzielle Funktion von TRPV4 in der Immunreaktion zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig. Hierbei sind besonders neutrophile Granulozyten und Alveolarmakrophagen zu beachten.

Weiterhin ist zu klären, ob durch den Knockout von TRPV4 weitere grundlegende Veränderungen des Alveolarparenchyms und Lungengerüsts vorliegen, welche die Reaktion auf Zigarettenrauch bzw. natürliche Alterungsprozesse beeinflussen könnten. Die in dieser Arbeit beobachtete veränderte elastische Zusammensetzung der Lungen von TRPV4^{-/-} Mäusen könnte in Untersuchungen von elastischen Fasern des Lungengerüsts beurteilt werden.

Die tatsächliche protektive Rolle von TRPV4 könnte durch epigenetische Stimulation der TRPV4-Expression im Zusammenhang mit Rauchexposition untersucht werden. Dabei sind besonders die frühen Zeitpunkte der Manifestation eines Emphysems zu beachten.

5. Zusammenfassung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) ist eine weit verbreitete Diagnose und aktuell die dritthäufigste Todesursache weltweit. Klinisch präsentiert sich die COPD mit starkem produktivem Husten und Dyspnoe. Extrapulmonale Symptome sind unter anderem Zyanose durch Hypoxämie oder Auswirkungen einer Rechtsherzbelastung, wie verstärkte periphere Ödeme oder gestaute Halsvenen. Häufige Komorbidität der COPD ist die Pulmonale Hypertonie mit Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks auf über 20 mmHg. Als Notfall gilt die Exazerbation bei COPD, welche häufig aufgrund einer Infektion zu aggravierten Symptomen führt und eine intensivierte Therapie erfordert. Die Zigarettenrauchexposition gilt – neben Feinstaubbelastung, dem Einatmen anderer Schadstoffe und angeborenen Faktoren – als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer COPD. Die so entstehende chronische Inflammation der Atemwege führt zum Untergang von Alveolen und der Destruktion des elastischen Grundgerüsts der Lunge. Ein wichtiger Bestandteil der Diagnostik liegt in der Lungenfunktion. Hierbei kann aufgrund des Kollapses von Alveolen eine erniedrigte forcierte Expiration in einer Sekunde (*forced expiratory volume in one second*, FEV₁) sowie ein erhöhtes Residualvolumen und eine erhöhte *compliance* gemessen werden. Die medikamentöse Therapie beschränkt sich dabei auf Symptomkontrolle durch atemwegserweiternde Inhalativa und Kortikosteroide.

Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4) ist ein membranständiger nichtselektiver Calciumkanal. Neben seiner Mechano- und Thermosensibilität wurde TRPV4 als Teil der Aktivierungskaskade von Alveolarmakrophagen und dem Zilienschlag des Bronchialepithels identifiziert. In dieser Arbeit wurde die Beteiligung von TRPV4 an der Frühentstehung der COPD mittels eines zigarettenrauchinduzierten Mausmodells untersucht. Somit wurden TRPV4^{-/-} und Wildtyp (WT)-Mäuse für 3 Monate Zigarettenrauch exponiert. Obwohl in anderen Studien eine Exposition von über 3 Monaten notwendig war, um alveoläre Veränderungen zu induzieren, zeigten TRPV4^{-/-} Mäuse bereits nach 3 Monaten in Lungenfunktion, Histologie und μ CT erste Merkmale einer Emphysementwicklung. So konnte eine erhöhte *compliance* der Lunge sowie eine gesteigerte inspiratorische Kapazität als Ausdruck des Untergangs elastischer Fasern beobachtet werden. Ebenso kam es zu einer Verringerung der Alveolar- und Lungendichte mit einem erhöhten

Verhältnis von Luft/Gewebe nach Rauchexposition. TRPV4^{-/-} Mäuse zeigten schon nach 3-monatiger Haltung in Raumluft eine verringerte Elastizität der Lunge. Dies deutet auf eine Alterierung des elastischen Grundgerüsts durch die TRPV4-Deletion hin.

Schlussfolgernd ist davon auszugehen, dass durch den Knockout von TRPV4 eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Zigarettenrauch hervorgerufen wird und alveoläre Veränderungen im Vergleich zu WT-Kontrollen früher auftreten. Somit konnte eine entscheidende Rolle für TRPV4 bei der Entwicklung eines Emphysems mit und ohne Rauchexposition im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden. Weiterhin gilt es zu klären, über welchen Mechanismus die Beteiligung an der Pathogenese maßgeblich stattfindet und wie sich die Ausprägung des Emphysems im Zeitverlauf verhält.

6. Summary

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a widespread diagnosis and currently the third most common cause of death worldwide. Clinically, patients present with a severe productive cough and dyspnea. Extrapulmonary symptoms include cyanosis due to hypoxemia or the effects of right heart strain, such as increased peripheral edema or congested neck veins. A common comorbidity of COPD is pulmonary hypertension with an increase in mean pulmonary artery pressure above 20 mmHg. The acute exacerbation of COPD is considered an emergency, which often leads to aggravated symptoms mostly due to infections and requires intensified therapy.

Exposure to cigarette smoke – among inhalation of particulate matter or other noxious substances and congenital factors – is considered the main risk factor for the development of COPD. The resulting chronic inflammation of the airways leads to the collapse of alveoli and the destruction of the elastic framework of the lungs. The most important diagnostic tool is the lung function test. Due to the collapse of alveoli, a reduced forced expiratory volume in one second (FEV₁) as well as an increased residual volume and compliance can be observed. Drug therapy is limited to the control of symptoms, mostly with dilating inhalants and corticosteroids.

Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4) is a membrane-bound non-selective calcium channel. Besides its mechano- and thermosensitivity, TRPV4 has been identified as part of the activation cascade of alveolar macrophages and the ciliary beat of the bronchial epithelium. In this study the involvement of TRPV4 in the early development of COPD was investigated using a cigarette smoke-induced mouse model. Thus, TRPV4^{-/-} and wild-type (WT) mice were exposed to cigarette smoke for 3 months. Although in other studies smoke exposure for more than 3 months was necessary to induce alveolar changes, TRPV4^{-/-} mice showed first signs of emphysema after 3 months of smoke exposure with regards to lung function, histological analysis and μ CT. Increased lung compliance and increased inspiratory capacity were observed as an expression of the loss of elastic fibers. There was also a reduction in alveolar and lung density, with an increased air/tissue ratio after smoke exposure. TRPV4^{-/-} mice already showed reduced lung elasticity under room air conditions. This indicates an aging of the elastic scaffold by the TRPV4 deletion. In conclusion, an increased susceptibility to cigarette smoke is induced by the knockout

of TRPV4, accompanied by an early induction of alveolar changes. Thus, we demonstrated a crucial role for TRPV4 in the development of emphysema with and without smoke exposure. Further analysis is needed to clarify the main mechanism of involvement of TRPV4 in the pathogenesis and how the severity of emphysema changes over time.

7. Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis

7.1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Celsius
μCT	mikro-Computertomografie
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
A.	Arterie
AECOPD	Akute Exazerbation COPD
An	<i>Ankyrin repeats</i>
BAL	<i>bronchoalveoläre Lavage</i>
BOLD	Burden of obstructive lung disease
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Carboxy-Terminus
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
CaM	<i>Calmodulin binding site</i>
CAT	COPD assessment test
CI	<i>cardiac index</i>
Cl ⁻	Chlorid-Ionen
cm	Zentimeter (<i>centi meters</i>)
cm ³	Kubikzentimeter
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO	Herzminutenvolumen (<i>cardiac output</i>)
COD	<i>coefficient of determination</i>
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
CPI	Cardiopulmonary institute
CRP	c-reaktives Protein
Crs	<i>respiratory system compliance</i>
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxy ribonucleotid acid</i>)
EC	Endothelzelle (<i>endothelial cell</i>)
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	und andere (<i>et alteri</i>)
EU	Europäische Union
FBS	Fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FEV1	forcierte Expiration in einer Sekunde (<i>forced expiratory volume in one second</i>)

G	Gauge
<i>G</i>	<i>tissue damping resistance</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
H	<i>tissue elasticity</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HU	Hounsfield units
IC	Inspiratorische Kapazität (<i>inspiratory capacity</i>)
ICS	inhalative Corticosteroide
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IVC	<i>individually ventilated cages</i>
K ⁺	Kalium-Ionen
Kat.	Kategorie
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KI	Konfidenzintervall
KO	Knockout
L	Liter
LABA	<i>long-acting beta2-agonist</i>
LAMA	<i>long-acting muscarinic antagonists</i>
LOT	Langzeitsauerstoffbehandlung (<i>long-term oxygen therapy</i>)
LTX	Lungentransplantation
LV	linker Ventrikel
LVSP	<i>left ventricular systolic pressure</i>
m	Meter
M	Molar
m ²	Quadratmeter
m ³	Kubikmeter
Min.	Minute
mL	Milliliter
MLI	<i>mean linear intercept</i>
mm	Millimeter
MME	<i>macrophage metalloelastase</i>
mmHg	millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MMP	<i>matrix-metalloprotease</i>
mMRC	<i>modified Medical Research Council</i>
mol	Mol
mPAP	<i>mean pulmonary arterial pressure</i>
N	Amino-Terminus
n	Stichprobengröße

Na ⁺	Natrium-Ionen
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	<i>nicotinamide adenine dineucleotide phosphate</i>
NaOH	Natronlauge
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
ns	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
P	<i>Pore region</i>
PAT	<i>pulmonary acceleration time</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PDE4	Phosphodiesterase-4
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck (<i>positive end-expiratory pressure</i>)
PET	<i>pulmonary ejection time</i>
PH	Pulmonale Hypertonie
pH	Potential des Wasserstoffs (lat. <i>pondus hydrogenii</i>)
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PRD	<i>proline-rich-domaine</i>
PV	<i>pressure-volume</i>
PVR	Pulmonaler Gefäßwiderstand (<i>pulmonary vascular resistance</i>)
py	<i>pack years</i>
RA	Raumluft (<i>room air</i>)
RHH	Rechtsherzhypertrophie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RV	rechter Ventrikel
RVSP	<i>right ventricular systolic pressure</i>
S	Septum
SABA	<i>short-acting beta2-agonist</i>
SAMA	<i>short-acting muscarinic antagonist</i>
SARS CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SE	Zigarettenrauchexposition (<i>smoke exposure</i>)
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SERCA	<i>sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium-transporting ATPase</i>
SLPI	<i>secretory leukocyte protease inhibitor</i>
SMC	glatte Muskelzelle (<i>smooth muscle cell</i>)
Std.	Stunde
Stdh.	Stunden

