Untersuchung zur Relevanz von Calcium-Proteinen in der Pathogenese der chronisch obstruktiven pulmonalen Erkrankung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Zahnmedizin oder Humanbiologie)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Julia Uhl
aus Germersheim

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zentrum für Innere Medizin, Cardio-Pulmonales Institut (CPI)

Gutachter: PD Dr. Manuel Richter

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 26.02.2025

1 EINLEITUNG 1

1.1 Chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung (COPD) 1
1.1.1 Definition 1
1.1.2 Ätiologie 2
1.1.3 Diagnostik und Klassifikation 3
1.1.4 Komorbiditäten bei COPD 5

1.2 Pathogenese der COPD 6
1.2.1 Inflammation 6
1.2.2 Emphysem 7
1.2.3 Bronchiales Remodeling 9
1.2.4 Pulmonal vaskuläres Remodeling 10

1.3 Ca^{2+}-assoziierte Signalkaskaden 11

1.4 Ca^{2+}-Kanäle 11
1.4.1 Transient Rezeptor-Potential (TRP) Ionenkanäle 11
1.4.2 Voltage-dependent Ca^{2+}-channels (VDCCs) 17
1.4.3 Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase (PMCA) und Sarco(endo)plasmatische Retikulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA) 18
1.4.4 Ca^{2+}-release-activated channels (CRACs) 19

1.5 *Downstream* Signalkaskaden 20

1.6 Ziel der Arbeit 21

2 MATERIAL UND METHODEN 22

2.1 Material 22
2.1.1 Software 22
2.1.2 Geräte 22
2.1.3 Verbrauchsmaterialien 24
2.1.4 Chemikalien 26
2.1.5 Kits und Standards 28
2.1.6 Primer 28

2.1.7 Antikörper 31
2.1.8 siRNA 33
2.1.9 Puffer und Lösungen 33
2.1.10 Medien 35
2.1.11 Medienzusammensetzung 36
2.1.12 Zellen 36

2.2 Probenmaterial 36
2.2.1 Auswahl und Charakterisierung der humanen Proben 36
2.2.2 Laser-Mikrodissektion 40

2.3 Expressionsanalyse mRNA 41
2.3.1 RNA-Isolation 41
2.3.2 cDNA-Synthese 42
2.3.3 Quantitative Real-Time PCR (RTqPCR) 42
2.3.4 Agarose Gelelektrophorese 44

2.4 Methoden Proteinbiochemie 44
2.4.1 Proteinextraktion und Proteinkonzentration 44
2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 45
2.4.3 Western Blot 46

2.5 Methoden Zellkultur 46
2.5.1 Kultivierung von PASMCs 46
2.5.2 Transfektion von PASMCs 47
2.5.3 CS-Extrakt Exposition von PASMCs 47
2.5.4 Proliferationsassay PASMCs 47

2.6 Ca^{2+}-Konzentrationsmessung 48

2.7 Statistische Analyse 49

3 ERGEBNISSE 50

3.1 Analyse der Expression von TRP-Kanälen 50
3.1.1 Analyse der TRP-Kanäle im Lungenhomogenat mittels RTqPCR 50

3.1.2 Analyse der TRP-Kanäle im Lungenhomogenat mittels Western Blot 51
3.1.3 Analyse der TRP-Kanäle in mikrodissektierten Kompartimenten 54

3.2 Analyse der Expression von VDCCs 55

3.3 Analyse der Expression von PMCA und SERCA 56

3.4 Analyse der Expression von STIM und ORAI 57

3.5 Analyse Ca^{2+}-assoziierter Proteine im Lungenhomogenat 58
3.5.1 Proteinkinasen (PDK1, PKC und PKA) 58
3.5.2 CaMKII 60
3.5.3 ERK1/2 62
3.5.4 Cyclin D1, Cyclin E und CDC25A 62

3.6 Ca^{2+}-Konzentrationsmessung und Proliferationsassay 64
3.6.1 Ca^{2+}-Konzentrationsmessung im Lungenhomogenat 64
3.6.2 Proliferationsassay PASMCs 65

4 DISKUSSION 66

4.1 Die Rolle von Ca^{2+}-Kanälen in der Pathogenese der COPD 66
4.1.1 TRPC-Kanäle 66
4.1.2 TRPV-Kanäle 70
4.1.3 Der TRPA1-Kanal 73
4.1.4 TRPM-Kanäle 74
4.1.5 VDCCs 75
4.1.6 PMCA und SERCA 76
4.1.7 CRACs 77

4.2 Die Rolle der Dysregulation der Ca^{2+}-Homöostase in der Pathogenese der COPD 78

4.3 Die Rolle von Ca^{2+}-assoziierten Proteinen und Signalkaskaden in der Pathogenese der COPD 81

4.4 Kritische Auseinandersetzung mit dem verwendeten Modell 87

4.5 Ausblick auf weiterführende Experimente 90

5 ZUSAMMENFASSUNG 92

6 SUMMARY 94

7 ANHANG 96

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 109

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 115

10 TABELLENVERZEICHNIS 117

11 FORMELVERZEICHNIS 117

12 LITERATURVERZEICHNIS 118

13 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG 155

14 DANKSAGUNG 156

1 Einleitung

1.1 Chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung (COPD)

1.1.1 Definition

Die chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung (*chronic obstructiv pulmonary disease*, COPD) ist weltweit von großer Relevanz. Nach Einschätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) starben 2019 weltweit 3,23 Millionen Menschen an den Folgen einer COPD [376]. Dies entspricht 6% der weltweiten Todesfälle. Bedingt durch die andauernde Exposition von Risikofaktoren und dem demografischen Wandel, wird ein Anstieg der globalen Belastung durch die Erkrankung in den nächsten Jahren erwartet [198, 218]. Die COPD wird von der Globalen Initiative für chronisch obstruktive Lungenerkrankungen *(Global Initiative for Chronic Lung Disease*, GOLD) als vermeidbare, nicht reversible, progrediente und obstruktive Lungenerkrankung definiert [105]. Das Krankheitsbild setzt sich dabei erstens aus der chronischen Bronchitis (mit einer Obstruktion der kleinen Atemwege) und zweitens dem Lungenemphysem (mit einer Destruktion von Lungengewebe) zusammen [124]. Hauptauslöser sind inhalative Noxen, die eine chronische Inflammation der kleinen Atemwege auslösen. Die Inflammation führt zu einer Verengung der Bronchiolen und einer gesteigerten Mukussekretion, wodurch die Patienten Symptome einer chronischen Bronchitis (Husten und Auswurf) zeigen. Gleichzeitig können die Patienten ein Emphysem entwickeln. Dabei kommt es zu einer Destruktion von Lungengewebe (insbesondere Alveolarsepten) distal der terminalen Bronchiolen und einer irreversiblen Erweiterung der Lufträume. In Folge steht weniger Fläche für den Gasaustausch in der Lunge zur Verfügung [23, 131]. Je nach Patient sind Emphysem und Obstruktion unterschiedlich stark ausgeprägt, wodurch das Krankheitsbild variiert [307]. Mittels Lungenfunktionsuntersuchung kann der Schweregrad der COPD ermittelt werden. Die Therapie mit Bronchodilatatoren und Antiphlogistika (entzündungshemmende Medikamente) ist symptomatisch und kann die fortschreitende Abnahme der Lungenfunktion zwar verlangsamen, jedoch nicht verhindern [46]. Für die Patienten ist daher die Entwicklung neuer Therapieoptionen von immenser Wichtigkeit, weswegen weitere Erkenntnisse auf molekularer Ebene zur Pathogenese der Erkrankung essentiell sind.

1.1.2 Ätiologie

Die Entstehung der COPD ist komplex und durch unterschiedliche Einflussfaktoren bedingt. Dabei kann zwischen exogenen und endogenen Faktoren unterschieden werden.
Etwa 80 bis 90% der COPD-Patienten weisen eine Raucheranamnese auf, womit Rauchen (Zigarette, Pfeife, Passivrauchen) der wichtigste Risikofaktor ist [27, 211]. Da nicht alle Raucher eine COPD entwickeln [201], ist davon auszugehen, dass auch eine genetische Disposition eine Rolle spielt. Welche Faktoren zu dieser persönlichen Disposition beitragen, ist noch nicht ausreichend erforscht [211]. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Zigarettenrauch (*Cigarette smoke*, CS) assoziierten COPD. Im CS sind eine Vielzahl toxischer Stoffe enthalten z. B. Nikotin, Acrolein, polyzyklische aromatische Wasserstoffe und reaktive Sauerstoffspezies, welche Signalkaskaden auf zellulärer Ebene regulieren [182]. Die Exposition mit CS kann u. a. zur Aktivierung von Immunzellen, Veränderungen des Zellzyklus, der Proliferation und Apoptose führen [59, 60, 265].
Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD ist die innerhäusliche Rauchentwicklung, welche durch die Verbrennung von organischem Material beim Kochen und Heizen entstehen kann. Insbesondere in Entwicklungsländern sind Frauen häufig von einer COPD betroffen [293, 294]. Außerdem erhöhen sowohl Frühgeburtlichkeit, als auch rezidivierende broncho-pulmonale Infekte bereits ab dem ersten Lebensjahr das Risiko für eine spätere COPD [293].
Als bekanntester endogener Risikofaktor zählt der α1-Antitrypsin Mangel, welcher durch eine Mutation im Serin-Protease-Inhibitor α1 Gen entsteht [146]. Neben der Mutation im Serin-Protease-Inhibitor α1 Gen existieren noch weitere genetische Faktoren, welche mit der Entstehung einer COPD in Verbindung gebracht werden können. In Genomanalysen konnte ein Zusammenhang mit Genpolymorphismen der Matrix-Metalloproteasen (MMP) MMP-3/MMP-12 und des transformierenden Wachstumsfaktor-beta (*transforming growth factor β*, TGF-β) gezeigt werden. Die Bedeutung dieser Veränderungen für die Entwicklung einer COPD ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung [56].

1.1.3 Diagnostik und Klassifikation

Zu Beginn der Diagnostik steht eine ausführliche Anamnese. Bei der anschließenden Lungenfunktionsuntersuchung wird mittels Spirometrie die Diagnose bestätigt.

Bei der Anamnese werden Risikofaktoren für die Entstehung einer COPD abgefragt (Raucheranamnese, Berufsanamnese) und bestehende Atemwegserkrankungen (z. B. Asthma und Allergien), körperliche Aktivität und Belastbarkeit, Schlafstörungen und Komorbiditäten erfasst. Die Kardinalsymptome der COPD, chronischer Husten mit Auswurf und Belastungsdyspnoe, welche zu einer zunehmenden Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit führen, werden ebenfalls anamnestisch erhoben [105].

Zur strukturierten Erfassung der Symptomatik kann der *COPD Assessment Test* genutzt werden. Dabei wird die Ausprägung der acht wichtigsten Symptome, Husten, Auswurf, Engegefühl in der Brust, Atemnot bei körperlicher Belastung, Einschränkung bei häuslichen Aktivitäten, Angst das Haus zu verlassen, Schlafqualität und Energieniveau festgestellt. Die Patienten geben die Symptomschwere mit einem Punktwert von null für keine Beschwerden bis fünf für starke Beschwerden auf einer Likert Skala an [162].

Speziell zur Erfassung der Dyspnoe wird die *modified Medical Research Council Scale* angewandt **(Tabelle 1).**

Tabelle 1: ***Modified Medical Research Council Scale***

0	Dyspnoe bei außergewöhnlicher Belastung
1	Dyspnoe beim Treppensteigen und Bergaufgehen
2	Langsameres Gehen als Gleichaltrige oder Pausen bei selbst gewählter Geschwindigkeit auf Grund von Dyspnoe
3	Dyspnoe und Pause beim Gehen nach 100 Metern
4	Dyspnoe beim An- und Ausziehen, Verlassen des Hauses nicht möglich

(modifiziert nach *GOLD* [105])

In der klinischen Untersuchung können die Befunde sehr variabel sein. Dabei können Lippen- und Fingerzyanosen auffallen, außerdem Uhrglasnägel und Trommelschlegelfinger als Zeichen einer chronischen Hypoxie beobachtet werden. Bei langjähriger COPD kann es zu einer Lungenüberblähung kommen, die sich als typisches Bild eines Fassthorax darstellen. Die Atemfrequenz kann erhöht und die Exspirationszeit verlängert sein. Beim Abhören der Lunge können Atemgeräusche wie Giemen, Pfeifen und Brummen auffallen. Des Weiteren kann es zur Kachexie und peripheren Ödemen kommen [124].

Klinisch wird die Atemflussbehinderung häufig erst auffällig, wenn die Erkrankung weit fortgeschritten und die Lungenfunktion stark eingeschränkt ist [134].

Als objektive Methode zur Erfassung der Lungenfunktion wird im Rahmen der Lungenfunktionsuntersuchung eine Spirometrie durchgeführt. Dabei können die Ergebnisse der Spirometrie nur im Zusammenhang mit der klinischen Untersuchung interpretiert werden, da sie zwar eine hohe Sensitivität, jedoch nur eine geringe Spezifität aufweisen. Bei der Spirometrie wird die forcierte Vitalkapazität (*forced vital capacity*, FVC), das nach maximaler Inspiration ausgeatmete Volumen und die Einsekundenkapazität (*forced expiratory volume in one second*, FEV_1) bestimmt. Das Verhältnis der FEV_1 zu FVC wird als Tiffeneau Index bezeichnet. Ist dieser Wert < 0,7 spricht dies für das Vorliegen einer Obstruktion und für eine klinisch relevante COPD [33]. Für die COPD existiert eine Einteilung nach GOLD, die anhand des prozentualen FEV_1-Wertes die Erkrankung in Gruppe I bis IV einteilt. Liegt der der FEV_1-Wert z. B. zwischen 50 und 79% des Sollwerts, wird eine COPD GOLD II diagnostiziert [105].

Die Einteilung der COPD nach Spirometer Parametern in GOLD I bis IV wird durch die subjektiv empfundene Schwere der Symptomatik ergänzt [105]. Diese wird anhand des oben erläuterten *COPD Assessment Test* und *modified Medical Research Council Scale* systematisch erfasst. Außerdem wird die Anzahl der Exazerbationen pro Jahr in die Einteilung aufgenommen. Der Klassifikation nach GOLD I bis IV wird demnach eine Einteilung in A, B oder E entsprechend der Ausprägung der Symptome beigefügt [105] **(Abbildung 1)**. Nach dieser Einteilung richtet sich der medikamentöse Therapiealgorithmus.

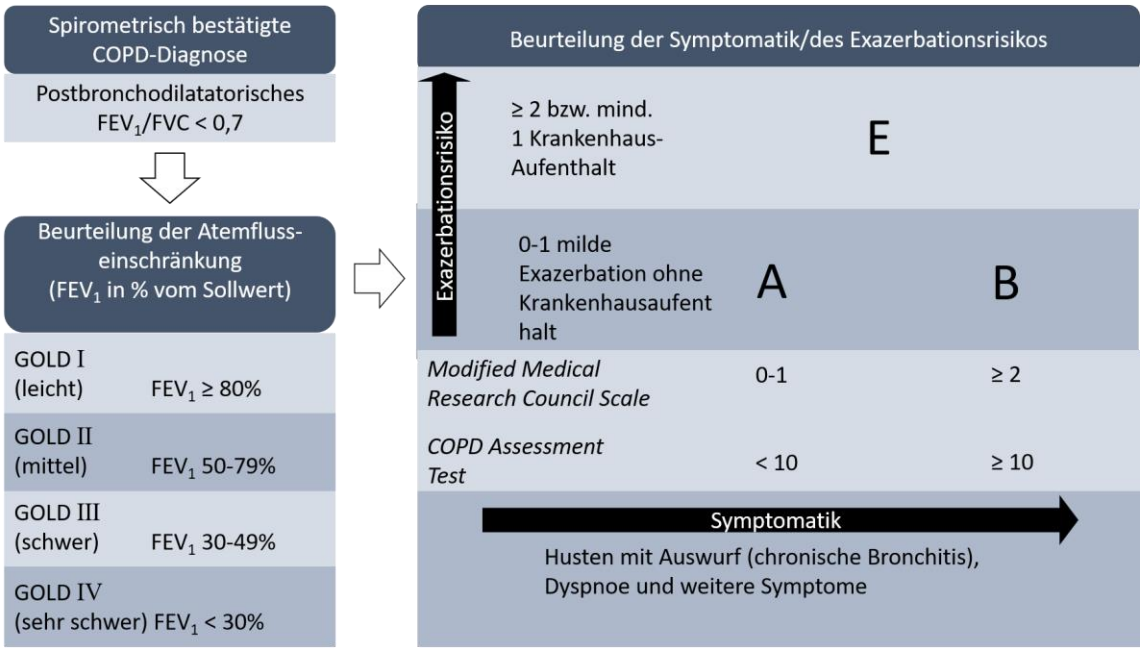


Abbildung 1: Schweregradeinteilung nach Lungenfunktionsuntersuchung und Symptomen GOLD I bis IV und Gruppe A, B und E.
Für die Schweregradeinteilung einer COPD wird sowohl die Atemwegsobstruktion in der Spirometrie mit ihrer Schweregradeinteilung GOLD I bis IV sowie die vorrausgegangenen Exazerbationen und die aktuelle Symptomatik mit A, B und E ermittelt. Nach dem Schema wird ein Patient mit einem FEV1 60% des Sollwertes, einem Wert von zwölf Punkten im *COPD Assessment Test* und keiner Exazerbation der Kategorie GOLD II und Gruppe B zugeordnet.

1.1.4 Komorbiditäten bei COPD

Neben der Beurteilung von Lunge und Atemwegen sind auch extrapulmonale Befunde von Bedeutung, da die COPD oftmals mit diversen Komorbiditäten einhergeht [2, 24, 72, 269]. Die Pulmonale Hypertonie (PH) gehört zu den Erkrankungen, welche häufig mit der COPD assoziiert sind [18]. Die PH wird als eine chronische Druckerhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks in der Pulmonalarterie (mPAP) ≥ 20 mmHg definiert und ist durch einen erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstand charakterisiert [316]. Der mPAP liegt bei gesunden Probanden im Schnitt bei 14,0 ± 3,3 mmHg [175]. Ein mPAP über 20 mmHg ist mit einer allgemein erhöhten Mortalität [80] und einem größeren Exazerbationsrisiko bei COPD-Patienten assoziiert [224]. In Studien konnte gezeigt werden, dass bis zu 90% der COPD-Patienten eine milde PH aufweisen [301, 372]. Drei bis fünf Prozent der COPD-Patienten weisen mPAP Werte von 35 bis 40 mmHg auf und leiden der Definition nach an einer schweren PH [244].

Neben der PH sind auch systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie mit der COPD assoziiert [212]. Weitere typische Begleiterkrankungen sind Osteoporose [107] und Muskelschwäche [170]. In Verbindung mit einer COPD kommt

es außerdem gehäuft zu obstruktiver Schlafapnoe, Schlafstörungen und Tagesmüdigkeit [7, 39]. Insbesondere während akuten Exazerbationen treten vermehrt Depressionen und Angstzustände auf [14].

1.2 Pathogenese der COPD

Die Pathogenese der COPD ist komplex und multifaktoriell. Bis heute sind viele Prozesse nicht vollständig verstanden und Gegenstand aktueller Forschung. Als Reaktion auf inhalative Noxen kommt es zu einer Inflammation, welche mit der Destruktion von Alveolarsepten sowie bronchialen und pulmonal vaskulären strukturellen Umbauprozessen (*Remodeling*) assoziiert ist. Langfristig kann es dabei zu einem Emphysem, einer Obstruktion der kleinen Atemwege und begleitend zu einer PH kommen [23, 131, 133]. Die Inflammation der kleinen Atemwege bleibt auch lange nach der Aufgabe des Rauchens bestehen [180, 285]. Dabei ist die Inflammation nicht nur auf die Lunge beschränkt, sondern kann sich im Verlauf der Erkrankung zu einer systemischen Inflammation entwickeln [3, 24].

1.2.1 Inflammation

Ein wichtiger Aspekt in der Pathogenese der COPD ist die chronische Inflammation, in deren Verlauf es zur Aktivierung von Immunzellen, Sekretion von Zytokinen und Rekrutierung weiterer Immunzellen kommt. Folgend zeigt sich eine Destruktion von Alveolarsepten sowie bronchiales und pulmonal vaskuläres *Remodeling* [23, 131]. Es wird sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aktiviert [38, 131]. Zum angeborenen Immunsystem gehört als erste „Verteidigungslinie“ die Barriere der alveolaren und bronchialen Epithelzellen (A/BECs) und die mukoziliäre *Clearance*. Außerdem zählen Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürlichen Killerzellen zur angeborenen Immunabwehr [200]. Die Inflammation ist charakterisiert durch einen Anstieg dieser Zellpopulationen. Bei der COPD ist außerdem das adaptive Immunsystem aktiv und es finden sich vermehrt dendritische Zellen [348], aktivierte B- und T-Lymphozyten und Lymphfollikel [42]. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen dem Fortschreiten der Erkrankung und der Akkumulation der Immunzellen [94, 130, 132].

A/BECs, dendritische Zellen und Makrophagen sind in nächster Nähe zum Lumen lokalisiert und haben direkten Kontakt zum CS. Als Reaktion auf die inhalativen Noxen sezernieren Makrophagen und A/BECs vermehrt proinflammatorische Zytokine, u. a. Interleukine (IL), IL-1β, IL-6 und IL-8 und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) [98]. Bei COPD-Patienten konnten erhöhte Spiegel von IL-6 und TNF-α nachgewiesen werden [369, 395] und im Zusammenhang mit akuten Exazerbationen auch erhöhte Serumspiegel von IL-8 [408]. Die Zytokine wirken chemotaktisch und rekrutieren weitere Immunzellen, darunter neutrophile Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten [58, 79]. Dabei spielen Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der COPD [22], sie kommen sowohl im Alveolarraum, als auch im der Wand der kleinen Atemwege bei Rauchern und COPD-Patienten vermehrt vor [4, 19, 25]. Makrophagen können in M1 und M2 Makrophagen unterschieden werden. Dabei sind M1 Makrophagen insbesondere an inflammatorischen Prozessen beteiligt, während M2 Makrophagen antiinflammatorisch und profibrotisch sind und Reparaturprozesse im Gewebe fördern [213, 217] Bei Rauchern und COPD-Patienten konnten vermehrt M1 Makrophagen in der Wand der kleinen Atemwege gefunden werden [82]. Gleichzeitig wurde in der bronchoalveolären Lavage, mit welcher die Zellen des Alveolarraum untersucht werden, eine vermehrte Deaktivierung von M1 assoziierten Genen und eine Polarisierung in Richtung M2 Makrophagen beobachtet [82, 311]. Außerdem konnte eine erhöhte Anzahl von CD8 positiven T- Lymphozyten im Sputum von COPD-Patienten im Vergleich zu Rauchern mit normaler Lungenfunktion und nichtrauchenden Probanden festgestellt werden [345]. Eine verringerte Apoptose der CD8 positiven T- Lymphozyten in den kleinen Atemwegen von COPD-Patienten konnte ebenfalls gezeigt werden (72).

1.2.2 Emphysem

In der Pathogenese der COPD kommt es zu einer Destruktion der Alveolarsepten und in Folge dessen zu einer irreversiblen Erweiterung der Lufträume distal der terminalen Bronchiolen. Dies wird als Lungenemphysem bezeichnet. Abhängig von der Lokalisation kann ein zentroazinäres Emphysem von einem panazinärem Emphysem unterschieden werden. Dabei ist das zentroazinäre Emphysem mit dem Konsum von Zigaretten assoziiert, während das panazinäre Emphysem häufig bei Patienten mit α1-Antitrypsin Mangel vorkommt [124, 147]. In die Pathogenese des Emphysems sind verschiedene Signalkaskaden involviert, wobei u. a. das Verhältnis zwischen Proteasen und Antiproteasen,

reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress sowie veränderte Reparaturprozesse und Apoptose eine wichtige Rolle spielt [147, 344].

CS ist entscheidend in der Entstehung des Emphysems, da eine CS-assoziierte Aktivierung von Immunzellen zu einer vermehrten Sekretion von Proteasen führt. Makrophagen und neutrophile Granulozyten sezernieren z. B. MMPs, welche zum Abbau von Elastin in der Extrazellulären Matrix (EZM) führen [61, 96, 121]. Im Sputum von COPD-Patienten konnten erhöhte Spiegel von MMP-12 beobachtet werden [48]. Zusätzlich begünstigt CS die Polymerisation von α 1-Antitrypsin, wobei das Protein seine Funktion als Proteaseinhibitor verliert [146]. Es kommt zu einer Dysbalance zwischen Proteasen und Antiproteasen, die zur Entstehung eines Emphysems beiträgt.

Außerdem spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese der COPD. Als oxidativer Stress wird eine erhöhte Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies bezeichnet. Oxidativer Stress entsteht in der Lunge zum einen exogen durch CS und zum anderen endogen durch die Aktivierung von Immunzellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, welche reaktive Sauerstoffspezies sezernieren [279, 334]. Des Weiteren wird angenommen, dass bei COPD-Patienten in den Mitochondrien vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden [347]. Vermehrter oxidativer Stress in der Lunge spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung des Emphysems, da reaktive Sauerstoffspezies zu einer reduzierten Aktivität der Antiproteasen beitragen. Weiterhin führt oxidativer Stress zu einer Aktivierung proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren, zu DNA Schäden, zu einer Ausschüttung von TGF-β, zu einer Fibrosierung der kleinen Atemwege und zu einer erhöhten Expression von Mucingenen womit er in unterschiedliche Pathomechanismen der COPD involviert ist [26].

Des Weiteren könnten auch apoptotische Signalkaskaden in AECs und Endothelzellen eine Rolle im CS-assoziierten Emphysem in der COPD spielen [75, 206]. Es konnten vermehrt apoptotische AECs in emphysematösem Lungengewebe von COPD-Patienten beobachtet werden [398].

1.2.3 Bronchiales Remodeling

In der Pathogenese der COPD kommt es in der Lunge zu *Remodeling* Prozessen, welche zum einen die Folge der Inflammation und der Aktivierung diverser Immunzellen sind. Zum anderen wird das *Remodeling* durch die direkten Effekte der inhalativen Noxen auf verschiedene Zelltypen, z. B. A/BECs bedingt. Das bronchiale *Remodeling* äußert sich dabei in einer Obstruktion der kleinen Atemwege und dem klinischen Bild einer chronischen Bronchitis [131, 133].

Inhalative Noxen führen im Flimmerepithel der Bronchiolen zu Schäden des Epithels und zu einer Permeabilitätszunahme [131, 161]. Die Zahl der Kinozilien tragenden BECs verringert sich, gleichzeitig kommt es zu einer Vermehrung und Metaplasie der Becherzellen [291]. Elektronenmikroskopisch kann eine deutliche Zunahme des Mukus festgestellt werden, der sich über das Oberflächenepithel legt [149]. Dieser Mukus ist visköser als bei gesunden Probanden. Die Hypersekretion und Hyperviskosität hat zur Folge, dass die mukoziliäre *Clearance*, als einer der wichtigsten Abwehrmechanismen der konduktiven Atemwege, erschwert wird [87, 133]. Es konnte gezeigt werden, dass CS die Rezeptoren epithelialer Wachstumsfaktoren aktiviert, welche über einen *mitogen activated protein* (MAP) Kinase Weg die Expression von Mucingenen (MUC5AC und MUCB) erhöht[25, 331]. Die genauen Mechanismen und die epigenetische Regulation der Schleimhypersekretion sind immer noch Gegenstand aktueller Forschung [289]. Des Weiteren findet man eine Hypertrophie der submukösen Drüsen und einhergehend mit der Inflammation vergrößerte intraepitheliale Lymphfollikel, sowie vermehrt inflammatorische Zellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, CD4 und CD8 positive T-Lymphozyten) [132]. Außerdem kommt es peribronchial zur Fibrose und Ablagerung von EZM. Die Mechanismen der Fibrose-Entstehung um die kleinen Atemwege herum ist noch nicht vollständig verstanden [21]. Dabei könnten Wachstumsfaktoren wie TGF-β und der *connective tissue growth factor* die Synthese von Bestandteilen der peribronchialen EZM induzieren [142]. Die Expression von TGF-β ist sowohl bei COPD-Patienten, als auch bei Rauchern verstärkt [34, 332]. Proliferierende glatte Muskelzellen (*smooth muscle cells* SMCs) produzieren weitere proinflammatorische Zytokine, Proteasen und Wachstumsfaktoren und beeinflussen so Migration, Proliferation und Apoptose von A/BECs und Immunzellen, wie T-Lymphozyten und dendritische Zellen [137, 389].

1.2.4 Pulmonal vaskuläres Remodeling

Bei COPD-Patienten sind neben den Bronchien auch pulmonale Gefäße vom *Remodeling* betroffen. Dabei kommt es insbesondere in den Gefäßen mit einem Durchmesser von < 500 µm zu Veränderungen [204] wobei alle drei Gefäßwandschichten, die inneren Schicht *(Intima),* die mittlere Schicht *(Media)* und die äußere Schicht (*Adventita)* betroffen sein können [305]. Der Gefäßdurchmesser verkleinert sich durch Proliferation und Hypertrophie von Fibroblasten, pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs) und Endothelzellen, sowie durch die Ablagerung von EZM-Bestandteilen, wie Kollagen, Fibronektin und Elastin. Es kommt zu einer Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes und des mPAP [150]. Das *Remodeling* führt zu einer Verdickung der *Intima* und der *Media,* welche mit der Schwere der COPD korrelieren [85, 204, 296].

Die Pathomechanismen des pulmonal vaskulären *Remodelings,* welche die Entstehung einer sekundären PH als Komorbidität der COPD zur Folge haben kann, sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt und werden in der Literatur kontrovers diskutiert [292]. Die im Zusammenhang mit der COPD auftretende PH wird in der Klassifikation der WHO der Gruppe 3 - PH bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie - zugeordnet [315]. Die Bedeutung der Hypoxie für das pulmonal vaskuläre *Remodeling* bei der PH bei COPD-Patienten wurde in den letzten Jahren durch neue Forschungserkenntnisse zunehmend hinterfragt [292]. *Peinado et al.* konnten Veränderungen der *Intima,* welche mit einer Proliferation von PASMCs sowie Ablagerungen von Kollagen und Elastin einhergehen, auch bei Patienten mit einer milden COPD, ohne Hypoxämie, sowie bei Rauchern mit normaler Lungenfunktion nachweisen [296]. Auch wurde gezeigt, dass vaskuläres *Remodeling* noch vor der Entstehung eines Emphysems auftreten kann [309, 377]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass CS eine entscheidende Rolle in den pulmonalen vaskulären Umbauprozessen, welche mit einer COPD einhergehen, spielen könnte [261, 296]. CS hat einen direkten Einfluss auf die Genexpression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), Endothelin, Endothelwachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) und deren Rezeptoren [378]. Diese Mediatoren sind sowohl an der Zellproliferation, als auch an Vasodilatation und Vasokonstriktion beteiligt [378]. Bei Rauchern kann eine endotheliale Dysfunktion mit einer verminderten Expression der e-NOS [17] und einer erhöhten Expression des VEGF [297] beobachtet werden. Auch Un-

tersuchungen an Tiermodellen zeigen, dass CS mit pulmonal vaskulärem *Remodeling* assoziiert ist. *Ferrer et al.* konnten zeigen, dass Meerschweinchen nach drei Monaten Exposition mit CS eine endotheliale Dysfunktion, mit einer verminderten eNOS-Expression und Proliferation von PASMCs aufweisen und diese Veränderungen zur Entstehung eines Emphysems beitragen. Dabei verstärkte eine Hypoxie-Exposition das CS-assoziierte *Remodeling* [90].

1.3 Ca^{2+}-assoziierte Signalkaskaden

Calcium Ionen (Ca^{2+}) sind als ubiquitär vorkommende Botenstoffe für diverse Signalkaskaden essentiell und könnten in der Pathogenese der COPD eine wichtige Rolle spielen [32, 260, 314]. Ca^{2+}-assoziierte Signalkaskaden sind für die Aktivierung, Migration und Differenzierung von Immunzellen [49, 91, 110, 355], für die Aktivität der Kinozilien [6, 199], die Proliferation und Kontraktion von bronchialen SMCs und PASMCs von Bedeutung [389]. Diese Veränderungen auf zellulärer Ebene führen zu einer chronischen Aktivierung des Immunsystems, einer verminderte mukoziliäre *Clearance* und einer vermehrten Proliferation verschiedener Zelltypen, wie z. B. bronchiale SMCs und PASMCs und tragen so zur Entstehung einer COPD bei [131, 133].

Ca^{2+}-assoziierte Signalkaskaden werden durch Veränderungen der intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration induziert. Hierfür werden in jedem Zelltyp bestimmte Proteine exprimiert, die für die Aufrechterhaltung der Ca^{2+}-Homöostase verantwortlich sind. Dazu gehören Ca^{2+}-Kanäle, wie die Transient Rezeptor-Potential (TRP) Ionenkanäle, spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle (*voltage-dependent Ca^{2+}-channels* VDCCs), Plasmamembran Ca^{2+}-ATPasen (PMCA), Sarco(endo)plasmatische Retikulum Ca^{2+}-ATPasen (SERCA), Ca^{2+}-bindende Proteine und Na^{+}/Ca^{2+}-Austauscher. Außerdem sind Zellorganellen, wie Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum (ER) für die Ca^{2+}-Homöostase in der Zelle essentiell [32].

1.4 Ca^{2+}-Kanäle

1.4.1 Transient Rezeptor-Potential (TRP) Ionenkanäle

Der erste Nachweis von TRP-Kanälen erfolgte im Jahr 1969 in Rezeptorzellen der Taufliege *Drosophila melanogaster* [68]. Heute ist bekannt, dass sie ubiquitär in Geweben

von Säugetieren exprimiert sind und ihr Aktivierung durch eine Vielzahl von Stimuli erfolgen kann. Dazu gehören Veränderungen der Temperatur, des PH-Werts und/oder der Osmolarität [63, 231, 233]. Auch die Interaktion mit diversen Liganden darunter Bestandteile von CS wie Acrolein oder Nikotin [12, 188, 333] sowie Proteine und Proteinkinasen [394] führen zur Aktivierung der TRP-Kanäle.

TRP-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle und je nach Subtyp neben Ca^{2+} auch permeabel für K^+, Mg^{2+} und Na^+ [83]. In Abhängigkeit davon welcher TRP-Kanal aktiviert wurde, kommt es demnach nicht ausschließlich zum Einstrom von Ca^{2+}, sondern auch zum Einstrom von Kationen wie Na^+ [239]Die erhöhte intrazelluläre Na^+-Konzentration führt zu Veränderungen des Membranpotentials und kann so direkt die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle (*voltage-dependent Ca^{2+}-channels*, VDCCs) induzieren und hierdurch auch Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration nehmen [78, 86]. Die Permeabilität für Ca^{2+} im Verhältnis zu Na^+ (P_{Ca}/P_{Na}) hängt von der Zugehörigkeit zur jeweiligen Unterfamilie der TRP-Kanäle ab. Die Mehrzahl der Kanäle sind nichtselektive Ionenkanäle mit einer P_{Ca}/P_{Na} von 0,1 bis 20 [254].

TRP-Kanäle sind aufgrund ihrer Leitfähigkeit von Ca^{2+} essentiell für die Ca^{2+}-Homöostase [62]. Der intrazelluläre Ca^{2+}-Anstieg ist die Grundlage verschiedener Signalkaskaden in der Zelle, z. B. Aktivierung und Migration von Immunzellen, Sekretion von Zytokinen, Proliferation und Apoptose sowie Kontraktion [31, 110, 260, 355]. Bedingt durch das ubiquitäre Vorkommen der TRP-Kanäle und ihre bedeutende Rolle in der Ca^{2+}-Homöostase können sie mit der Entstehung vieler Erkrankungen in Verbindung gebracht werden [251]. Dazu zählen pathologische Veränderungen des kardiovaskulären Systems [144] z. B. die arterielle Hypertonie[392] oder die PH [209, 370]. Außerdem kann ihnen eine Bedeutung in der Entstehung der Lungenfibrose [129], verschiedener Formen von Lungenödemen [338, 371] und von Asthma sowie COPD zugeschrieben werden [16, 66, 251].

TRP-Kanäle können anhand der Aminosäurenhomologien im Menschen in folgende sechs Subgruppen mit insgesamt 27 Proteinen differenziert werden: die Untergruppen der Klassischen-TRP (TRPC), der Melastatin-TRP (TRPM), der Mucolipin.TRP (TRPML), der Vanilloid-TRP (TRPV), der Ankyrin-TRP (TRPA) und die der Polycystin-TRP (TRPP) **(Abbildung 2)** [63, 233, 234, 249]

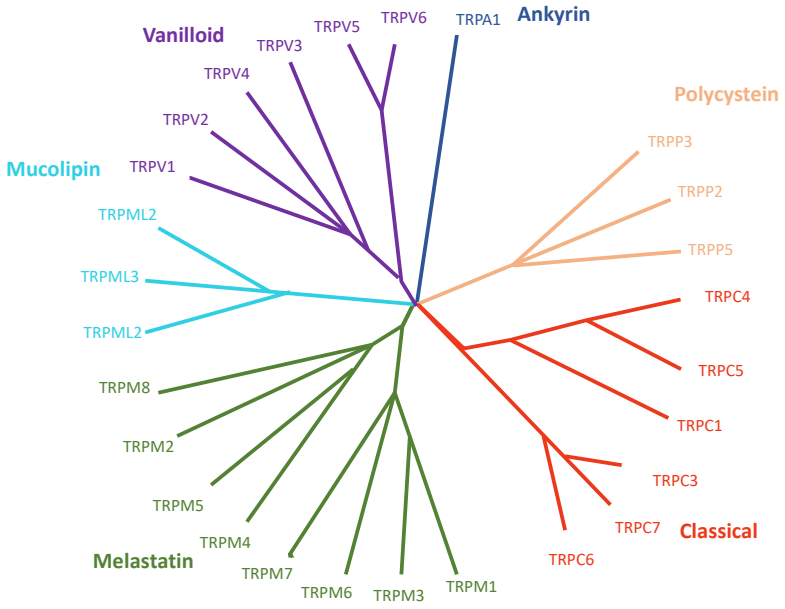


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Superfamilie im Menschen.
Die humanen TRP-Kanäle können anhand der Aminosäurenhomologien in die folgenden sechs Subgruppen eingeteilt werden: der Klassische-TRP (TRPC), der Melastatin-TRP (TRPM), der Mucolipin-TRP (TRPML), der Vanilloid-TRP (TRPV), der Ankyrin-TRP (TRPA) und der Polycystin-TRP (TRPP). Modifiziert nach *Nilius und Owsianik, 2011 [249]*

Alle TRP-Kanäle zeigen Ähnlichkeiten in ihrer Grundstruktur: Ein Ionenkanal besteht aus vier TRP-Proteinen, welche ein Tetramer bilden. Dabei kommen sowohl Homotetramere (vier gleiche Untereinheiten), als auch Heterotetramere (verschiedene Untereinheiten) vor [92, 127]. Jedes TRP-Protein besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) mit einer Schleife zwischen S5 und S6 **(Abbildung 3)** [63, 257]. An dieser Stelle befindet sich die zentrale Pore für den Ioneneinstrom [276, 352]. Strukturell unterscheiden sich die TRP-Kanäle in Länge der intrazellulären NH2- und COOH-Enden und der hier lokalisierten Domänen **(Abbildung 3)** [62]. Dazu gehören Bindungsstellen für regulatorische Proteine, wie z. B. Calmodulin sowie enzymatisch aktive Domänen [63]. Am N-Terminus finden sich bei TRPC, TRPV, TRPA und TRPN *Ankyrinrepeats*, welche verschiedene

Liganden binden können [100, 194]. Spezifisch für TRPC, TRPM und TRPN ist die hochkonservierte TRP-Domäne am C-Terminus, bestehend aus 23-25 Aminosäuren, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist [233].