SWT	<i>septal wall thickness</i>
TAPSE	<i>tricuspid annular plane systolic excursion</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinase</i>
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPA	Ankyrin TRP
TRPC	<i>classical TRP</i>
TRPM	Melastatin TRP
TRPML	Mucolipin TRP
TRPN	<i>no mechanoreceptor potential TRP</i>
TRPP	Polycystin TRP
TRPV	Vanilloid TRP
u. a.	unter anderem
V.	Vene
VC	Vitalkapazität (<i>vital capacity</i>)
Vol.-%	Volumenprozent
VR-OAC	<i>vanilloid receptor-related osmotically activated channel</i>
vs.	versus
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematischer Aufbau von TRPV4	15
Abbildung 2 Versuchsaufbau Rauchexposition über drei Monate.....	30
Abbildung 3 Versuchsaufbau Organ- und BAL-Entnahme	35
Abbildung 4 Versuchsaufbau Water Displacement Messung.....	36
Abbildung 5 Versuchsaufbau Schneiden der linken Lunge in Agarose.....	37
Abbildung 6 Alveolar Morphometrie.....	40
Abbildung 7 Stereologie.....	45
Abbildung 8 Ergebnisse Hämodynamik: RVSP und LVSP.....	48
Abbildung 9 Ergebnisse Echokardiografie: cardiac output, cardiac index und pulmonary vascular resistance	49
Abbildung 10 Ergebnisse Echokardiografie: TAPSE und PAT/PET	49
Abbildung 11 Ergebnisse Hämodynamik: RV/Tibia und Fulton Index.....	50
Abbildung 12 Ergebnisse Histologie: muscularization.....	51
Abbildung 13 Ergebnisse Lungenfunktion und μ CT: Inspiratory capacity und lung volume/tibia.....	52
Abbildung 14 Ergebnisse Lungenfunktion: compliance und elastance	53

Abbildung 15 Ergebnisse Lungenfunktion: tissue elasticity, hysteresis und tissue damping resistance	54
Abbildung 16 Ergebnisse Lungenfunktion: Pressure Volume Loops	55
Abbildung 17 Ergebnisse Histologie und μ CT: airspace, air/tissue, lung density, septal wall thickness, MLI und alveolar density	57
Abbildung 18 Histologisches Ergebnis nach Rauchexposition in HE-Färbung	58

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einordnung in GOLD A, B und E nach Symptomatik und Exazerbationen.....	5
Tabelle 2 Therapieschema nach GOLD A, B und E	8
Tabelle 3 Material Versuchstierhaltung und Rauchmodell	18
Tabelle 4 Material Geräte und Software	19
Tabelle 5 Material Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 6 Material Lösungen, Puffer und Chemikalien	24
Tabelle 7 Material Eigenherstellung Puffer und Lösungen	24
Tabelle 8 Material Histologie Geräte	25
Tabelle 9 Material Histologie Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 10 Material Histologie Färbemittel und Lösungen	27
Tabelle 11 Protokoll Entwässerung der Herzen	37
Tabelle 12 Protokoll Entwässerung der Lungen	38
Tabelle 13 Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin.....	39
Tabelle 14 Färbeprotokoll Doppelfärbung α -Aktin und von-Willebrand-Faktor	41
Tabelle 15 Färbeprotokoll van-Gieson.....	43
Tabelle 16 Differenzierung der Signifikanzen	46

8. Literaturverzeichnis

1. Adeloye D, Chua S, Lee C, *et al.*: Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *Journal of global health* 2015;Band 5: 20415. DOI 10.7189/jogh.05-020415
2. Aghasafari P, George U, Pidaparti R: A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 2019;Band 68: 59–74. DOI 10.1007/s00011-018-1191-2
3. Agustí AGN, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X: Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal* 2003;Band 21: 347–360. DOI 10.1183/09031936.03.00405703
4. Akademie für Ethik in der Medizin e. V. (AEM), Arzneimittelkommission der Deutschen Apotheker (AMK), Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ), *et al.*: NVL COPD – Teilpublikation der Langfassung, 2. Auflage. Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) 2021
5. Alessandri-Haber N, Yeh JJ, Boyd AE, *et al.*: Hypotonicity Induces TRPV4-Mediated Nociception in Rat. *Neuron* 2003;Band 39: 497–511. DOI 10.1016/S0896-6273(03)00462-8
6. Babusyte A, Stravinskaite K, Jeroch J, Lötvall J, Sakalauskas R, Sitkauskienė B: Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD. *Respir Res* 2007;Band 8: 81. DOI 10.1186/1465-9921-8-81
7. Bagur R, Hajnóczky G: Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Molecular cell* 2017;Band 66: 780–788. DOI 10.1016/j.molcel.2017.05.028
8. Baines KJ, Simpson JL, Gibson PG: Biology of Neutrophils. In Adkinson NF, Middleton E (Hrsg): *Middleton's allergy. Principles and practice*. ExpertConsult.com. Elsevier Saunders, Philadelphia, Pa. 2014, 280–291
9. Balakrishna S, Song W, Achanta S, *et al.*: TRPV4 inhibition counteracts edema and inflammation and improves pulmonary function and oxygen saturation in chemically induced acute lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2014;Band 307: L158-72. DOI 10.1152/ajplung.00065.2014
10. Balzano G, Stefanelli F, Iorio C, *et al.*: Eosinophilic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. Relationship with neutrophils and airway function. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1999;Band 160: 1486–1492. DOI 10.1164/ajrccm.160.5.9810105
11. Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO: Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ (Clinical research ed.)* 1991;Band 303: 671–675. DOI 10.1136/bmj.303.6804.671
12. Barnes PJ: Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2016;Band 138: 16–27. DOI 10.1016/j.jaci.2016.05.011

13. Barreiro E, Jaitovich A: Muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease: molecular basis and potential therapeutic targets. *J. Thorac. Dis.* 2018;Band 10: S1415-S1424. DOI 10.21037/jtd.2018.04.168
14. Baxter M, Eltom S, Dekkak B, *et al.*: Role of transient receptor potential and pannexin channels in cigarette smoke-triggered ATP release in the lung. *Thorax* 2014;Band 69: 1080–1089. DOI 10.1136/thoraxjnl-2014-205467
15. Bhatt SP, Kim Y-I, Harrington KF, *et al.*: Smoking duration alone provides stronger risk estimates of chronic obstructive pulmonary disease than pack-years. *Thorax* 2018;Band 73: 414–421. DOI 10.1136/thoraxjnl-2017-210722
16. Boutten A, Goven D, Boczkowski J, Bonay M: Oxidative stress targets in pulmonary emphysema: focus on the Nrf2 pathway. *Expert opinion on therapeutic targets* 2010;Band 14: 329–346. DOI 10.1517/14728221003629750
17. Burden of Obstructive Lung Disease: <https://goldcopd.org/>
18. Chaouat A, Naeije R, Weitzenblum E: Pulmonary hypertension in COPD. *The European respiratory journal* 2008;Band 32: 1371–1385. DOI 10.1183/09031936.00015608
19. Cox G, Gauldie J, Jordana M: Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1992;Band 7: 507–513. DOI 10.1165/ajrcmb/7.5.507
20. Cunha FQ, Mohcada S, Liew FY: Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- γ in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992;Band 182: 1155–1159. DOI 10.1016/0006-291x(92)91852-h
21. D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, Berg RA, Chada K: Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell* 1992;Band 71: 955–961. DOI 10.1016/0092-8674(92)90391-O
22. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research* 2018;Band 46: D8-D13. DOI 10.1093/nar/gkx1095
23. Decramer M, Janssens W, Miravittles M: Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* 2012;Band 379: 1341–1351. DOI 10.1016/S0140-6736(11)60968-9
24. Devos FC, Maaske A, Robichaud A, *et al.*: Forced expiration measurements in mouse models of obstructive and restrictive lung diseases. *Respir Res* 2017;Band 18: 123. DOI 10.1186/s12931-017-0610-1
25. Di Stefano A, Turato G, Maestrelli P, *et al.*: Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996;Band 153: 629–632. DOI 10.1164/ajrccm.153.2.8564109
26. Dietrich A: *TRP Channels in Health and Disease*. MDPI AG, Basel 2019
27. Eklöf J, Sørensen R, Ingebrigtsen TS, *et al.*: *Pseudomonas aeruginosa* and risk of death and exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease: an observational cohort study of 22 053 patients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2020;Band 26: 227–234. DOI 10.1016/j.cmi.2019.06.011

28. Environmental tobacco smoke. Measuring exposures and assessing health effects. National Academy Press, Washington, D.C. 1987
29. Fauci AS, Harrison TR: Harrison's principles of internal medicine. McGraw-Hill Medical, New York, London 2008
30. Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, *et al.*: Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. American journal of respiratory and critical care medicine 1997;Band 156: 240–247. DOI 10.1164/ajrccm.156.1.9612018
31. Foronjy R, D'Armiento J: The role of collagenase in emphysema. Respir Res 2001;Band 2: 348–352. DOI 10.1186/rr85
32. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, *et al.*: 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. Eur Heart J 2016;Band 37: 67–119. DOI 10.1093/eurheartj/ehv317
33. Gredic M, Wu C-Y, Hadzic S, *et al.*: Myeloid-cell-specific deletion of inducible nitric oxide synthase protects against smoke-induced pulmonary hypertension in mice. The European respiratory journal 2022;Band 59. DOI 10.1183/13993003.01153-2021
34. Groneberg DA, Chung KF: Models of chronic obstructive pulmonary disease. Respir Res 2004;Band 5: 18. DOI 10.1186/1465-9921-5-18
35. Gronski TJ, Martin RL, Kobayashi DK, *et al.*: Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. The Journal of biological chemistry 1997;Band 272: 12189–12194. DOI 10.1074/jbc.272.18.12189
36. Hamanaka K, Jian M-Y, Weber DS, *et al.*: TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 2007;Band 293: L923-32. DOI 10.1152/ajplung.00221.2007
37. Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ: Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. Journal of Applied Physiology 1992;Band 72: 168–178. DOI 10.1152/jappl.1992.72.1.168
38. Hartmannsgruber V, Heyken W-T, Kacik M, *et al.*: Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression. PLoS ONE 2007;Band 2: e827. DOI 10.1371/journal.pone.0000827
39. Hatano N, Suzuki H, Itoh Y, Muraki K: TRPV4 partially participates in proliferation of human brain capillary endothelial cells. Life sciences 2013;Band 92: 317–324. DOI 10.1016/j.lfs.2013.01.002
40. Herold G: Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung, unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Herold, Gerd, Köln 2020
41. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, *et al.*: The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. The New England journal of medicine 2004;Band 350: 2645–2653. DOI 10.1056/NEJMoa032158
42. Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, *et al.*: 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. Eur Heart J 2022;Band 43: 3618–3731. DOI 10.1093/eurheartj/ehac237