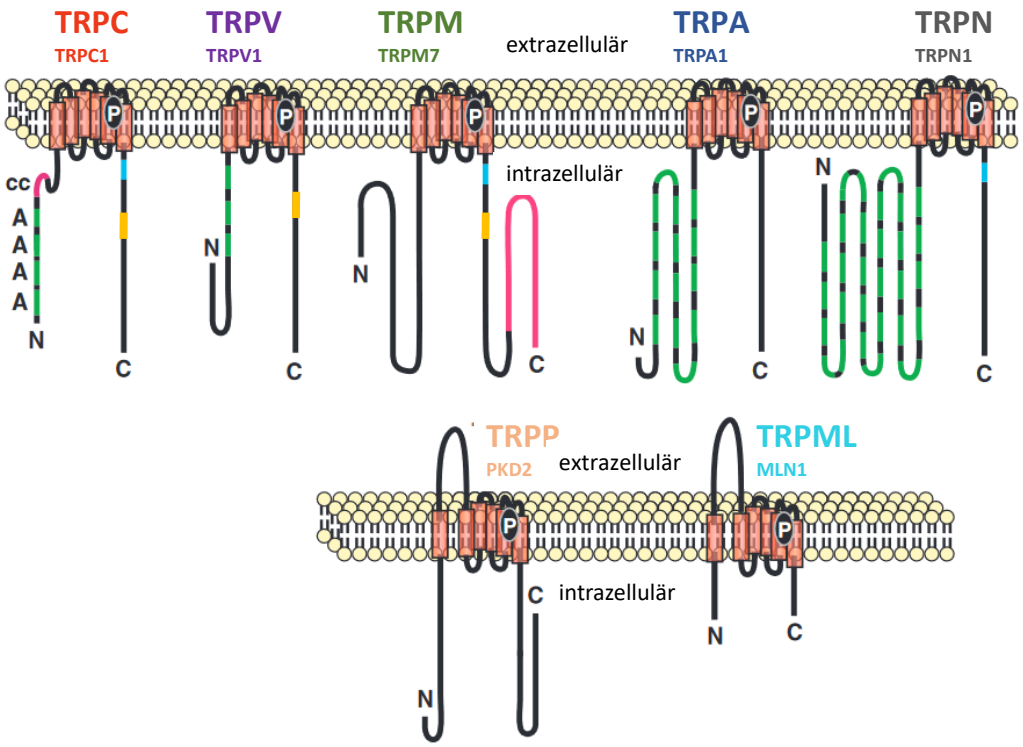


Abbildung 3: Aufbau der TRP-Kanäle.
Darstellung des Aufbaus der TRP-Kanäle anhand eines exemplarischen Vertreters jeder TRP-Subgruppe. Eine Untereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen mit einer Pore (P) zwischen der fünften und sechsten Schleife. C- und N-Terminus sind intrazellulär lokalisiert. TRPC, TRPM und TRPN besitzen eine hochkonservierte TRP-Domäne (hellblau). TRPM-Kanäle besitzen eine Proteinkinase-Domäne (rosa). Für TRPC, TRPV und TRPM sind Calmodulin-/Inositoltrisphosphat-Bindungsstellen eingezeichnet (gelb). Außerdem sind noch *Ankyrinrepeats* (A, grün) der Kanäle TRPC, TRPV, TRPA und TRPN dargestellt. Abbildung modifiziert nach *Montell 2005 [233]*.

Die Familie der *Cationical/Classical Transient Receptor-Potential* (TRPC) zählt sieben Unterformen TRPC1 bis TRPC7, wobei TRPC2 im Menschen als Pseudogen vorliegt [352]. Die Kanäle können anhand ihrer Sequenzhomologie in vier Untergruppen zusammengefasst werden: TRPC1, TRPC2, TRPC4 und TRPC5 sowie TRPC3, TRPC6 und TRPC7 [233]. TRPC-Kanäle werden in vielen Geweben und Zelltypen exprimiert, sie wurden u. a. im Nervensystem, im kardiovaskulären System, in Leber und Niere sowie in Epithel- und Endothelzellen nachgewiesen [1]. Ihnen können diverse physiologische und pathophysiologische Funktionen zugeordnet werden [249] und sie sind für die Funktion des Immunsystem von Bedeutung [49, 95, 258]. Eine verstärkte Expression von

TRPC1, TRPC3, TRPC4 und TRPC6 scheint in der Pathogenese des Ovarialkarzinoms eine Rolle zu spielen und ist mit einem vermehrtem Proliferationsverhalten der Tumorzellen assoziiert [406]. Im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom konnte ein Zusammenhang zwischen der TRPC-Expression und dem Differenzierungsgrad des Karzinoms beobachtet werden [156].

TRPC-Kanäle werden über Signalkaskaden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert. Sie sind somit am *receptor-operated* Ca^{2+}*-entry* (ROCE) beteiligt. Aktiviert durch die Bindung eines Agonisten an G_i-gekoppelte Rezeptoren hydrolysiert die Phospholipase C membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die *Second messenger* Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat [30]. DAG kann den ROCE über TRPC-Kanäle regulieren, indem es TRPC3, TRPC6 und TRPC7 direkt aktiviert[128]. Es wird außerdem eine Aktivierung von TRPC4 [388] beziehungsweise eine Inhibition von TRPC4 und TRPC5 [353] über die Proteinkinase C (PKC) diskutiert. IP_3 diffundiert in das Zytosol und führt über die Bindung an IP_3-Rezeptoren zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER [88, 207, 336]. Als Folge einer Absenkung der Ca^{2+}-Konzentration im ER/SR der Zelle kommt es zu Ca^{2+}-Einstrom aus dem Extrazellularraum [270], was als *store-operated* Ca^{2+}*-entry* (SOCE) bezeichnet wird. TRPC-Kanäle vermitteln auch SOCE, wobei TRPC1 vermutlich mit dem stromalen Interaktionsmolekül 1 (*stromal interacting molecule*, STIM1) im ER/SR und dem Ca^{2+}-aktivierbaren Ca^{2+}-Kanalprotein 1 *(*Ca^{2+}*-release-activated* Ca^{2+}*-channel protein 1*, ORAI1) interagiert. Die genaue Rolle von TRPC im SOCE wird jedoch kontrovers diskutiert [8, 11, 52, 74, 97, 197].

TRPV1 ist der erste beschriebene Kanal der *Transient Receptor-Potential Vaniloid* (TRPV) Familie und kann u. a. durch Hitze aktiviert werden [44]. Während TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV4 den nicht selektiven Ca^{2+}-Kanälen zugeordnet werden, sind TRPV5 und TRPV6 die einzigen der TRP-Superfamilie, welche hochpermeabel für Ca^{2+} sind [349, 405]. TRPV1 wird besonders stark in sensorischen Nervenfasern exprimiert, welche den Respirationstrakt innervieren [44, 81, 384]. Die Aktivierung von sensorischen Nervenfasern über TRPV1-Agonisten, wie z. B. Capsaicin verursacht ein Schmerzempfinden und löst reflektorisch Husten bei Meerschweinchen aus [179, 222]. Des Weiteren weisen auch Patienten mit chronischem Husten eine erhöhte Expression von TRPV1 auf [113]. Neben TRPV1 wird auch TRPV4 im Respirationstrakt exprimiert und kann in A/BECs, Endothelzellen, Lungenfibroblasten, bronchialen SMCs und PASMCs nachgewiesen werden [10, 16, 216, 275]. TRPV4 reagiert sensibel auf mechanischen Stress und

Veränderungen der Osmolarität [327]. TRPV4 ist sowohl an der Regulierung der epithelialen Barriere, als auch an der Regulierung der Aktivität der Kinozilien beteiligt [6, 154, 380]. TRPV-Kanäle können außerdem in Zellen des Immunsystems, wie z. B. Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T- Lymphozyten nachgewiesen werden und könnten hier Inflammationsprozesse modulieren [16].

Der *Transient Receptor-Potential Ankyrin* (TRPA1) Kanal wurde erstmals in humanem Lungenfibroblasten kloniert [148] und ist der einzige Vertreter dieser Subgruppe. TRPA1 kann sowohl in neuronalem als auch in nicht neuronalem Gewebe nachgewiesen werden [117, 416]. TRPA1 ist in afferenten sensorischen Nervenfasern des *Nervus Vagus*, *Nervus Trigeminus* und in den Spinalganglien exprimiert, welche den Respirationstrakt innervieren [28, 242]. Im nicht neuronalen Lungengewebe wurde die Expression TRPA1 u. a. in Fibroblasten [396], bronchialen SMCs [243], PASMCs *(nicht publiziert Brosien et al. 2024)* und A/BEC [166, 243] nachgewiesen. TRPA1 kann direkt durch verschiedene Komponenten des CS aktiviert werden, wozu Acrolein, Crotonaldehyde, Formaldehyde und auch Nikotin gehören [12, 188, 230, 333].

Zu der Familie der *Transient Receptor Potential Melastatin* (TRPM) gehören acht Proteine. Diese lassen sich in weitere vier Untergruppen unterscheiden: TRPM1 und TRPM3, TRPM4 und TRPM5, TRPM6 und TRPM7 sowie TRPM2 und TRPM8 [120]. Dabei sind TRPM4 und TRPM5 nicht für Ca^{2+} permeabel sondern ermöglichen hauptsächlich den Na^{+}-Einstrom [250]. TRPM6 und TRPM7 sind durch eine Kinase am C-Terminus charakterisiert und sind in den Mg^{2+}-Haushalt involviert [120, 306]. TRPM-Kanäle werden in dendritischen Zellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Mastzellen exprimiert [16, 20, 240, 415]. Sie sind für die Regulation des Immunsystems von Bedeutung und werden als therapeutische Zielstrukturen für inflammatorische Erkrankungen diskutiert [415]. Außerdem wird ihnen eine mögliche Rolle in der Pathogenese von Tumorerkrankungen wie dem Melanom [115] und dem Prostatakarzinom [112] zugeschrieben. Des Weiteren wird für TRPM4 ein Zusammenhang mit kardiovaskulärem *Remodeling* beschrieben [361]. Über die Rolle von TRPM-Kanälen in der Pathogenese von Lungenerkrankungen ist bis dato wenig bekannt.

Die Familie der TRPP- und TRPML-Kanäle unterscheiden sich in ihrer Sequenz deutlich von den anderen TRP-Kanälen und weisen hohe Sequenzhomologien untereinander auf. Sowohl TRPP als auch TRPML haben eine große extrazelluläre Schleife zwischen der

ersten und zweiten Transmembrandomäne [352]. Mutationen in TRPP1 und TRPP2 spielen eine wichtige Rolle in der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung [103]. TRPML-Kanäle sind für die Funktion von Lysosomen und Endosomen von Bedeutung [359]. In der Lunge wird TRPML3 in den Alveolar-Makrophagen exprimiert und im Zusammenhang mit der COPD wurde eine Hochregulation des TRPML3-Kanals festgestellt. *Spix et al.* konnten zeigen, dass TRPML3 essentiell für die Endozytose von MMP-12 durch Makrophagen ist und dass eine gestörte Funktion von TRPML3 zu einer Erhöhung der MMP-12 Konzentration führt [319]. Damit könnte TRPML3 eine wichtige Rolle in der Entstehung des Emphysems bei der COPD zukommen.

1.4.2 Voltage-dependent Ca^{2+}-channels (VDCCs)

In erregbaren Zellen sind die VDCCs für eine schnelle intrazelluläre Ca^{2+}-Erhöhung verantwortlich. Diese spielt z. B. bei der Exozytose von Neurotransmittern an synaptischen Endknöpfchen oder der Kontraktion von Muskelzellen eine Rolle [32]. Die VDCCs können anhand der α-Untereinheit in die drei Hauptgruppen, Ca_v1, Ca_v2 und Ca_v3, unterteilt werden. Zur Gruppe der Ca_v1 gehören die L-Typ- *(long lasting)* Kanäle, zu Ca_v2 die N-Typ- (*Neither;* weder N- noch L-Typ), die P/Q-Typ- (Purkinje Zellen) und R-Typ-*(Remaining)* Kanäle und zu Ca_v3 die T-Typ-*(transient)* Kanäle [45]. P/Q-Typ-Kanäle werden insbesondere im neuronalen Gewebe (Cerebellum, Hippocampus, Cortex) exprimiert, sie spielen eine wichtige Rolle in der synaptischen Signalübertragung und können mit neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden [45, 274]. T-Typ-Kanäle werden mit neuropathischen Schmerzen [36], kardialer Hypertrophie [54] und PH assoziiert [53]. L-Typ-Kanäle sind essentiell für die Kontraktion glatter Muskelzellen und sind an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Bei der arteriellen Hypertonie kann eine Hochregulation von L-Typ-Kanälen beobachtet werden [235, 267]. Die Aktivierung von L- und T-Typ-Kanälen unterscheidet sich. L-Typ-Kanäle benötigen eine größere Verschiebung des Membranpotentials und werden erst ab einem Potential positiver als -20 mV aktiviert. Sie werden nur langsam inaktiviert und ermöglichen so einen lang andauernden Ioneneinstrom [341]. Die T-Typ-Kanäle dagegen werden schon bei -70 mV aktiv. Sie besitzen eine geringe Leitfähigkeit und werden schnell wieder inaktiviert [252]. Die Aktivität der VDCCs kann über die Proteinkinase A (PKA), die PKC und Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMKII) reguliert werden[155, 165, 351].

1.4.3 Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase (PMCA) und Sarco(endo)plasmatische Retikulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA)

Um ein hohes Konzentrationsgefälle von Ca^{2+} zwischen dem Extra- und Intrazellularraum aufrechtzuerhalten und nach einem Ca^{2+}-Einstrom die intrazelluläre Konzentration wieder zu senken, sind verschiedene Ca^{2+}-Kanäle und Austauscher in der Zelle exprimiert [32]. Die Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase (PMCA) wurde erstmals 1966 identifiziert [302] und pumpt Ca^{2+} unter Verbrauch von ATP wieder in den Extrazellularraum. Vier Gene ATP2B1 bis 4 codieren für mehr als 20 Transkriptionsvarianten der PMCA. Sie unterscheiden sich in ihrer basalen Aktivität [43] und werden in verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert [5, 326]. PMCAs sind durch eine hohe Ca^{2+}-Affinität charakterisiert und werden auch bei niedrigen Ca^{2+}-Konzentrationen aktiviert, dafür ist ihre Transportrate für Ca^{2+} vergleichsweise gering [41, 64]. Eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivität der PMCAs spielt Calmodulin. Die Bindung von Calmodulin führt zu einer Konformationsänderung der PMCA und erhöht sowohl die Affinität als auch die Transportrate für Ca^{2+} [64]. Außerdem beeinflussen die PKA und die PKC durch Phosphorylierungen die Aktivität der PMCA [367, 417]. Veränderungen der PMCAs können mit neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere mit der arteriellen Hypertonie, assoziiert werden [322]. Es konnte gezeigt werden, dass ein *Knockout* von PMCA1 in arteriellen SMCs der Maus über einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration zu einer Vasokonstriktion und damit zu einem Ansteig des arteriellen Drucks führt [172]. PMCAs werden daher seit einigen Jahren als potentielle Zielstrukturen für die Therapie der arteriellen Hypertonie diskutiert [195]. Zudem wurden sie im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen, wie dem Kolonkarzinom [284] und dem Mammakarzinom [151, 350] beschrieben. Über eine mögliche Rolle der PMCAs in Lungenerkrankungen ist bis dato nichts bekannt.

Sarco(endo)plasmatische Retikulum Ca^{2+}-ATPasen (SERCA) sind in der Membran von ER/SR sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen lokalisiert. SERCA wird von drei Genen ATP2A1 bis 3 codiert. Das Ergebnis alternativen *Splicings* sind zehn verschiedene Isoformen: SERCA-1a,b, SERCA2a bis c und SERCA3a bis f [136]. Die Isoformen unterscheiden sich in ihrer Ca^{2+}-Affinität und ihrer Ca^{2+}-Transportrate und werden in verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert [202]. SERCA1 wird im schnell kontrahierenden Skelettmuskel exprimiert, SERCA2a im langsam kontrahieren-

den Skelettmuskel, im Herzmuskel und in SMCs [263]. SERCA2b kann sowohl in Muskelzellen als auch in nicht-muskulärem Gewebe nachgewiesen werden. SERCA3 wird ebenfalls in nicht-muskulärem Gewebe exprimiert und kommt insbesondere in Epithel- und Endothelzellen vor [263]. SERCA pumpt unter ATP Verbrauch Ca^{2+} aus dem Zytosol in die intrazellulären Ca^{2+}-Speicher des ER/SR und senkt so die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration [32]. Eine veränderte Expression von SERCA-Proteinen kann zu verschiedensten Erkrankungen führen, darunter viele Erkrankungen des Herzmuskels [93, 104, 310]. Außerdem konnte bei Tumorerkrankungen wie z. B. dem Bronchialkarzinom, oder dem Kolonkarzinom Veränderungen im ATP2A2 Gen, welches für die SERCA-2 Isoform codiert, festgestellt werden [174]. Auch beim Schilddrüsenkarzinom findet sich eine veränderte Expression der SERCA2b [255]. Des Weiteren können durch SERCA-vermittelte Veränderungen der Ca^{2+}-Homöostase mit neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. Alzheimer oder Parkinson und neuropsychiatrischen Erkrankungen wie z. B. Schizophrenie assoziiert werden [37].

1.4.4 Ca^{2+}-release-activated channels (CRACs)

Erstmals wurde 1986 der Mechanismus des SOCE beschrieben, bei dem als Folge einer Entleerung der intrazellulären Ca^{2+}-Speicher, Ca^{2+}-Kanäle in der Plasmamembran aktiviert werden und extrazelluläres Ca^{2+} in die Zelle einströmt [270]. Diese Ca^{2+}-Kanäle werden als *Ca^{2+}-release-activated channels* (CRACs) bezeichnet. In den letzten Jahren konnten zwei Proteine identifiziert werden, die an der Kopplung der intrazellulären Ca^{2+}-Speicherentleerung und der Öffnung von Ca^{2+}-Kanälen in der Zellmembran beteiligt sind. Das stromale Interaktionsmoleküle (*stromal interacting molecule* STIM) und das Ca^{2+}-aktivierbare Ca^{2+}-Kanalprotein (*Ca^{2+}-release-activated Ca^{2+}-channel protein* ORAI). STIM-Proteine fungieren als Ca^{2+}-Sensoren und sind in der Membran des ERs lokalisiert [191, 282]. Es kann zwischen STIM1 und STIM2 unterschieden werden, wobei STIM2 sensibler auf Ca^{2+}-Konzentrationsänderungen reagieren [325]. Die ORAI-Proteine befinden sich in der Plasmamembran und bilden die zentrale Pore des CRACs, im Menschen gibt es drei Isoformen: ORAI1, ORAI2 und ORAI3 [193]. Mit einem Ca^{2+}-Bindungsmotiv (EF Hand Motiv) [183] und einem sterilen Alpha Motiv detektiert STIM die Ca^{2+}-Konzentration im ER [324]. Ein Absinken der Ca^{2+}-Konzentration hat eine Translokalisation und Oligomerisierung der STIM-Proteine zur Folge [192]. Daraufhin werden CRACs und vermutlich TRPC-Kanäle [11, 197] in der Plasmamembran aktiviert und es

kommt zu einem Ca^{2+}-Einstrom aus dem Extrazellularraum [238, 259]. Eine direkte Interaktion von STIM1 an Bindungsstellen am C- und N-Terminus des ORAI1-Proteins kann die Funktion des Kanals modulieren [223]. Als wesentlicher Bestandteil des SOCE sind die ORAI-Proteine in der Pathogenese verschiedener Krankheiten involviert. Eine veränderte Expression der ORAI-Proteine in verschiedensten Zelltypen spielt im *Remodeling* von kardiovaskulären und respiratorischen Erkrankungen wie Atherosklerose, Arterielle Hypertonie, PH, Asthma und COPD eine Rolle [158].

1.5 *Downstream* Signalkaskaden

Sowohl die Aktivitätsregulierung der Ca^{2+}-Kanäle als auch die einem Ca^{2+}-Einstrom nachgeschalteten Signalkaskaden sind komplex. Die Konzentration von intrazellulärem freiem Ca^{2+} wird zunächst erhöht, freies Ca^{2+} wird jedoch durch verschiedene Proteine gebunden, welche als Pufferproteine und Effektorproteine fungieren [32]. Zu den Pufferproteinen zählen Parvalbumin, Calcineurin, sowie im ER/SR lokalisiertes Calretikulin und Calsequesterin [84]. Zu den Effektorproteinen gehören u. a. Annexine, S100-Proteine, Calpain, Troponin oder Calmodulin. Die Bindung von Ca^{2+} an diese Effektorproteine initiiert weitere Signalkaskaden. Beispielsweise sind S100-Proteine an der Regulation des Immunsystems beteiligt [383] und bei COPD-Patienten kann eine erhöhte Konzentration von S100A9 beobachtet werden [273]. Calpain, eine Familie Ca^{2+}-abhängiger Proteasen bestehend aus 15 verschiedenen Isoproteinen [106], scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PH zu spielen [203]. Die Aktivierung von Calpain durch oxidativen Stress ist mit bronchialem und vaskulärem *Remodeling* assoziiert [176, 413]. Das Effektorprotein Calmodulin wird ubiquitär exprimiert und besitzt zwei Ca^{2+}-bindende EF-Domänen [84]. Jede Domäne kann zwei Ca^{2+}-Ionen binden und Calmodulin wird hierdurch allosterisch aktiviert [64] Aktiviertes Calmodulin führt wiederum zur Aktivierung von Ca^{2+}/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaMK). Diese phosphorylieren Serin- und Threoninreste von Zielproteinen und initiieren so Signalkaskaden, welche u. a. den Zellzyklus beeinflussen [317, 330]. Zudem kann Calmodulin die Aktivität von VDCCs [118] sowie von TRPC-, TRPM- und TRPV-Kanälen regulieren, indem es an intrazellulär lokalisierten Calmodulin-Bindungsstellen dieser Kanäle bindet [177, 414].

1.6 Ziel der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist es die Rolle von Ca^{2+}-Kanälen und Ca^{2+}-assoziierten Proteinen in der Pathogenese der COPD zu untersuchen. Hierbei soll ein Überblick über mögliche pathologische Veränderungen der Ca^{2+}-Homöostase im Zellverbund der Lunge, zusammengesetzt aus Immunzellen, A/BECs, Fibroblasten, bronchialen SMCs, PASMCs, erlangt werden.

Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die folgenden Aspekte näher untersucht:

A) Identifizierung potenzieller Gene und Genfamilien mittels Literaturrecherche. Dabei wurde der Fokus auf TRP-Kanäle gelegt, da bekannt ist, dass sie eine essentielle Rolle in der Ca^{2+}-Homöostase spielen.

B) Expressionsanalyse der ausgewählten Zielgene in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen mittels RTqPCR.

C) Expressionsanalyse einzelner ausgewählter Proteine in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen mittels Western Blot. Außerdem Bestätigung der Antikörperspezifität einzelner Antikörper mit Hilfe von siRNA und PASMCs sowie *Pathway*-Inhibitoren

D) Analyse der Ca^{2+}-Konzentration in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen

E) Analyse des Proliferationsverhaltens von PASMCs nach Exposition mit CS-Extrakt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Software

CFX-Manager	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
ChemiDoc XRS+, *Software Image*	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
GraphPad Prism Version 9	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
i-Control Version 1.10	Tecan, Männedorf, Schweiz
Image LabTM Software Version 6.1	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Laser-Capture Microscope, Laser Micro-dissection 6000, System-Version 6.5.0.3104	Leica, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop Software, Version 3.7.1	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.2 Geräte

Absaugsystem *Vacusafe Comfort*	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoreseeinrichtung Mini-Proteon® Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
geschliffene Deckgläschen	Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Handzähler	Kobe, Marburg, Deutschland

Heizblock	VWR, Radnor, PA, USA
Homogenisator, *Precellys* ® 24	Bertin Technologies, Aix en Provence, Frankreich
Lichtquelle für das Stereomikroskop KL1500	Schott, Mainz, Deutschland
Magnetrührer RCT *basic* mit Heizung	Ika-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Microplate Reader Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microplate Reader Spark 10M	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop für Microdissektion	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom, Leica 1805 UV	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mini centrifuge ROTILABO®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Molecular Imager® ChemiDocTM XRS	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
MS1 *Minishaker* IKA	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
pH-Meter 766 *Climatic*	Knick, Berlin, Deutschland
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe *Pipetboy acu* 2	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Platefuge MicroPlate MicroCentrifuge	Benchmark Scientific, Sayreville NJ, USA
Probenständer ROTILABO® PTFE	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PX1 PCR *Plate Sealer*	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Rollenmischer	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer, Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Spannungsgerät *Electrophoresis Power Supply* Consort E835 für Western Blot	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Spectrophotometer, NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Stereomikroskop (Zellkultur)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Thermocycler Tpersonal	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer Compact Eppendorf	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trans-Blot® TurboTM Transfer System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wippschüttler	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Wippschüttler WS 10	Edmund Bühler, Sindelfingen, Deutschland
Zellinkubator, Hera Cell 150	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Zentrifuge, Mikro 200R	Hettich AG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge, Rotina 420R	Hettich AG, Tuttlingen, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

0,2 ml PCR *Tube without cap*	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
0,5 ml *Micro Centrifuge Tube*	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
1,5 ml Gefäß, DNase/RNase-frei	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
12-Well, 24-Well Zellkultur Multiwellplatte	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

15 ml, 50 ml *Cellstar Tube*	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
2 ml Mikroröhre mit Verschluss	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
35er, 60er Zellkulturschale	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
50 ml Einmalspitze	B. Braun, Melsungen, Deutschland
96-Well Mikrotestplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well PCR-Platte *(Hard Shell)*	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Äußere Glasplatte (Western Blot)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Filter Westernblot *Whatman*	GE Healthcare Life Sciences, Milwaukee WI, USA
Handschuhe	Ansell, Richmond, Australien
Innere Glasplatte (Western Blot)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Keramikkügelchen, 2 ml *Pecellyse Ceramic*, Zirconium(IV)-oxid	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Membran Slides 2,0 µm	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Klingen	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Mörser (Porzellan Reibeschale)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Optically Clear Heat Seal	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Parafilm	Bemis, Neenah, WI, USA
Pasteurpipetten Glas 230 mm	VWR, Radnor, PA, USA
Pipetten 10 ml Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen RNase-frei (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
PVDF Blotting Membran peqGOLD	VWR, Radnor, PA, USA

Skalpell	Feather®Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan

2.1.4 Chemikalien

1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG)	Calbiochem, Millipore, Darmstadt, Deutschland
DNA Ladepuffer *(Loading Dye)* 6x	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Agarose for DNA electrophoresis	SERVA electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Amersham ECL Prime Peroxide Solution	Cytiva Global Life Sciences Solutions, Marlborough, MA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) *protease-free*	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Clarity Max TM Western ECL Substrate	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Clarity TM Western ECL Substrate	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
DNase/RNase-freies Wasser	Qiagen N.V. Venlo, Niederlande
Doppeldestilliertes Wasser (ddH2O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eosin Y *Alkoholic*	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Freezing Medium Cryo-SFM	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ionomycin	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

iTag Universal SYBR® *Green* Supermix	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Kresylviolettacetat p.a. 7651.3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Laemmli-Proben Puffer 4x	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Lipofectamine® 2000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NuPage® LDS Sample Buffer 4x	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RLT-Lysis-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Salzsäure 25%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 37%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 20% *Solution*	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
SDS-Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Tokjo, Japan
Tris Pufferan®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin/EDTA 10x	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Zelllysis-Puffer 10x	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

2.1.5 Kits und Standards

Calcium Assay Kit	Abcam, Cambridge, UK
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colometric)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
GeneRuler DNA-Leiter	Thermo Fisher, Waltham MA, USA
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, Niederlande
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Niederlande
ROTI®-Mark WESTERN PLUS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6 Primer

Die Primersequenzen wurden zum Teil aus der Literatur entnommen, nicht bekannte Sequenzen wurden von Dr. M. Brosien entworfen und die Qualität anhand der Schmelzkurven bewertet. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Größe der Fragmente überprüft.

Genbezeichnung	**Primer-Sequenz**
GAPDH	F: 5' CCACATCGCTCAGACACCAT 3'
	R: 5' AAAAGCAGCCCTGGTGACC 3'
L-Typ 1.2 CACNA1C	F: 5' TGACAACTTTGCCTTCGCCA 3'
	R: 5' ACTCATAGCCCATAGCGTCCT 3'
L-Typ 1.3 CACNA1D	F: 5' CAAGCGGACCACGCGAAC 3'
	R: 5' AGCATCGATTGCAGCTTGCC 3'
L-Typ 1.4 CACNA1F	F: 5' TCGGAATCTGAAGGCGGGAA 3'

	R: 5' TAGGGGTCCCTAGGCCTGAT 3'
ORAI1	F: 5' ATGAGCCTCAACGAGCACT 3'
	R: 5' GTGGGTAGTCGTGGTCAG 3'
ORAI2	F: 5' ATGGAAGTGCTTGGATGCGG 3'
	R: 5' GGCACGTTAAGCTCAGCACT 3'
ORAI3	F: 5' TACCGGGAGTTCGTGCA 3'
	R: 5' GGTACTCGTGGTCACTCT 3'
PBGD	F: 5' CCCACGCGAATCACTCTCAT 3'
	R: 5' TGTCTGGTAACGGCAATGCG 3'
PMCA1	F: 5' ATCCTCCTTGTCTGTAGTGTG 3'
	R: 5' TCACCATATTTCACTTGAGC 3'
PMCA2	F: 5' GATAGTGATCGTGCAGTTTG 3'
	R: 5'AATGAATATGCACCACATCC 3'
PMCA3	F: 5' CACCCACTACAAAGAGATTC 3'
	R: 5' GTAGTATTTTGGTGGTATAGGC 3'
PMCA4	F: 5' AACTCTCAGACTGGAATCATC 3'
	R: 5' ACCTTTCTCTTTTTCTCCC 3'
SERCA2	F: 5' GCTCGAGTTGAACCCTCCCA 3'
	R: 5' AGTGCCAGAGCCCATAGCAA 3'
SERCA3	F: 5' CCGCCCCTGCCTCTCATTTT 3'
	R: 5' GGTACACACCGGAGACTCCAC 3'
STIM1	F: 5' CCTCGGTACCATCCATGTTGTAGCA 3'
	R: 5' GCGAAAGCTTACGCTAAAATGGTGTCT 3'
STIM2	F: 5' CAAGTTGCCCTGCGCGCTTTAT 3'
	R: 5' ATTCACTTTTGCACGCACCG 3'

TRPA1	F: 5' AAGTGCACAGATCGCCTGGA 3'
	R: 5' AAGGAGGCCTGCTGCTTGTT 3'
TRPC1	F: 5' CTTTTCTTGCTGGCGTGCGA 3'
	R: 5' TTCTCCCAAGCACATCTACGCA 3'
TRPC3	F: 5' GCTACTGGATCGCACCTTGC 3'
	R: 5'TGGTGATGCCTTCGAACCTGT 3'
TRPC6	F: 5' TCTGCTCATGGAGC 3'
	R: 5' AACCTTCTCCCCTTCTCACGG 3'
TRPM4	F: 5' CCACCGATGCCTACGGAGAG 3'
	R: 5' AGCACTGACACCACCAGGTT 3'
TRPM7	F: 5' CCCCGTGAGGAGAATGTCCC 3'
	R: 5' ACACCTGACGAGTTGCTGACA 3'
TRPM8	F: 5' TGGGGTCCAGGAAGAAACCT 3'
	R: 5' TGAGCAGCACGTAGGCAAAC 3'
TRPV1	F:5'CAACTGTGAGGGCGTCAAGC3'
	R: 5' GGGCTGAGCAGACTGCCTAT 3'
TRPV4	F: 5' GCCAAGACGGGCAAGATTGG 3'
	R: 5' AGCGAGGAATACACTGGCCC 3'
T-Typ 3.1 CACNA1G	F: 5' GGGGTGTTCACCGTCGAGAT 3'
	R: 5' CTGCCGATTACGATGAGGGAGT 3'
T-Typ 3.2 CACNA1H	F: 5' CGTTGGGACGGACACAACGTG 3'
	R: 5' AGCAGAAGGACGTTCCCGAG 3'

F: *Forward* (vorwärts); R: *Reverse* (rückwärts)

2.1.7 Antikörper

Bezeichnung	**Nummer**	**Verdünnung**	**Bezugsquelle**
Anti-Cyclin D1	ab134175	1:10000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-ATP2A2/SERCA2 (D51B11)	9580	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Calmodulin	4830	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-CaMKII (pan)	4436S	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-Cyclin E	bs-0573R	1:1000	Bioss Inc, Woburn, MA, USA
Anti-Mouse IgG (Sekundärantikörper)	W4021	1:5000	Promega, Madison, WI, USA
Anti-P42/44 MAPK (ERK1/2)	4695	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-phospho P42/44 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	4377	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-phospho P42/44 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	9101	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-phospho (Ser) PKC Substrate	2261S	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-phospho-CaMKII (Thr231)	3356S	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-phospho-PDK1 (Ser241)	3438S	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Anti-phospho-PKA (Thr197)	5661	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-phospo-c-Raf (Ser338) (56A6)	9427	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-PKA	5842	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-PMCA1	ab190355	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-PMCA4	ab2783	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Rabbit IgG (Sekundärantikörper)	W4011	1:5000	Promega, Madison, WI, USA
Anti-β-Aktin	A5316	1:50000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-STIM1	4916S	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-STIM2	4917	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-TRPA1	PA1-46159	1:1000	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Anti-TRPC6	18236-1-AP	1:1000	Proteintech Group, Rosemont, IL, USA
Anti-TRPV4	39260	1:1000	Abcam, Cambridge, UK

2.1.8 siRNA

Bezeichnung	**Nummer**	**Bezugsquelle**
siRandom	SR-CL000-005	Eurogentec, Seraing, Belgien
siRNA TRPV4	006109-01-005	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
siRNA TRPC6	004192-03-005	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
siRNA TRPC3	006509-01-0005	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
siRNA TRPA1	006109-01-0005	Dharmacon, Lafayette, CO, USA

2.1.9 Puffer und Lösungen

Puffer	**Substanz**	**Menge**
BSA-Lösung 6%	BSA	6 g
	TBST-Puffer 1x	100 ml
Blocking-Lösung	Magermilchpulver	6 g
	TBST-Puffer 1x	100 ml
EDTA-Lösung 0,5 M pH 8,0	EDTA	36,5 g
	dH_2O	250 ml
	NaOH	bis pH 8,0
Lauf-Puffer (Laemmli) 10x	Tris 250 mM	60,56 g
	Glycin 1,9 M	288 g
	SDS 1%	20 g
	dH_2O	2000 ml

Lauf-Puffer 1x	Lauf-Puffer 10x	100 ml
	dH_2O	900 ml
RLT-Puffer	RLT-Puffer	1 ml
	β-MeEtOH	10 µl
Stripping-Lösung	ddH_2O	10 ml
	Glycin	5 ml
	HCl 25%	1 ml
TAE-Puffer 50x	Tris	242 g
	0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml
	Essigsäure	57 ml
	dH_2O	600 ml
Transfer-Puffer	Tris	11,6 g
	Glycin	5,8 g
	SDS 20%	3,7 ml
	Methanol	400 ml
	dH_2O	1600 ml
Wasch-Puffer (TBS-Puffer) 10x pH 7,5	Tris 200 mM	24,23 g
	NaCl 1,5 M	87,66 g
	HCl 37%	ca. 28 ml
	dH_2O	1000 ml

Wasch-Puffer (TBST-Puffer) 1x pH 7,5	TBS-Puffer 10x	100 ml
	Tween®20	1 ml
	dH_2O	900 ml
Zelllysis-Puffer 1x	Zelllysis-Puffer 10x	100 µl
	dH_2O	900 µl
	PMSF	1 µl

2.1.10 Medien

Dulbeccos's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS)	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium MV	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium MV Supplement Mix	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Fetales bovines Serum (*Fetal Bovine Serum*, FBS)	Sigma, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Normocin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Opti-MEM® Medium	Gibco Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 Supplement Mix	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Trypsin/EDTA 10x	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

2.1.11 Medienzusammensetzung

Medium	Substanz	Menge
SMC-Medium	*Smooth Muscle Growth Medium 2*	500 ml
	Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 Supplement Mix	1 Mix
	Normocin	1 ml
Trypsin 1x	Trypsin/EDTA 10x	12 ml
	Herpes Ringer Lösung 0,2 M	12 ml
	NaCl 0,9%	96 ml

2.1.12 Zellen

Humane PASMC — *PromoCell*, Heidelberg, Deutschland

2.2 Probenmaterial

2.2.1 Auswahl und Charakterisierung der humanen Proben

Die humanen Proben wurden von der DZL/UGMLC Biobank (Genehmigung AZ 58/15; 10/06) zur Verfügung gestellt. Die untersuchten Proben in der COPD-Gruppe stammen von Patienten im GOLD Stadium IV, bei denen eine Lungentransplantation durchgeführt wurde.

Tabelle 2: Charakteristika der Proben von Donoren (Nichtrauchern), Rauchern und COPD-Patienten für die Analyse der Lungenhomogenate

Proben ID	Gruppe	Alter	Geschlecht	Komorbiditäten
38	Nichtraucher	25	männlich	n. b.
64	Nichtraucher	36	weiblich	n. b.
406	Nichtraucher	42	n. b.	Anthrakose
457	Nichtraucher	53	männlich	n. b.

471	Nichtraucher	48	weiblich	n. b.
491	Nichtraucher	44	männlich	n. b.
492	Nichtraucher	51	weiblich	n. b.
493	Nichtraucher	44	männlich	n. b.
495	Nichtraucher	60	weiblich	Anthrakose
498	Nichtraucher	54	weiblich	n. b.
500	Nichtraucher	51	weiblich	n. b.
503	Nichtraucher	59	männlich	n. b.
504	Nichtraucher	14	weiblich	n. b.
516	Nichtraucher	44	weiblich	n. b.
527	Nichtraucher	56	weiblich	Bronchopneumonie
533	Nichtraucher	54	weiblich	Fibrose, Vaskulopathie
542	Nichtraucher	24	weiblich	Lungenödem
544	Nichtraucher	52	männlich	n. b.
552	Nichtraucher	54	männlich	n. b.
557	Nichtraucher	76	weiblich	n. b.
561	Nichtraucher	46	weiblich	Lungenödem
563	Nichtraucher	56	männlich	n. b
564	Nichtraucher	21	weiblich	n. b.
419D	Raucher	31	männlich	n. b.
473B	Raucher	76	weiblich	n. b.
480D	Raucher	52	männlich	n. b.
485	Raucher	47	männlich	n. b.
497	Raucher	37	weiblich	n. b.
501	Raucher	59	männlich	n. b.

523	Raucher	21	männlich	n. b.
532	Raucher	34	weiblich	n. b.
538	Raucher	58	weiblich	n. b.
545	Raucher	60	männlich	n. b.
553	Raucher	30	männlich	n. b.
40	COPD-Patient	49	männlich	n. b.
44	COPD-Patient	60	männlich	PH
50	COPD-Patient	57	männlich	Bronchopneumonie
66	COPD-Patient	65	männlich	PH
69	COPD-Patient	52	männlich	PH, Hämorrhagie
75	COPD-Patient	58	männlich	n. b.
85	COPD-Patient	n. b.	n. b.	n. b.
96	COPD-Patient	56	männlich	n. b.
gi97	COPD-Patient	n. b.	n. b.	n. b.
98	COPD-Patient	56	männlich	n. b.
102	COPD-Patient	60	weiblich	Bronchopneumonie
103	COPD-Patient	55	männlich	Bronchopneumonie
114	COPD-Patient	50	weiblich	Bronchopneumonie
115	COPD-Patient	56	männlich	n. b.
117	COPD-Patient	63	männlich	PH
122	COPD-Patient	55	männlich	n. b.
138	COPD-Patient	58	weiblich	Pneumonie
405	COPD-Patient	53	männlich	n. b.
413	COPD-Patient	45	männlich	n. b.
420	COPD-Patient	n. b.	n. b.	n. b.

446	COPD-Patient	n. b.	n. b.	n. b.
456	COPD-Patient	n. b.	n. b.	n. b.
460	COPD-Patient	n. b.	n. b.	n. b.
479	COPD-Patient	n. b.	n. b.	n. b.
499	COPD-Patient	n. b.	n. b.	n. b.

Tabelle 3: Charakteristika der Proben von Donoren (Nichtraucher), Rauchern und COPD-Patienten für die Laser-Mikrodissektion

Proben ID	Gruppe	Alter	Geschlecht	Komorbiditäten
947	Nichtraucher	51	männlich	Chronische Herzinsuffizienz
932	Nichtraucher	32	weiblich	Intrakraniale Blutung
919	Nichtraucher	49	weiblich	Intrakraniale Blutung
930	Nichtraucher	67	weiblich	Subarachnoidale Blutung
951	Nichtraucher	57	männlich	Zerebrale Ischämie
927	Nichtraucher	53	weiblich	Hirntrauma
943	Nichtraucher	58	männlich	Hirntrauma
938	Nichtraucher	54	weiblich	Subarachnoidale Blutung
934	Raucher	34	weiblich	n. b.
908	Raucher	25	männlich	n. b.
921	Raucher	58	männlich	n. b.
917	Raucher	n. b.	n. b.	n. b.
936	Raucher	36	weiblich	n. b.
915	Raucher	53	männlich	n. b.
941	Raucher	50	weiblich	n. b.
940	Raucher	50	weiblich	n. b.
946	COPD-Patient	64	männlich	Emphysem (mild)

955	COPD-Patient	61	männlich	Emphysem, PH
916	COPD-Patient	58	weiblich	Emphysem (mild)
952	COPD-Patient	63	männlich	Emphysem (mild)
925	COPD-Patient	52	weiblich	Emphysem (schwer), PH
944	COPD-Patient	58	weiblich	Emphysem (mild)
924	COPD-Patient	62	männlich	Emphysem
958	COPD-Patient	55	männlich	Emphysem, PH

2.2.2 Laser-Mikrodissektion

In der vorliegenden Arbeit wurden spezifische Gewebsstrukturen mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion gewonnen und untersucht. Die Mikrodissektion von Gefäßen, Bronchien und Septen wurde von Ingrid Breitenborn-Müller durchgeführt.

Die in Formalin fixierten und in Paraffin gebetteten Lungenproben wurden in einem Mikrotom zunächst bei -20 °C in 10 µm dicke Scheiben geschnitten und auf *Membran Slides* (2,0 µm) überführt. Danach wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll gefärbt **(Tabelle 4)**.

Tabelle 4: Färbeprotokoll Laser-Mikrodissektion

Substanz	**Zeit**
95% Ethanol	30 Sek.
Kreslviolett	Zwei Min.
Eosin Y	20 Sek.
95% Ethanol	30 Sek.
95% Ethanol	30 Sek.
100% Ethanol	30 Sek.
100% Ethanol	30 Sek.

Für die Mikrodissektion wurden die *Membran Slides* auf der Objektträgerhalterung des Mikroskops fixiert und die Zielstrukturen (Gefäße, Bronchien oder Septen) mittels Laser

ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Gewebsstück wurde in einem ihm zugeordneten Eppendorf-Tube mit RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol gesammelt. Es wurden aus jedem Lungenblock jeweils 60 Gefäße (Durchmesser < 100 µm), 30 Bronchien und 30 Septen ausgeschnitten. Anschließend wurde die RNA aus den Proben isoliert.

2.3 Expressionsanalyse mRNA

2.3.1 RNA-Isolation

Aus den Lungenhomogenaten, den Gewebsstrukturen und den PASMCs wurde mRNA mit Hilfe des *RNeasy®Micro* und *RNeasy®Mini Kits* nach Herstellerprotokoll isoliert.

Für die Isolation von mRNA aus humanem Lungengewebe wurden zunächst Mikroschraubröhrchen mit 10 bis 20 Keramikkügelchen, 300 µl RTL-Puffer und 3 µl β-Mercaptoethanol vorbereitet. Unter der Verwendung von Flüssigstickstoff und einem Keramikmörser wurden aus dem gefrorenen Lungengewebe ca. 30 mg schwere Gewebsstücker rausgebrochen.

Die Proben wurden homogenisiert (zweimal 30 Sek., 6800 gr.) und anschließend bei 4 °C zentrifugiert (10 Min., 9503 gr.). Für die mRNA-Isolation aus PASMCs wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, mit 300 µl RTL-Puffer und 3 µl β-Mercaptoethanol von den Platten abgelöst und in Eppendorf-Tubes überführt.

Das Lysat der homogenisierten Lungenstücke sowie der PASMCs wurde unter Verwendung des *RNeasy®Mini Kits* isoliert. Hierfür wurden die Proben mit 300 µl 70%igem Ethanol vermischt und auf Filtersäulen (*Mini Spin Colums*) überführt. Die Filtersäulen wurden zentrifugiert (15 Sek., 9503 gr.) und anschließend nach Protokoll in mehreren Schritten gewaschen. Dafür wurde zunächst 700 µl RW1 Puffer auf die Filtersäulen gegeben, zentrifugiert (15 Sek., 9503 gr.), mit 500 µl RPE-Puffer eluiert und nochmals zentrifugiert (zwei Min., 9503 gr.). Zum Trocknen der Membran wurden die Säulen in neue Eppendorf-Tubes gestellt und abermals zentrifugiert (eine Min., 21382 gr.). Abschließend wurden die Proben mit 35 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (eine Min., 9503 gr.) eluiert. Die Konzentration der isolierten mRNA wurde mit Hilfe des *NanoDrop* Spektrophotometers (Thermo Fisher) quantifiziert und die Proben zur weiteren Verwendung bei -80 ºC gelagert.

Die mRNA aus den Gefäßen, Bronchien und Septen wurde mittels *RNeasy®Micro Kit* isoliert. Die Proben wurden mit jeweils 5 µl Carrier RNA Arbeitslösung versetzt, welche

zuvor aus Carrier RNA und RLT-Puffer auf eine Konzentration von 4 ng/µl vorbereitet wurde. Im nächsten Schritt wurden die Proben „gevortext", mit 350 µl 70% Ethanol versetzt und auf Filtersäulen (*Micro Spin Colums)* überführt. Anschließend wurden die Proben nach Protokoll aufgereinigt. Dafür wurde zunächst 700 µl RW1-Puffer auf die Filtersäulen gegeben, zentrifugiert (30 Sek., 9503 gr.), mit 500 µl RPE-Puffer eluiert und nochmals zentrifugiert (30 Sek., 9503 gr.). Daraufhin wurden 500 µl 80% Ethanol hinzugegeben und die Proben abermals zentrifugiert (zwei Min., 9503 gr.). Nach dem Abkippen des Ethanols wurden die Filtersäulen durch Zentrifugation getrocknet (fünf Min., 21382 gr.) und mit 18 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Für die cDNA-Synthese wurden 15 µl der RNA-Probe verwendet.

2.3.2 cDNA-Synthese

Nach der Isolation der mRNA wurde die RNA mittels *iSkript™ cDNA Synthesis Kit* in 200 bis 1000 ng *complimentary* DNA (cDNA) nach Herstellerangaben umgeschrieben. Jede Probe wurde mit 4 µl *iScript Reaction Mix* und 1 µl *iScript Reverse Transkriptase* vermischt. Das Volumen wurde mit 20 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Entsprechend der gemessenen RNA-Konzentration wurde RNA-Template und RNase-freies Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe eines *Thermal Cyclers* nach Reaktionsprotokoll **(Tabelle 5)** in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 5: Reaktionsprotokoll der Reversen Transkription

Priming	5 Min. bei 25 °C
Reverse Transcription	20 Min. bei 46 °C
RT Inactivation	1 Min. bei 95 °C
Optional	Hold bei 4 °C

2.3.3 Quantitative Real-Time PCR (RTqPCR)

Mit der RTqPCR wurde die Expression der Zielgene anhand der vorhandenen Menge an cDNA bestimmt. Dabei wurde die cDNA zunächst denaturiert, damit spezifische Primer binden können. Eine hitzebeständige DNA-Polymerase synthetisiert den komplementä-

ren DNA-Strang, wobei SYBR Green, welches unspezifisch in doppelsträngige DNA eingebaut wird, mit einem Fluoreszenzsignal detektiert wird. Zur Normalisierung wurde der *threshold cycle* Ct-Wert des untersuchten Zielgens gegen den entsprechenden Ct-Wert des Referenzgens (*Housekeepinggen*) berechnet **(Formel 1)**. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) für die Analyse der humanen Lungenhomogenate und Porphobilinogen Desaminase (PBGD) für die Analyse der Proben aus der Laser-Mikrodissektion verwendet.

Formel 1: Berechnung der Ct-Werte

$$\Delta Ct = Ct_{Referenzgen} - Ct_{Zielgen}$$

Um die Spezifität der vervielfältigten Produkte zu untersuchen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Schmelztemperatur ist dabei abhängig von der Länge der Fragmente sowie der Basenpaarzusammensetzung.

Für die RTqPCR wurde zunächst ein Mastermix aus 5 µl *SYBR Green*, 3,5 µl RNase freiem Wasser und 0,5 µl Primerstock vorbereitet. Der Primerstock setzt sich dabei aus 10 µl *forward* Primer, 10 µl *revers* Primer und 80 µl RNase-freiem Wasser zusammen. 9 µl des Mastermix wurden auf eine 96-Well Platte aufgetragen und jeweils 1 µl cDNA (200 ng) hinzugegeben.

Die 96-Well Platte wurde versiegelt und zentrifugiert. Danach wurde die RTqPCR an einem *CFX ConnectTM Real-Time System* nach Reaktionsprotokoll **(Tabelle 6)** durchgeführt.

Tabelle 6: Reaktionsprotokoll der RTqPCR

Zyklusphase	Zyklen	Prozess	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	1 Zyklus	Denaturierung	10 Min.	95 °C
2. Amplifikation	40 Zyklen	Denaturierung	10 Sek.	95 °C
		Hybridisierung	20 Sek.	59 °C
		Polymerisation	10 Sek.	72 °C
3. Schmelzkurve	1 Zyklus	Denaturierung	60 Sek.	95 °C
		Hybridisierung	30 Sek.	55 °C

2.3.4 Agarose Gelelektrophorese

Um die spezifische Größe der mit einem Primer vervielfältigten Produkte zu verifizieren, wurden die Fragmente nach der Durchführung der RTqPCR mittels Agarose Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Aus Agarose und TAE-Puffer 1x wurde ein 1,5%-Agarose-Gel hergestellt **(Tabelle 7)**.

Tabelle 7: Agarose-Gel

Agarose-Gel	Substanz	Menge
1,5%	Agarose	1,5 g
	TAE-Puffer 1x	100 ml
	Sybr Safe DNA Gel Stain	10 µl

Die Agarose wurde kurz in der Mikrowelle aufgekocht und mit *SYBR Safe DNA-Gel Stain* 1x versetzt. Nach dem auspolymerisieren des Gels wurden 5 µl des PCR-Produktes mit *Loading Dye* versetzt und auf das Gel geladen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde 5 µl *GeneRuler* Marker aufgetragen. Das Gel wurde mit TAE-Puffer übergossen und die Gelelektrophorese wurde gestartet (120 V, 120 mA, 100 W, ca. 35 Min.). Anschließend wurden die Banden mit einem *Molecular Imager* unter UV-Licht bei 320 nm visualisiert.

2.4 Methoden Proteinbiochemie

2.4.1 Proteinextraktion und Proteinkonzentration

Es wurden Western Blots mit Proteinen aus humanen homogenisierten Lungen und mit transfizierten PASMCs durchgeführt.

Für die Isolation von Proteinen aus humanem Lungengewebe wurden zunächst Mikroschraubröhrchen mit 200 µl Zelllysis-Puffer und 10 bis 20 Keramikkügelchen vorbereitet. Unter Verwendung von Flüssigstickstoff und einem Keramikmörser wurde das gefrorene Lungengewebe zerkleinert und ca. 30 mg Gewebe in die Mikro-Tubes überführt. Diese wurden anschließend zweimal homogenisiert (30 Sek., 6800 gr.). Daraufhin wurden die Proben bei 4°C zentrifugiert (10 Min., 21382 gr.) und der Überstand in neue 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt.

Für die Aufbereitung von Proteinen aus PASMCs wurde das Medium zunächst abgesaugt, die Zellen in 100 µl Zelllysis-Puffer lysiert und in ein Eppendorf-Tube transferiert.
Die Proteinkonzentration wurde mittels *DC™ Protein Assay* Kit nach Herstellerprotokoll bestimmt. In eine 96-Well Platte wurden im Doppelansatz jeweils 5 µl Probe pipettiert und die Ansätze mit den Reagenzien A und S und dem Reagenz B versetzt. Die Proben der homogenisierten Lungen wurden zunächst im Verhältnis 1:10 mit Zelllysis-Puffer verdünnt. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) mit unterschiedlichen Konzentrationen verwendet **(Tabelle 8)**. Anschließend wurde die Absorption an einem *Microplate Reader* bei 750 nm und der Software *i-Control* gemessen. Mit Hilfe des Proteinstandards und der gemessenen Absorption wurde die Proteinkonzentration berechnet.

Tabelle 8: BSA-Verdünnungsreihe zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Standard	Konzentration
Standard 1	0,128 µg/µl
Standard 2	0,258 µg/µl
Standard 3	0,515 µg/µl
Standard 4	1,028 µg/µl
Standard 5	2,056 µg/µl

2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung wurden 1 µg bis 20 µg der Proteinproben mit Zelllysis-Puffer verdünnt und anschließend mit β-Mercaptoethanol und *NuPage® LDS Sample Buffer 4x* aufbereitet, um bei 99 °C für 10 Min. denaturiert zu werden. Daraufhin wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf Eis gelagert. Die Gele wurden mit Hilfe drei verschiedener *TGX Stain-Free FastCast™ Acrylamid* Kits mit den Konzentrationen von 7,5%, 10% und 12% nach Herstellerangaben gegossen. Für das Trenngel wurden 3,5 ml *Fast Cast Resolver A* und 3,5 ml *Fast Cast Resolver B*, 35 µl Ammoniumpersulfat (APS) 10% und 3,5 µl Tetramethylethylendiamin (Temed) vermischt und das Gemisch zwischen zwei Glasplatten gegossen. Anschließend wurde das Sammelgel aus 1 ml *Fast Cast Stacker A*, 1 ml *Fast Cast Stacker B*, 10µl APS 10% und 2 µl Temed hergestellt. Das Trenngel wurde mit dem

Sammelgel überschichtet und ein Kamm eingesetzt. Nach dem auspolymerisieren des Gels wurde der Kamm entfernt, die Taschen gespült und zwischen 30 und 50 µg Protein sowie 5 µl Marker geladen. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer 1x bei 100 V, 400 mA und 150 W für 90 bis 120 Min..

2.4.3 Western Blot

Nach dem Auftrennen der Proteine wurden diese mit Hilfe der *semidry* Technik auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVFD) transferiert. Es wurde das *Trans-Blot® TurboTM Transfer System* verwendet. Vorbereitend wurde die PVFD-Membran für eine Sek. in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer überführt. Pro Gel wurden jeweils vier *Whatman* Filterpapiere in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurden anodenseitig zwei Filterpapiere, die PVFD-Membran und das Gel übereinander gelegt. Zwei weitere Filterpapiere wurden luftblasenfrei kathodenseitig auf das Gel platziert. Der Proteintransfer erfolgte bei 2,5 A, 25 V für 35 Min.. Nach dem Transfer wurde die Membran zum Blocken der unspezifischen Bindungsstellen für 60 Min. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in 6% Milchlösung inkubiert.

Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit einem primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran fünf Mal für jeweils fünf Min. in TBST-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Membran erneut fünf Mal für jeweils fünf Min. in TBST-Puffer gewaschen. Die Membran wurde mit *Clarity ECL Substrate* für einige Sekunden inkubiert. Mit Hilfe des *ChemiDoc™ Touch Imaging* Systems wurden die Banden visualisiert. Für die Auswertung wurde die Software *Image LabTM* genutzt.

Zur Verifizierung der Spezifität der genutzten Antikörper wurden zum einen Versuche mit siRNA und *Pathway*-Inhibitoren durchgeführt, zum anderen konnte die Spezifität einzelner Antikörper in der Literatur nachgewiesen werden.

2.5 Methoden Zellkultur

2.5.1 Kultivierung von PASMCs

Die PASMCs wurden im SMC-Medium kultiviert und ihr Wachstum regelmäßig überprüft. Ab einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen passagiert. Bei der Passage wurden

die Zellen zunächst mit 37 °C warmen DPBS gewaschen. Anschließend wurden die PASMCs für eine bis fünf Min. mit Trypsin 1x bei 37 °C inkubiert, um die adhärenten Zellen von der Kulturplatte abzulösen. Der enzymatische Verdau wurde mit fetalem Kälberserum (*fetal calf serum,* FCS) gestoppt und die suspendierten PASMCs wurden anschließend zentrifugiert (fünf Min., 338 g.). Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf einer Kulturplatte wieder ausgesät (5×10^3 bis 1×10^4 pro cm^2). Die Kultivierung der PASMCs wurde von Dr. M. Brosien durchgeführt.

2.5.2 Transfektion von PASMCs

Die Transfektion der PASMCs erfolgte nach dem Herstellerprotokoll mit Lipofektamin 3000 (*Invitrogen*). Sowohl Lipofektamin als auch die jeweilige siRNA wurden in Opti-Mem gelöst und fünf Min. inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen miteinander vermischt. Nach 20 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden die PASMCs mit einer siRNA Konzentration von 100 nM in Kulturmedium für 24 bis 72 Stunden kultiviert. Die Transfektion der Zellen wurde mit Hilfe von Dr. M. Brosien durchgeführt.

2.5.3 CS-Extrakt Exposition von PASMCs

Für die Versuche mit CS-Extrakt wurden die PASMCs auf eine 6 oder 24 Well Kulturplatte ausgesät und für 24 Stunden im Basalmedium kultiviert. Darauffolgend wurden die Zellen für 120 Stunden mit 0%, 0,5% und 1% CS-Extrakt inkubiert. Der CS-Extrakt wurde nach etabliertem Protokoll hergestellt. Hierzu wurde eine 3R4F Standard Zigarette *(University of Kentucky)* für eine Min. mit Hilfe einer Pumpe abgeraucht. Der Rauch wurde in Basalmedium geleitet und als 100% CS-Extrakt definiert. Die Berauchung wurde von Dr. M. Brosien durchgeführt.

2.5.4 Proliferationsassay PASMCs

Die Analyse der Proliferation von PASMCs erfolgte mit dem *Cell Proliferation ELISA BrdU* Kit nach Herstellerangaben.

Die PASMCs wurde auf einer Kulturplatte ausgesät darauf folgte eine Exposition mit CS für

120 Stunden sowie je nach Versuch eine zusätzliche Inkubation mit Hypoxie bzw. Epithelzellmedium für 24 Stunden. Die Zellen wurden daraufhin für weitere 24 Stunden

mit BrdU versetzt. Es folgte die Fixierung und Färbung nach Herstellerangaben. Abschließend wurde die Messung bei 370 nm und 492 nm am *Microplate Reader* durchgeführt. Die Färbung wurde mit Hilfe von Dr. M. Brosien durchgeführt.

2.6 Ca^{2+}-Konzentrationsmessung

Für die Ca^{2+}-Messung im homogenisierten Lungengewebe wurde mit dem *Calcium Assay Kit* nach Herstellerangaben gearbeitet. Für die Probenvorbereitung wurde unter Zuhilfenahme von Flüssigstickstoff und einem Keramikmörser ca. 15 µg Lungengewebe in vorbereitete Mikro-Tubes mit 10 bis 20 Keramikkügelchen und 250 µl *Calcium Assay Buffer* überführt. Die Proben wurden homogenisiert (zweimal 30 Sek., 6800 gr.) und anschließend bei 4 °C zentrifugiert (10 Min., 21382 gr.). Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt und eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Protokoll durchgeführt.

Auf eine 96 Well Platte wurden jeweils 50 µl Ca^{2+}-Standard bzw. Probe aufgetragen. Im nächsten Schritt wurden 90 µl *Chromogenic Reagent* und 60 µl *Calcium Assay Buffer* in jedes Well pipettiert. Nachdem die Platte für 10 Min. lichtgeschützt, bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurde die Konzentration am *Microplate Reader* bei 575 nm gemessen. Mit Hilfe des Calcium Standards und der gemessenen Absorption wurde die jeweilige Ca^{2+}-Konzentration berechnet.

Es wurde eine Standardreihe mit dem Calciumstandard 500 nM pipettiert **(Tabelle 9)**.

Tabelle 9: Ca^{2+}-Standard Verdünnungsreihe zur Ca^{2+}-Konzentrationsbestimmung

Standard	Konzentration
Ca^{2+}-Standard 1	0 µg/µl
Ca^{2+}-Standard 2	0,4 µg/µl
Ca^{2+}-Standard 3	0,8 µg/µl
Ca^{2+}-Standard 4	1,2 µg/µl
Ca^{2+}-Standard 5	1,6 µg/µl
Ca^{2+}-Standard 6	2,0 µg/µl

2.7 Statistische Analyse

In Abhängigkeit der durchgeführten Versuche und der jeweiligen Fragestellung wurden in dieser Arbeit der *Students-t-Test*, der *Fischers Test* und die *one-way Anova* zur statistischen Auswertung der Daten angewendet. Die statistische Analyse der Daten wurden mit Hilfe von Dr. M. Brosien durchgeführt. Alle erhobenen Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehlern dargestellt. Für ein statistisch signifikantes Ergebnis wurde ein p-Wert $\leq 0{,}05$ festgelegt und mit einem * gekennzeichnet. Mit ** wurde ein p-Wert $\leq 0{,}01$ kenntlich gemacht, *** steht für einen p-Wert $\leq 0{,}001$ und **** für $p \leq 0{,}0001$. Die statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 9.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Expression von TRP-Kanälen

3.1.1 Analyse der TRP-Kanäle im Lungenhomogenat mittels RTqPCR

Für die Identifizierung von TRP-Kanälen in der Pathogenese der COPD wurde die Expression einzelner Kanäle aus der TRPC, TRPV, TRPA und TRPM Subfamilie zunächst auf mRNA-Ebene untersucht. Hierfür wurde die Expression in homogenisierten Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen mit Hilfe der RTqPCR verglichen. TRPC1, TRPC3 und TRPC6 konnten im homogenisierten Lungengewebe nachgewiesen werden **(Abbildung 4A)**. Die Expression von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 war im Gewebe von COPD-Lungen im Vergleich zu dem der Donoren jeweils erhöht. Des Weiteren konnten TRPV1 und TRPV4 sowie TRPA1 nachgewiesen werden **(Abbildung 4B)**. In den COPD-Lungen waren TRPV1, TRPV4 und TRPA1 im Vergleich mit den Donor-Lungen verstärkt exprimiert. Die Expression von TRPA1 und TRPV4 war außerdem bei Raucher- im Vergleich zu Donor-Lungen erhöht. Aus der Subfamilie der TRPM konnte TRPM4, TRPM7 und TRPM8 mRNA nachgewiesen werden **(Abbildung 4C)**. Nur für TRPM4 war die Expression bei Raucher- im Vergleich zu Donor-Lungen erhöht.

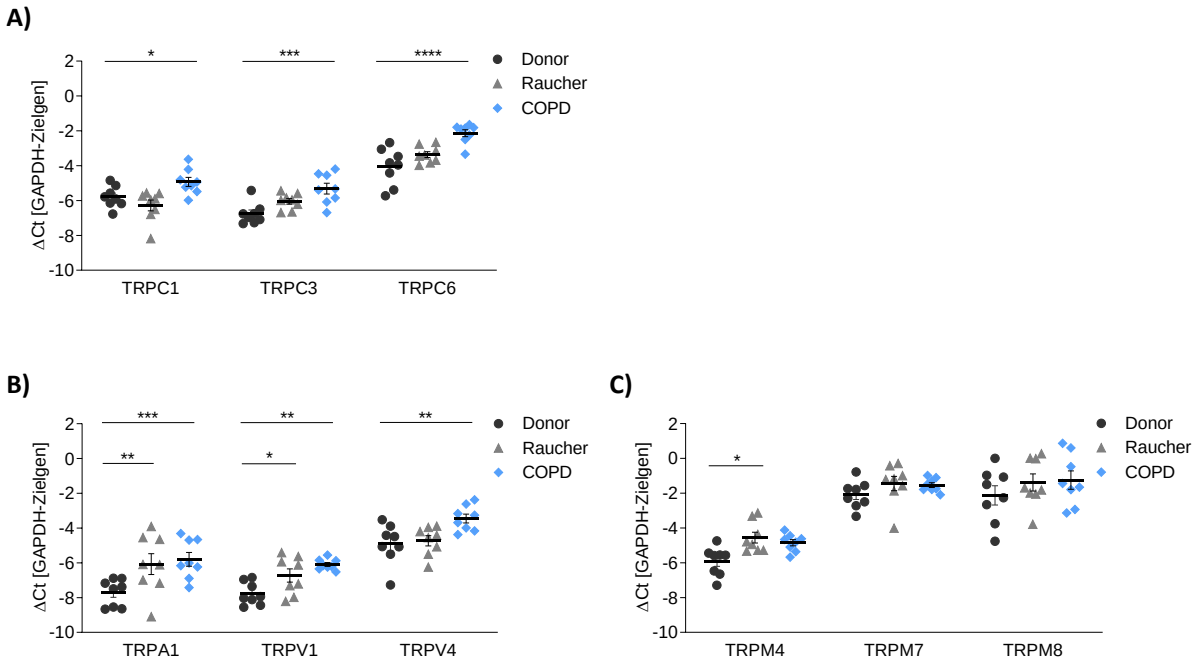


Abbildung 4: Genexpression von TRP-Kanälen in humanen Lungenhomogenaten.
Relative Expression von A) TRPC1, TRPC3, TRPC6 (n=8), B) TRPA1, TRPV1, TRPV4 (n=8) und C) TRPM4, TRPM7, TRPM8 (n=8) auf mRNA-Ebene in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen. Die Quantifizierung erfolgte mittels RTqPCR. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * ($p \leq 0{,}05$); ** ($p \leq 0{,}01$); *** ($p \leq 0{,}001$); **** ($p \leq 0{,}0001$).

3.1.2 Analyse der TRP-Kanäle im Lungenhomogenat mittels Western Blot

Um die Ergebnisse der Expressionsanalyse der TRP-Kanäle aus der RTqPCR auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Western Blots durchgeführt. Für TRPC1 und TRPC3 sind aktuell keine spezifischen Antikörper verfügbar. Die Spezifität für TRPA1-, TRPC6- und TRPV4-Antikörper wurde mit Hilfe von siRNA untersucht. Dabei wurden PASMCs mit Kontroll-siRNA (siRandom) und siRNA gegen spezifische TRP-Kanäle inkubiert. Mit siTRPA1 und siTRPC6 inkubierte PASMCs zeigten in der RTqPCR eine Herunterregulation von TRPA1 und TRPC6 **(Abbildung 5A und 6A)**. Auf Proteinebene konnte keine Herunterregulation von TRPA1 gezeigt werden **(Abbildung 5B)**. Auch für TRPC6 konnte auf Proteinebene keine Herunterregulation gezeigt werden **(Abbildung 6B)**. Im Lungenhomogenat zeigte sich im Western Blot für TRPA1 keine Bande und für TRPC6 zwar eine Bande in der gesuchten Größe, die aber nicht als spezifisch gewertet werden kann **(Abbildung 6C)**.

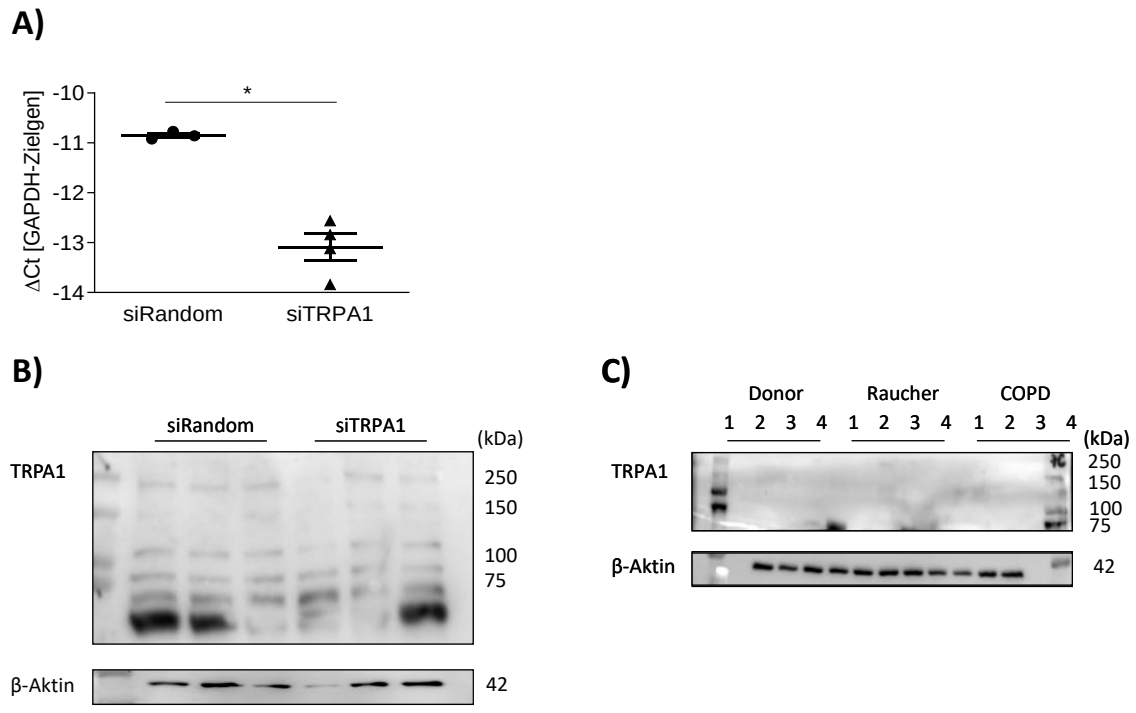


Abbildung 5: TRPA1-Antikörpertest und Protein-Expression von TRPA1 in humanen Lungenhomogenaten.
Relative Expression von A) TRPA1 auf mRNA-Ebene in PASMCs nach 72 Stunden Inkubation mit Kontroll-siRNA (siRandom) und siRNA gegen TRPA1 (n=3-4), B) TRPA1 auf Proteinebene in PASMCs nach 72 Stunden Inkubation mit Kontroll-siRNA (siRandom) und siRNA gegen TRPA1 (n=3) und C) TRPA1 auf Proteinebene in homogenisierten humanen Lungenproben. kDa: Kilodalton. Die Signifikanz ist wie folgt dargestellt: * ($p \leq 0{,}05$). Übersichtsbilder des kompletten Western Blots von TRPA1 und TRPC6 befinden sich im Anhang (Abbildung 22).

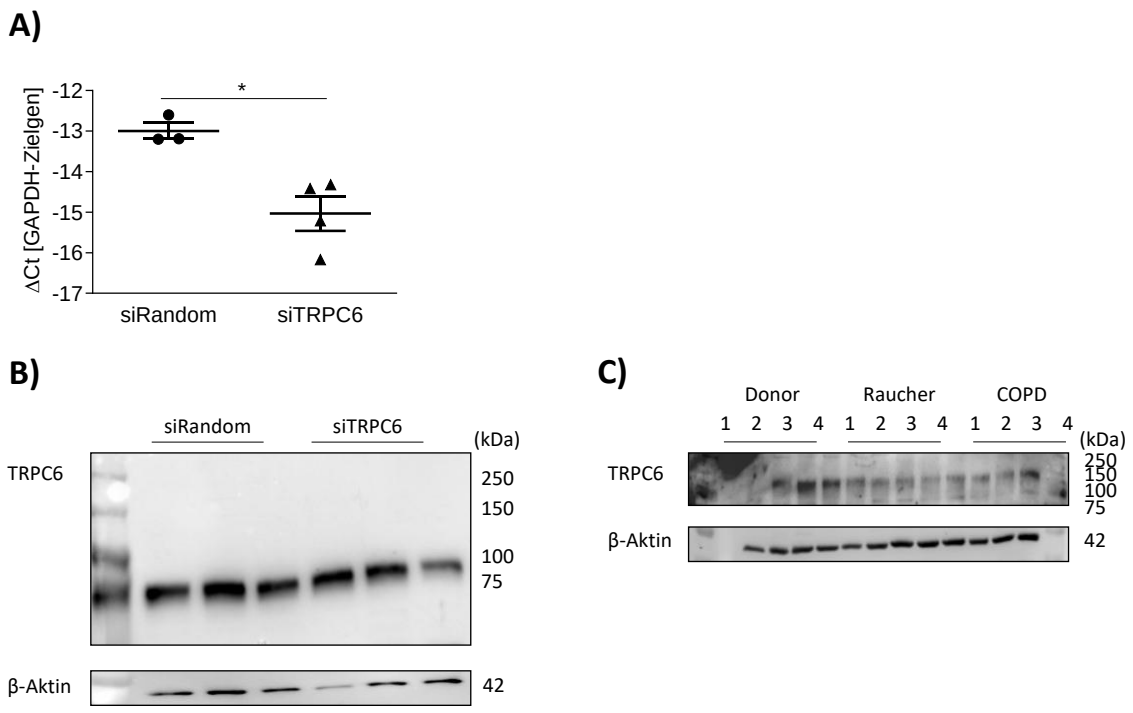


Abbildung 6: TRPC6-Antikörpertest und Protein-Expression von TRPC6 in humanen Lungenhomogenaten.
Relative Expression von A) TRPC6 auf mRNA-Ebene in PASMCs nach 72 Stunden Inkubation mit Kontroll-siRNA (siRandom) und siRNA gegen TRPC6 (n=3-4), B) TRPC6 auf Proteinebene in PASMCs nach 72 Stunden Inkubation mit Kontroll-siRNA (siRandom) und siRNA gegen TRPC6 (n=3) und C) TRPC6 auf Proteinebene in homogenisierten humanen Lungenproben (n=16). kDa: Kilodalton. Die Signifikanz ist wie folgt dargestellt: * ($p \leq 0{,}05$)

Die Spezifität des Antikörpers gegen TRPV4 wurde mit Hilfe von siRNA gezeigt. Nach 72 Stunden Inkubation mit siTRPV4 war die mRNA-Expression von TRPV4 in PASMCs reduziert **(Abbildung 7A)**. Die Protein-Expression von TRPV4 war nach 72 Stunden Inkubation mit siTRPV4 ebenfalls reduziert **(Abbildung 7B)**. Im humanen Lungenhomogenat wurde für TRPV4 eine erhöhte Expression bei COPD-Lungen nachgewiesen **(Abbildung 7C)**.

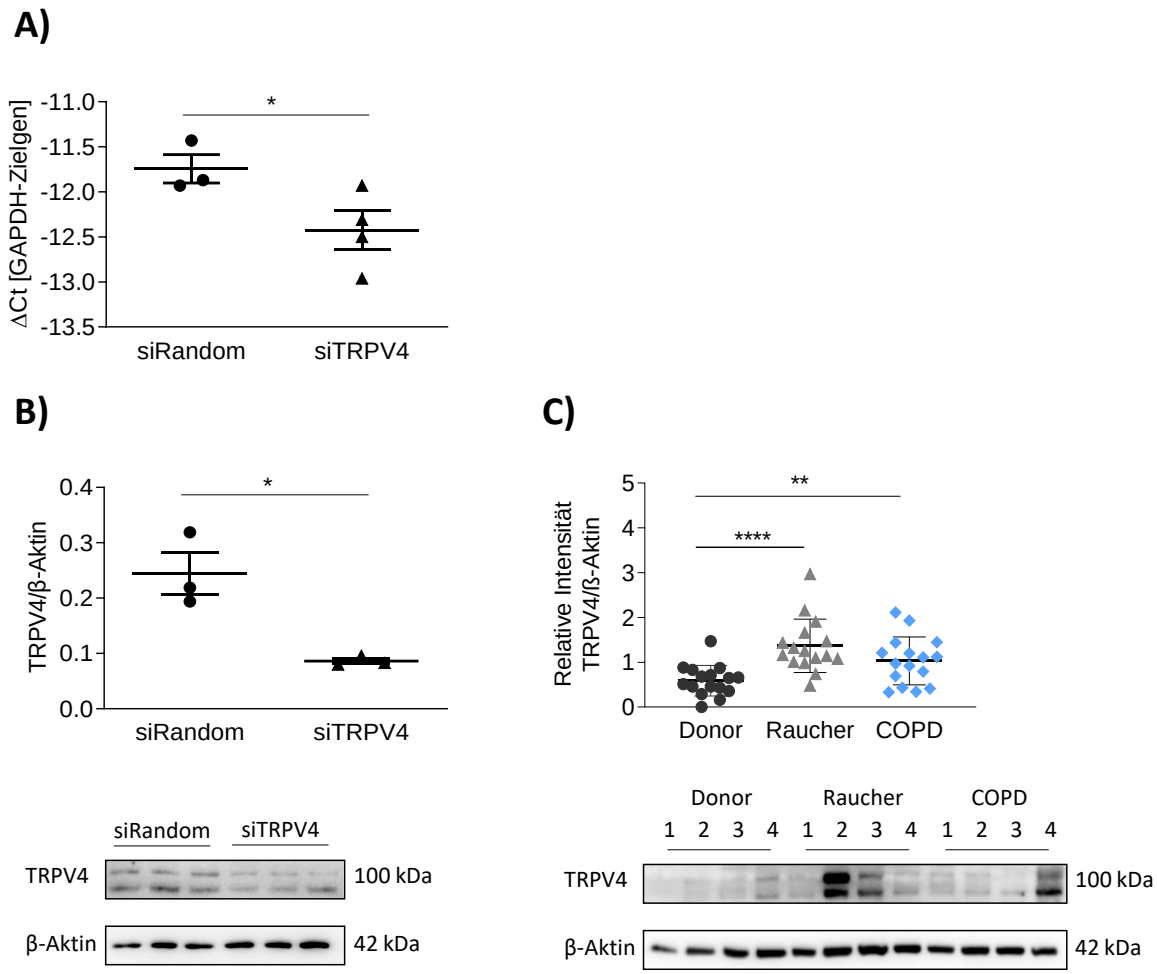
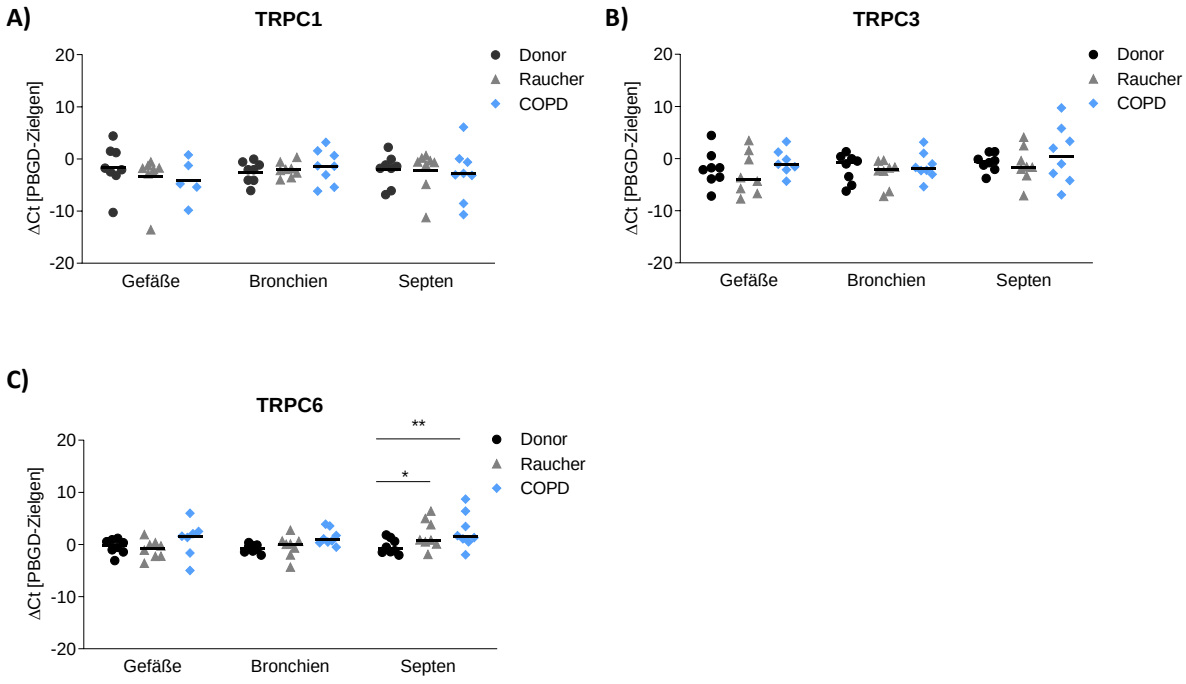


Abbildung 7: TRPV4-Antikörpertest und Protein-Expression von TRPV4 in humanen Lungenhomogenaten.
Relative Expression von A) TRPV4 auf mRNA-Ebene in PASMCs nach 72 Stunden Inkubation mit Kontroll-siRNA (siRandom) und siRNA gegen TRPV4 (n=3-4), B) TRPV4 auf Proteinebene in PASMCs nach 72 Stunden Inkubation mit Kontroll-siRNA (siRandom) und siRNA gegen TRPV4 (n=3) und C) TRPV4 auf Proteinebene in homogenisierten humanen Lungenproben (n=16). kDa: Kilodalton. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * ($p \leq 0{,}05$); ** ($p \leq 0{,}01$); *** ($p \leq 0{,}001$); **** ($p \leq 0{,}0001$). In dieser Abbildung ist ein exemplarischer Western Blot gezeigt, Übersichtsbilder der übrigen für die Analyse durchgeführten Western Blots befinden sich im Anhang (Abbildung 23).