43. Hung AY, Sheng M: PDZ Domains: Structural Modules for Protein Complex Assembly *. *Journal of Biological Chemistry* 2002;Band 277: 5699–5702. DOI 10.1074/jbc.R100065200
44. Iwashita H, Fujimoto K, Morita S, Nakanishi A, Kubo K: Increased human Ca^{2+} -activated Cl^- channel 1 expression and mucus overproduction in airway epithelia of smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respiratory research* 2012;Band 13: 55. DOI 10.1186/1465-9921-13-55
45. Jian M-Y, King JA, Al-Mehdi A-B, Liedtke W, Townsley MI: High vascular pressure-induced lung injury requires P450 epoxigenase-dependent activation of TRPV4. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2008;Band 38: 386–392. DOI 10.1165/rcmb.2007-0192OC
46. Jiang W-T, Liu X-S, Xu Y-J, Ni W, Chen S-X: Expression of Nitric Oxide Synthase Isoenzyme in Lung Tissue of Smokers with and without Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chinese medical journal* 2015;Band 128: 1584–1589. DOI 10.4103/0366-6999.158309
47. Johns DP, Walters JAE, Walters EH: Diagnosis and early detection of COPD using spirometry. *Journal of thoracic disease* 2014;Band 6: 1557–1569. DOI 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.08.18
48. Jones B, Donovan C, Liu G, *et al.*: Animal models of COPD: What do they tell us? *Respirology (Carlton, Vic.)* 2017;Band 22: 21–32. DOI 10.1111/resp.12908
49. Köhler D, Schönhofer B, Voshaar T: *Pneumologie. Ein Leitfaden für rationales Handeln in Klinik und Praxis.* Thieme, Stuttgart 2015
50. Königshoff M, Brandenburger T: *Kurzlehrbuch Biochemie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2018
51. Kuhn C, Yu SY, Chraplyvy M, Linder HE, Senior RM: The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1976;Band 34: 372–380
52. Kulvinskiene I, Raudoniute J, Bagdonas E, *et al.*: Lung alveolar tissue destruction and protein citrullination in diesel exhaust-exposed mouse lungs. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2019;Band 125: 166–177. DOI 10.1111/bcpt.13213
53. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM: IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *The Journal of clinical investigation* 1995;Band 96: 2304–2310. DOI 10.1172/JCI118286
54. Lawlor DA, Ebrahim S, Davey Smith G: Association of birth weight with adult lung function: findings from the British Women's Heart and Health Study and a meta-analysis. *Thorax* 2005;Band 60: 851–858. DOI 10.1136/thx.2005.042408
55. an Lehouck, Boonen S, Decramer M, Janssens W: COPD, bone metabolism, and osteoporosis. *Chest* 2011;Band 139: 648–657. DOI 10.1378/chest.10-1427
56. Li Y, Lu Y, Zhao Z, *et al.*: Relationships of MMP-9 and TIMP-1 proteins with chronic obstructive pulmonary disease risk: A systematic review and meta-analysis. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 2016;Band 21: 12. DOI 10.4103/1735-1995.178737

57. Liedtke W: TRPV4 plays an evolutionary conserved role in the transduction of osmotic and mechanical stimuli in live animals. *The Journal of physiology* 2005;Band 567: 53–58. DOI 10.1113/jphysiol.2005.088963
58. Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, *et al.*: Vanilloid Receptor–Related Osmotically Activated Channel (VR-OAC), a Candidate Vertebrate Osmoreceptor. *Cell* 2000;Band 103: 525–535. DOI 10.1016/S0092-8674(00)00143-4
59. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung KF: Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000;Band 162: 1355–1360. DOI 10.1164/ajrccm.162.4.9910097
60. Liu S, Zhou Y, Wang X, *et al.*: Biomass fuels are the probable risk factor for chronic obstructive pulmonary disease in rural South China. *Thorax* 2007;Band 62: 889–897. DOI 10.1136/thx.2006.061457
61. Lorenzo IM, Liedtke W, Sanderson MJ, Valverde MA: TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;Band 105: 12611–12616. DOI 10.1073/pnas.0803970105
62. Lüllmann-Rauch R, Asan E: *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme, Stuttgart 2019
63. Ma X, Qiu S, Luo J, *et al.*: Functional role of vanilloid transient receptor potential 4-canonical transient receptor potential 1 complex in flow-induced Ca²⁺ influx. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010;Band 30: 851–858. DOI 10.1161/ATVBAHA.109.196584
64. Malkmus K, Brosien M, Knoepf F, *et al.*: Deletion of classical transient receptor potential 1, 3 and 6 alters pulmonary vasoconstriction in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Frontiers in physiology* 2022;Band 13: 1080875. DOI 10.3389/fphys.2022.1080875
65. Mamazhakypov A, Sommer N, Assmus B, *et al.*: Novel Therapeutic Targets for the Treatment of Right Ventricular Remodeling: Insights from the Pulmonary Artery Banding Model. *International journal of environmental research and public health* 2021;Band 18. DOI 10.3390/ijerph18168297
66. McAlexander MA, Luttmann MA, Hunsberger GE, Undem BJ: Transient receptor potential vanilloid 4 activation constricts the human bronchus via the release of cysteinyl leukotrienes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2014;Band 349: 118–125. DOI 10.1124/jpet.113.210203
67. Minai OA, Chaouat A, Adnot S: Pulmonary hypertension in COPD: epidemiology, significance, and management: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest* 2010;Band 137: 39S–51S. DOI 10.1378/chest.10-0087
68. Mizuno A, Matsumoto N, Imai M, Suzuki M: Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *American journal of physiology. Cell physiology* 2003;Band 285: C96–101. DOI 10.1152/ajpcell.00559.2002
69. Molet S, Belleguic C, Lena H, *et al.*: Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation*