3.1.3 Analyse der TRP-Kanäle in mikrodissektierten Kompartimenten

Um die Resultate der Expressionsanalyse aus den Lungenhomogenaten besser einzuordnen, und die Regulation einzelner TRP-Kanäle spezifischen Strukturen zuordnen zu können, wurden mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion aus Lungengewebsschnitten Gefäße, Bronchien und Septen einzeln isoliert. Dabei wurde TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPA1 und TRPV4 sowohl in Gefäßen und Bronchien als auch in Septen detektiert **(Abbildung 8)**.

TRPC1 ist in Gefäßen, Bronchien und Septen von Donoren gleichmäßig exprimiert **(Abbildung 8A)**. Eine Regulation bei Rauchern oder COPD-Lungen wurde nicht beobachtet. Insbesondere in den Gefäßen und in den Septen zeigt sich eine deutliche Streuung der Werte. Für TRPC3 wurde ebenfalls kein Unterschied festgestellt **(Abbildung 8B)**. Für TRPC6 wurde in den Septen bei COPD-Lungen und Rauchern im Vergleich zu Donoren eine erhöhte Expression beobachtet **(Abbildung 8C)**. Des Weiteren wurden TRPA1 und TRPV4 untersucht, auch hier zeigt sich keine Regulation **(Abbildung 8D und 8E)**.



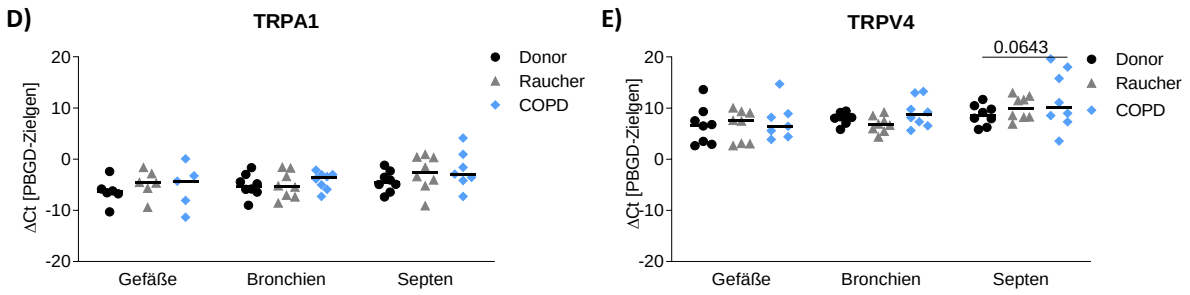


Abbildung 8: Genexpression von TRP-Kanälen in humanen Gefäßen, Bronchien und Septen.
Relative Expression von A) TRPC1, B) TRPC3, C) TRPC6, D) TRPA1 und E) TRPV4 auf mRNA-Ebene in Gefäßen, Bronchien und Septen von Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=5-8). Die Quantifizierung erfolgte mittels RTqPCR. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * (p≤0,05); ** (p≤0,01).

3.2 Analyse der Expression von VDCCs

Neben den TRP-Kanälen wurden auch VDCCs analysiert. Die Expression verschiedener Subtypen der L-Typ- und der T-Typ-Kanäle in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen wurden miteinander verglichen **(Abbildung 9)**. Dabei konnten alle untersuchten Kanäle nachgewiesen werden. Der L-Typ-Kanal 1.3 sowie der T-Typ-Kanal 3.2 waren bei COPD-Lungen verglichen mit Donoren erhöht exprimiert, der L-Typ-Kanal 1.4 zeigte sich bei COPD-Lungen vermindert exprimiert. Die Expression des T-Typ-Kanals 3.2 war außerdem auch bei Rauchern erhöht. Keine Regulation wurde für die L-Typ-Kanäle 1.2 und L-Typ 3.1 festgestellt.

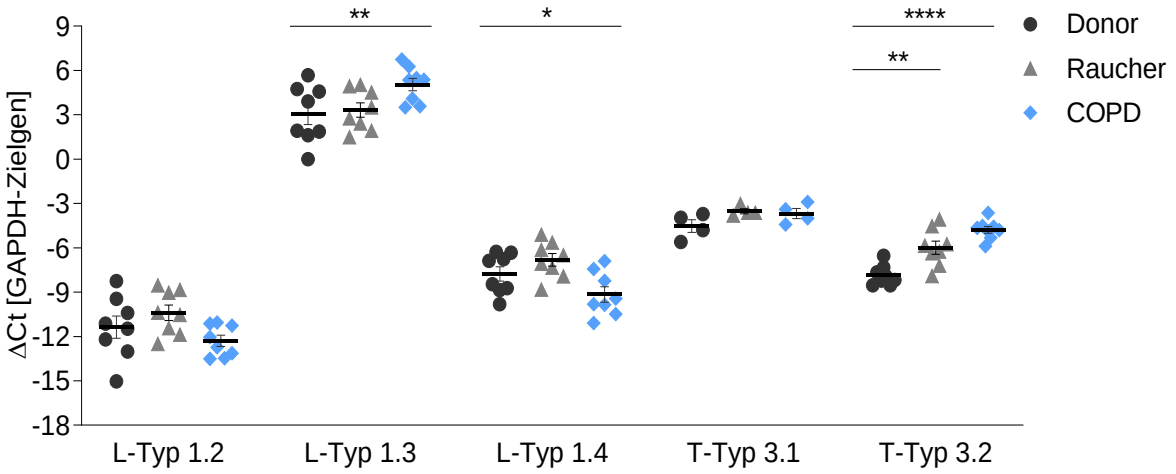


Abbildung 9: Genexpression der VDCCs in humanen Lungenhomogenaten.
Relative Expression von T-Typ und L-Typ VDCCs auf mRNA-Ebene in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=4-8). Die Quantifizierung erfolgte mittels RTqPCR. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * (p≤0,05); ** (p≤0,01); *** (p≤0,001); **** (p≤0,0001).

3.3 Analyse der Expression von PMCA und SERCA

PMCA und SERCA sind essentiell für die intrazelluläre Ca^{2+}-Homöostase[32], weshalb ihre Expression in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Die Expression von PMCA1, PMCA2, PMCA3 und PMCA4 war in COPD-Lungen verglichen zu Donoren jeweils vermindert **(Abbildung 10A)**. Auf Proteineben konnten PMCA1 und PMCA4 nicht detektiert werden (Abbildung 24). SERCA2 und SERCA3 waren auf mRNA-Ebene in COPD-Lungen im Vergleich zu Donoren verstärkt exprimiert. Eine erhöhte Expression von SERCA2 wurde auch bei Rauchern beobachtet **(Abbildung 10A)**. Auf Proteinebene konnte keine Regulation von SERCA2 nachgewiesen werden **(Abbildung 10B)**.

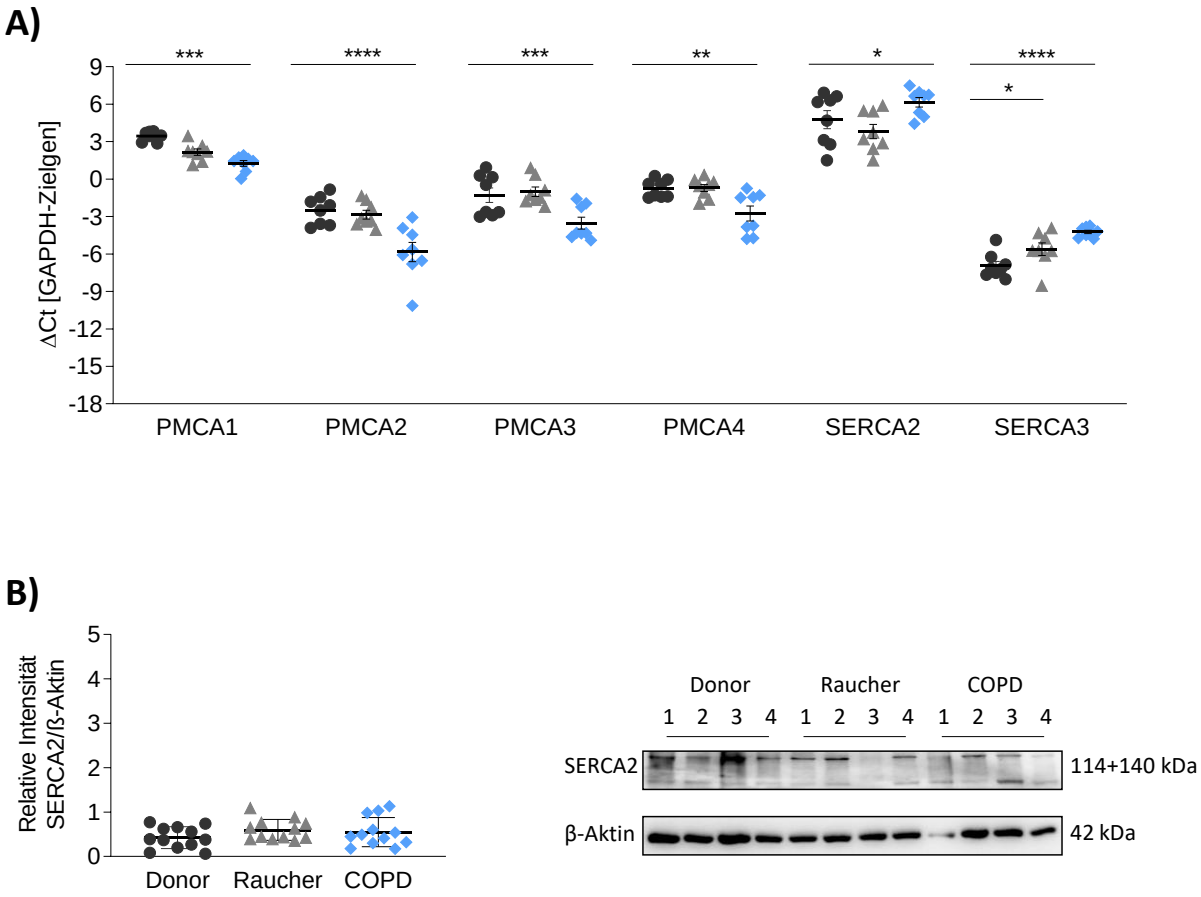


Abbildung 10: Gen- und Protein-Expression von PMCA und SERCA in humanen Lungenhomogenaten.

Relative Expression von A) SERCA und PMCA auf mRNA-Ebene in homogenisierten in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=8) und B) SERCA2 auf Proteinebene in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=12). PMCA: Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase, SERCA: Ca^{2+}-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums, kDa: Kilodalton Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * ($p \leq 0{,}05$); ** ($p \leq 0{,}01$); *** ($p \leq 0{,}001$); **** ($p \leq 0{,}0001$).

In dieser Abbildung ist ein exemplarischer Western Blot dargestellt, Übersichtsbilder der übrigen für die Analyse durchgeführten Western Blots befinden sich im Anhang (Abbildung 25).

3.4 Analyse der Expression von STIM und ORAI

In humanen Lungenhomogenaten wurde die mRNA-Expression von STIM1 und STIM2 sowie ORAI1 bis 3 nachgewiesen **(Abbildung 11A)**. Dabei wurde für STIM1 und STIM2 eine verminderte Expression in COPD-Lungen festgestellt, STIM2 war zusätzlich bei Rauchern vermindert exprimiert. Für ORAI1 und ORAI3 wurde in COPD-Lungen eine verstärkte Expression gezeigt, zusätzlich war ORAI3 auch bei Rauchern verstärkt exprimiert. Für ORAI2 konnte keine Regulation nachgewiesen werden. Auf Proteinebene wurden STIM1 nachgewiesen, jedoch zeigte sich keine Regulation **(Abbildung 11B)**. STIM2 hingegen konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden (Abbildung 26).

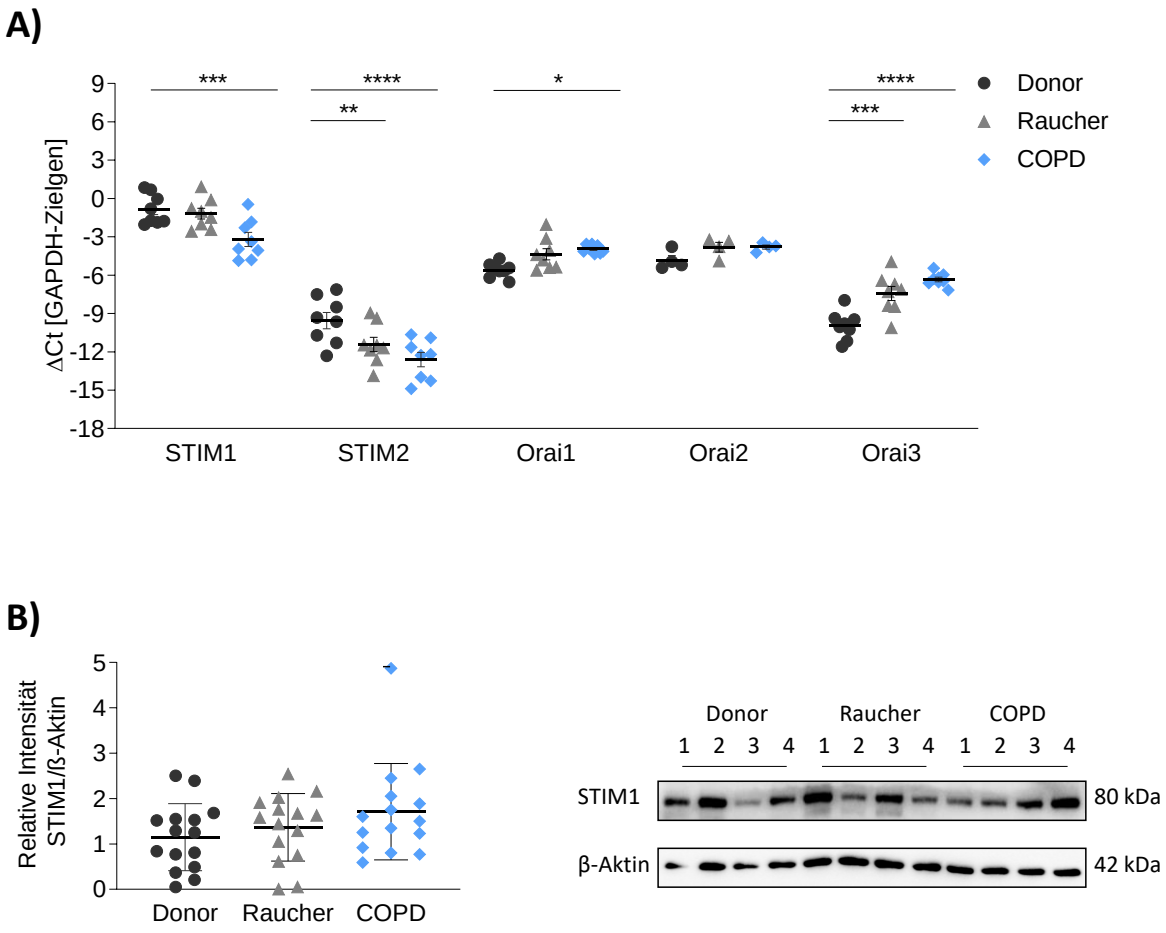
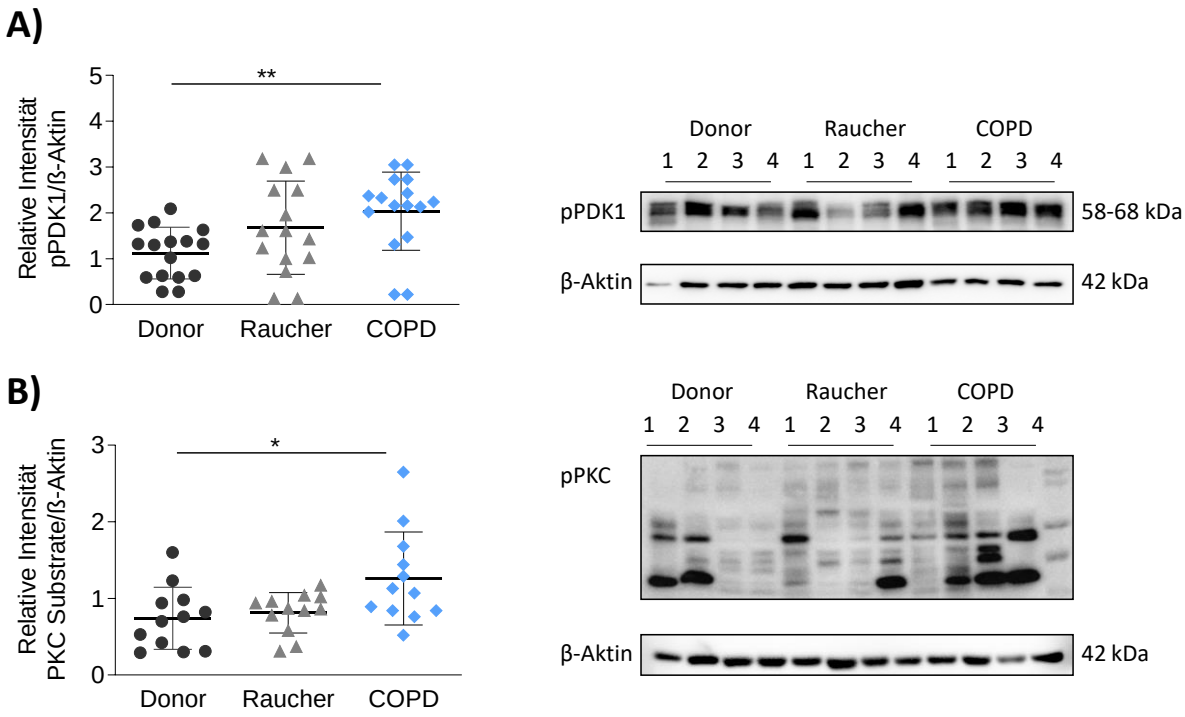


Abbildung 11: Gen- und Protein-Expression von STIM und ORAI in humanen Lungenhomogenaten. Relative Expression von A) STIM und ORAI auf mRNA-Ebene in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=4-8) und B) von STIM1 auf Proteinebene in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=15-16). STIM: stromales Interaktionsmolekül, ORAI: Ca^{2+}-aktivierbares Ca^{2+}-Kanalprotein, kDa: Kilodalton Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * ($p \leq 0{,}05$); ** ($p \leq 0{,}01$); *** ($p \leq 0{,}001$); **** ($p \leq 0{,}0001$).
In dieser Abbildung ist ein exemplarischer Western Blot dargestellt, Übersichtsbilder der übrigen für die Analyse durchgeführten Western Blots befinden sich im Anhang (Abbildung 26).

3.5 Analyse Ca^{2+}-assoziierter Proteine im Lungenhomogenat

3.5.1 Proteinkinasen (PDK1, PKC und PKA)

Die durch den Ca^{2+}-Einstrom induzierten Signalkaskaden werden über diverse Proteinkinasen vermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Phosphoinositol-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1), die Substrate der Proteinkinase C (PKC) sowie die Proteinkinase A (PKA) im Western Blot analysiert. Es zeigte sich eine Erhöhung der phosphorylierten PDK1 im Verhältnis zu β-Aktin **(Abbildung 12A)**. Außerdem konnte eine verstärkte Phosphorylierung von PKC-Substraten in COPD-Lungen im Vergleich zu Donoren beobachtet werden **(Abbildung 12B)**. Des Weiteren konnte eine verstärkte Expression von phosphorylierter PKA im Verhältnis zu nicht-phosphorylierter PKA und phosphorylierter PKA zu β-Aktin in COPD-Lungen festgestellt werden. Die nicht-phosphorylierte PKA war nicht reguliert **(Abbildung 12C)**.



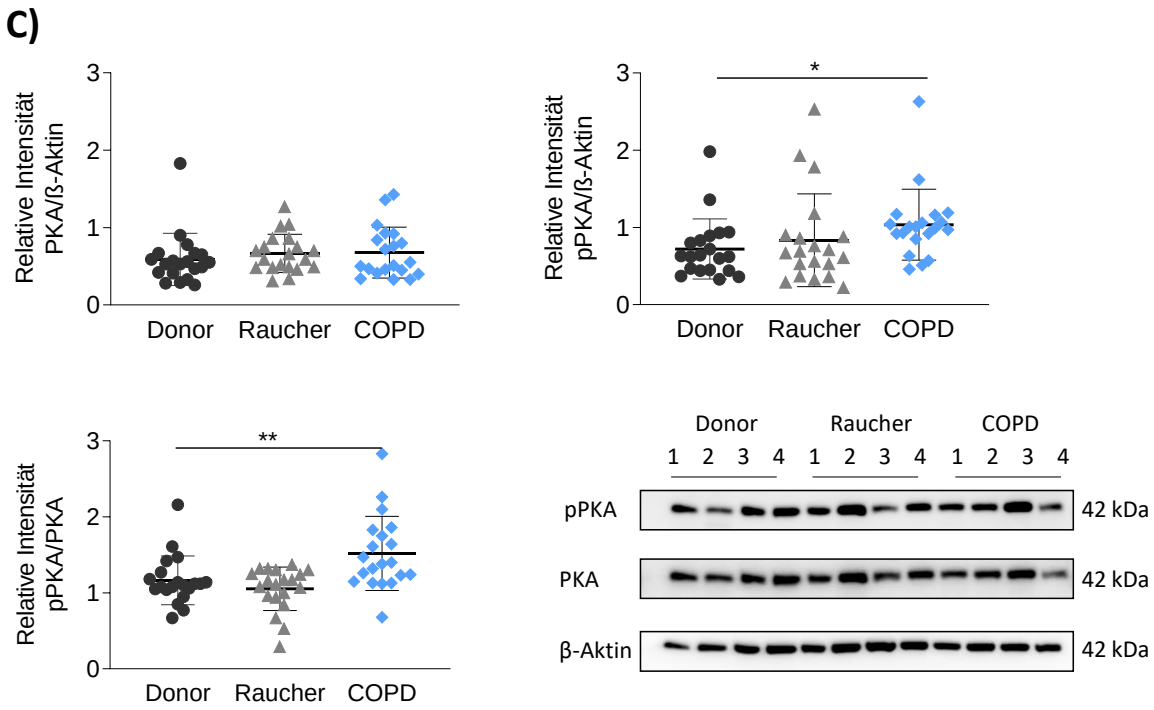


Abbildung 12: Protein-Expression von Proteinkinasen in humanen Lungenhomogenaten.
Analyse der relative Protein-Expression von A) phosphorylierter PDK1 in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=11-12), B) phosphorylierten PKC-Substraten in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=12) und C) phosphorylierter PKA in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=20) mittels Western Blot. PDK1: Phosphoinositol-abhängige Kinase-1, PKC: Proteinkinase C, PKA: Proteinkinase A, kDa: Kilodalton. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * ($p \leq 0{,}05$); ** ($p \leq 0{,}01$).
In dieser Abbildung ist jeweils ein exemplarischer Western Blot dargestellt, Übersichtsbilder der übrigen für die Analyse durchgeführten Western Blots befinden sich im Anhang (Abbildung 27, 28 und 29).

Die Spezifität des Antikörpers gegen phosphorylierte PKC-Substrate wurde mit Hilfe von 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG), sowie Ionomycin untersucht. Bei OAG handelt es sich um ein DAG-Analogon, welches ROCE vermittelt. Hierdurch steigt die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration und PKC wird aktiviert. Ionomycin erhöhte die Plasmamembranpermeabiliät, wodurch es zu einem Ca^{2+}-Einstrom aus dem Extrazellularraum kommt. PASMCs in der Kontrollgruppe weisen moderate Banden im Western Blot auf. Die mit OAG behandelten Zellen, bei denen es zu einem ROCE kommt, zeigen eine erhöhte Phosphorylierung der PKC-Substrate, während die mit Ionomycin inkubierten Zellen eine schwächere Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen **(Abbildung 13)**.

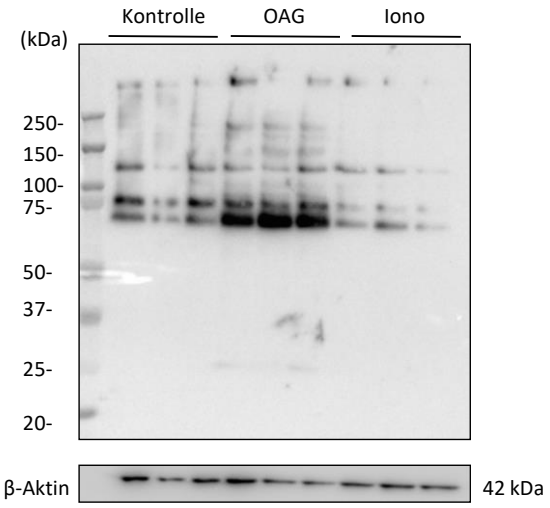


Abbildung 13: Antikörpertest phospho-PKC-Substrat
Phosphorylierte PKC-Substrat-Expression quantifiziert mittels Western Blot. Detektion von phosphorylierten PKC-Substraten in PASMCs nach Inkubation mit OAG (für 30 Min.) bzw. Ionomycin (für fünf Min.) (n=3). Iono: Ionomycin, OAG: 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol, kDa: Kilodalton.

3.5.2 CaMKII

Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration führt zur Autophosphorylierung und Aktivierung von CaMK über Calmodulin [330]. Es wurde eine verstärkte Protein-Expression von CaMKII in COPD-Lungen beobachtet. Zudem wurde eine erhöhte Phosphorylierung von CaMKII in COPD-Lungen festgestellt **(Abbildung 14)**.

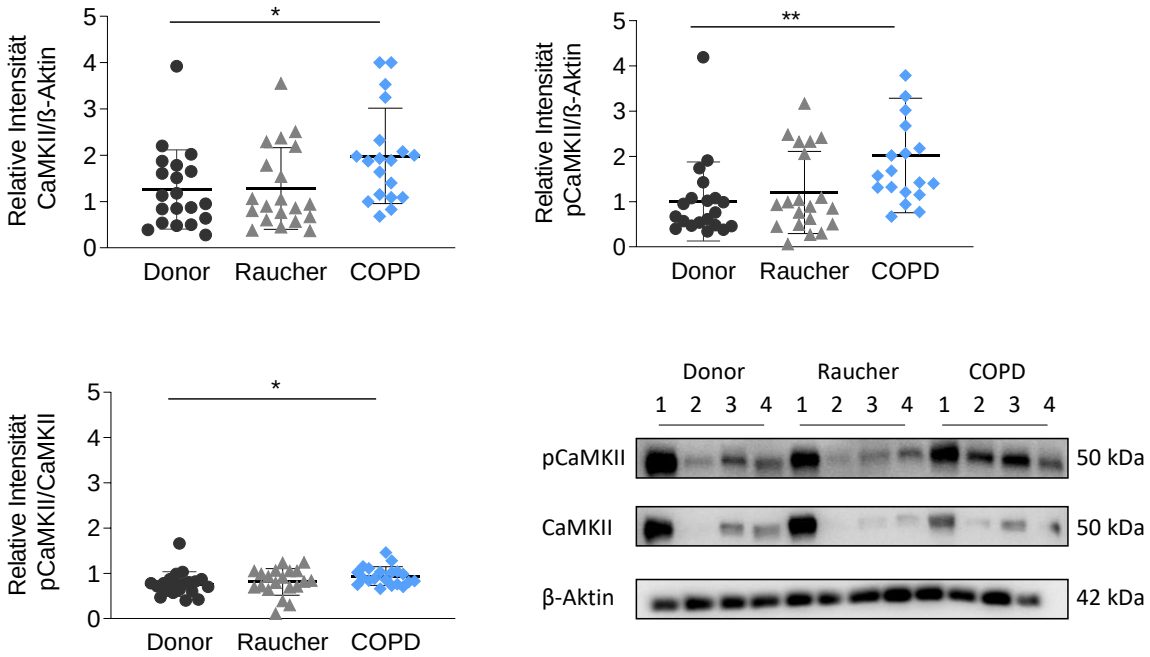


Abbildung 14: Protein-Expression von CaMKII in humanen Lungenhomogenaten.
Analyse der relativen Phosphorylierung von CaMKII in in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=19-20) mittels Western Blot. CaMK: Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen, kDa: Kilodalton. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * ($p \leq 0{,}05$); ** ($p \leq 0{,}01$).
In dieser Abbildung ist ein exemplarischer Western Blot dargestellt, Übersichtsbilder der übrigen für die Analyse durchgeführten Western Blots befinden sich im Anhang (Abbildung 31).

Die Spezifität des Antikörpers gegen phosphoryliertes CaMKII wurde mit Hilfe von OAG und Ionomycin untersucht. Die Phosphorylierung von CaMKII wurde durch OAG vermindert, sodass keine Banden mehr detektiert werden konnten. Die Inkubation mit Ionomycin führte zu einer verstärkten Phosphorylierung von CaMKII im Vergleich zu Kontrollgruppe (**Abbildung 15)**.

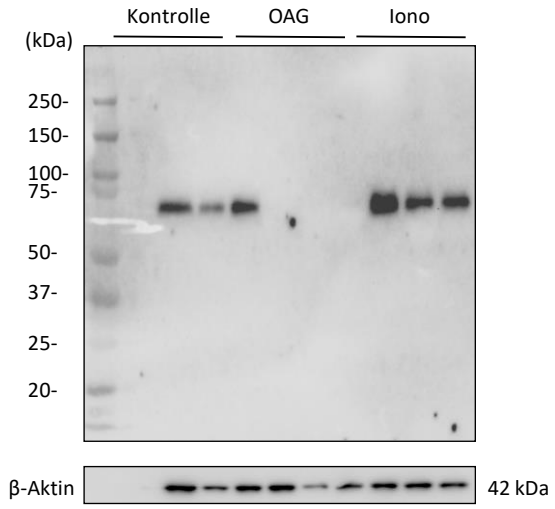


Abbildung 15: Antikörpertest phospho-CaMKII
Phosphorylierte CaMKII-Expression quantifiziert mittels Western Blot. Detektion von phosphoryliertem CaMKII in PASMCs nach Inkubation mit OAG (für 30 Min.) und Ionomycin (für fünf Min.) (n=3). Iono: Ionomycin, OAG: 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol, kDa: Kilodalton.

3.5.3 *ERK1/2*

Bei der Analyse von ERK1/2 wurde beobachtet, dass sich die Expression in Raucher- und COPD-Lungen nicht von den Donoren unterscheidet. Es zeigte sich ein erhöhter Anteil an phosphoryliertem ERK1/2 in Raucher- und COPD-Lungen im Vergleich zu Donoren **(Abbildung 16)**.

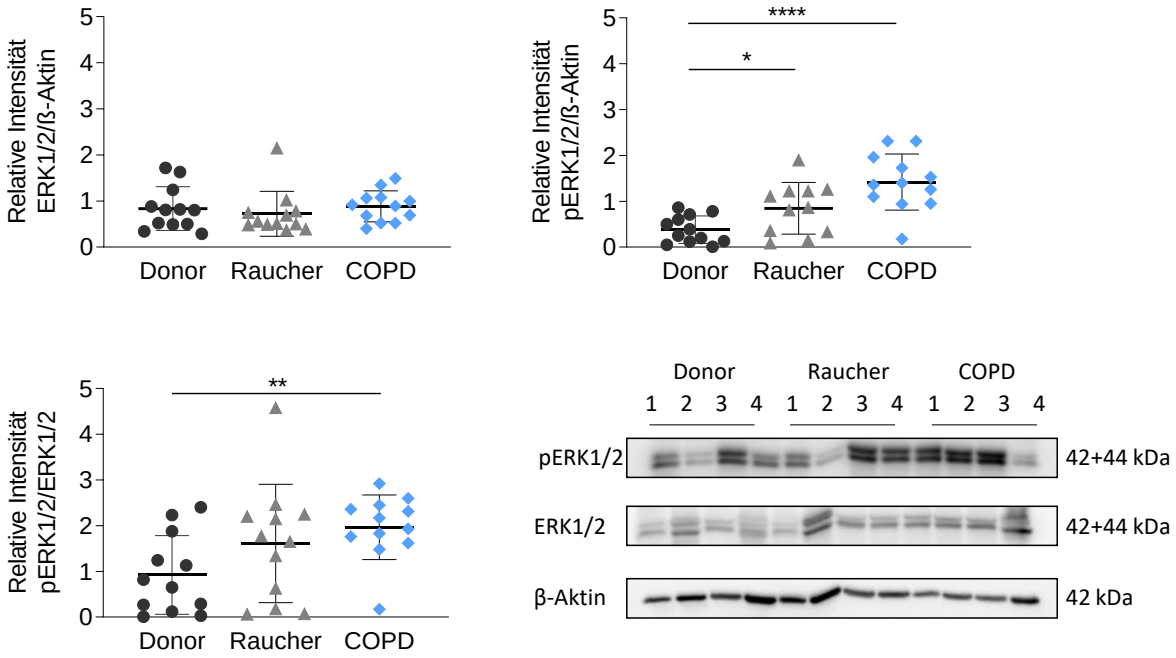


Abbildung 16: Protein-Expression von ERK1/2 in humanen Lungenhomogenaten.
Analyse der relativen Phosphorylierung von ERK1/2 in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=11-12) mittels Western Blot. ERK1/2: Extrazelluläre signalregulierte Kinasen 1 und 2, kDa: Kilodalton. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * (p≤0,05); ** (p≤0,01); *** (p≤0,001); **** (p≤0,0001).
In dieser Abbildung ist ein exemplarischer Western Blot dargestellt, Übersichtsbilder der übrigen für die Analyse durchgeführten Western Blots befinden sich im Anhang (Abbildung 32).

3.5.4 *Cyclin D1, Cyclin E und CDC25A*

Des Weiteren wurde die Expression von Cyclin D1, Cyclin E und dem *cell cycle division* Protein 25A (CDC25A) untersucht, die in der Regulation des Zellzyklus eine wichtige Rolle spielen [236, 312, 321]. In COPD-Lungen wurde eine stärkere Expression von Cyclin D1 im Vergleich zu Rauchern und Donoren detektiert **(Abbildung 17A)**. Im Gegensatz dazu wurde für Cyclin E in Raucher- und COPD-Lungen eine verminderte Expression beobachtet **(Abbildung 17B)**. Für CDC25A konnte eine verstärkte Expression in Raucher- sowie COPD-Lungen im Vergleich zur Donoren Gruppe festgestellt werden **(Abbildung 17C)**.

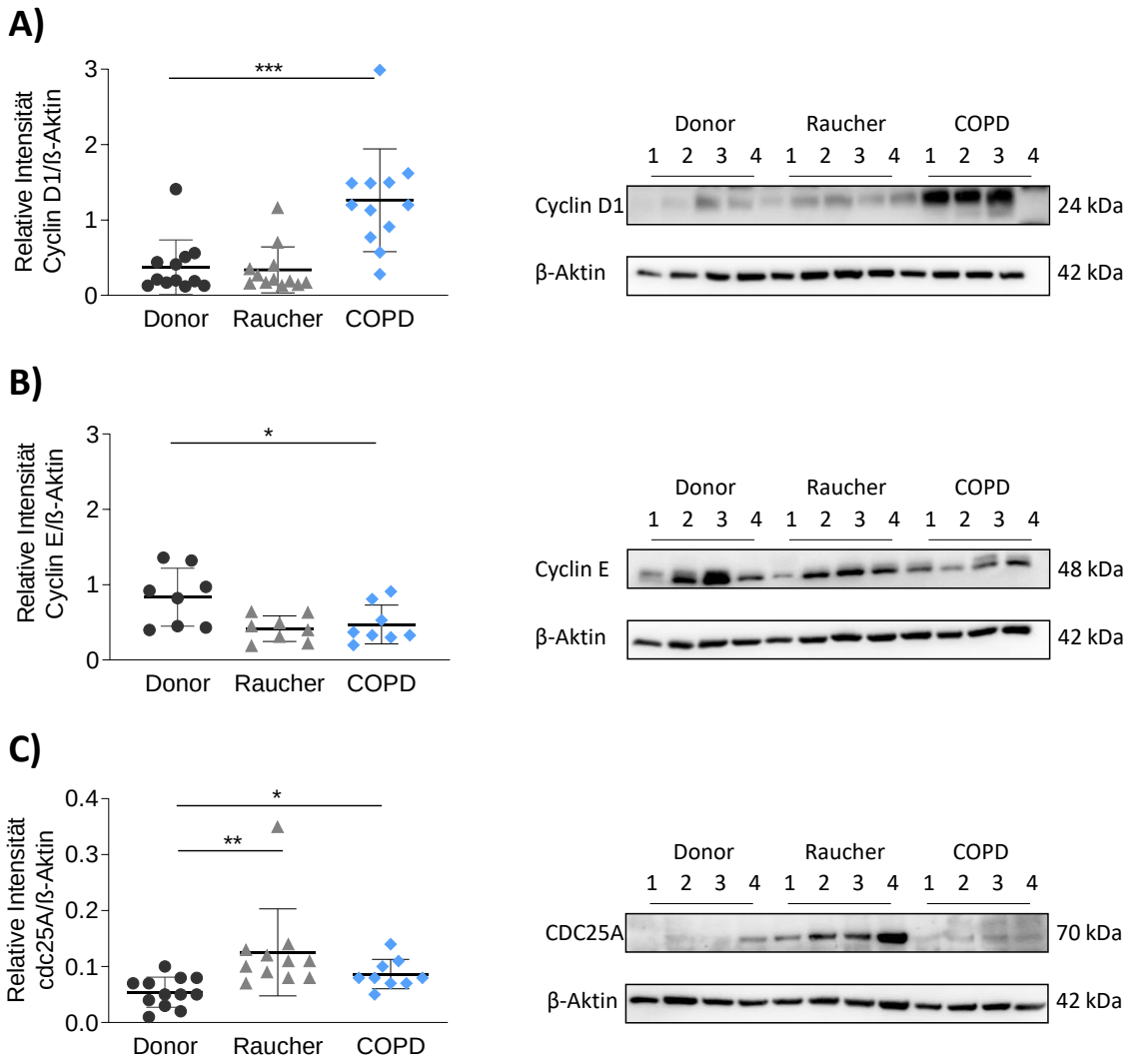


Abbildung 17: Protein-Expression von Cyclin D1, Cyclin E und CDC25A in humanen Lungenhomogenaten.

Analyse der relative Protein-Expression von A) Cyclin D1, B) Cyclin E und C) CDC25A in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=8-12) mittels Western Blot. CDC25A: *cell cycle division* Protein 25A, kDa: Kilodalton. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * (p≤0,05); ** (p≤0,01); *** (p≤0,001); **** (p≤0,0001).

In dieser Abbildung ist jeweils ein exemplarischer Western Blot dargestellt, Übersichtsbilder der übrigen für die Analyse durchgeführten Western Blots befinden sich im Anhang (Abbildung 33 und 34).

3.6 Ca^{2+}-Konzentrationsmessung und Proliferationsassay

3.6.1 Ca^{2+}-Konzentrationsmessung im Lungenhomogenat

Um der Frage nachzugehen, ob die Ca^{2+}-Konzentration in COPD-Lungen erhöht ist, wurde für die vorliegende Arbeit mit einem Ca^{2+}-Assay Kit die Ca^{2+}-Konzentration im homogenisierten Lungengewebe gemessen. Dabei wurde eine erhöhte Ca^{2+}-Konzentration in COPD-Lungen im Vergleich zu Donoren und Rauchern festgestellt **(Abbildung 18)**.

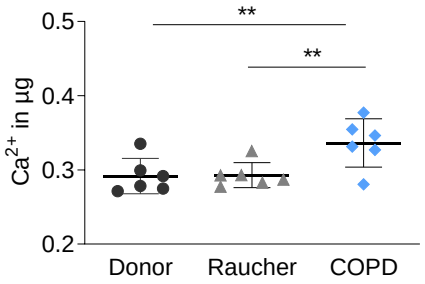


Abbildung 18: Ca^{2+}-Konzentrationsmessung in humanen homogenisierten Lungenhomogenaten
Ca^{2+}-Konzentrationsmessung in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen (n=6). Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * ($p \leq 0{,}05$); ** ($p \leq 0{,}01$).

3.6.2 Proliferationsassay PASMCs

Ca^{2+} spielt u.a. eine wichtige Rolle in der Proliferation von Zellen und bei der COPD kommt es zu pulmonal vaskulärem *Remodeling [292]*. In dieser Arbeit wurde abschließend der Einfluss von CS-Extrakt auf die Proliferation von PASMCs untersucht. PASMCs wurden hierfür mit 0%, 0,5% und 1% CS-Extrakt für 120 Stunden inkubiert und die Proliferation mittels eines BrdU-basierten Proliferationsassay ermittelt. Dabei wurde nach der Behandlung mit 0,5% und 1% CS-Extrakt eine reduzierte Proliferation der PASMCs im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet **(Abbildung 19A)**. PASMCs welche 120 Stunden mit 0,5% CS inkubiert und zusätzlich für 24 Stunden mit Hypoxie oder Epithelzellmedium behandelt wurden, zeigten eine verstärkte der Proliferation im Vergleich zu 0% CS-Extrakt **(Abbildung 19B und C)**.

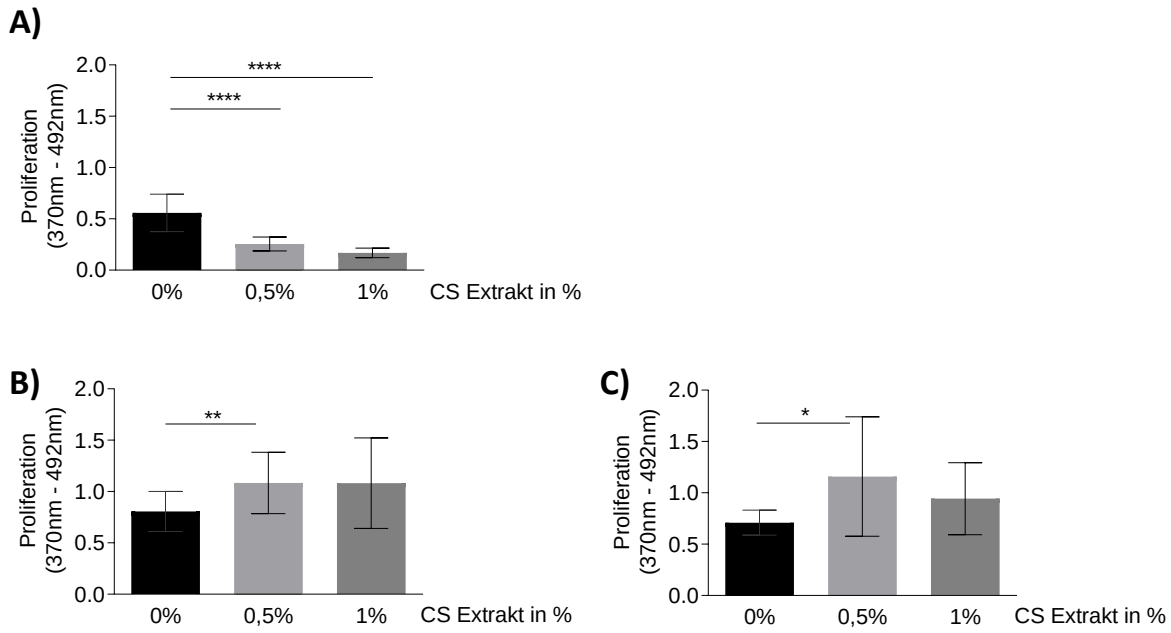


Abbildung 19: Proliferation PASMCs nach Exposition mit CS-Extrakt

Proliferation von PASMCs nach 120 Stunden Exposition mit 0,5% und 1% CS-Extrakt. A) Messung nach 120 Stunden Exposition mit CS-Extrakt. B) Messung nach 120 Stunden Exposition mit CS-Extrakt plus zusätzlicher Inkubation für 24 Stunden in Hypoxie. C) Messung nach 120 Stunden Exposition mit CS-Extrakt plus zusätzliche Inkubation für 24 Stunden in Epithelzellmedium. Quantifiziert mittels BrdU-basiertem Proliferationsassay (n=9). CS: *Cigarette smoke*, nm: Nanometer. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * ($p \leq 0{,}05$); ** ($p \leq 0{,}01$); *** ($p \leq 0{,}001$); **** ($p \leq 0{,}0001$).

4 Diskussion

Die Pathogenese der COPD ist komplex und das Zusammenspiel diverser Signalkaskaden und verschiedener Zelltypen in der Lunge ist hierbei von Bedeutung. Es kommt zur Aktivierung des Immunsystems und zu bronchialen sowie pulmonal vaskulären *Remodeling* Prozessen, welche mit einer Aktivierung von Immunzellen, Sekretion von Zytokinen sowie einer gesteigerten Proliferation einzelner Zelltypen einhergehen [25, 131, 133, 292]. Ca^{2+} spielt für diese Prozesse, als ubiquitär vorkommender Botenstoff, eine essentielle Rolle [32, 110, 260, 355]. So ist die Exposition mit CS-Extrakt von bronchialen SCMs oder PASMCs mit einer verstärkte Expression von Ca^{2+}-Kanälen, einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration, der Sekretion von Zytokinen und Proliferation assoziiert [364, 381]. Das genaue Verständnis über die Zusammenhänge und Interaktionen zwischen einer Exposition mit CS, einem intrazellulären Ca^{2+}-Anstieg, den darin involvierten Ca^{2+}-Kanälen und assoziierten Proteinen und den induzierten, simultan ablaufenden Signalkaskaden fehlt bis dato. In dieser Arbeit wurde daher die Expression verschiedener Ca^{2+}-Kanäle und Ca^{2+}-assoziierter Proteine sowie die Ca^{2+}-Konzentration in homogenisierten Donor-, Raucher- und COPD-Lungen untersucht und verglichen.

4.1 Die Rolle von Ca^{2+}-Kanälen in der Pathogenese der COPD

4.1.1 TRPC-Kanäle

Einzelne Mitglieder der TRPC-Familie werden in der Pathogenese der COPD diskutiert, insbesondere TRPC1 scheint ein vielversprechender Kandidat zu sein. Der Kanal wird in Makrophagen [49] sowie in verschiedenen Zellen des Lungengewebes exprimiert u. a. in BECs [403], bronchialen SMCs [184] und PASMCs [358, 364]. Die mechanische Aktivierbarkeit von TRPC1 [215] könnte bei der COPD relevant sein, da die Obstruktion der Atemwege und der chronische Husten mit mechanischem Stress einhergehen [119, 298]. In der Literatur wird beschrieben, dass der TRPC1-Kanal eine Rolle in der Differenzierung der Makrophagen spielt und der TRPC1-vermittelte Ca^{2+}-Einstrom essentiell für die Polarisierung der Makrophagen hin zum inflammatorischen Phänotyp (M1 Makrophagen) ist [49, 70]. In TRPC1-*Knockout* Mäusen wurde eine verminderte Expression von M1 Makrophagen-assoziierten inflammatorischen Signalmolekülen nachgewiesen. Au-

ßerdem korrelierte die TRPC- Expression in Makrophagen aus Patienten mit einem *systemischen inflammatorischen Response Syndrom* mit der Schwere der Erkrankung und dem Transkriptionsniveau an M1 Makrophagen- assoziierten inflammatorischen Signalmolekülen [70]. Eine Akkumulation von M1 Makrophagen in der Wand der kleinen Atemwege von COPD-Patienten wurde ebenfalls beschrieben, während im Alveolarraum eine Polarisierung in Richtung M2 Makrophagen beobachtet wurde [82, 311]. Obwohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Expression von TRPC1in COPD-Lungen nachgewiesen wurde, wurde nicht untersucht, ob diese mit einer erhöhten Anzahl aktivierter M1 Makrophagen in Zusammenhang steht. Eine durch M1 Makrophagen vermittelte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen könnte zur chronischen Inflammation bei der COPD beitragen.

Auch beim bronchialen *Remodeling* der Lunge, welches sich in einer Obstruktion der kleinen Atemwege äußert, spielt mechanosensitiv aktivierter TRPC1 möglicherweise eine Rolle. Für BECs konnte gezeigt werden, dass die Stimulation durch mechanischen Stress zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration und einer Hochregulation von TRPC1, IL-13 und MMP-9 führt [403]. IL-13 und MMP-9 werden mit Inflammation, bronchialem *Remodeling* sowie Emphysembildung in Asthma und COPD assoziiert [114, 241, 403]. Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen der mechanischen Aktivierung von TRPC1 in BECs und dem Prozess der sogenannten epithelialen-mesenchymalen Transition beschrieben [365]. Dabei verlieren die BECs ihre Polarität und gehen in mesenchymale Zellen über, welche Bestandteile der EZM sezernieren und so zum bronchialen *Remodeling* mit peribronchialer Fibrosierung beitragen können [163]. Bei Rauchern und COPD-Patienten findet diese Umwandlung von BECs in mesenchymale Zellen vermehrt statt [229, 256], hier könnte TRPC1 eine wichtige Rolle spielen. Neben BECs sind auch bronchiale SMCs für das bronchiale *Remodeling* von Bedeutung. Bronchiale SMCs tragen durch Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, verstärkte Proliferation und Veränderungen in der Regulation von Kontraktion und Relaxation zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung bei [389]. Eine Hochregulation von TRPC1 wird mit der Proliferation von bronchialen SMCs assoziiert [328]. *Li et al.* konnten in einem Asthmatiermodel zeigen, dass ein TRPC1-*Knockdown* mit vermindertem bronchialen *Remodeling*, verminderter Wanddicke der Bronchien, reduzierter bronchialer SMC-Hypertrophie und Hyperplasie, reduzierter EZM-Deposition und geringerer Inflammation einhergeht [184]. Die in dieser Arbeit festgestellte verstärkte Expression von

TRPC1 in COPD-Lungen könnte demnach Veränderungen in der Ca^{2+}-Homöostase von BECs und bronchialen SMCs zur Folge haben, welche Inflammation und bronchiales *Remodeling* in der Lunge induzieren.

Neben dem bronchialen *Remodeling* findet bei der COPD auch pulmonal vaskuläres *Remodeling* statt, welches mit der Exposition von CS assoziiert ist und sich im klinischen Bild einer PH äußert [18, 292]. In isolierten PASMCs aus Rattengewebe konnte gezeigt werden, dass eine drei- bzw. sechsmonatige Exposition mit CS zu einer Hochregulation von TRPC1, einem Anstieg der basalen Ca^{2+}-Konzentration und einem SOCE induzierten Ca^{2+}-Einstrom führt [358]. Außerdem wurde für humane PASMCs gezeigt, dass eine Exposition mit CS-Extrakt eine erhöhte Expression von TRPC1, sowie eine Hochregulation von Cyclin D1 und eine vermehrte Proliferation zur Folge hat [364]. Für die durch chronische Hypoxie-induzierte PH in der Maus konnte gezeigt werden, dass TRPC1-*Knockout* Mäuse partiellen Schutz gegenüber Gefäßveränderungen aufweisen und chronische Hypoxie in PASMCs eine Hochregulation von TRPC1 zur Folge hat [208]. Während im Rahmen der vorliegenden Arbeit in COPD-Lungen eine erhöhte TRPC1-Expression gezeigt wurde, konnten in den pulmonalen Gefäßen keine veränderte Expression nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich eine große Streuung der Messwerte in der RTqPCR, dies könnte in der unterschiedlichen Größe (100 µm bis 20 µm) der untersuchten Gefäße begründet sein.

Als weiteres Mitglied der TRPC-Familie wurde in dieser Arbeit die Expression von TRPC3 untersucht. Der TRPC3-Kanal wird besonders stark im Gehirn exprimiert, kann aber auch in anderen Organen wie Herz, Niere, Ovarien und Hoden nachgewiesen werden [99]. In der Lunge ist TRPC3 u. a. in bronchialen SMCs [373] und in PASMCs [187] exprimiert. In wieweit TRPC3 einen Ca^{2+}-Einstrom vermittelt, der zu Veränderungen von Proliferation und Kontraktion in bronchialen SMCs und PASMCs führt, ist nicht abschließend geklärt. Erste Hinweise auf eine Rolle von TRPC3 in der Pathogenese der durch chronische Hypoxie-induzierten PH konnte *Mayser* in TRPC3-*Knockout* Mäusen zeigen. Der Verlust von TRPC3 wurde mit einem teilweisen Schutz vor Gefäßveränderungen assoziiert [219]. Während in der vorliegenden Arbeit in der Analyse von Gefäßen und Bronchien keine Regulation von TRPC3 beobachtet wurde, konnte in homogenisierten COPD-Lungen eine erhöhte Expression von TRPC3 nachgewiesen werden. Für bron-

chiale SMCs konnten *White et al.* nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Mediator TNF-α eine Hochregulation von TRPC3 sowie eine Erhöhung des SOCE und der basalen Ca^{2+}-Konzentration beobachten [373]. TNF-α ist bei COPD-Patienten erhöht [395] und könnte TRPC3 in bronchialen SMCs aktivieren und somit durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration zu pathologischer Proliferation und Kontraktion von bronchialen SMCs beitragen. Des Weiteren führt Nikotinexposition in humanen bronchialen SMCs zu einer TRPC3-vermittelten Proliferation [157]. Allerdings wurde in dieser Arbeit lediglich eine Hochregulation von TRPC3 in COPD-Lungen beobachtet und keine Regulation bei Rauchern, dies spricht gegen eine CS-induzierte Aktivierung von TRPC3. Durch ein individuell stark unterschiedliches Rauchverhalten der Patienten wären auch falsch negative Ergebnisse in den vorliegenden Daten möglich.

Von der Familie der TRPC-Kanäle wurde außerdem die Expression von TRPC6 untersucht. Der TRPC6-Kanal spielt eine wichtige Rolle für die Funktion des Immunsystems und wird in neutrophilen Granulozyten [190] und Makrophagen [91], außerdem in bronchialen SMCs [67] und PASMCs [358] exprimiert. Für Lungenmakrophagen von COPD-Patienten konnten *Finney-Hayward et al.* eine verstärkte TRPC6 Expression zeigen [91]. In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Hochregulation von TRPC6 in COPD-Lungen detektiert. TRPC6 wurde in Gefäßen, Bronchien und Alveolarsepten nachgewiesen, besonders hoch war hierbei die Expression in den Alveolarsepten von Rauchern- und COPD-Lungen.

TRPC6 ist zusätzlich für die Funktion der neutrophilen Granulozyten wichtig [190], die eine essentielle Rolle in der Pathogenese der COPD spielen [126]. TRPC6 ist im molekularen Mechanismus der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut sowie deren Migration ins Gewebe von Bedeutung [190]. Neutrophile Granulozyten sind vermehrt im Sputum von Rauchern und COPD-Patienten zu finden, wobei ihre Akkumulation mit einem fortschreitenden Verlust der Lungenfunktion korreliert [253, 323]. Die in dieser Arbeit festgestellte verstärkte Expression von TRPC6 in COPD-Lungen könnte mit einer verstärkten Rekrutierung und Migration von neutrophilen Granulozyten ins Lungengewebe zusammenhängen.

Im Zusammenhang mit CS-assoziiertem bronchialem *Remodeling* wird TRPC6 ebenfalls diskutiert. Für bronchiale SMCs wurde gezeigt, dass Nikotin zu einer Hochregulation von

TRPC6 führt und diese mit einem verstärkten SOCE und ROCE sowie einer vermehrten Proliferation der Zellen einhergeht [135].

Auch im pulmonal vaskulären *Remodeling* spielt TRPC6 möglicherweise eine wichtige Rolle [78, 210]. An PASMCs isoliert aus der Ratte wurde gezeigt, dass eine drei bzw. sechsmonatige Exposition mit CS zu einer Hochregulation von TRPC6 und einem Anstieg der basalen Ca^{2+}-Konzentration führt [358]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Übergang der PASMCs von einem kontraktilen zu einem proliferativen Phänotypen mit einer Hochregulation von TRPC6 einhergeht [89]. Auch für die Hypoxie-induzierte und idiopathische PH konnte eine erhöhte Expression von TRPC6 in PASMCs beobachtet werden, weshalb TRPC6 hier als mögliches therapeutisches Ziel diskutiert wird [145, 187, 400]. Auch wenn in dieser Arbeit keine Regulation von TRPC6 in Bronchien und Gefäßen beobachtet wurde, bedeutet dies nicht, dass TRPC6 keine Rolle im bronchialen und pulmonal vaskulären *Remodeling* spielt.

4.1.2 TRPV-Kanäle

Aus der Familie der TRPV-Kanäle wurden in dieser Arbeit TRPV1 und TRPV4 analysiert. TRPV1 ist besonders stark in sensorischen Nervenfasern des Respirationstrakts exprimiert [44, 81, 384], kommt aber auch in nicht-neuralem Gewebe wie z. B. in Immunzellen, bronchialen SMCs, PASMCs sowie in Lungenfibroblasten und Endothelzellen vor [81, 384]. Chemische und mechanische Reize in der Lunge aktivieren sensorische Nervenfasern, welche den Respirationstrakt innervieren. Die Aktivierung führt zu Bronchokonstriktion, Mukussekretion, Auslösung eines Hustenreflexes sowie Aktivierung des Immunsystems [220]. Der TRPV1-Kanal spielt in der Auslösung des Hustenreflexes eine wichtige Rolle [108]. Für Patienten mit chronischem Husten konnte eine Hochregulation von TRPV1 gezeigt werden [113, 232]. TRPV1-Antagonisten werden als Antitussiva untersucht, konnten in klinischen Studien jedoch bis dato keine Erfolge aufweisen [168]. In der vorliegenden Arbeit wurde für TRPV1 sowohl in Raucher- als auch in COPD-Lungen eine Hochregulation festgestellt. Die erhöhte Expression von TRPV1 bei Rauchern könnte darauf hinweisen, dass TRPV1 initial bei Kontakt mit Noxen in den sensorischen Nervenfasern hochreguliert wird, um die Lunge durch Abwehrmechanismen wie den Hustenreflex, Bronchokonstriktion, Mukussekretion und Inflammation zu schützen, ohne dabei zu der Entwicklung einer COPD zu führen.

Die Rolle von TRPV1 bei der Inflammation ist komplex und es werden sowohl proinflammatorische, als auch antiinflammatorische Signalkaskaden diskutiert [40, 171, 342, 384]. In der Lunge führt die Aktivierung von TRPV1 in sensorischen Nervenfasern zur Ausschüttung von Neuropeptiden wie Somastatin, Tachykinin, *Calcitonin Gene-Related Peptide* und Substanz-P [81]. Die TRPV1-vermittelte Sekretion von Somastatin aus sensorischen Nervenfasern in der Lunge könnte sich antiinflammatorisch auswirken [123, 266]. Auch *Tsuji et al*. konnten eine potentiell antiinflammatorische Rolle von TRPV1 in der Lunge zeigen. Sie beobachteten, dass in einer LPS-induzierten Lungenschädigung bzw. bei allergischen Reaktionen TRPV1-Agonisten die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Leukozyten sowie die Ausschüttung von TNF-α und IL-4 vermindern [343]. Eine TRPV1-vermittelte Sekretion von Tachykininen induziert dabei im Lungengewebe Bronchokonstriktion, Mukussekretion sowie Inflammation [329]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von TRPV1 zu einer reduzierten Inflammation im Mausmodel für chronisches Asthma führt [57]. Außerdem gibt es eine Rückkopplungsschleife in der die TRPV1-vermittelte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wiederum eine Hochregulation von TRPV1 zur Folge hat. So wurde gezeigt, dass Fibroblasten nach Stimulation mit TNF-α, LPS und IL-1α eine erhöhte Expression von TRPV1 aufweisen [290]. Eine Hochregulation von TRPV1 wurde sowohl in dieser Arbeit als auch in vorherigen Untersuchungen in COPD-Lungen festgestellt [29]. Unklar bleibt, ob die Hochregulation mit der Inflammation im Lungengewebe assoziiert ist, oder ob die verstärkte Expression von TRPV1 einen protektiven und antiinflammatorischen Effekt hat.

Im Prozess des bronchialen *Remodelings* führte die Stimulation von TRPV1-Kanälen mit dem Agonisten Capsaicin zu einem Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration und einer Proliferation von bronchialen SMCs [410]. Eine Herunterregulation von TRPV1 wurde im Mausmodell mit einem vermindertem bronchialem *Remodeling* assoziiert [57].

Im Pathomechanismus der PH wird für TRPV1 sowohl eine krankheitsfördernde, als auch eine protektive Rolle diskutiert [409]. Die TRPV1-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration in PASMCs führt zu Proliferation und Kontraktion der Zellen. Gleichzeitig werden TRPV1-vermittelt aber auch antiinflammatorische Mediatoren sezerniert, welche sich protektiv auf den Krankheitsverlauf auswirken [409].

TRPV4 wird im Lungengewebe u. a. in Endothel- und Epithelzellen sowie in bronchialen SMCs exprimiert [10, 16, 216] und konnte in dieser Arbeit im Lungenhomogenat sowie in Gefäßen, Bronchien und Septen nachgewiesen werden. Dabei wurde eine verstärkte Expression von TRPV4 auf mRNA und Proteinebene in COPD-Lungen beobachtet, was auf eine Rolle von TRPV4 in der Pathogenese der COPD hinweist. Zusätzlich wurde eine verstärkte Expression von TRPV4 auf Proteinebene auch bei Rauchern nachgewiesen. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen von *Baxter et al.*, die ebenfalls eine erhöhte Expression von TRPV4 im Lungengewebe von COPD-Patienten festgestellt haben [29].

Vergleichbar mit TRPV1 spielt auch TRPV4 eine komplexe Rolle in der Regulierung des Immunsystems [248, 303]. Der TRPV4-vermittelte Ca^{2+}-Einstrom ist essentiell für die ziliäre Schlagfrequenz und spielt eine wichtige Rolle in der mukoziliären *Clearance* und damit auch für die Protektion der Lunge vor pathogenen Erregern [6, 199]. Eine schützende Rolle von TRPV4 in der Mauslunge konnte in TRPV4-*Knockout* Mäusen gezeigt werden, welche nach Stimulation mit LPS verstärkt Atemwegsveränderungen und eine verstärkte Rekrutierung von Leukozyten aufwiesen [9]. Auch in Makrophagen ist der TRPV4-Kanal von Bedeutung, hier werden sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte diskutiert [248, 304].

TRPV4 könnte außerdem eine wichtige Rolle in den Alveolen und der Entstehung des Emphysems bei der COPD spielen. *Weber et al.* konnten zeigen, dass TRPV4-*Knockout* Mäuse vermehrt Emphysem-ähnliche Veränderungen in der Lunge aufweisen [368]. Dieses Ergebnis und die in dieser Arbeit festgestellt erhöhte Expression von TRPV4 in den Septen von COPD-Lungen deuten darauf hin, dass TRPV4 kompensatorisch hochreguliert sein könnte und einen protektiven Effekt haben könnte.

TRPV4 könnte außerdem eine Rolle im pulmonal vaskulären *Remodeling* spielen. In zwei Tiermodellen der PH (chronische Hypoxie und Monocrotalin) konnte eine Hochregulation von TRPV4 in der Adventitia gezeigt werden [69]. In dieser Arbeit wurde in den Gefäßen von COPD-Lungen keine Regulation von TRPV4 beobachtet. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Relevanz von TRPV4 in der Pathogenese der COPD assoziierten PH beurteilen zu können.

4.1.3 Der TRPA1-Kanal

TRPA1 ist durch seine Eigenschaften direkt durch verschiedene Komponenten des CS wie Acrolein, Crotonaldehyd, Formaldehyd und auch Nikotin aktivierbar [230, 333] Da CS den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer COPD darstellt [27, 211], ist der TRPA1-Kanal von besonderem Interesse.

Der TRPA1-Kanal wird insbesondere in den sensorischen Nerven des Respirationstraktes exprimiert [242, 384] und ist an der Auslösung des Hustenreflex beteiligt [102, 108]. Daher gelten TRPA1-Antagonisten als vielversprechend zur Entwicklung neuer Antitussiva [109, 337]. In dieser Arbeit konnte eine verstärkte Expression von TRPA1 sowohl in COPD-Lungen als auch in Raucher-Lungen beobachtet werden. Die beobachtete Regulation von TRPA1 in Raucher-Lungen könnte darauf hindeuten, dass die inhalativen Noxen TRPA1-Kanäle in sensorischen Nerven aktivieren und protektive Abwehrmechanismen wie den Hustenreflex auslösen.

Auch in nicht neuronalen Zellen wird TRPA1 in der Lunge exprimiert u. a. in Lungenfibroblasten, bronchialen SMCs und A/BECs [117, 148, 243]. A/BECs sind in direkter Nähe zum Lumen lokalisiert und haben Kontakt mit den inhalativen Noxen. Als Reaktion auf diese sezernieren A/BECs proinflammatorische Zytokine [98] und insbesondere bei der Sekretion von IL-8 könnte dem TRPA1-Kanal eine wichtige Bedeutung zukommen. *Nassini et al*. konnten für AECs zeigen, dass mittels eines TRPA1-Antagonisten die CS-assoziierte Sekretion von IL-8 vermindert wurde [243]. Auch *Wang et al.* beobachteten einen proinflammatorischen Effekt von TRPA1. Sie konnte zeigen, dass die Exposition von A/BECs mit CS-Extrakt zu einem verstärkten Ca^{2+}-Einstrom, vermehrtem oxidativen Stress und einer Induktion von proinflammatorischen Genen führt und diese Effekte durch die Hinzugabe von TRPA1-siRNA reduziert werden konnten [362]. Die in dieser Arbeit beobachtete Hochregulation von TRPA1 in Raucher- und COPD-Lungen könnte mit einer verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 einhergehen.

Die Rolle von TRPA1 in der Regulation der Inflammation scheint komplex und vielschichtig zu sein. *Hajna et al*. konnten zeigen, dass TRPA1 auch eine protektive Rolle bei der Inflammation der Lunge zukommen könnte. Sie beobachteten, dass TRPA1-*Knockout* Mäuse eine stärkere LPS-induzierte Lungenschädigungen aufweisen [117]. Gleichzeitig konnten sie zeigen, dass TRPA1-*Knockout* Mäuse nach Exposition mit CS partiell vor der Entstehung eines Emphysems geschützt sind [117]. *Hajna et al.* diskutie-

ren im Zusammenhang mit den Ergebnissen ihrer Arbeit mögliche unterschiedliche Aktivierungsmechanismen von TRPA1 durch CS und LPS. Außerdem wird eine eventuell unterschiedliche Rolle von TRPA1 bei der akuten und der chronischen Inflammation der Lunge diskutiert [117]. In der Pathogenese der COPD könnte dies bedeuten, dass nach einer kurzen Exposition mit CS eine TRPA1-Aktivierung in den sensorischen Nervenfasern protektiv wirkt, während eine chronische Aktivierung von TRPA1 auch in nichtneuralen Zellen der Lunge zu Inflammation und Emphysembildung führt und so zu den Pathomechanismen der COPD beiträgt.

Im Hinblick auf die Funktion von TRPA1 in bronchialen SMCs konnte gezeigt werden, dass der Kanal für den CS-assoziierten Ca^{2+}-Einstrom in bronchialen SMCs von Bedeutung ist und hier vermutliche eine Rolle bei der pathologischen Kontraktion der bronchialen SMCs spielt [188]. Über die Funktion von TRPA1 in pulmonalen Gefäßen ist bis dato wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass TRPA1 in PASMCs, isoliert aus der Maus, exprimiert ist und dort funktionelle Kanäle bildet, welche mit Proliferation und Apoptose dieser Zellen assoziiert sind (noch nicht publiziert: Brosien et al.2024).

4.1.4 TRPM-Kanäle

TRPM-Kanäle spielen eine wichtige Rolle für die Funktion des Immunsystems [415] und werden in der Lunge u. a. in BECs und PASMCs exprimiert [287, 390]. Bei der Expressionsanalyse der Familie der TRPM-Kanäle wurden in der vorliegenden Arbeit TRPM4, TRPM6 und TRPM8 untersucht. TRPM4 wird in dendritischen Zellen exprimiert [20], die bei COPD-Patienten vermehrt in der Wand der kleinen Atemwege vorkommen [348]. Die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Expression von TRPM4 in COPD-Lungen könnte mit einer verstärkten Aktivierung des Immunsystems und einem vermehrten Vorkommen von dendritischen Zellen in Zusammenhang stehen.

TRPM8 hingegen ist ein möglicher Kandidat, welcher in der Entstehung von Exazerbationen bei COPD-Patienten eine Rolle spielen könnte. Exazerbationen sind akute Verschlechterungen der Symptomatik, welche gehäuft bei kaltem Wetter auftreten [214, 340]. TRPM8 ist kältesensitiv und durch niedrige Temperaturen aktivierbar [221, 397] und wird im Zusammenhang mit der Kälte-getriggerten Inflammation der Atemwege bei Asthma diskutiert. Die Aktivierung von TRPM8 durch Menthol oder Kälte führt in BEC zu einer verstärkten Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. IL-1, IL-

4, IL-8, IL-13 oder TNF-α. Diese Hochregulation der Zytokine lässt sich durch die Applikation von siRNA oder einem TRPM8-Antagonisten abschwächen [288]. Ähnliche Mechanismen könnten auch bei der COPD von Bedeutung sein. Neben Kälte induziert auch CS in BECs eine Hochregulation von TRPM8 und eine erhöhte Expression von IL-6, IL-8 und TNF-α [363].
Des Weiteren wird in der Literatur im Zusammenhang mit einer Hypoxie-induzierten PH im Tiermodell eine Herunterregulation von TRPM8 in PASMCs beschrieben [196, 237]. In dieser Arbeit konnte weder für TRPM6 noch TRPM8 eine veränderte Expression in Raucher- oder COPD-Lungen festgestellt werden. Es bleibt unklar, welche Rolle TRPM-Kanäle in der Pathogenese der COPD spielen.

4.1.5 VDCCs

Als zweite große Gruppe von Ca^{2+}-Kanälen wurden in dieser Arbeit die VDCCs untersucht. VDCCs werden u.a. in bronchialen SMCs, Endothel- und Epithelzellen sowie in PASMCs exprimiert [268, 281]. In der Literatur finden sich bei verschiedenen pulmonalen Erkrankungen Hinweise auf eine veränderte Regulation von VDCCs im Lungengewebe. So konnte in PASMCs von Mäusen, mit einer Hypoxie-induzierten PH, eine Hochregulation von L-Typ 1.3 und T-Typ 3.2 nachgewiesen werden [356]. Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration über eine Hochregulation von VDCCs induziert Proliferation und Kontraktion in humanen PASMCs [281, 295]. Die Kanäle L-Typ 1.3 und T-Typ 3.2 waren in der vorliegenden Arbeit in Raucher- und COPD-Lungen hochreguliert und könnten eine Rolle in der Pathogenese der COPD-assoziierten PH spielen.
Für das kleinzellige Bronchialkarzinom finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass Komponenten von CS eine chronische Aktivierung von VDCCs induzieren können und damit Ca^{2+}-assoziierte Signalkaskaden aktivieren, welche sich krankheitsfördernd auswirken [313]. Es ist nicht bekannt, ob ein ähnlicher Mechanismus auch für die Pathogenese der COPD relevant sein könnte.
Die Aktivierung von VDCCs steht im engen Zusammenhang mit der Aktivität von TRP-Kanälen. Die Aktivierung von TRP-Kanälen, z. B. TRPC6, führt über einen Na^{+}-Einstrom zu Veränderungen des Membranpotentials und induziert eine Aktivierung von VDCCs [78, 86] **(Abbildung 20**). Eine Hochregulation von TRP-Kanälen bei COPD-Patienten könnte somit auch mit einer vermehrten Aktivierung von VDCCs im Lungengewebe einhergehen.

4.1.6 PMCA und SERCA

Neben den Ca^{2+}-Kanälen, die einen Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle vermitteln, sind für die Ca^{2+}-Homöostase einer Zelle auch Kanäle wichtig, welche die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration wieder senken [31]. Dazu gehören die PMCA und die SERCA, welche Ca^{2+} unter ATP-Verbrauch in den Extrazellularraum bzw. ins SR/ER transportieren [32].

PMCAs werden in der Lunge u. a. in bronchialen SMCs und PASMCs exprimiert [51, 77] und könnten in der Pathogenese der COPD in bronchiales und pulmonal vaskuläres *Remodeling* involviert sein. Sowohl in bronchialen SMCs als auch in PASMCs spielen PMCA1 bzw. PMCA4 eine wichtige Rolle in der Proliferation [51, 77]. Für PMCA1 bis 4 wurde in der vorliegenden Arbeit eine verminderte Expression auf mRNA-Ebene in COPD-Lungen gezeigt. Eine Herunterregulation von PMCAs könnte zu einem verminderten Ca^{2+}-Transport in den Extrazellularraum führen und dies könnte eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration zur Folge haben. Diese Hypothese wird durch eine, in der vorliegenden Arbeit gemessene, erhöhte Ca^{2+}-Konzentration in COPD-Lungen unterstützt. Eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration könnte eine verstärkte Proliferation, Kontraktion, Migration und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen zur Folge haben [32, 260, 314, 355].

SERCA wird in der Lunge u. a. in bronchialen SMCs [205, 299] und PASMCs [116] exprimiert und spielt eine essentielle Rolle für die Ca^{2+}-Homöostase und damit verbundene Proliferation und Kontraktion [32]. Im Zusammenhang mit Asthma wird eine Rolle der SERCA im bronchialen *Remodeling* diskutiert. In bronchialen SMCs von Asthmapatienten wurde eine verminderte Expression von SERCA2 beobachtet [205]. Auch konnte gezeigt werden, dass eine Exposition mit TNF-α und IL-13 zu einer Herunterregulation der SERCA2 in diesen Zellen führt [299]. Des Weiteren wird auch für die PH eine verminderte Expression der SERCA2 in PASMCs beschrieben [116]. In der Literatur finden sich keine Daten bezüglich der Expression von SERCA bei COPD-Patienten. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit für SERCA2 und SERCA3 auf mRNA-Ebene eine erhöhte Expression in COPD-Lungen festgestellt, auf Proteinebene war SERCA2 dagegen nicht reguliert. Es könnte als Reaktion auf eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration zu einer kompensatorischen Hochregulation der SERCA kommen, damit Ca^{2+} vermehrt von Zytosol ins ER transportieren werden kann. Es bleibt offen, welche Rolle SERCA in der Pathogenese der COPD zukommen könnte.

4.1.7 CRACs

Über die beschriebenen Mechanismen des SOCE hat ein Abfall der Ca^{2+}-Konzentration im ER einen Ca^{2+}-Einstrom von extrazellulär zur Folge [11, 197]. STIM fungiert hierbei als Ca^{2+}-Sensor im ER und ORAI bildet die in der Plasmamembran die zentrale Pore der CRACs [11]. STIM und ORAI werden in der Lunge in bronchialen SMCs und PASMCs sowie in BECs exprimiert [264, 360, 381] und werden in der Literatur im Zusammenhang mit PH, Asthma und COPD beschrieben [158].

STIM und ORAI könnten eine Bedeutung im bronchialen *Remodeling* bei der COPD haben. Für humane bronchiale SMCs konnte eine Hochregulation von STIM1 und ORAI1 nach Exposition mit CS gezeigt werden, diese Hochregulation geht mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration, einer verstärkten Proliferation sowie einer vermehrten Sekretion von Zytokinen einher [381]. Im Mausmodell für Asthma konnte für STIM1 und ORAI1 in bronchialen SMCs ebenfalls eine Hochregulation gezeigt werden, welche mit bronchialem *Remodeling* assoziiert wurde. Der *Knockdown* von STIM1 oder ORAI1 reduzierte sowohl Proliferation als auch Migration der bronchialen SMCs [160, 318]. In dieser Arbeit wurde eine verminderte Expression von STIM1 und STIM2 in COPD-Lungen und für STIM2 zusätzlich in Raucher-Lungen beobachtet.

Neben ORAI1 wurde auch die Expression von ORAI3 im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. ORAI3 ist essentiell für die Funktion der Kinozilien [264] und somit durch den Mechanismus der mukoziliären *Clearance* für die Schutzfunktion der Lunge von Relevanz. Weiterhin weisen Raucher eine verminderte Expression von ORAI3 in BECs auf, unabhängig von dem Vorkommen einer COPD [264]. In dieser Arbeit wurde in Raucher- und COPD-Lungen eine erhöhte Expression von ORAI3 beobachtet. Damit bleibt unklar welche Rolle ORAI3 in der Pathogenese der COPD zukommt. Da ORAI3 wichtig für die Funktion der Kinozilien ist, ist es denkbar, dass es als Reaktion auf die Exposition mit CS zu einer protektiven Hochregulation von ORAI3 kommt.

Im Zusammenhang mit pulmonal vaskulärem *Remodeling* könnten STIM- und ORAI-Proteine eine Rolle in der Pathogenese der COPD-assoziierten PH spielen. ORAI-Proteine werden als potentielle Zielstrukturen in der Therapie der PH diskutiert und könnten u. a. in pulmonal-arteriellen Endothelzellen, Fibroblasten und PASMCs in veränderte Signalkaskaden involviert sein [280]. So haben *Fernandez et al.* gezeigt, dass die Transition von PASMCs von einem kontraktilen zu einem proliferativen Phänotyp mit einem verstärkten SOCE und einer Hochregulation von STIM2 und ORAI2 assoziiert ist [89].

4.2 Die Rolle der Dysregulation der Ca^{2+}-Homöostase in der Pathogenese der COPD

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Proteine aus der TRP-Familie als auch VDCCs und die Proteine PMCA, SERCA, STIM und ORAI untersucht. Dabei wurden für TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPV1, TRPV4 und TRPA1 eine verstärkte Expression in COPD-Lungen festgestellt. TRPV1, TRPA1 sowie TRPM4 waren zusätzlich auch im Lungengewebe von Rauchern erhöht exprimiert. Außerdem wurde in COPD-Lungen eine verstärkte Expression des L-Typ-Kanals 1.3 und T-Typ-Kanals 3.2 beobachtet **(Abbildung 20)**. Diese Daten weisen darauf hin, dass es bei der COPD zu einem verstärkten Ca^{2+}-Einstrom aus dem Extrazellularraum kommen könnte. Auf der anderen Seite wurde in COPD-Lungen eine verminderte Expression von PMCA1 bis 4 beobachtet. Da PMCAs dafür zuständig sind Ca^{2+} vom Intrazellulär- in den Extrazellularraum zu transportieren, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass bei COPD-Patienten sowohl ein erhöhter Ca^{2+}-Einstrom, als auch ein verminderter Ca^{2+}-Ausstrom für eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration sorgen könnten **(Abbildung 20)**. In der Tat wurde in dieser Arbeit in COPD-Lungen eine erhöhte Ca^{2+}-Konzentration gemessen. Da TRPC-Kanäle neben Ca^{2+} auch für Na^{+} permeabel sind, könnte durch eine vermehrte Depolarisation und der damit einhergehenden vermehrten Aktivierung von VDCCs, der Ca^{2+}-Einstrom nochmals zusätzlich verstärkt werden [78, 86] **(Abbildung 20)**. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Expression von SERCA festgestellt, wodurch die Ca^{2+}-Konzentration im ER zusätzlich steigen könnte. Außerdem waren STIM1 und STIM2 auf mRNA-Ebene in COPD-Lungen herunterreguliert **(Abbildung 20)**. Die beobachtete Hochregulation von ORAI1 und ORAI3 könnte den Ca^{2+}-Einstrom aus dem Extrazellularraum zusätzlich verstärken.