- research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.] 2005;Band 54: 31–36. DOI 10.1007/s00011-004-1319-4
70. Müller MR, Watzka SB (Hrsg): Expertise Thoraxchirurgie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2016
 71. Narita K, Sasamoto S, Koizumi S, *et al.*: TRPV4 regulates the integrity of the blood-cerebrospinal fluid barrier and modulates transepithelial protein transport. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2015;Band 29: 2247–2259. DOI 10.1096/fj.14-261396
 72. Nazia M. Sadiq, Srividya Naganathan, Madhu Badireddy: Hypercalcemia. In Sadiq NM, Naganathan S, Badireddy M (Hrsg): StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing 2022
 73. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, *et al.*: The number of alveoli in the human lung. American journal of respiratory and critical care medicine 2004;Band 169: 120–124. DOI 10.1164/rccm.200308-1107OC
 74. Ochs M, Schipke J: A short primer on lung stereology. Respir Res 2021;Band 22: 305. DOI 10.1186/s12931-021-01899-2
 75. Pan Z, Yang H, Reinach PS: Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels. Human genomics 2011;Band 5: 108–116. DOI 10.1186/1479-7364-5-2-108
 76. Pandey KC, De S, Mishra PK: Role of Proteases in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Frontiers in pharmacology 2017;Band 8: 512. DOI 10.3389/fphar.2017.00512
 77. Pape H-C, Klinke R, Brenner B, Silbernagl S: Physiologie. Georg Thieme Verlag KG, [Erscheinungsort nicht ermittelbar] 2014
 78. Paulin LM, Diette GB, Blanc PD, *et al.*: Occupational exposures are associated with worse morbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. American journal of respiratory and critical care medicine 2015;Band 191: 557–565. DOI 10.1164/rccm.201408-1407OC
 79. Perlmutter DH: Alpha-1-antitrypsin deficiency: biochemistry and clinical manifestations. Annals of medicine 1996;Band 28: 385–394. DOI 10.3109/07853899608999097
 80. Petit A, Knabe L, Khelloufi K, *et al.*: Bronchial Epithelial Calcium Metabolism Impairment in Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Decreased ORAI3 Signaling. American journal of respiratory cell and molecular biology 2019;Band 61: 501–511. DOI 10.1165/rcmb.2018-0228OC
 81. Pichl A, Justus Liebig University Giessen: Die Rolle des serotonergen Systems und der Effekt des Serotonin-Antagonisten Tergurid im Zigarettenrauch-induzierten Lungenemphysemmodell der Maus 2013
 82. Pichl A, Sommer N, Bednorz M, *et al.*: Riociguat for treatment of pulmonary hypertension in COPD: a translational study. The European respiratory journal 2019;Band 53. DOI 10.1183/13993003.02445-2018
 83. Pipavath SNJ, Schmidt RA, Takasugi JE, Godwin JD: Chronic obstructive pulmonary disease: radiology-pathology correlation. Journal of thoracic imaging 2009;Band 24: 171–180. DOI 10.1097/RTI.0b013e3181b32676

84. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, *et al.*: Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017;Band 2017: 8416763. DOI 10.1155/2017/8416763
85. Prinz C, Farr M, Hering D, Horstkotte D, Faber L: The diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Deutsches Arzteblatt international* 2011;Band 108: 209–215. DOI 10.3238/arztebl.2011.0209
86. Rahman I, MacNee W: Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 1996;Band 21: 669–681. DOI 10.1016/0891-5849(96)00155-4
87. Rajan S, Schremmer C, Weber J, Alt P, Geiger F, Dietrich A: Ca²⁺ Signaling by TRPV4 Channels in Respiratory Function and Disease. *Cells* 2021;Band 10: 822. DOI 10.3390/cells10040822
88. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, *et al.*: Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2004;Band 114: 1248–1259. DOI 10.1172/JCI200421146
89. Robichaud A, Fereydoonzad L, Limjunyawong N, *et al.*: Automated full-range pressure-volume curves in mice and rats. *Journal of Applied Physiology* 2017;Band 123: 746–756. DOI 10.1152/jappphysiol.00856.2016
90. Robison P, Sussan TE, Chen H, Biswal S, Schneider MF, Hernández-Ochoa EO: Impaired calcium signaling in muscle fibers from intercostal and foot skeletal muscle in a cigarette smoke-induced mouse model of COPD. *Muscle & nerve* 2017;Band 56: 282–291. DOI 10.1002/mus.25466
91. Sanders KJC, Kneppers AEM, van de Bool C, Langen RCJ, Schols AMWJ: Cachexia in chronic obstructive pulmonary disease: new insights and therapeutic perspective. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2016;Band 7: 5–22. DOI 10.1002/jcsm.12062
92. Sandford AJ, Weir TD, Paré PD: Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* 1997;Band 10: 1380–1391. DOI 10.1183/09031936.97.10061380
93. Schikowski T, Sugiri D, Ranft U, *et al.*: Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respir Res* 2005;Band 6: 152. DOI 10.1186/1465-9921-6-152
94. Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF: Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *The American review of respiratory disease* 1993;Band 147: 1151–1156. DOI 10.1164/ajrccm/147.5.1151
95. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks: Addictiveness and Attractiveness of Tobacco Additives. https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/policy/index_en.htm. [Stand: 03.09.2021].
96. Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, *et al.*: Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell* 2011;Band 147: 293–305. DOI 10.1016/j.cell.2011.08.035

97. Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG: Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *The Journal of biological chemistry* 1991;Band 266: 7870–7875
98. Sethi S: Infection as a comorbidity of COPD. *The European respiratory journal* 2010;Band 35: 1209–1215. DOI 10.1183/09031936.00081409
99. Sethi S, Evans N, Grant BJB, Murphy TF: New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 2002;Band 347: 465–471. DOI 10.1056/NEJMoa012561
100. Sharafkhaneh A, Hanania NA, Kim V: Pathogenesis of emphysema: from the bench to the bedside. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2008;Band 5: 475–477. DOI 10.1513/pats.200708-126ET
101. Shigematsu H, Sokabe T, Danev R, Tominaga M, Nagayama K: A 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by Zernike phase-contrast cryoelectron microscopy. *The Journal of biological chemistry* 2010;Band 285: 11210–11218. DOI 10.1074/jbc.M109.090712
102. Shu J, Li D, Ouyang H, *et al.*: Comparison and evaluation of two different methods to establish the cigarette smoke exposure mouse model of COPD. *Scientific reports* 2017;Band 7: 15454. DOI 10.1038/s41598-017-15685-y
103. Silverman EK, Chapman HA, Drazen JM, *et al.*: Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998;Band 157: 1770–1778. DOI 10.1164/ajrccm.157.6.9706014
104. Singh A, Rangasamy T, Thimmulappa RK, *et al.*: Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2006;Band 35: 639–650. DOI 10.1165/rcmb.2005-0325OC
105. Skrzypski M, Kakkassery M, Mergler S, *et al.*: Activation of TRPV4 channel in pancreatic INS-1E beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion via calcium-dependent mechanisms. *FEBS letters* 2013;Band 587: 3281–3287. DOI 10.1016/j.febslet.2013.08.025
106. Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, *et al.*: Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *The European respiratory journal* 2008;Band 32: 1639–1651. DOI 10.1183/09031936.00013908
107. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF: Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2009;Band 297: L1013-32. DOI 10.1152/ajplung.00217.2009
108. Stewart AP, Smith GD, Sandford RN, Edwardson JM: Atomic force microscopy reveals the alternating subunit arrangement of the TRPP2-TRPV4 heterotetramer. *Biophysical Journal* 2010;Band 99: 790–797. DOI 10.1016/j.bpj.2010.05.012
109. Stoller JK, Aboussouan LS: A review of α 1-antitrypsin deficiency. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2012;Band 185: 246–259. DOI 10.1164/rccm.201108-1428CI

110. Suki B, Sato S, Parameswaran H, Szabari MV, Takahashi A, Bartolák-Suki E: Emphysema and mechanical stress-induced lung remodeling. *Physiology (Bethesda, Md.)* 2013;Band 28: 404–413. DOI 10.1152/physiol.00041.2013
111. Suresh K, Servinsky L, Jiang H, *et al.*: Reactive oxygen species induced Ca²⁺ influx via TRPV4 and microvascular endothelial dysfunction in the SU5416/hypoxia model of pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2018;Band 314: L893-L907. DOI 10.1152/ajplung.00430.2017
112. Talukder MAH, Johnson WM, Varadharaj S, *et al.*: Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired NO bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2011;Band 300: H388-96. DOI 10.1152/ajpheart.00868.2010
113. Tanabe N, Ohnishi K, Fukui H, Ohno R: Effect of smoking on the serum concentration of erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 1997;Band 36: 680–684. DOI 10.2169/internalmedicine.36.680
114. Tsagareli MG, Nozadze I: An overview on transient receptor potential channels superfamily. *Behavioural Pharmacology* 2020;Band 31: 413–434. DOI 10.1097/FBP.0000000000000524
115. Tsai Y-F, Hwang T-L: Neutrophil elastase inhibitors: a patent review and potential applications for inflammatory lung diseases (2010 - 2014). *Expert opinion on therapeutic patents* 2015;Band 25: 1145–1158. DOI 10.1517/13543776.2015.1061998
116. Tudor RM: Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Cell and tissue research* 2017;Band 367: 643–649. DOI 10.1007/s00441-016-2539-y
117. U.S. Department of Health and Human Services (Hrsg): How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General
118. U.S. Department of Health and Human Services (Hrsg): Smoking Cessation. A Report of the Surgeon General
119. van Eeden SF, Sin DD: Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a lung and systemic process. *Canadian respiratory journal* 2013;Band 20: 27–29. DOI 10.1155/2013/509130
120. Venkatachalam K, Montell C: TRP channels. *Annual review of biochemistry* 2007;Band 76: 387–417. DOI 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819
121. Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, *et al.*: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013;Band 187: 347–365. DOI 10.1164/rccm.201204-0596PP
122. Villalta PC, Rocic P, Townsley MI: Role of MMP2 and MMP9 in TRPV4-induced lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2014;Band 307: L652-9. DOI 10.1152/ajplung.00113.2014
123. Vogelmeier C, Buhl R, Burghuber O, *et al.*: Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD).

- Pneumologie (Stuttgart, Germany) 2018;Band 72: 253–308. DOI 10.1055/s-0043-125031
124. Vogelmeier CF: Possible harms of theophylline in chronic obstructive pulmonary disease. *Deutsches Arzteblatt international* 2014;Band 111: 291–292. DOI 10.3238/arztebl.2014.0291
 125. Weber J, Rajan S, Schremmer C, *et al.*: TRPV4 channels are essential for alveolar epithelial barrier function as protection from lung edema. *JCI insight* 2020;Band 5. DOI 10.1172/jci.insight.134464
 126. White JPM, Cibelli M, Urban L, Nilius B, McGeown JG, Nagy I: TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiological Reviews* 2016;Band 96: 911–973. DOI 10.1152/physrev.00016.2015
 127. World Health Organization: Projections of mortality and cause of death, 2016 and 2060 2018
 128. World Health Organization: GLOBAL HEALTH ESTIMATES 2019 SUMMARY TABLES: DEATHS BY CAUSE, AGE AND SEX, BY WORLD BANK INCOME GROUP, 2000-2019. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>.
 129. Wright JL, Churg A: Effect of long-term cigarette smoke exposure on pulmonary vascular structure and function in the guinea pig. *Experimental lung research* 1991;Band 17: 997–1009. DOI 10.3109/01902149109064331
 130. Yang S-R, Chida AS, Bauter MR, *et al.*: Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2006;Band 291: L46-57. DOI 10.1152/ajplung.00241.2005
 131. Yang X-R, Lin AHY, Hughes JM, *et al.*: Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2012;Band 302: L555-68. DOI 10.1152/ajplung.00005.2011
 132. Yang X-R, Lin M-J, McIntosh LS, Sham JSK: Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2006;Band 290: L1267-76. DOI 10.1152/ajplung.00515.2005
 133. Yin J, Michalick L, Tang C, *et al.*: Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in Neutrophil Activation and Acute Lung Injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2016;Band 54: 370–383. DOI 10.1165/rcmb.2014-0225OC
 134. Yin P, Jiang CQ, Cheng KK, *et al.*: Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank Cohort Study. *The Lancet* 2007;Band 370: 751–757. DOI 10.1016/S0140-6736(07)61378-6
 135. Zangiabadi A, Pasquale CG de, Sajkov D: Pulmonary hypertension and right heart dysfunction in chronic lung disease. *BioMed research international* 2014;Band 2014: 739674. DOI 10.1155/2014/739674