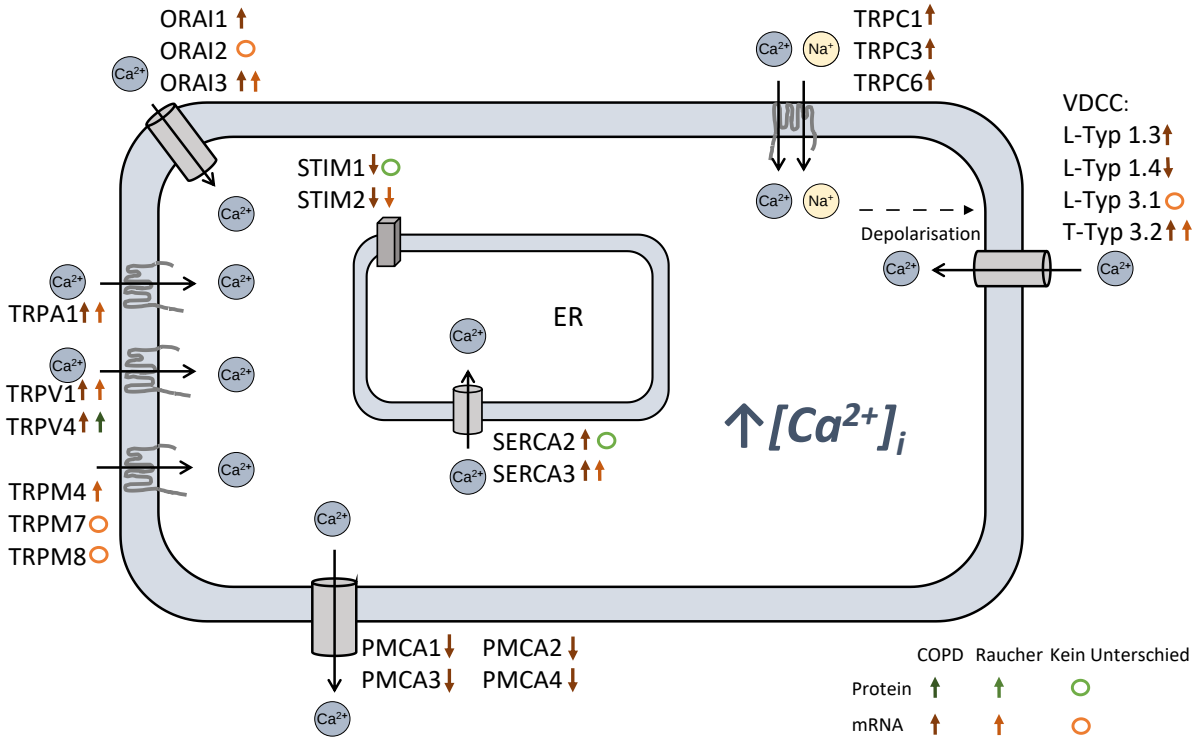


Abbildung 20: Zusammenfassung der Regulation der Expression von Ca^{2+}-Kanälen und Ca^{2+}-assoziierten Proteinen in humanen Lungenhomogenaten
In der vorliegenden Arbeit konnte eine Hochregulation von TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPV1, TRPV4, TRPA1, TRPM4, einzelner VDCCs (L-Typ 1.3, T-Typ 3.2) sowie von SERCA2 und 3 in Raucher- bzw. COPD-Lungen beobachtet werden. Außerdem wurde eine verminderte Expression von PMCA1 bis 4 sowie eine veränderte Regulation von ORAI- und STIM-Proteinen festgestellt. Durch die veränderte Expression der Ca^{2+}-Kanäle und Ca^{2+}-assoziierter Proteine könnte es zu einem vermehrten Ca^{2+}-Einstrom und verminderten Ca^{2+}-Ausstrom in einzelnen Zelltypen kommen. In Folge dessen könnte es zu einem intrazellulären Ca^{2+}-Überschuss und der Initiierung Ca^{2+}-assoziierter Signalkaskaden kommen, welche in der Pathogenese der COPD eine Rolle spielen könnten. ER: endoplasmatisches Retikulum, ORAI: Ca^{2+}-aktivierbares Ca^{2+}-Kanalprotein, PMCA: Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase, SERCA: Ca^{2+}-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums, STIM: stromales Interaktionsmolekül, TRP: *transient receptor potential*, VDCC: *voltage-dependent Ca^{2+}-channels*, Pfeil nach oben: erhöhte Expression, Pfeil nach unten: erniedrigte Expression, Kreis: kein signifikanter Unterschied in der Expression, grün: Ergebnisse der Versuche im Western Blot, orange: Ergebnisse der Versuche in der RTqPCR.

Eine Dysregulation der Ca^{2+}-Homöostase und eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration könnte mit der Initiierung diverser Ca^{2+}-assoziierter Signalkaskaden und der Aktivierung Ca^{2+}-abhängiger Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichen Zelltypen einhergehen. Dies könnte eine Aktivierung und Migration von Immunzellen, Sekretion von Zytokinen, Proliferation und Apoptose sowie Kontraktion von PASMCs zur Folge haben. Diese zellulären Prozesse könnten zu einer Inflammation, Destruktion von Alveolarsepten, bronchialem sowie pulmonal vaskulärem *Remodeling* führen und zur Entstehung einer COPD beitragen, welche sich klinisch mit einer Obstruktion der Atemwege, einem Emphysem und einer begleitenden PH äußert.

Neben möglichen krankheitsfördernden Effekten von Ca^{2+} und Ca^{2+}-Kanälen in der Pathogenese der COPD ist es allerdings auch denkbar, dass die Regulation einzelner Ca^{2+}-Kanäle einen kompensatorischen Mechanismus darstellt, der die Lunge vor der toxischen Wirkung von CS schützen soll. In verschiedenen Publikationen werden TRP-Kanäle im Zusammenhang mit protektiven Funktionen in der Lunge diskutiert [117, 384]. TRPA1 und TRPV1, welche in den sensorischen Nerven der Lunge exprimiert werden, sind an Abwehrmechanismen wie dem Hustenreflex, Bronchokonstriktion und Mukussekretion beteiligt [384]. Das in dieser Arbeit eine Hochregulation von TRPA1 und TRPV sowohl in COPD-Lungen als auch bei gesunden Rauchern beobachtet wurde, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Kanäle als erste Reaktion auf die Exposition mit CS hochreguliert werden, um die Lunge zu schützten. Dies könnte unter Umständen auch eine Ursache dafür sein, dass nicht jeder Raucher an einer COPD erkrankt. In Bezug auf die Inflammation werden für TRPA1 und TRPV1 sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen diskutiert [117, 343, 409]. Auch der TRPV4-Kanal, welcher wichtig für die Aktivität der Kinozilien und damit die mukoziliäre *Clearance* ist, könnte eine wichtige Rolle in der Protektion der Atemwege spielen [6, 199]. Erste Hinweise auf eine protektive Rolle von TRPV4 zeigen Versuche in Mäusen, welche nach Deletion von TRPV4 bereits nach 3 Monaten ein Emphysem entwickeln, während Kontrollmäuse erst nach 8 Monaten erkranken (unpublizierte Daten, persönliche Mitteilung von Jo Meister, JLU, ECCPS). Eine therapeutische Inhibition von TRP-Kanälen könnte mit einer verminderten Abwehrfunktion der Lunge sowie mit möglicherweise gehäuften Infektionen und Exazerbationen einhergehen.

Hinzu kommt, dass die in dieser Arbeit analysierten COPD-Proben von Patienten stammen, die für die Transplantation seit mindestens einem Jahr nicht mehr rauchen. Das Aufhören des Rauchens gilt als beste Methode, um die Progression der Erkrankung zu verlangsamen [339]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass COPD-Patienten, die mit dem Rauchen aufgehört haben, im Vergleich mit COPD-Patienten, die noch rauchen, ein verringertes bronchiales *Remodeling* aufweisen [181]. Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass die Hochregulation der Ca^{2+}-Kanäle bei COPD-Patienten, die nicht mehr rauchen, dazu beiträgt die Progression der Erkrankung zu verlangsamen.

Des Weiteren finden sich Assoziationen zwischen einzelnen TRP-Polymorphismen und der COPD. Für TRPV4 wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen nachgewiesen, welche mit einem höheren Erkrankungsrisiko für COPD assoziiert werden [412]. Außerdem

konnten *Naumov et al.* zeigen, dass TRPA1-Polymorphismen bei COPD-Patienten mit einer gesteigerten Bronchokonstriktion assoziiert sind [245]. Auch für TRPV1 wurde in der chinesischen Han Population ein Polymorphismus entdeckt, der mit der COPD/COPD-PH assoziiert ist [386]. Des Weiteren wurde in der idiopathischen PH ein TRPC6-Polymorphismus beschrieben, welcher mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergeht [401]. Wie sich der Polymorphismus auf die Funktion des Kanals auswirkt und ob dieser zu einer gesteigerten oder verringerten Aktivität und/oder Aktivierbarkeit führt, ist zum aktuellen Stand der Forschung nicht bekannt. Es bleibt unklar, inwiefern TRP-Kanäle eine krankheitsfördernde oder protektive Rolle bei der COPD spielen.

4.3 Die Rolle von Ca^{2+}-assoziierten Proteinen und Signalkaskaden in der Pathogenese der COPD

In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Expression der untersuchten TRP-Kanäle in COPD-Lungen und teilweise auch in Raucher-Lungen beobachtet werden. Außerdem konnte eine veränderte Regulation von VDCCs, SERCA und PMCA sowie STIM und ORAI in Raucher- und COPD-Lungen gezeigt werden und es wurde eine erhöhte absolute Ca^{2+}-Konzentration in COPD-Lungen detektiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Dysregulation in der Ca^{2+}-Homöostase eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der COPD spielt und Rauchen einen Einfluss auf diese hat. Daher wurden in einem nächsten Schritt Ca^{2+}-assoziierte Proteine, darunter Proteinkinasen wie die PKC oder die Ca^{2+}-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und Proliferationsmarker wie ERK1/2 und Cyclin D1 im Western Blot analysiert.

Proteinkinasen können sowohl über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration als auch über andere sekundäre Botenstoffe wie z. B. DAG und zyklisches Adenosinmonophosphat aktiviert werden [140, 226] **(Abbildung 21)**. Proteinkinasen werden ubiquitär exprimiert und sind Schlüsselproteine diverser Signalkaskaden. So aktivieren die PDK1 und die PKC u. a. die MEK/ERK Signalkaskade [300, 346] **(Abbildung 21)**, während die PKA durch die Regulation von c-Raf sowohl stimulierende als auch inhibierende Wirkung auf den Zellzyklus haben kann [55]. Die Proteinkinasen PDK1, PKC und PKA sind für Aktivierung und Migration von Immunzellen sowie Proliferation und Apoptose von immenser Bedeutung [138, 186, 399] und wurden schon im Zusammenhang mit Lungenerkrankungen, wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, Asthma und

COPD beschrieben [76]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine verstärkte Phosphorylierung von PDK1 und PKA, sowie ein verstärktes Signal für die Substrate der PKC in COPD-Lungen beobachtet. Da verschiedene Isoformen der PKC existieren [246], wurden die phosphorylierten Substrate der PKC untersucht. Die verstärkte Phosphorylierung der Substrate in COPD-Lungen könnte auf eine erhöhte Aktivität der PKC hindeuten und mit einer Induktion nachfolgender Signalkaskaden einhergehen. Für BECs wird beschrieben, dass eine Aktivierung der PKC mit der Sekretion von Zytokinen und Inflammation einhergeht [169]. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Exposition von humanen PASMCs mit CS-Extrakt, mit einer PKCα und Cyclin D1-abhängigen Proliferation einhergeht [385]. Außerdem kann eine erhöhte PKC- und Cyclin D1-Expression bei Rauchern mit und ohne COPD beobachtet werden [382]. Diese Ergebnisse deuten drauf hin, dass CS über die Aktivierung von PKC einen Einfluss auf die Proliferation einzelner Zelltypen haben könnte. In dieser Arbeit wurde allerdings nicht untersucht, welche Rolle die PDK1, PKA und PKC im Bezug auf die akute und chronische Inflammation und die bronchialen und pulmonal vaskulären *Remodeling* Prozesse spielen.

Die in dieser Arbeit beobachtet verstärkte Phosphorylierung von PDK1 und PKA und PKC-Substraten in COPD-Lungen hat wiederum einen Einfluss auf die Aktivität der Ca^{2+}-Kanäle. So kann z. B. eine aktivierte PKC die Aktivität von TRPC-Kanälen regulieren [353] und die PKA die Aktivität von TRPV1 und TRPA1 beeinflussen [152, 225]. Somit hat die verstärkte Phosphorylierung von Proteinkinasen in COPD-Lungen sowohl einen Einfluss auf *Downstream*-Signalkaskaden, als auch auf *Upstream*-Signalkaskaden **(Abbildung 21)**.

Ein weiteres wichtiges Protein in den Ca^{2+}-assoziierten Signalkaskaden ist Calmodulin [64]. Calmodulin hat zum einen Einfluss auf die Aktivität von Ca^{2+}-Kanälen, wie z. B. VDCCs und TRP-Kanäle [118, 414], zum anderen auch auf *Downstream* Signalkaskaden **(Abbildung 21)**. Bindet freies Ca^{2+} an Calmodulin, kann der Ca^{2+}-/Calmodulin-Komplex sogenannte Ca^{2+}-/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CaMK) durch Autophosphorylierung aktivieren [330]. Da für die Phosphorylierung von CaMK die Bindung des Ca^{2+}-/Calmodulin-Komplexes und damit freies Ca^{2+} im Intrazellularraum notwendig ist, könnte die verstärkte Phosphorylierung von CaMK ein Hinweis auf eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration sein. Daher wurde in dieser Arbeit die Expression von CaMKII im Lungenhomogenat untersucht. In COPD-Lungenwurde eine verstärkte Phosphorylie-

rung von CaMKII beobachtet. Aktiviertes CaMKII phosphoryliert Proteine, welche Inflammation [125, 189], Proliferation [141] und Apoptose [375] induzieren. In AECs führt eine Inhibition von CaMKII zu weniger Apoptose und reduziert eine Bleomycin-induzierte Fibrosierung [375]. Für PASMCs konnte gezeigt werden, dass CaMKII bei Proliferation und Migration eine wichtige Rolle spielt [141]. CaMKII könnte demnach in bronchiales sowie pulmonal vaskuläres *Remodeling* involviert sein und ein interessantes Zielprotein für weitere Untersuchungen und mögliche therapeutische Ansätze darstellen. Ein zweiter Aktivierungsweg der CaMKII ist die Aktivierung durch oxidativen Stress [272]. Da es im Lungengewebe von COPD-Patienten vermehrt zu oxidativem Stress kommt [26], ist dieser ebenfalls als Ursache für die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Phosphorylierung von CaMKII denkbar.

CAMKII aktiviert wiederum mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), die in drei Kinasen unterschieden werden können [143]. Die P38-mitogen aktivierten Proteinkinasen, die c-Jun-N-terminalen Kinasen und die extrazellulär signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) [65, 159, 308]. Die MAPK sind in inflammatorische Prozesse involviert [164, 178] und regulieren außerdem zentrale Prozesse wie Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose [50, 167]. So können TNF-α, Interleukine und Wachstumsfaktoren Signalkaskaden der MAPK und des nukleären Faktors κB aktivieren, welche in einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und bronchialem *Remodeling* resultieren [122, 407]. In der Literatur werden MAPK im Zusammenhang mit Lungenerkrankungen, wie dem Bronchialkarzinom, der Lungenfibrose, Asthma und COPD beschrieben [139, 262, 278, 354], weswegen MAPK-Inhibitoren mögliche therapeutische Zielproteine in der Behandlung der COPD darstellen [227].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Neben CaMKII kann die ERK1/2-Signalkaskade auch durch extrazelluläre Stimuli wie z. B. Inflammation, Wachstumsfaktoren oder Hypoxie über die Ras-Raf-MEK-Signalkaskade aktiviert werden [173, 374] **(Abbildung 21)**. ERK1/2 spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellzyklus. So führt die Aktivierung von ERK1/2 zur Induktion von Cyclin D1 und Cyclin D1 reguliert den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase [47]. Hierdurch wird die Proliferation von Zellen reguliert, weshalb die ERK1/2-Signalkaskade mit pulmonal vaskulärem *Remodeling* assoziiert wird [402, 404]. Im COPD-Ratten-Modell mit dreimonatiger Berauchung hatte eine intranasale Applikation von ERK1/2-siRNA eine Reduktion des pulmonal vaskulären *Remodelings* zur Folge,

dabei wurden eine geringere Wanddicke der Gefäße und weniger voll-muskularisierte Gefäße festgestellt [404]. Außerdem wird im CS-assoziierten Emphysem eine Hochregulation von ERK1/2 beschrieben [228]. Die in dieser Arbeit festgestellte verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 in Raucher- und COPD-Lungen deutet darauf hin, dass es bei COPD-Patienten und Rauchern vermehrt zu Proliferation von PASMCs und pulmonal vaskulärem *Remodeling* kommt. Da jedoch nicht alle Raucher an einer COPD oder PH erkranken, muss es protektive Mechanismen geben.

Die zyklisch exprimierten Cycline spielen eine essentielle Rolle in der Regulation des Zellzyklus und somit bei der Proliferation von Zellen [393]. Der Zellzyklus ist in vier Phasen unterteilt, die Gap Phase 1 (G1-Phase), die Synthesephase (S-Phase) die Gap Phase 2 (G2-Phase) und die Mitosephase. In der G1-Phase kommt es zur Proteinbiosynthese, in der S-Phase kommt es zu DNA-Verdopplung und in der G2-Phase steht die Vorbereitung der Mitose und die Synthese mitosespezifischer Proteine im Vordergrund. Beim Übergang von der G1- in die S-Phase, beim Übergang von der G2- in die Mitosephase und während der Mitosephase gibt es Restriktionspunkte, die dem Schutz der Integrität des Erbguts und dem Schutz vor maligner Entartung dienen. Für das Passieren dieser Restriktionspunkte ist die Bildung von Komplexen zwischen den zyklisch exprimierten Cyclinen A, B, D1-3 und E mit jeweils spezifischen Cyclin-abhängigen Kinasen notwendig [393]. In dieser Arbeit wurden Cyclin D1 und Cyclin E im homogenisierten Lungengewebe untersucht. Die Expression von Cyclin D1 wird mit Proliferation assoziiert [321] und kann u. a. durch die ERK1/2-Signalkaskade [47, 277] und PKC [271] induziert werden **(Abbildung 21)**. Während des Zellzyklus´ unterliegen die Expressionslevel von Cyclin D1 Schwankungen, eine erhöhte Cyclin D1-Expression ist in der G1-Phase und für den Beginn der S-Phase essentiell. In der S-Phase ist für die DNA Synthese dann eine niedrigere Cyklin D1-Konzentration notwendig, bevor sie in der G2-Phase wieder ansteigt [321, 391]. In dieser Arbeit wurde eine erhöhte Expression von Cyclin D1 in COPD-Lungen beobachtet. Diese Ergebnisse decken sich mit in der Literatur beschriebenen Daten, in denen eine Hochregulation von Cyclin D1 bei einer CS-assoziierten Proliferation von PASMCs beobachtet wird [364, 385]. Eine Hochregulation von Cyclin D1 kann außerdem mit bronchialem und pulmonal vaskulärem *Remodeling* assoziiert werden [101, 382, 411].

Außerdem wurde in dieser Arbeit auch die Expression von Cyclin E analysiert. Cyclin E ist für den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase von Bedeutung, daher ist Cyclin

E nur vom Ende der G1-Phase bis zum Ende der S-Phase exprimiert [236]. Die Expression von Cyclin E kann durch aktiviertes ERK1/2 induziert werden. Die ERK1/2- und Cyclin E-Signalkaskade wird in der Literatur mit pulmonal vaskulärem *Remodeling* assoziiert und es konnte eine Hochregulation von ERK1/2 und Cyclin E in PASMCs von Ratten, welche CS ausgesetzt waren, festgestellt werden [402]. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit, in Raucher- und COPD-Lungen eine niedrigere Expression von Cyclin E im Vergleich zu Donoren beobachtet. Die verminderte Expression von Cyclin E deutet darauf hin, dass sich die Mehrzahl der Zellen in nicht in der Transition von der G1- in die S-Phase befinden. Die Cycline A und B wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

In der Regulation der Cycline D1 und E spielt CDC25A eine wichtige Rolle, indem es sowohl den Komplex aus Cyclin D1 und zugehöriger Kinase, als auch den Cyclin E/Kinase-Komplex aktivieren kann [312]. CDC25A wiederum kann u. a. durch ERK1/2 aktiviert werden [357] (**Abbildung 21)**. Eine erhöht Expression von CDC25A wird in der Literatur im Zusammenhang mit verschiedenen Tumorarten wie dem hepatozellulären Karzinom [387] oder dem kleinzelligen Bronchialkarzinom beschrieben [185]. Die in dieser Arbeit beobachte verstärkte Expression von CDC25A deutet darauf hin, dass sowohl in Raucher-als auch in COPD-Lungen Zellen vermehrt proliferieren.

Da in dieser Arbeit eine verstärkte Expression der Proliferationsmarker ERK1/2 und Cyklin D1 sowie CDC25A in Raucher- und COPD-Lungen beobachtet wurde, wurde abschließend im Hinblick auf das pulmonal vaskuläre *Remodeling* der Effekt von CS auf die Proliferation von PASMCs untersucht. In der Literatur konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Exposition mit CS-Extrakt zu einer Proliferation von PASMCS führt [364, 366]. Da COPD-Patienten meist über Jahre hinweg geraucht haben und somit chronisch dem CS ausgesetzt waren, wurde in dieser Arbeit PASMCs für 120 Stunden mit CS-Extrakt inkubiert. Interessanterweise wurde beobachtet, dass es zu einer verminderten Proliferation der PASMCs nach 120 Stunden Inkubation mit CS in Monokultur kommt. Eine ähnliche Beobachtung machten auch *Roxlau et al.*, die eine verminderte Proliferation von humanen PASMCs und murine PASMCs nach Exposition mit E-Zigarettenrauch beobachteten [283]. Da PASMCs nicht isoliert in der Lunge vorkommen, sondern in ständiger Interaktion mit ihrer Umgebung sind, wurden PASMCs nach der Exposition mit CS-Extrakt zusätzlich mit einem zweiten Faktor (Hypoxie oder Epithelzellmedium) be-

handelt, wobei eine verstärkte Proliferation der Zellen beobachtet wurde. Dies deutet darauf hin, dass CS auf PASMCs eine toxische Wirkung hat und es nur in der Interaktion mit anderen Zellen zur Proliferation kommt. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Komplexität der COPD sowie die Schwierigkeiten von Zellversuchen, in denen die Zellen isoliert betrachtet werden.

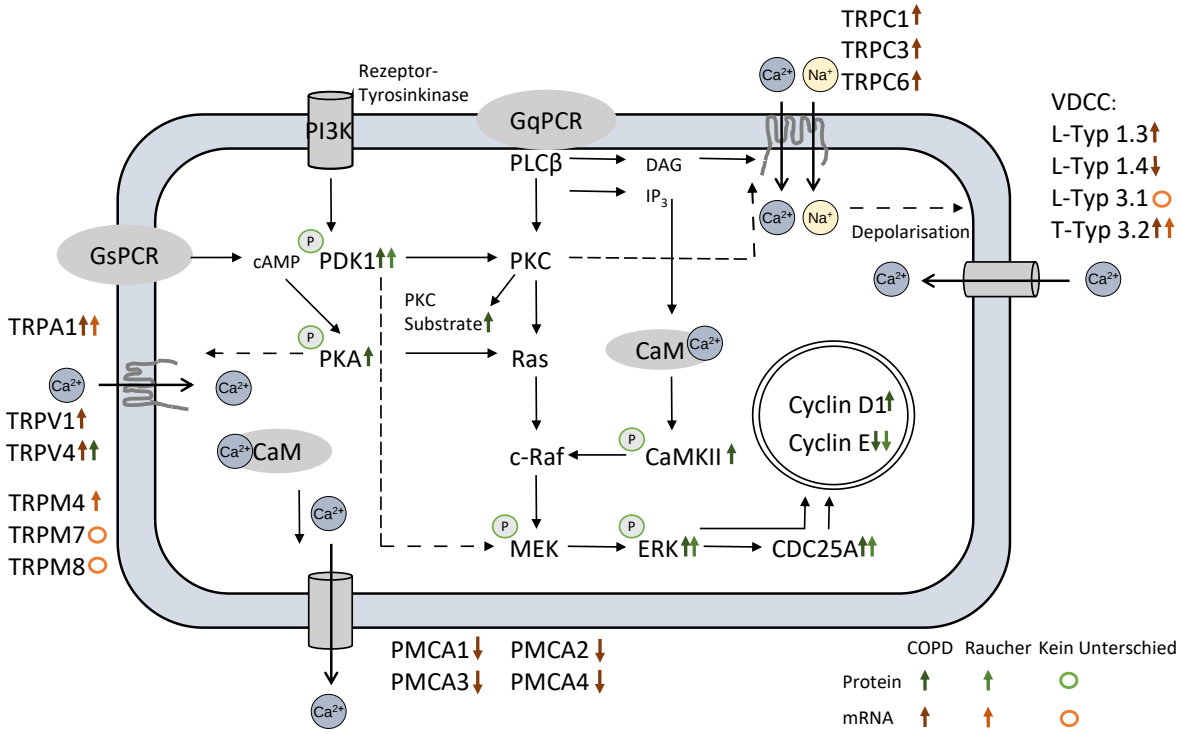


Abbildung 21: Zusammenfassung der Regulation der analysierten Ca^{2+}-assoziierten Proteine und mögliche Signalkaskaden in humanen Lungenhomogenaten.
Es wurde eine verstärkte Phosphorylierung von Proteinkinasen (PKC, PKA, PDK1 und CaMKII) sowie eine Hochregulation der für den Zellzyklus essentiellen Proteine ERK1/2, CDC25A und Cyclin D1 in Raucher- bzw. COPD-Lungen beobachtet. Diese Ergebnisse und die möglichen Signalkaskaden sind in dieser Abbildung zusammengefasst. CaM: Calmodulin, CaMKII: Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, DAG: Diacylglycerol, ERK1/2: extrazelluläre signalregulierte Kinasen 1 und 2, GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor *(G-protein coupled receptor)*, P (grüner Kreis) phosphoryliertes Protein, PDK1: Phosphoinositid-abhängige Kinase-1, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PKA: Proteinkinase A, PKC: Proteinkinase C, PLC: Phospholipase C, PMCA: Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase, TRP: *transient receptor-potential*, VDCC: *voltage-dependend Ca^{2+}-channels*, Pfeil nach oben: erhöhte Expression, Pfeil nach unten: erniedrigte Expression, Kreis: kein signifikanter Unterschied in der Expression, grün: Ergebnisse der Versuche im Western Blot, orange: Ergebnisse der Versuche in der RTqPCR.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit neben einer Dysregulation von Ca^{2+}-Kanälen auch eine veränderte Expression der untersuchten Ca^{2+}-assoziierten Proteine be-

obachtet. Dabei konnte in Raucher- und COPD-Lungen für die PKA, PDK1, PKC-Substrate sowie für CaMKII eine verstärkte Phosphorylierung gezeigt werden. Auch die Proliferationsmarker ERK1/2 sowie Cyclin D1 waren in Raucher- und COPD-Lungen hochreguliert, Cyclin E war hingegen in Raucher- und COPD-Lungen vermindert exprimiert **(Abbildung 21)**.

Die in dieser Arbeit festgestellte verstärkte Expression von Ca^{2+}-Kanälen, könnte zu einer Erhöhung der intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration führen, welche wiederum eine Aktivierung von Proteinkinasen zur Folge hat [140, 226, 330]. Über die Aktivierung der PKC könnte es zu einer vermehrten Sekretion proinflammatorischer Zytokine kommen. Über die Signalkaskade PKC/Ras/MEK/ERK/CDC25A/Cyclin D1 könnte es in bronchialen SMCs und PASMCs zu einer verstärkten Proliferation und so zu bronchialen und pulmonal vaskulären *Remodeling* kommen. Diese zellulären Prozesse könnten zu einer Inflammation, Destruktion der Alveolarsepten, bronchialem sowie pulmonal vaskulärem *Remodeling* führen und zur Entstehung einer COPD beitragen, welche sich klinisch mit einer Obstruktion der Atemwege, einem Emphysem und einer Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks äußert.

4.4 Kritische Auseinandersetzung mit dem verwendeten Modell

In der vorliegenden Arbeit wurde humanes Lungengewebe von nicht an COPD erkrankten Spendern (Donoren) und Rauchern sowie von an COPD erkrankten Patientenproben molekularbiologisch analysiert. Untersuchungen an humanen Lungenproben haben Vorteile gegenüber den häufig angewandten Tiermodellen wie z. B. der Maus. Die Komplexität der COPD ist im Tiermodel schwer zu erfassen und Ergebnisse können nicht ohne Einschränkungen auf an COPD erkrankte Patienten übertragen werden. Insbesondere die unterschiedlichen Manifestationen der COPD wie chronische Bronchitis, Emphysem und PH können in einem einzelnen Tiermodell schwer erfasst werden [335, 379]. Während Versuchstiere unter kontrollierten Bedingungen heranwachsen, haben diverse Umwelteinflüsse langfristige Effekte auf die Lunge, so hat z. B. der Kontakt zu Haustieren Einfluss auf die Entstehung von Asthma [13]. Diese Faktoren unterscheiden sich von Patient zu Patient, sodass die Kohorte an COPD-Patienten im Vergleich zu Versuchstieren sehr heterogen ist. Außerdem sind die Tiere über einen begrenzten Zeitraum (Monate) dem CS kontinuierlich ausgesetzt, während Raucher über Jahre hinweg kurze intermittierende

Phasen der CS-Exposition erfahren. Des Weiteren müssen bei der Forschung am Mausmodel anatomische Unterschiede sowie Differenzen in der Funktion den Immunsystems zwischen Mensch und Tier beachtet werden [286, 335].

Die Arbeit mit humanen Lungenhomogenaten ist ebenfalls mit Einschränkungen verbunden. Bei der chirurgischen Entnahme der Lungen kommt es zur kurzzeitigen Ischämie und die Zeitspanne zwischen Organentnahme und Aufbewahrung der Proben ist essentiell. Nicht nur Hypoxie-assoziierte Gene, sondern auch Gene des Zytoskeletts, Zellzyklus, Apoptose und Inflammation können von Veränderungen betroffen sein [247, 320]. Insbesondere posttranslational phosphorylierte Proteine sind instabil [15]. Der Einfluss der Ischämie auf die Stabilität diverser Gene und auf die Protein-Expression wird in der Literatur kontrovers diskutiert und könnte auch Einfluss auf die in dieser Arbeit untersuchten Proteine haben [71, 111, 153].

Eine weitere Schwierigkeit bei der Verwendung von humanen Lungenproben sind häufig fehlende Angaben zum GOLD-Stadium der COPD-Patienten, deren Spirometrie-Parametern sowie zum Rauchverhalten der Raucher *(Packyears)* oder zu Begleiterkrankungen. Insbesondere das Rauchverhalten ist schwer zu beurteilen und unterscheidet sich wahrscheinlich deutlich zwischen den einzelnen Patienten-Proben. Es ist durchaus möglich, dass auch Donoren vor Jahren einmal geraucht haben oder Cannabiskonsum nicht als Rauchen angegeben wird. Dies erschwert den Vergleich innerhalb und zwischen den Gruppen zusätzlich und hat eine hohe Streuung der Daten zur Folge. In den durchgeführten Versuchen in der RTqPCR und im Western Blot wurden von den Proben wiederum nur jeweils 15-30 µg analysiert. Es ist demnach anzunehmen, dass sich die Verteilung von Alveolen, Bronchien und Gefäßen und damit auch das Vorkommen der verschiedenen Zellpopulationen in den jeweiligen Proben deutlich unterscheidet.

Unabhängig von der Verwendung von humanen Proben oder Proben vom Tiermodel ist die Analyse von Lungenhomogenaten mit Einschränkungen verbunden. Lungenhomogenate bestehen aus einer Vielzahl verschiedener Zellen, wozu A/BECs, bronchiale SMCs, PASMCs und Fibroblasten sowie Immunzellen wie z. B. Makrophagen gehören [335]. Infolgedessen ist es nicht möglich aus den Ergebnissen der molekulargenetischen Untersuchungen Rückschlüsse auf veränderte Signalkaskaden in definierten Zelltypen zu ziehen. Es kann zu Fehlinterpretationen kommen, da eine scheinbare Regulation oder Nicht-

Regulation auch durch das vermehrte oder verminderte Vorkommen eines Zelltyps zustande kommen kann. Somit können falsch positive oder falsch negative Ergebnisse entstehen.

Ein klareres Bild erhält man durch die Laser-Mikrodissektion, bei der Gefäße, Bronchien und Septen mit Hilfe eines Laser aus dem Lungengewebe ausgeschnitten werden und hierdurch die Strukturen einzeln analysiert werden können. Doch auch hierbei sind Einschränkungen zu beachten. Durch die Dissektion mit dem Laser bei hohen Temperaturen kann es zur Zerstörung von Lungengewebe und RNA sowie zur Denaturierung von Proteinen kommen. Des Weiteren sind die Lungenblöcke nicht mit einem Protease-/RNase-Inhibitor versetzt, weshalb bei langer Aufbewahrung und wiederholtem Auftauen und Einfrieren von einer teilweisen Degradierung von RNA und Proteinen auszugehen ist.

Nicht zuletzt ist die Frage nach der Spezifität der verwendeten Primer und Antikörper in der vorliegenden Arbeit zu diskutieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden teilweise zuvor in unserem Labor von Kollegen auf Spezifität getestet und etabliert. Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit designten Primer wurden mittels Schmelzkurve analysiert und mittels Gelelektrophorese wurde die Größe der amplifizierten Fragmente überprüft. Die Spezifität der Antikörper wurde mit Hilfe von siRNA (z. B. TRP-Antikörper) und *Pathway*-Inhibitoren (z. B. Anti-phospho-PKC) untersucht. Bei Antikörpern welche aus der Literatur bekannt waren und bei denen eine klar identifizierbare Bande in der gesuchten Größe wie z. B. bei ERK1/2 detektiert wurden, wurde von einer spezifischen Bindung ausgegangen. Nichtdestotrotz kann bei einzelnen Primern und Antiköpern eine mögliche unspezifische Bindung nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend ist es von essentieller Bedeutung die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit vor dem Hintergrund, der hier erläuterten limitierenden Faktoren, zu betrachten.

4.5 Ausblick auf weiterführende Experimente

Für die COPD gibt bis heute keine Therapieoptionen, welche die fortschreitende Abnahme der Lungenfunktion langfristig verhindern oder pathologische Veränderungen der Lungenstrukturen rückgängig machen könnten [105]. Die Identifizierung neuer Signalkaskaden und ein tieferes Verständnis der Pathomechanismen, die bei der Entstehung der COPD eine Rolle spielen, sind daher essentiell für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Seit einigen Jahren werden TRP-Kanäle als mögliche Zielstrukturen bei Atemwegserkrankungen wie Asthma und COPD diskutiert [16], vielversprechend sind z. B. Ansätze mit TRPA1- oder TRPV1-Antagonisten gegen den chronischen Husten [35]. Strukturelle Ähnlichkeiten der TRP-Kanäle untereinander erschweren jedoch eine spezifische Inhibition oder Aktivierung der Kanäle. Daher ist es auch notwendig andere mit Ca^{2+}-assoziierte Signalkaskaden zu untersuchen. In diesem Zusammenhang werden beispielsweise Proteinkinaseinhibitoren diskutiert [73].

In der hier verfassten Arbeit wurde homogenisiertes Lungengewebe analysiert sowie mikrodissektierte Gefäße, Bronchien und Septen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Ca^{2+}-Kanälen und weiterer Ca^{2+}-assoziierter Proteine in COPD-Lungen verändert ist. Bei molekulargenetischen Untersuchungen im Lungenhomogenat ist es nicht möglich Rückschlüsse auf veränderte Signalkaskaden in definierten Zelltypen zu ziehen. Um genauere Kenntnis über die Regulation der hier identifizierten Zielproteine zu erlangen, sind daher Untersuchungen in einzelnen Zelltypen notwendig. Hierbei ist es nötig molekulargenetische Expressionsanalysen der TRP-Kanäle und anderer Ca^{2+}-assoziierter Proteine in spezifischen isolierten Zellen, z. B. Makrophagen, A/BECS, bronchiale SMCs oder PASMCs, durchzuführen. Neben der Analyse einzelner Zelltypen ist es weiterhin notwendig Experimente in Co-Kulturen unter CS-Exposition durchzuführen, um die Interaktion der einzelnen Zelltypen im Zellverband der Lunge besser zu verstehen.

Neben der Regulation der Expression von Ca^{2+}-Kanälen ist auch die Funktion der Kanäle entscheidend. Es ist nicht bekannt, ob Ca^{2+}-Kanäle wie z. B. TRP-Kanäle unter pathologischen Bedingungen vermehrt oder vermindert aktiviert sind. Um Einblicke in die Funktion von TRP-Kanälen zu gewinnen, ist es möglich durch siRNA eine Inhibition zu erreichen. In dieser Arbeit konnte die Spezifität von siRNA für TRPV4 gezeigt werden. Hierdurch werden weitere Zellversuche ermöglicht, in denen die Funktion dieser Ca^{2+}-Kanäle in der CS-assoziierten COPD untersucht werden kann. Durch die Inhibition einzelner TRP-Kanäle mittels siRNA in Makrophagen oder neutrophile Granulozyten könnte die

Funktion von TRP-Kanälen im Zusammenhang mit der pulmonalen Inflammation untersucht werden und es könnte beispielsweise die Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-8) nach CS-Exposition analysiert werden. Im Zusammenhang mit bronchialem und pulmonal vaskulären *Remodeling* wären Zellversuche mit bronchialen SMCs und PASMCs wichtig, um den Einfluss einer Inhibition von TRP-Kanälen auf das Proliferationsverhalten der Zellen zu untersuchen. Sowohl in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, als auch in bronchialen SMCs und PASMCs sollte im Zusammenhang mit der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und der Proliferation außerdem die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die Komplexität der COPD und zeigt, wie viele verschiedene Ca^{2+}-Kanäle und Ca^{2+}-assoziierte Proteine in COPD-Lungen verändert sein können. Dies deckt sich mit der Diversität an klinischen Erscheinungsbildern, die bei COPD-Patienten beobachtet werden. So unterscheiden sich die Patienten in der Ausprägung von Inflammation, Obstruktion und Emphysem sowie den Komorbiditäten. Ein möglicher Ansatz in der Zukunft könnte sein, über Patientenregister die große heterogene Gruppe an COPD-Patienten einzelnen Gruppen zuzuordnen. In diesen Gruppen könnte dann die Erforschung der vorherrschenden zugrundeliegenden Pathomechanismen erfolgen und den Patienten könnten je nach vorliegenden klinischen und molekulargenetischen Pathomechanismen spezifischere Therapien angeboten werden.

5 Zusammenfassung

Für die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructiv pulmonary disease*, COPD) gibt es bis dato keine Therapieoptionen, welche die Progression aufhalten bzw. die Erkrankung heilen könnten. Bei der COPD kommt es zu einer chronischen Inflammation der Atemwege, welche mit einer Destruktion der Alveolarsepten sowie mit bronchialem und pulmonal vaskulärem *Remodeling* einhergeht. Es können Akkumulation von Immunzellen, peribronchialer Fibrose, Hypertrophie submuköser Drüsen und Proliferation von bronchialen glatte Muskelzellen sowie eine Verdickung von *Intima* und *Media* der pulmonalen Gefäße und Proliferation von pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen (PASMCs) beobachtet werden. In die Veränderungen sind sowohl Immunzellen, als auch alveolare und bronchiale Epithelzellen, bronchiale glatte Muskelzellen und PASMCs involviert. Die zellulären Veränderungen resultieren im klinischen Bild einer COPD mit Emphysem, Obstruktion der kleinen Atemwege und pulmonaler Hypertonie. Die komplexen Pathomechanismen der COPD sind bis dato noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Exposition mit Zigarettenrauch, welcher als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer COPD gilt, hat Einfluss auf die Aktivierung von Immunzellen, Sekretion von Zytokinen, Proliferation und Kontraktion einzelner Zelltypen. In diesen Prozessen spielt Ca^{2+} als ubiquitär vorkommender Botenstoff eine wichtige Rolle, weshalb in der vorliegenden Arbeit die Expression von Ca^{2+}-Kanälen, mit besonderem Fokus auf die Familie der Transient- Rezeptor-Potential (TRP)-Kanäle sowie Ca^{2+}-assoziierten Proteinen, untersucht wurde.

Dabei konnte in dieser Arbeit in COPD-Lungen eine verstärkte Expression von TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPV1, TRPV4 und TRPA1 beobachtet werden. TRPV1 und TRPA1 waren dabei auch im Lungengewebe von Rauchern verstärkt exprimiert. Außerdem zeigte sich eine erhöhte Expression der spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanäle (L-Typ 1.3 und T-Typ 3.2), der Ca^{2+}-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) und des Ca^{2+}-aktivierbaren Ca^{2+}-Kanalprotein (ORAI1 und ORAI3). Das stromale Interaktionsmolekül (STIM1 und STIM2) war in COPD-Lungen vermindert exprimiert, ebenso die Plasmamembran Ca^{2+}-ATPasen (PMCA1 bis 4). Bei der weiteren Analyse Ca^{2+}-assoziierter Proteine konnte eine verstärkte Phosphorylierung der untersuchten

Proteinkinasen und der mit Proliferation assoziierten Proteine, der extrazellulär signalregulierten Kinase 1/2 (ERK1/2) und Cyclin D1 in Raucher- und COPD-Lungen beobachtet werden.

In der Analyse der Ca^{2+}-Messungen konnte eine erhöhte absolute Ca^{2+}-Konzentration in COPD-Lungen detektiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine 120-stündige Exposition von PASMCs mit Zigarettenrauch-Extrakt in Kombination mit einem sekundären Faktor (Hypoxie oder Epithelzellmedium) zu einer verstärkten Proliferation der Zellen führt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die COPD mit einer Dysregulation verschiedener Ca^{2+}-Kanäle sowie weiterer Ca^{2+}-assoziierter Proteine im Lungengewebe assoziiert ist. Des Weiteren ist bei einigen Proteinen auch eine veränderte Regulation bei Rauchern zu beobachten, was auf einen Effekt des Zigarettenrauchs hindeutet. Um aus diesen Erkenntnissen neue therapeutische Ansätze zu entwickeln, bedarf es jedoch noch weiterer Forschung.

6 Summary

There are currently no therapeutic options available to cure chronic obstructive pulmonary disease (COPD). COPD is characterized by chronic airway inflammation with destruction of the airway alveoli and bronchial and pulmonary vascular remodeling. Accumulation of immune cells, airway thickening with peribronchial fibrosis, hypertrophy of submucosal glands, proliferation of bronchial smooth muscle cells may be observed. Remodeling also occurs in the pulmonary vasculature and thickening of the intima and media can be observed. These modulations involve immune cells, alveolar and bronchial epithelial cells, bronchial smooth muscle cells and pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs). The alterations in cellular function result in emphysema, small airway obstruction and pulmonary hypertension. The complex pathomechanisms of COPD have not yet been fully elucidated. It is known that exposure to cigarette smoke, which is considered as a major risk factor for COPD, influences the activation of immune cells, secretion of cytokines, proliferation, and contraction of individual cell types. Many of the underlying mechanisms are Ca^{2+}-dependent, therefore the present work investigated the expression of Ca^{2+}-channels with a special focus on the family of transient receptor potential proteins (TRP) and Ca^{2+}-associated proteins in COPD.

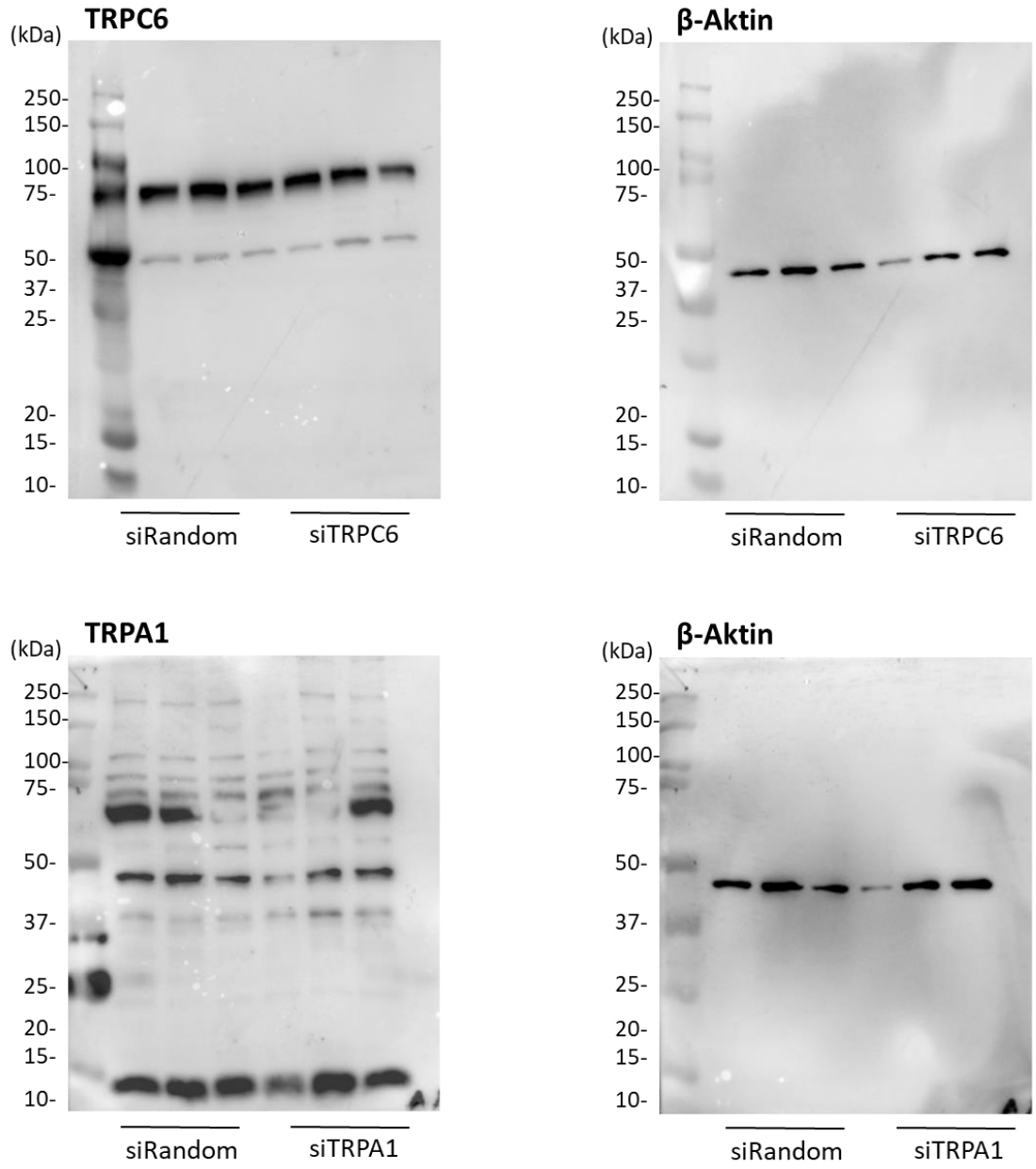
In this work, increased expression of TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPV1, TRPV4 and TRPA1 was observed in COPD-lungs. Furthermore, TRPA1 expression and TRPV1 expression were also increased in the lung tissue of smokers. Additionally, an increased expression of voltage-gated Ca^{2+}-channels (L-type 1.3 and T-type 3.2), sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA) and Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel protein (ORAI1 and ORAI3) was observed. At the same time, the expression of stromal interaction molecule (STIM1 and STIM2) and plasma membrane Ca^{2+}-ATPases (PMCA1 to 4) was reduced in COPD-lungs. The analysis of Ca^{2+}-associated proteins revealed an increased phosphorylation of the investigated protein kinases and proteins associated with proliferation, the extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) and cyclin D1 in smoker- as well as in COPD-lungs.

The Ca^{2+}-measurements showed a significant increase of Ca^{2+}-concentration in COPD-lungs. Through experiments with human PASMCs it was also shown that 120 hours exposure to cigarette smoke extract and incubation with a secondary factor (hypoxia or smoked epithelial cell medium) leads to an increased proliferation of cells.

In conclusion, COPD can be associated with dysregulation of several Ca^{2+}-channels and other Ca^{2+}-associated proteins in lung tissue. For some proteins, an altered regulation can already be observed in smokers, which emphasizes the importance of cigarette smoke in the pathogenesis of COPD. However, to develop new therapeutic approaches further in-depth research is needed.

7 Anhang

Abbildung 22: Western Blots PASMCs mit TRPC6- (100 kDa), TRPA1- (100-130 kDa) und TRPV4- (100 kDa) Antikörper



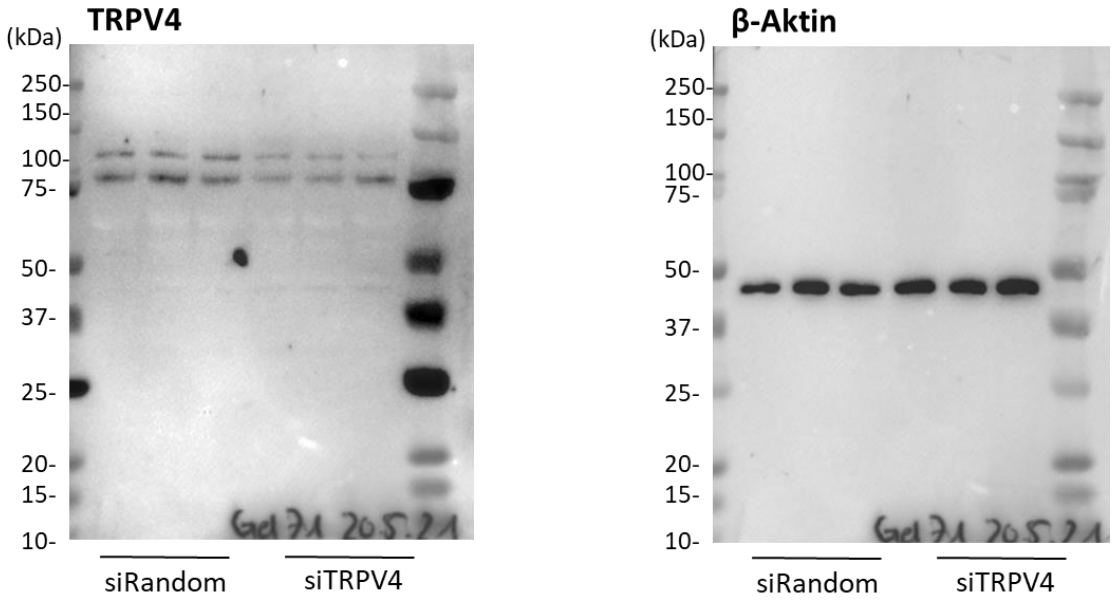
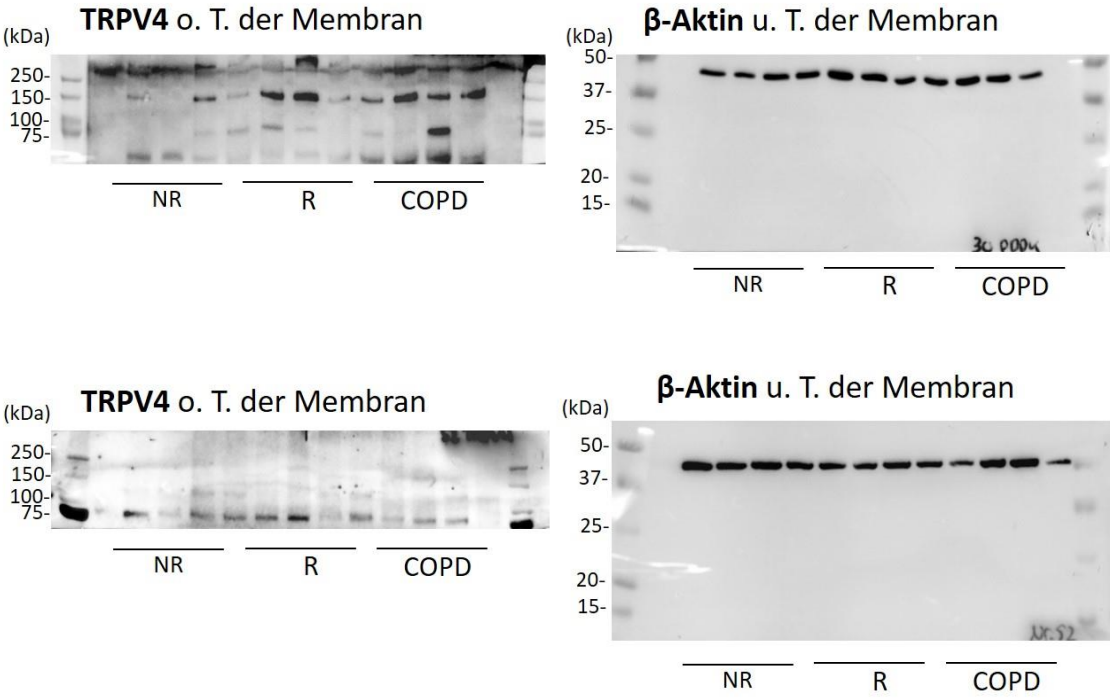


Abbildung 22 zeigt die Untersuchung der Spezifität von TRPC6, TRPA1 und TRPV4 mit Hilfe von siRNA. Für die TRPC6- und TRPA1-Antikörper konnte keine Spezifität gezeigt werden. Für TRPV4 konnte eine Herunterregulation nach Inkubation mit siTRPV4 und damit die Spezifität des TRPV4-Antikörpers gezeigt werden.

Abbildung 23: Western Blots mit TRPV4-Antikörper (100 kDa)



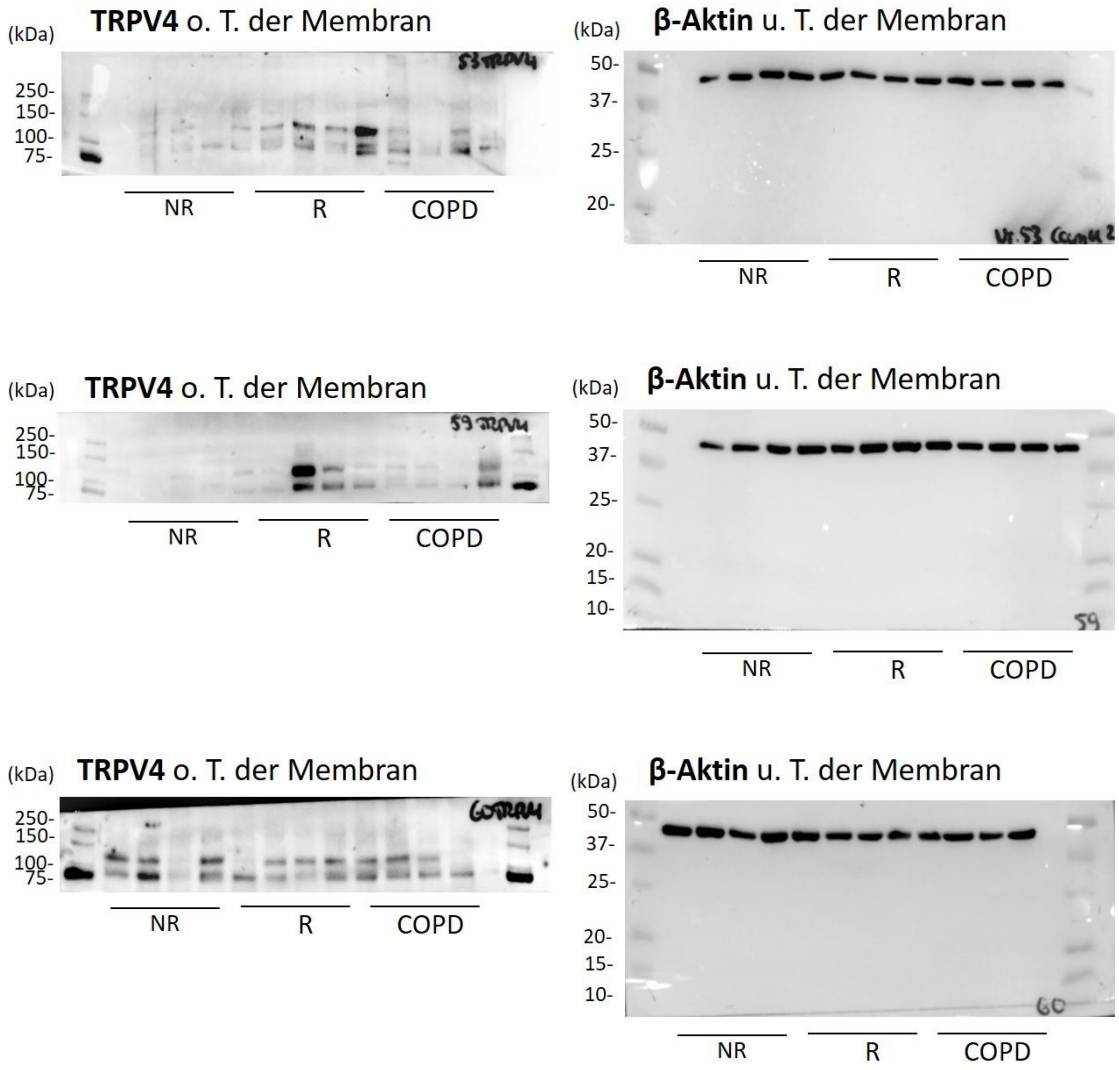
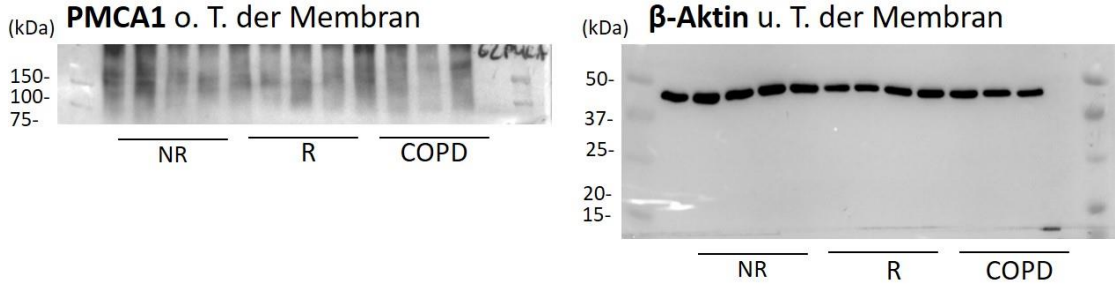


Abbildung 23 zeigt die Untersuchung der TRPV4-Expression in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. Es wurde eine verstärkte Expression von TRPV4 in COPD-Lungen beobachtet.

Abbildung 24: Western Blots mit PMCA1- und PMCA4-Antikörper (130 kDa)



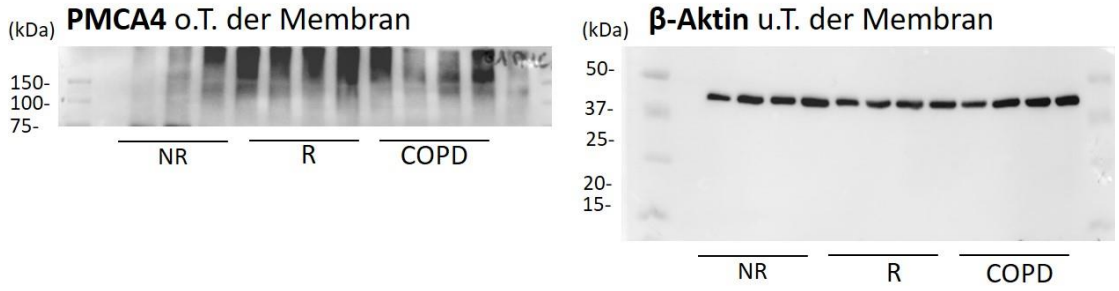


Abbildung 24 zeigt die Untersuchung vom PMCA1 und PMCA4 in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. Hierbei zeigten sich die Antikörper als nicht spezifisch und es wurden keine Banden detektiert, so dass diese Western Blots nicht ausgewertet wurden.

Abbildung 25: Western Blots mit SERCA2-Antikörper (114, 140 kDa)

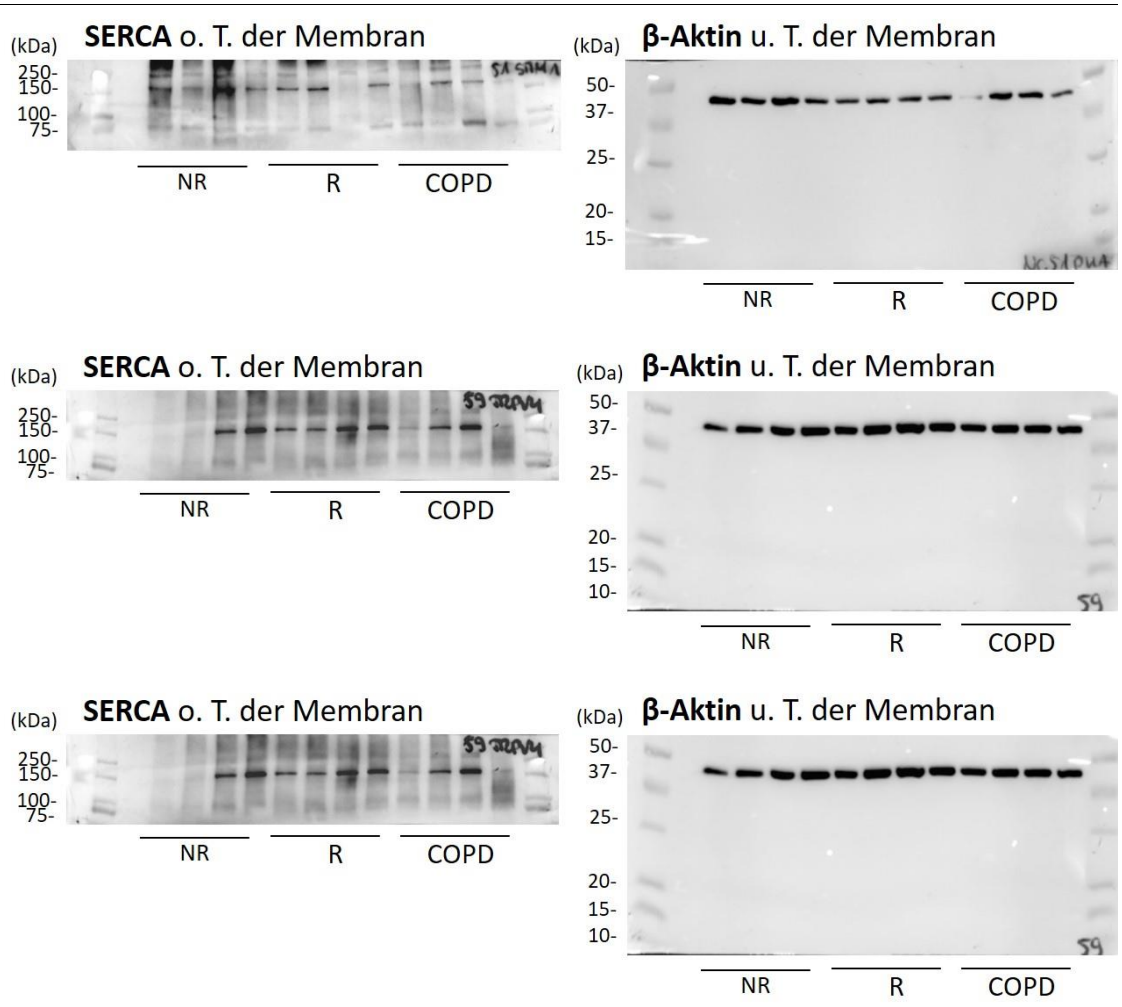


Abbildung 25 zeigt die Untersuchung von SERCA2 in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. Es wurden keine Unterschiede in der Expression zwischen den Gruppen beobachtet.

Abbildung 26: Western Blots mit STIM1-Antikörper (85 kDa)

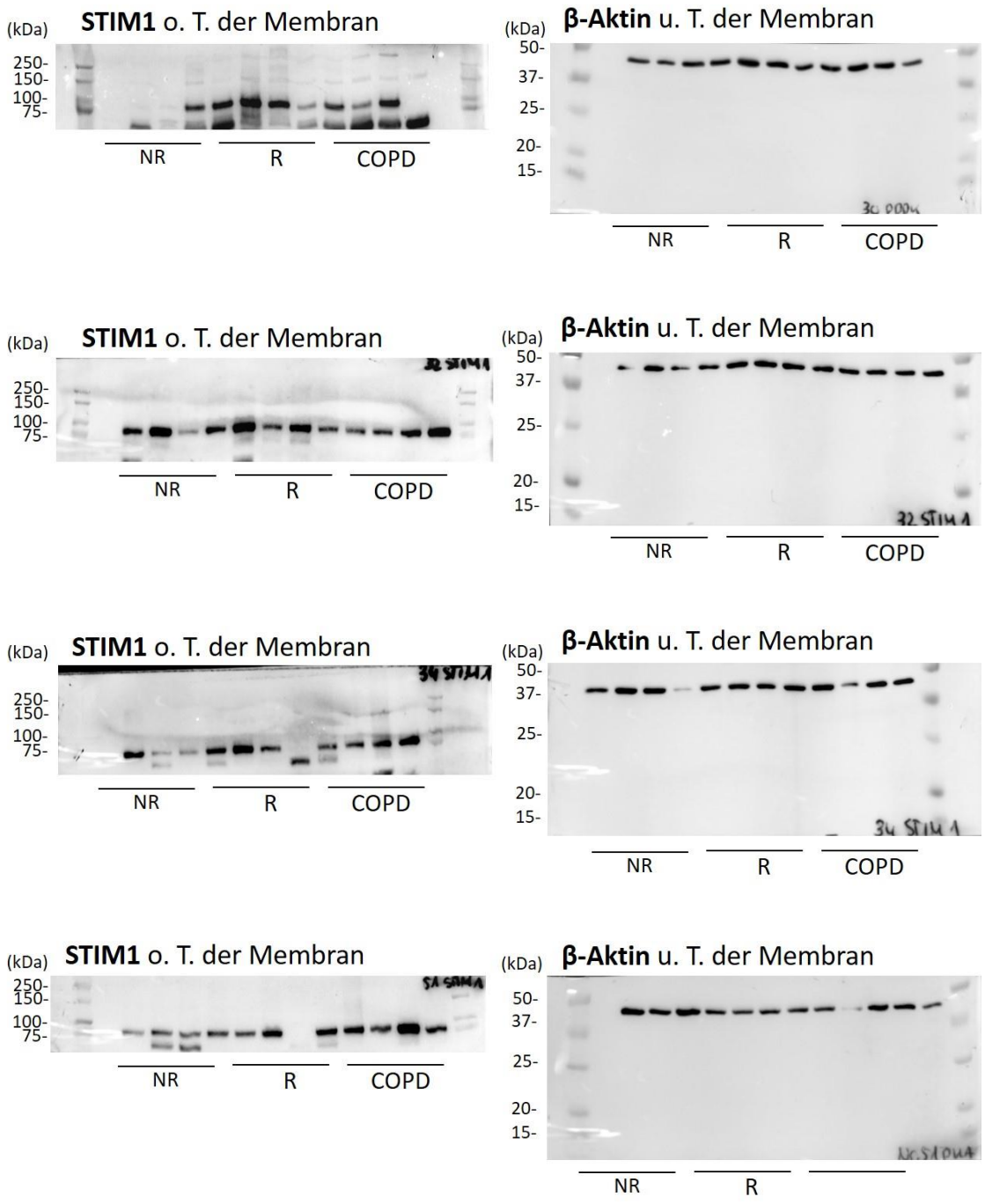


Abbildung 26 zeigt die Untersuchung von STIM1 in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. Es wurden keine Unterschiede in der Expression zwischen den Gruppen beobachtet.

Abbildung 27: Western Blots mit p-PDK1-Antikörper (58-68 kDa)

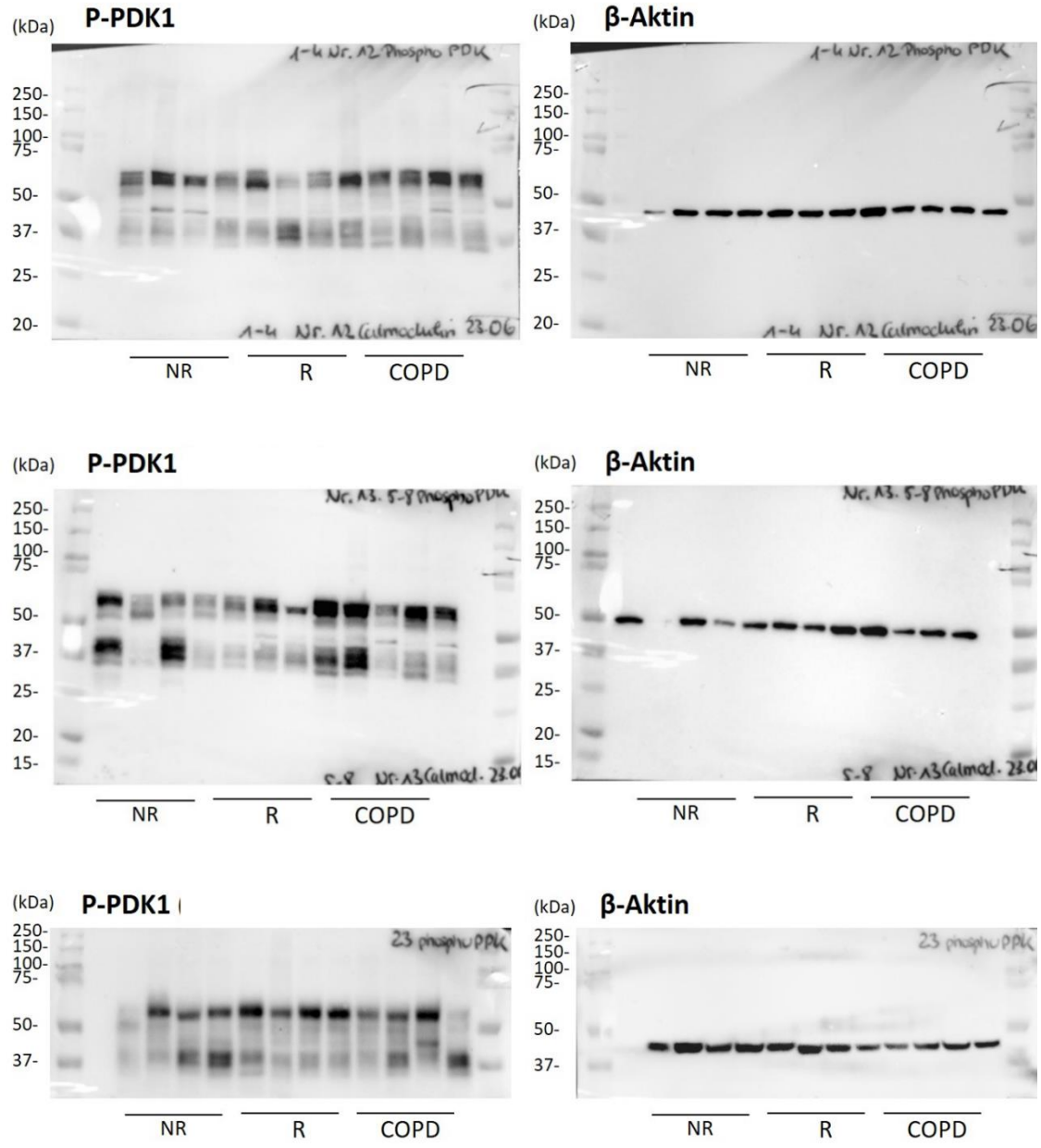


Abbildung 27 zeigt die Untersuchung von phosphorylierter PDK1 in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. In COPD-Lungen wurde eine verstärkte Expression von phosphorylierter PDK1 beobachtet.

Abbildung 28: Western Blots mit p-PKC-Substrat-Antikörper

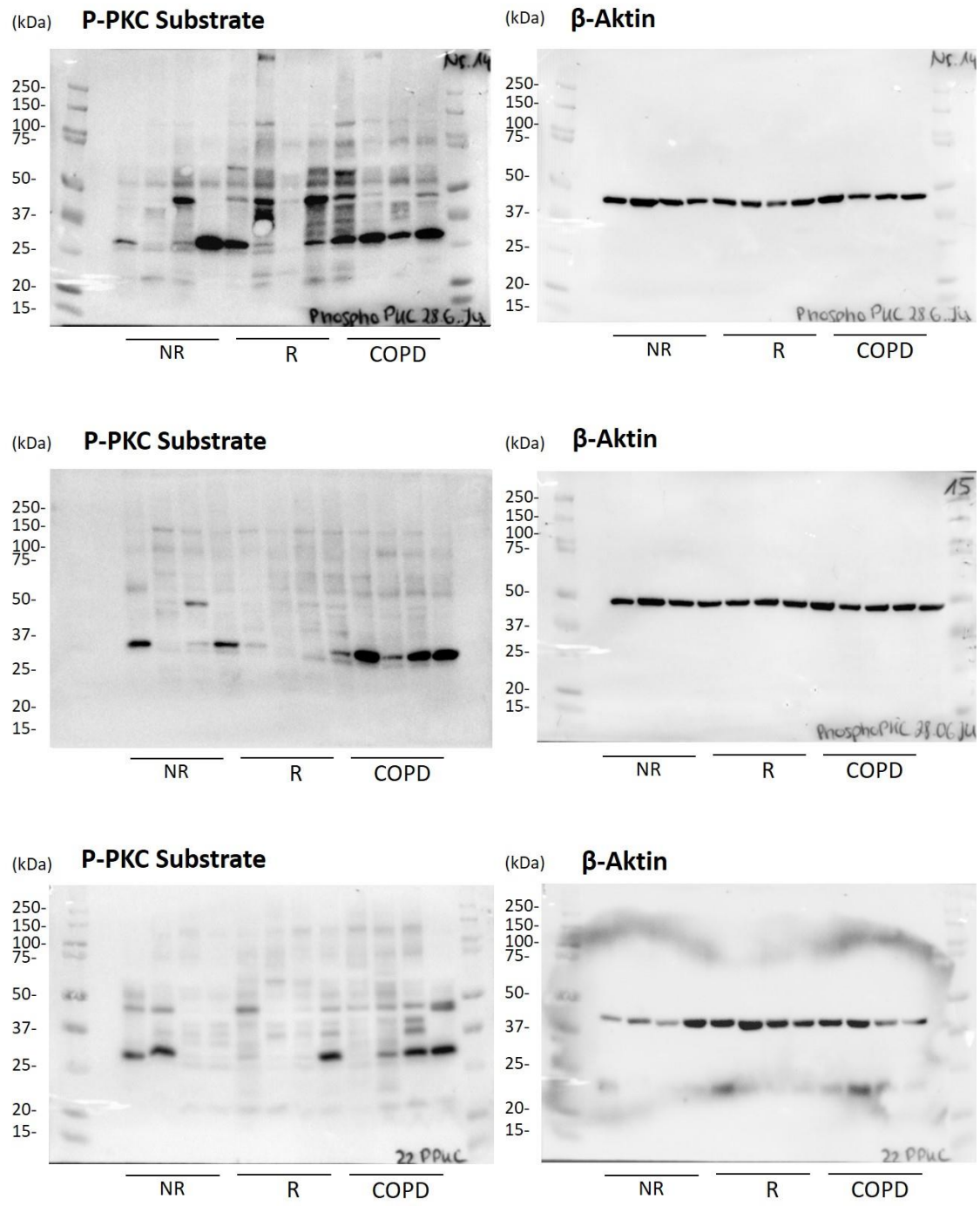


Abbildung 28 zeigt die Untersuchung von phosphorylierten PKC-Substraten in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. Die Spezifität wurde mittels *Pathway*-Inhibitoren untersucht. Es zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung von PKC-Substraten in COPD-Lungen.

Abbildung 29: Western Blots mit p-PKA- und PKA-Antikörper (42 kDa)

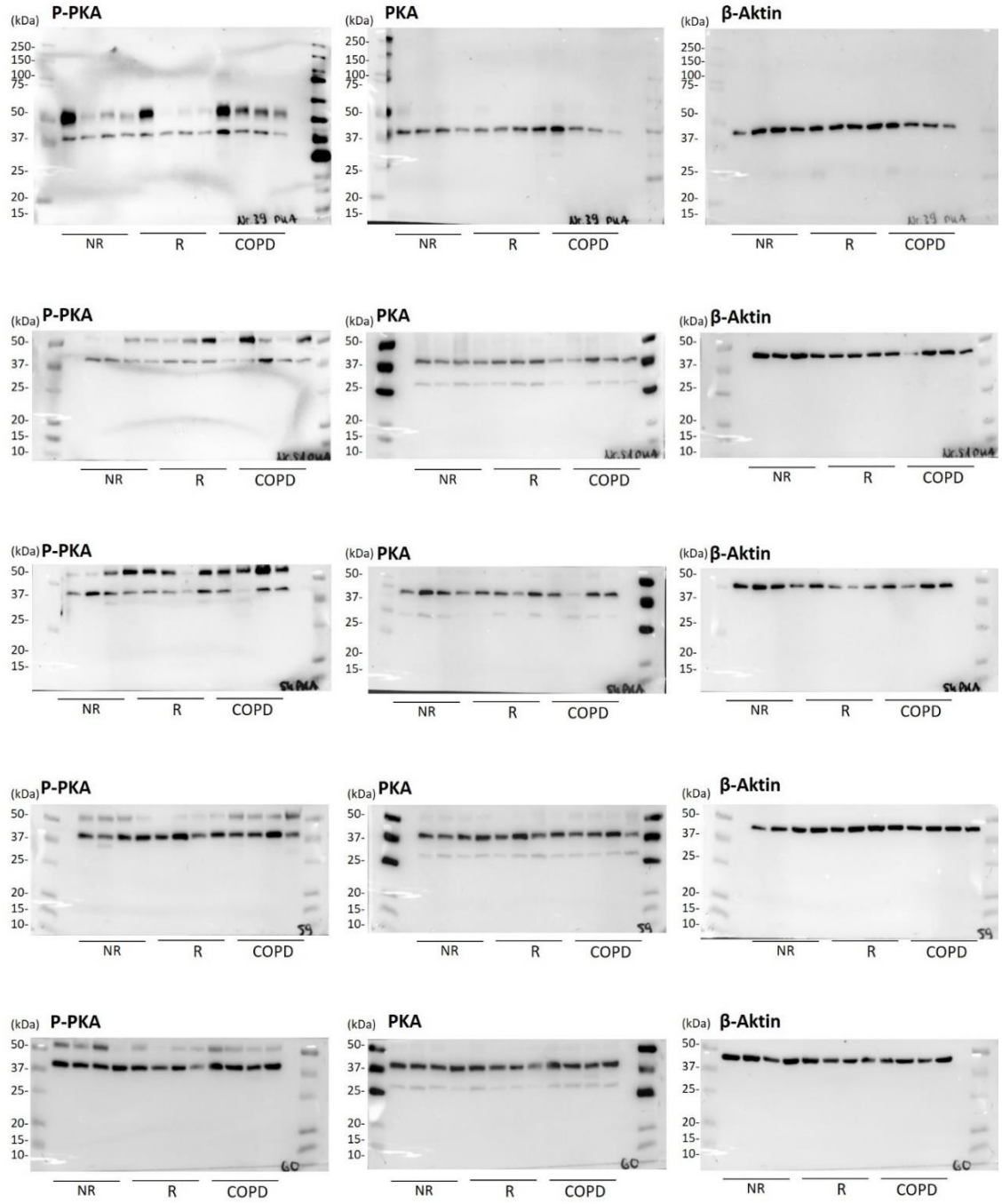


Abbildung 29 zeigt die Untersuchung der PKA und phosphorylierten PKA in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. Hierbei zeigte sich eine verstärkte Expression der PKA und phosphorylierter PKA in COPD-Lungen.