136. Zhu G, Gulsvik A, Bakke P, *et al.*: Association of TRPV4 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Human molecular genetics* 2009;Band 18: 2053–2062. DOI 10.1093/hmg/ddp111

9. Anhang

Regierungspräsidium Gießen

HESSEN



Regierungspräsidium Gießen • Postfach 21 69 • 35531 Wetzlar

Justus-Liebig-Universität Gießen
Medizinische Klinik II, ECCPS
z. Hd. Frau Dr. Monika Brosien
Aulweg 130
35392 Gießen

Geschäftszeichen: V 54 - 19 c 20 15 h 01 GI 20/10
Nr. G 66/2019

Bearbeiter/-in: Frau Bahr
Telefon: 0641 303-5434
Telefax: 0611 327644508
E-Mail: veterinaer@rpgi.hessen.de
Ihr Zeichen:
Ihre Nachricht vom:

Datum: 15. Oktober 2019

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

hier: Genehmigung gem. § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG)

Ihr Antrag vom 01.08.2019, eingegangen am 07.08.2019

Sehr geehrte Frau Dr. Brosien,

auf Grund des § 9 der Zuständigkeitsverordnung Veterinärwesen, Lebensmittel- und Futtermittelüberwachung vom 25.11.2010 (GVBl. I S. 354), in der jeweils gültigen Fassung, erteile ich

**der Justus-Liebig-Universität Gießen
(Anschrift: Ludwigstraße 23, 35390 Gießen)**

gemäß § 8 Abs. 1 TierSchG die Genehmigung zur Durchführung von wissenschaftlichen Versuchen an

max. 1.032 Mäusen

für folgendes Versuchsvorhaben:

„Rolle von TRPV4 und TRPA1 bei COPD“.

Grundlage für die Genehmigung ist Ihr Antrag vom 01.08.2019 einschließlich der Ergänzungen vom 09.08.2019 und 19.09.2019.

Verantwortlich für die antragsgemäße Durchführung des Versuchsvorhabens und die Einhaltung der rechtlichen Vorschriften ist:

Leitung des Versuchsvorhabens:

Dr. Monika Brosien

Stellvertretende Leitung des Versuchsvorhabens:

Dr. Ingrid Henneke

Hausanschrift:
35578 Wetzlar • Schanzenfeldstraße 8
Postanschrift:
35531 Wetzlar • Postfach 21 69
Telefonzentrale: 0641 303-0
Zentrales Telefax: 0641 303-2197
Zentrale E-Mail: poststelle@rpgi.hessen.de
Internet: <http://www.rp-giessen.de>

Servicezeiten:
Mo. - Do. 08:00 - 16:30 Uhr
Freitag 08:00 - 15:00 Uhr
oder nach Vereinbarung

Die telefonische Vereinbarung eines persönlichen Gesprächstermins wird empfohlen.

Fristenbriefkasten:
35390 Gießen
Landgraf-Philipp-Platz 1 – 7



10. Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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 und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

11. Danksagung

Zunächst gebührt mein Dank Prof. Norbert Weißmann für Bereitstellung des Themas, der Laborausrüstung und finanziellen Unterstützung. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Alexander Dietrich (LMU) für die Bereitstellung der Mäuse bedanken.

Ein großer Dank geht an Monika Brosien und Simone Kraut für ihre außerordentliche Betreuung während der Labor- und Schreibtätigkeiten. Weiterhin möchte ich mich für die Leitung und Koordination des Projekts als auch die ständige Erreichbarkeit und Beirat bedanken.

Für die methodische und inhaltliche Unterstützung möchte ich mich besonders bei Kathrin Malkmus, Stefan Hadzic, Ingrid Henneke und Baktybek Kojonazarov bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeiter/innen des täglichen Laboralltags sowie der Tierhaltung bedanken, die zu jeder Zeit eine angenehme und nette Arbeitsatmosphäre boten und mit viel Rat und Unterstützung beistanden. Besonders genannt seien hier Karin Quanz, Carmen Homberger, Miriam Wessendorf und Susanne Lich.

Zuletzt geht ein großer Dank an meine Familie und Freunde, die sich regelmäßig mit meinen Problemen und Gedanken auseinandersetzen mussten und mich langjährig unterstützt haben. Ganz herzlich seien an dieser Stelle meine Eltern erwähnt, die mir sowohl das Studium als auch die Doktorarbeit ermöglichten.

12. Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen aus der publizierten Version entfernt.