Abbildung 30: Western Blot mit Calmodulin- (17 kDa) und p-c-Raf- (74 kDa) Antikörper

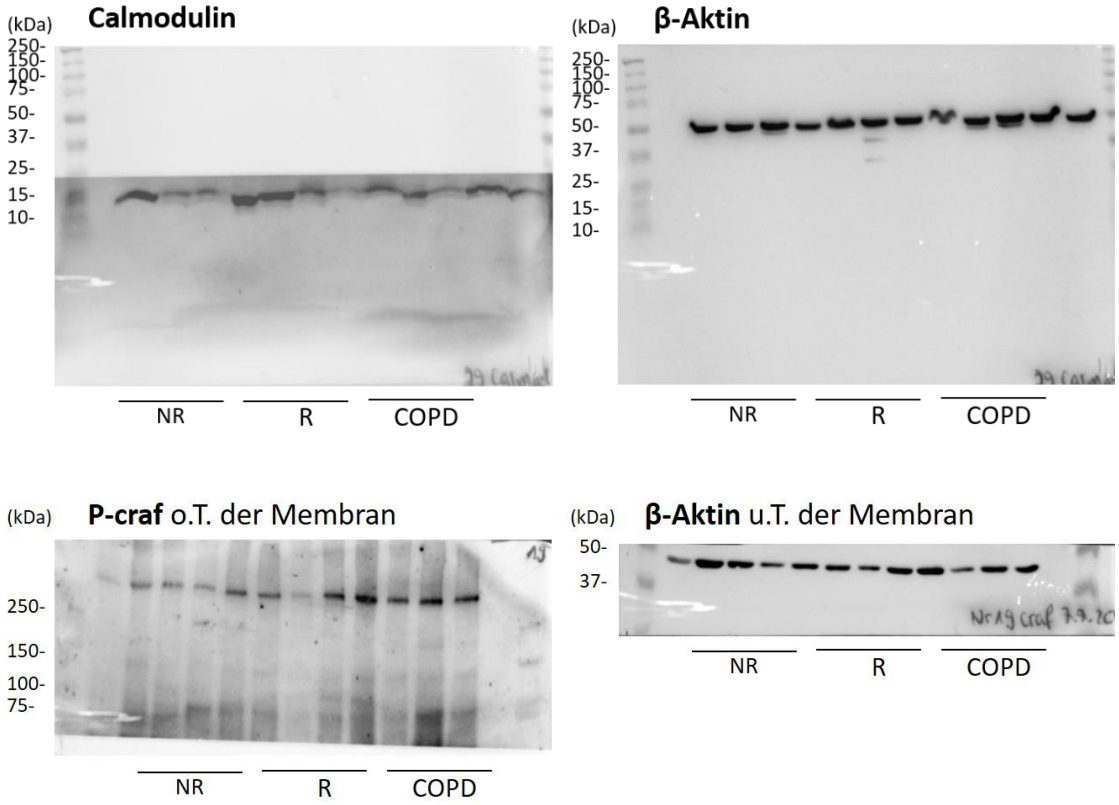


Abbildung 30 zeigt die Untersuchung von Calmodulin und phosphoryliertem c-Raf in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. Hierbei konnten weder bei mit dem Calmodulin-Antikörper noch mit dem p-c-Raf-Antikörper Banden in der zu erwartenden Größe detektiert werden, so dass diese Western Blots nicht ausgewertet wurden.

Abbildung 31: Western Blots mit p-CaMKII- (50 kDa) und CaMKII- (50, 60 kDa) Antikörper

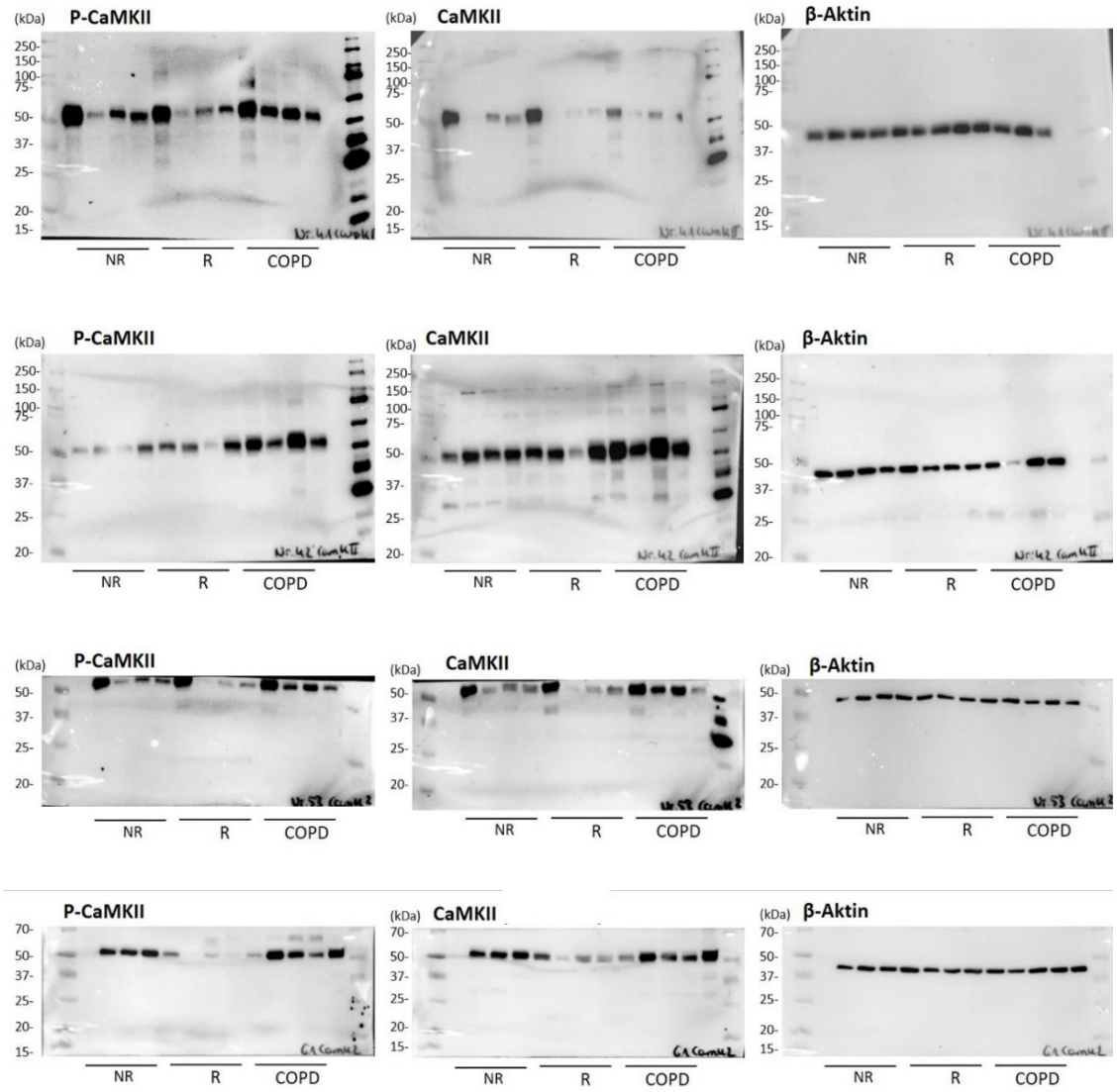


Abbildung 31 zeigt die Untersuchung von phosphorylierter CaMKII in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. Die Spezifität des Antikörpers wurde mittels *Pathway*-Inhibitoren untersucht. Es zeigte sich eine verstärkte Expression von CaMKII und phosphoryliertem CaMKII in COPD-Lungen.

Abbildung 32: Western Blot mit p-ERK1/2- und ERK1/2-Antikörper (42, 44 kDa)

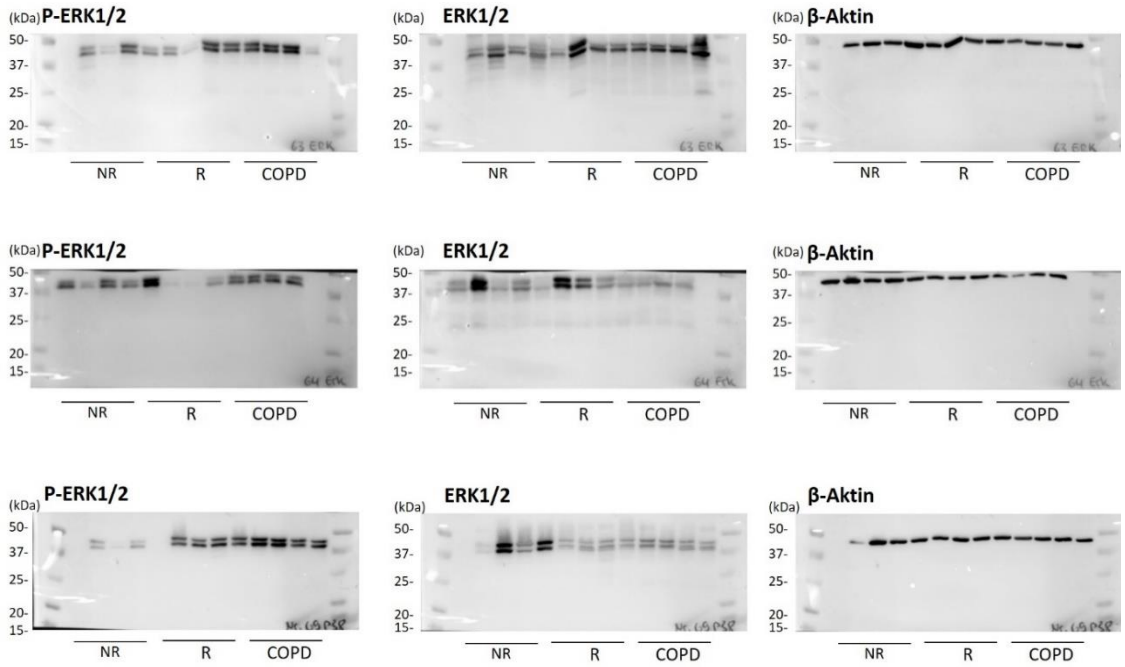


Abbildung 32 zeigt die Untersuchung von ERK1/2 und phosphoryliertem ERK1/2 in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. Es konnte eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 in Raucher und COPD-Lungen beobachtet werden.

Abbildung 33: Western Blot mit Cyclin D1- (34 kDa) und Cyclin E- (45 kDa) Antikörper

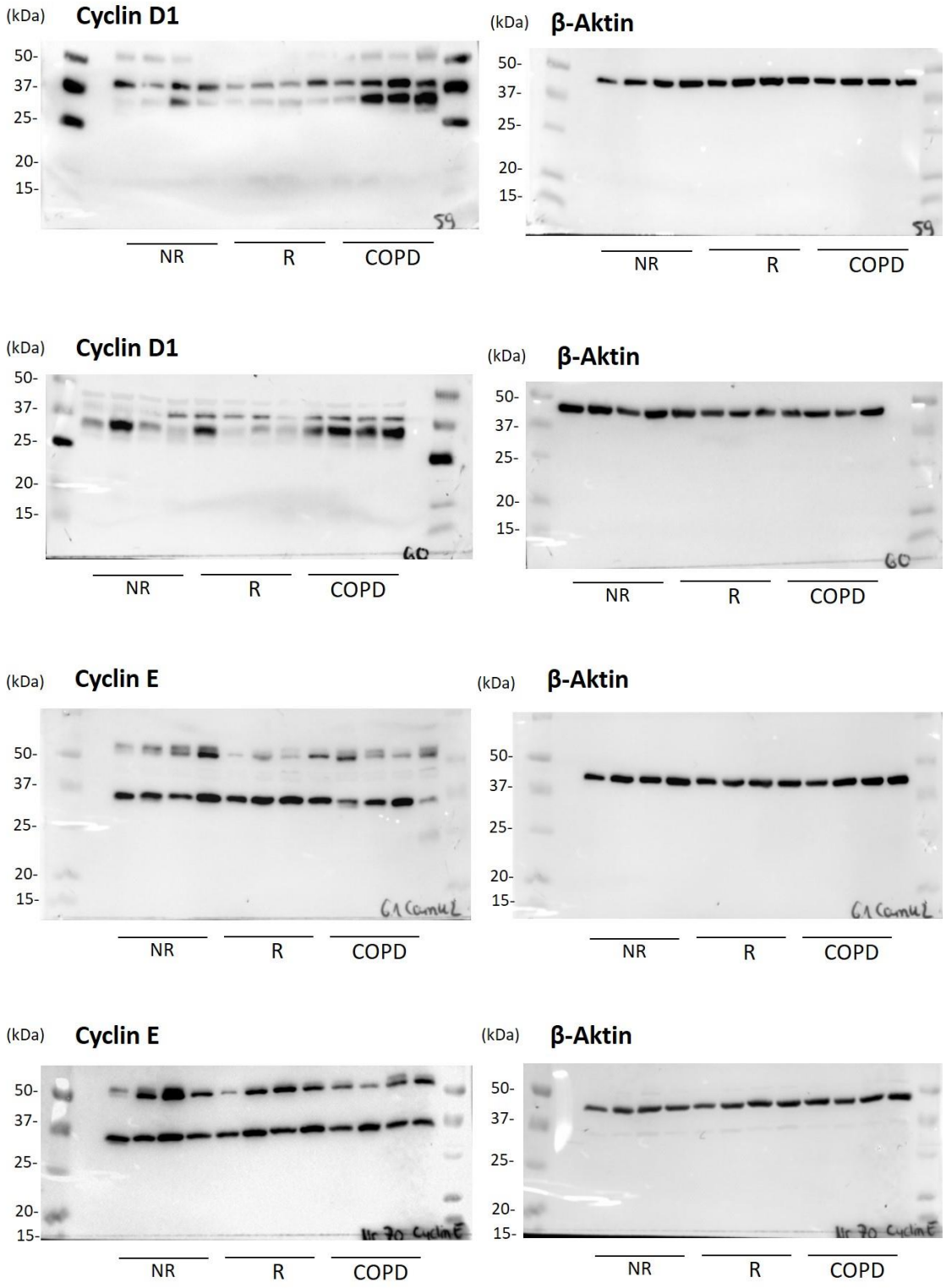


Abbildung 33 zeigt die Untersuchung von Cyclin D1 und Cyclin E in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. Es wurde eine verstärkte Expression von Cyclin D1 sowie eine verminderte Expression von Cyclin E in COPD-Lungen beobachtet.

Abbildung 34: Western Blot mit CDC25A-Antikörper (70 kDa)

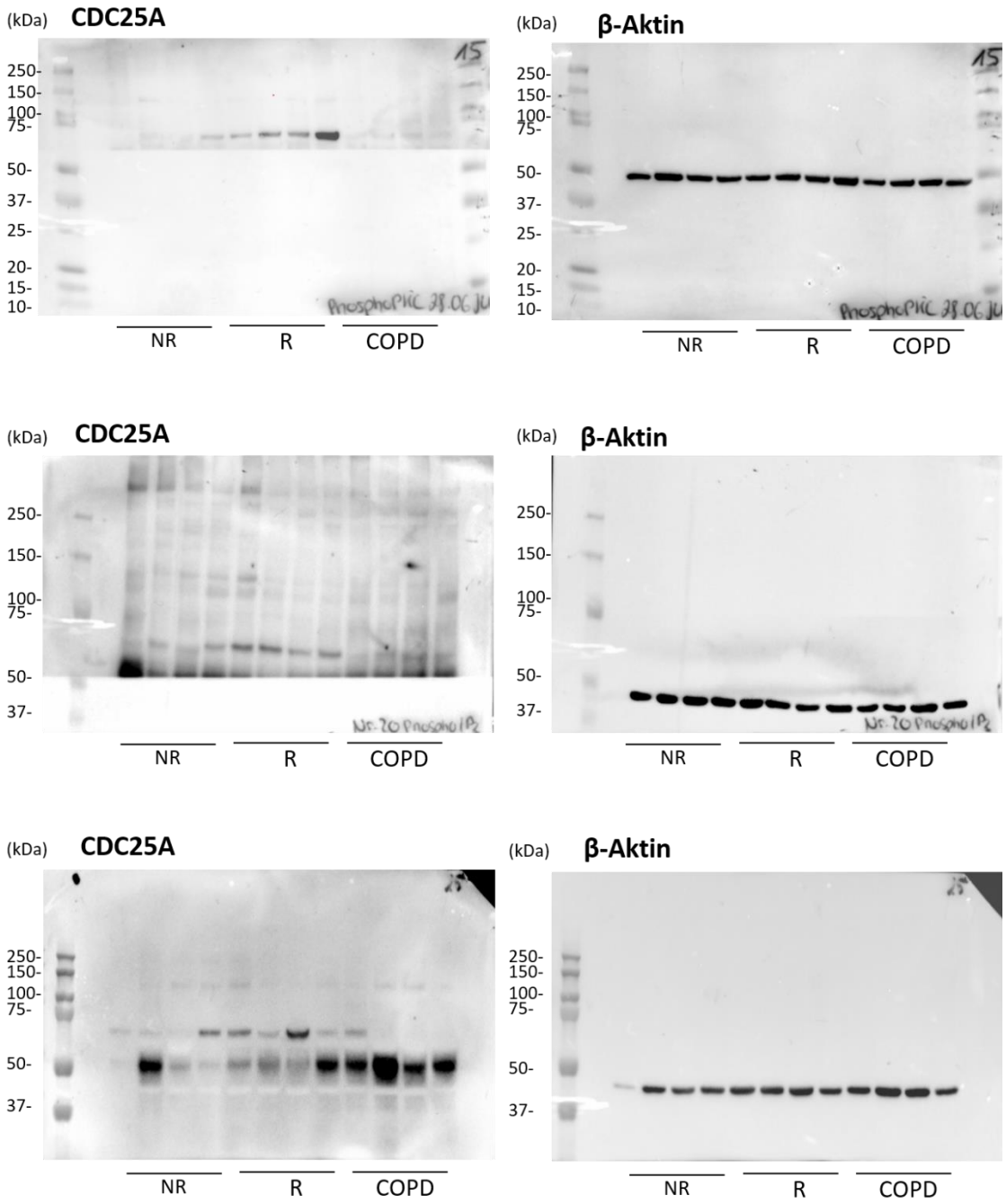


Abbildung 34 zeigt die Untersuchung von CDC25A in Donor- (Nichtraucher), Raucher- und COPD-Lungen. Es wurde eine verstärkte Expression von CDC25A in Raucher- und COPD-Lungen beobachtet.

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Amper
AEC	alveolare Epithelzelle *(alveolar epithelial cell)*
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BEC	bronchiale Epithelzelle *(bronchial epithelial cell)*
BSA	Rinderserumalbumin *(bovine serum albumin)*
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium-Ion
CaMK	Ca^{2+}-/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen
CD	*Cluster of differentiation*
CDC25A	*cell cycle division* Protein 25A
cDNA	komplementäre DNA *(complementary DNA)*
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
COOH	Carboxylgruppe
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung *(chronic obstructive pulmonary disease)*
CRAC	*Ca^{2+}-release-activated Ca^{2+}-channel*
CS	Zigarettenrauch *(cigarette smoke)*
C_t-Wert	Schwellenzyklus *(cycle treshold)*
d. h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol

ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
dH_2O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure *(desoxyribonucleoic acid)*
DPBS	Dulbeccos's Phosphat-gepufferte Salzlösung *(dulbecco's phosphat buffered saline)*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extrazellulär signalregulierte Kinasen 1 und 2
et al.	und andere *(et alteri)*
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	fetales Rinderserum *(fetal bovine serum)*
FCS	fetales Kälberserum *(fetal calf serum)*
FEV1	Einsekundenkapazität *(forced expiratory volume in one second)*
FVC	forcierte Vitalkapazität *(forced vital capacity)*
gr	Erdbeschleunigung *(gravity of earth)*
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOLD	Globale Initiative für chronisch obstruktive Lungenerkrankungen *(Global Initiative for Chronic Lung Disease)*
H_2O	Wasser
HCl	Salzsäure
PASMC	glatte Muskelzellen der Pulmonalarterie *(pulmonary artery smooth muscle cell)*
IL	Interleukin

IP_3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K^+	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
L	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeEtOH	β-Mercaptoethanol
mg	Milligramm
Mg^{2+}	Magnesium Ion
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloprotease
mPAP	mittlerer pulmonalarterieller Druck *(mean pulmonary arterial pressure)*
mRNA	*messenger* RNA
n	Anzahl der Einzelexperimente
Na^+	Natrium Ion
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
n. b.	Nicht bekannt
ng	Nanogramm

NH_2	Aminogruppe
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid *(nitric oxide)*
NOS	NO-Synthase
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
ORAI	Ca^{2+}-aktivierbares Ca^{2+}-Kanalprotein 1 *(Ca^{2+}-release-activated Ca^{2+}-channel protein)*
P	Pore
PBGD	Porphobilinogen Desaminase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion *(polymerase chain reaction)*
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 *(phosphoinositide-dependent protein kinase 1)*
pH	negative dekadischer Logarithmus der H_3O^+-Konzentration
PH	Pulmonale Hypertonie
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca^{2+}-ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	pulmonalvaskulärer Widerstand *(pulmonary vascular resistance)*
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleine acid)
ROCE	Rezeptor-vermittelter Calciumeinstrom *(receptor-operated Ca^{2+}-entry)*

RTqPCR	quantitative Echt-Zeit Polymerase Kettenreaktion *(real time quantitative polymerase chain reaction)*
S1-S6	Transmembrandomänen 1 bis 6
SDS	Natriumdodecylsulfat *(sodium dodecylsulfate)*
Sek.	Sekunde
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums *(sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase)*
siRNA	kleine interferierende RNA *(small-interfering RNA)*
SMC	glatte Muskelzelle *(smooth muscle cell)*
SOCE	Speicher-vermittelter Calciumeinstrom *(store-operated Ca^{2+}-entry)*
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STIM	stromales Interaktionsmolekül *(stromal interaction molecule)*
TBST	Trispufferlösung *(tris buffer saline)* mit 0,1% Tween
Temed	N, N, N', N'-tetramethylendiamin
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor *(transforming growth factor)*
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	Transient Rezeptor-Potential
TRPA	Ankyrin-TRP
TRPC	Klassischer-*(classical)* TRP
TRPM	Melastatin-TRP
TRPML	Mucolipin TRP
TRPN	kein Mechanorezeptor potential C *(no mechanoreceptor potential C)* TRP
TRPP	Polycystein-TRP
TRPV	Vanilloid-TRP

u. a.	unter anderem
V	Volt
VDCC	Spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle *(voltage-dependend Ca^{2+}-channels)*
VEGF	Endothelwachstumsfaktor *(vascular endothelial growth factor)*
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation *(world health organisation)*
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schweregradeinteilung nach Lungenfunktionsuntersuchung und Symptomen GOLD I bis IV und Gruppe A, B und E.....5

Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Superfamilie im Menschen.....13

Abbildung 3: Aufbau der TRP-Kanäle.....14

Abbildung 4: Genexpression von TRP-Kanälen in humanen Lungenhomogenaten. 50

Abbildung 5: TRPA1-Antikörpertest und Protein-Expression von TRPA1 in humanen Lungenhomogenaten.....51

Abbildung 6: TRPC6-Antikörpertest und Protein-Expression von TRPC6 in humanen Lungenhomogenaten.....52

Abbildung 7: TRPV4-Antikörpertest und Protein-Expression von TRPV4 in humanen Lungenhomogenaten.....53

Abbildung 8: Genexpression von TRP-Kanälen in humanen Gefäßen, Bronchien und Septen. 55

Abbildung 9: Genexpression der VDCCs in humanen Lungenhomogenaten.....55

Abbildung 10: Gen- und Protein-Expression von PMCA und SERCA in humanen Lungenhomogenaten. 56

Abbildung 11: Gen- und Protein-Expression von STIM und ORAI in humanen Lungenhomogenaten. 57

Abbildung 12: Protein-Expression von Proteinkinasen in humanen Lungenhomogenaten. 59

Abbildung 13: Antikörpertest phospho-PKC-Substrat 60

Abbildung 14: Protein-Expression von CaMKII in humanen Lungenhomogenaten.....61

Abbildung 15: Antikörpertest phospho-CaMKII 61

Abbildung 16: Protein-Expression von ERK1/2 in humanen Lungenhomogenaten. 62

Abbildung 17: Protein-Expression von Cyclin D1, Cyclin E und CDC25A in humanen Lungenhomogenaten. 63

Abbildung 18: Ca^{2+}-Konzentrationsmessung in humanen homogenisierten Lungenhomogenaten 64

Abbildung 19: Proliferation PASMCs nach Exposition mit CS-Extrakt 65

Abbildung 20: Zusammenfassung der Regulation der Expression von Ca^{2+}-Kanälen und Ca^{2+}-assoziierten Proteinen in humanen Lungenhomogenaten 79

Abbildung 21: Zusammenfassung der Regulation der analysierten Ca^{2+}-assoziierten Proteine und mögliche Signalkaskaden in humanen Lungenhomogenaten. 86

Abbildung 22: Western Blots PASMCs mit TRPC6- (100 kDa), TRPA1- (100-130 kDa) und TRPV4- (100 kDa) Antikörper 96

Abbildung 23: Western Blots mit TRPV4-Antikörper (100 kDa) 97

Abbildung 24: Western Blots mit PMCA1- und PMCA4-Antikörper (130 kDa) 98

Abbildung 25: Western Blots mit SERCA2-Antikörper (114, 140 kDa) 99

Abbildung 26: Western Blots mit STIM1-Antikörper (85 kDa) 100

Abbildung 27: Western Blots mit p-PDK1-Antikörper (58-68 kDa) 101

Abbildung 28: Western Blots mit p-PKC-Substrat-Antikörper 102

Abbildung 29: Western Blots mit p-PKA- und PKA-Antikörper (42 kDa) 103

Abbildung 30: Western Blot mit Calmodulin- (17 kDa) und p-c-Raf- (74 kDa) Antikörper 104

Abbildung 31: Western Blots mit p-CaMKII- (50 kDa) und CaMKII- (50, 60 kDa) Antikörper 105

Abbildung 32: Western Blot mit p-ERK1/2- und ERK1/2-Antikörper (42, 44 kDa) ... 106

Abbildung 33: Western Blot mit Cyclin D1- (34 kDa) und Cyclin E- (45 kDa) Antikörper ... 107

Abbildung 34: Western Blot mit CDC25A-Antikörper (70 kDa) ... 108

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: *Modified Medical Research Council Scale* ... 3

Tabelle 2: Charakteristika der Proben von Donoren (Nichtrauchern), Rauchern und COPD-Patienten für die Analyse der Lungenhomogenate ... 36

Tabelle 3: Charakteristika der Proben von Donoren (Nichtraucher), Rauchern und COPD-Patienten für die Laser-Mikrodissektion ... 39

Tabelle 4: Färbeprotokoll Laser-Mikrodissektion ... 40

Tabelle 5: Reaktionsprotokoll der Reversen Transkription ... 42

Tabelle 6: Reaktionsprotokoll der RTqPCR ... 43

Tabelle 7: Agarose-Gel ... 44

Tabelle 8: BSA-Verdünnungsreihe zur Proteinkonzentrationsbestimmung ... 45

Tabelle 9: Ca^{2+}-Standard Verdünnungsreihe zur Ca^{2+}-Konzentrationsbestimmung ... 48

11 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Ct-Werte ... 43

12 Literaturverzeichnis

1. Abramowitz J, Birnbaumer L (2009) Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. FASEB j 23:297–328. doi: 10.1096/fj.08-119495
2. Agusti A, Calverley PMA, Celli B et al. (2010) Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. Respir Res 11:122. doi: 10.1186/1465-9921-11-122
3. Agustí AGN, Noguera A, Sauleda J et al. (2003) Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. European Respiratory Journal 21:347–360. doi: 10.1183/09031936.03.00405703
4. Akata K, van Eeden SF (2020) Lung Macrophage Functional Properties in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Int J Mol Sci 21. doi: 10.3390/ijms21030853
5. Albert AP (2011) Gating mechanisms of canonical transient receptor potential channel proteins: role of phosphoinositols and diacylglycerol. Adv Exp Med Biol 704:391–411. doi: 10.1007/978-94-007-0265-3_22
6. Alenmyr L, Uller L, Greiff L et al. (2014) TRPV4-mediated calcium influx and ciliary activity in human native airway epithelial cells. Basic Clin Pharmacol Toxicol 114:210–216. doi: 10.1111/bcpt.12135
7. Ali Zohal M, Yazdi Z, Kazemifar AM (2013) Daytime sleepiness and quality of sleep in patients with COPD compared to control group. Glob J Health Sci 5:150–155. doi: 10.5539/gjhs.v5n3p150
8. Alicia S, Angélica Z, Carlos S et al. (2008) STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts. Cell Calcium 44:479–491. doi: 10.1016/j.ceca.2008.03.001
9. Alpizar YA, Boonen B, Sanchez A et al. (2017) TRPV4 activation triggers protective responses to bacterial lipopolysaccharides in airway epithelial cells. Nat Commun 8:1059. doi: 10.1038/s41467-017-01201-3
10. Alvarez DF, King JA, Weber D et al. (2006) Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury. Circ Res 99:988–995. doi: 10.1161/01.RES.0000247065.11756.19
11. Ambudkar IS, Souza LB de, Ong HL (2017) TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. Cell Calcium 63:33–39. doi: 10.1016/j.ceca.2016.12.009

12. Andrè E, Campi B, Materazzi S et al. (2008) Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. J Clin Invest 118:2574–2582. doi: 10.1172/JCI34886
13. Apelberg BJ, Aoki Y, Jaakkola JJ (2001) Systematic review: Exposure to pets and risk of asthma and asthma-like symptoms. Journal of Allergy and Clinical Immunology 107:455–460. doi: 10.1067/mai.2001.113240
14. Bailey PH (2004) The dyspnea-anxiety-dyspnea cycle--COPD patients' stories of breathlessness: "It's scary /when you can't breathe". Qual Health Res 14:760–778. doi: 10.1177/1049732304265973
15. Baker AF, Dragovich T, Ihle NT et al. (2005) Stability of phosphoprotein as a biological marker of tumor signaling. Clin Cancer Res 11:4338–4340. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0422
16. Banner KH, Igney F, Poll C (2011) TRP channels: emerging targets for respiratory disease. Pharmacol Ther 130:371–384. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.03.005
17. Barberà JA, Peinado VI, Santos S et al. (2001) Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers. Am J Respir Crit Care Med 164:709–713. doi: 10.1164/ajrccm.164.4.2101023
18. Barberà JA, Blanco I (2009) Pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease: advances in pathophysiology and management. Drugs 69:1153–1171. doi: 10.2165/00003495-200969090-00002
19. Barbers RG, Evans MJ, Gong H et al. (1991) Enhanced alveolar monocytic phagocyte (macrophage) proliferation in tobacco and marijuana smokers. Am Rev Respir Dis 143:1092–1095. doi: 10.1164/ajrccm/143.5_Pt_1.1092
20. Barbet G, Demion M, Moura IC et al. (2008) The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells. Nat Immunol 9:1148–1156. doi: 10.1038/ni.1648
21. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA (2003) Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. Eur Respir J 22:672–688. doi: 10.1183/09031936.03.00040703
22. Barnes PJ (2004) Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. COPD 1:59–70. doi: 10.1081/COPD-120028701
23. Barnes PJ (2008) Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nat Rev Immunol 8:183–192. doi: 10.1038/nri2254

24. Barnes PJ, Celli BR (2009) Systemic manifestations and comorbidities of COPD. Eur Respir J 33:1165–1185. doi: 10.1183/09031936.00128008
25. Barnes PJ (2016) Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. J Allergy Clin Immunol 138:16–27. doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.011
26. Barnes PJ (2022) Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Antioxidants (Basel) 11. doi: 10.3390/antiox11050965
27. Bartal M (2005) COPD and tobacco smoke. Monaldi Arch Chest Dis 63:213–225. doi: 10.4081/monaldi.2005.623
28. Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M (2013) TRPA1: A gatekeeper for inflammation. Annu Rev Physiol 75:181–200. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183811
29. Baxter M, Eltom S, Dekkak B et al. (2014) Role of transient receptor potential and pannexin channels in cigarette smoke-triggered ATP release in the lung. Thorax 69:1080–1089. doi: 10.1136/thoraxjnl-2014-205467
30. Berridge MJ, Irvine RF (1989) Inositol phosphates and cell signalling. Nature 341:197–205. doi: 10.1038/341197a0
31. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 1:11–21. doi: 10.1038/35036035
32. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 4:517–529. doi: 10.1038/nrm1155
33. Bhatt SP, Balte PP, Schwartz JE et al. (2019) Discriminative Accuracy of FEV1:FVC Thresholds for COPD-Related Hospitalization and Mortality. JAMA 321:2438–2447. doi: 10.1001/jama.2019.7233
34. Boer WI de, van Schadewijk A, Sont JK et al. (1998) Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 158:1951–1957. doi: 10.1164/ajrccm.158.6.9803053
35. Bonvini SJ, Birrell MA, Smith JA et al. (2015) Targeting TRP channels for chronic cough: from bench to bedside. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 388:401–420. doi: 10.1007/s00210-014-1082-1

36. Bourinet E, Alloui A, Monteil A et al. (2004) Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. EMBO J 24:315–324. doi: 10.1038/sj.emboj.7600515
37. Britzolaki A, Saurine J, Klocke B et al. (2020) A Role for SERCA Pumps in the Neurobiology of Neuropsychiatric and Neurodegenerative Disorders. Adv Exp Med Biol 1131:131–161. doi: 10.1007/978-3-030-12457-1_6
38. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR (2011) New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. The Lancet 378:1015–1026. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60988-4
39. Budhiraja R, Siddiqi TA, Quan SF (2015) Sleep disorders in chronic obstructive pulmonary disease: etiology, impact, and management. J Clin Sleep Med 11:259–270. doi: 10.5664/jcsm.4540
40. Bujak JK, Kosmala D, Szopa IM et al. (2019) Inflammation, Cancer and Immunity-Implication of TRPV1 Channel. Front Oncol 9:1087. doi: 10.3389/fonc.2019.01087
41. Carafoli E (1992) The Ca2+ pump of the plasma membrane. Journal of Biological Chemistry 267:2115–2118. doi: 10.1016/S0021-9258(18)45848-6
42. Caramori G, Casolari P, Barczyk A et al. (2016) COPD immunopathology. Semin Immunopathol 38:497–515. doi: 10.1007/s00281-016-0561-5
43. Caride AJ, Filoteo AG, Penheiter AR et al. (2001) Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca2+: fast pumps reside in fast cells. Cell Calcium 30:49–57. doi: 10.1054/ceca.2001.0212
44. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M et al. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 389:816–824. doi: 10.1038/39807
45. Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. Cold Spring Harb Perspect Biol 3:a003947. doi: 10.1101/cshperspect.a003947
46. Celli BR, Anderson JA, Cowans NJ et al. (2021) Pharmacotherapy and Lung Function Decline in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A Systematic Review. Am J Respir Crit Care Med 203:689–698. doi: 10.1164/rccm.202005-1854OC
47. Chambard J-C, Lefloch R, Pouysségur J et al. (2007) ERK implication in cell cycle regulation. Biochim Biophys Acta 1773:1299–1310. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.11.010

48. Chaudhuri R, McSharry C, Brady J et al. (2012) Sputum matrix metalloproteinase-12 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma: relationship to disease severity. J Allergy Clin Immunol 129:655-663.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2011.12.996
49. Chauhan A, Sun Y, Sukumaran P et al. (2018) M1 Macrophage Polarization Is Dependent on TRPC1-Mediated Calcium Entry. iScience 8:85–102. doi: 10.1016/j.isci.2018.09.014
50. Chen Z, Gibson TB, Robinson F et al. (2001) MAP Kinases. Chem Rev 101:2449–2476. doi: 10.1021/cr000241p
51. Chen Y, Cao J, Zhong J et al. (2014) Plasma membrane Ca2+-ATPase regulates Ca2+ signaling and the proliferation of airway smooth muscle cells. Eur J Pharmacol 740:733–741. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.05.055
52. Cheng KT, Ong HL, Liu X et al. (2013) Contribution and regulation of TRPC channels in store-operated Ca2+ entry. Curr Top Membr 71:149–179. doi: 10.1016/B978-0-12-407870-3.00007-X
53. Chevalier M, Gilbert G, Roux E et al. (2014) T-type calcium channels are involved in hypoxic pulmonary hypertension. Cardiovasc Res 103:597–606. doi: 10.1093/cvr/cvu166
54. Chiang C-S, Huang C-H, Chieng H et al. (2009) The Ca(v)3.2 T-type Ca2+ channel is required for pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. Circ Res 104:522–530. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184051
55. Chiaradonna F, Balestrieri C, Gaglio D et al. (2008) RAS and PKA pathways in cancer: new insight from transcriptional analysis. Front Biosci 13:5257–5278. doi: 10.2741/3079
56. Cho MH, McDonald M-LN, Zhou X et al. (2014) Risk loci for chronic obstructive pulmonary disease: a genome-wide association study and meta-analysis. The Lancet Respiratory Medicine 2:214–225. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70002-5
57. Choi JY, Lee HY, Hur J et al. (2018) TRPV1 Blocking Alleviates Airway Inflammation and Remodeling in a Chronic Asthma Murine Model. Allergy Asthma Immunol Res 10:216–224. doi: 10.4168/aair.2018.10.3.216
58. Chung KF (2001) Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. European Respiratory Journal 18:50–59. doi: 10.1183/09031936.01.00229701

59. Church DF, Pryor WA (1985) Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect 64:111–126. doi: 10.1289/ehp.8564111
60. Churg A, Cosio M, Wright JL (2008) Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294:L612-31. doi: 10.1152/ajplung.00390.2007
61. Churg A, Zhou S, Wright JL (2012) Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Matrix metalloproteinases in COPD. Eur Respir J 39:197–209. doi: 10.1183/09031936.00121611
62. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001) The TRP ion channel family. Nat Rev Neurosci 2:387–396. doi: 10.1038/35077544
63. Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. Nature 426:517–524. doi: 10.1038/nature02196
64. Clapham DE (2007) Calcium signaling. Cell 131:1047–1058. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.028
65. Cobb MH, Goldsmith EJ (1995) How MAP Kinases Are Regulated. J Biol Chem 270:14843–14846. doi: 10.1074/jbc.270.25.14843
66. Colsoul B, Nilius B, Vennekens R (2009) On the putative role of transient receptor potential cation channels in asthma. Clin Exp Allergy 39:1456–1466. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03315.x
67. Corteling RL, Li S, Giddings J et al. (2004) Expression of transient receptor potential C6 and related transient receptor potential family members in human airway smooth muscle and lung tissue. Am J Respir Cell Mol Biol 30:145–154. doi: 10.1165/rcmb.2003-0134OC
68. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. Nature 224:285–287. doi: 10.1038/224285a0
69. Cussac L-A, Cardouat G, Tiruchellvam Pillai N et al. (2020) TRPV4 channel mediates adventitial fibroblast activation and adventitial remodeling in pulmonary hypertension. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 318:L135-L146. doi: 10.1152/ajplung.00084.2019
70. Da Nascimento Conceicao V, Sun Y, Ramachandran K et al. (2021) Resolving macrophage polarization through distinct Ca2+ entry channel that maintains intracellular signaling and mitochondrial bioenergetics. iScience 24:103339. doi: 10.1016/j.isci.2021.103339

71. Dash A, Maine IP, Varambally S et al. (2002) Changes in Differential Gene Expression because of Warm Ischemia Time of Radical Prostatectomy Specimens. The American Journal of Pathology 161:1743–1748. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64451-3
72. Decramer M, Janssens W (2013) Chronic obstructive pulmonary disease and comorbidities. The Lancet Respiratory Medicine 1:73–83. doi: 10.1016/S2213-2600(12)70060-7
73. Defnet AE, Hasday JD, Shapiro P (2020) Kinase inhibitors in the treatment of obstructive pulmonary diseases. Curr Opin Pharmacol 51:11–18. doi: 10.1016/j.coph.2020.03.005
74. DeHaven WI, Jones BF, Petranka JG et al. (2009) TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. J Physiol (Lond) 587:2275–2298. doi: 10.1113/jphysiol.2009.170431
75. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR et al. (2006) Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. Respir Res 7:53. doi: 10.1186/1465-9921-7-53
76. Dempsey EC, Cool CD, Littler CM (2007) Lung disease and PKCs. Pharmacol Res 55:545–559. doi: 10.1016/j.phrs.2007.04.010
77. Deng L, Chen J, Wang T et al. (2021) PDGF/MEK/ERK axis represses Ca2+ clearance via decreasing the abundance of plasma membrane Ca2+ pump PMCA4 in pulmonary arterial smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol 320:C66-C79. doi: 10.1152/ajpcell.00290.2020
78. Dietrich A, Kalwa H, Fuchs B et al. (2007) In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. Cell Calcium 42:233–244. doi: 10.1016/j.ceca.2007.02.009
79. Donnelly LE, Barnes PJ (2006) Chemokine receptors as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. Trends Pharmacol Sci 27:546–553. doi: 10.1016/j.tips.2006.08.001
80. Douschan P, Kovacs G, Avian A et al. (2018) Mild Elevation of Pulmonary Arterial Pressure as a Predictor of Mortality. Am J Respir Crit Care Med 197:509–516. doi: 10.1164/rccm.201706-1215OC
81. Du Q, Liao Q, Chen C et al. (2019) The Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Common Diseases of the Digestive Tract and the Cardiovascular and Respiratory System. Front Physiol 10:1064. doi: 10.3389/fphys.2019.01064

82. Eapen MS, Hansbro PM, McAlinden K et al. (2017) Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Sci Rep 7:13392. doi: 10.1038/s41598-017-13888-x
83. Earley S, Brayden JE (2015) Transient receptor potential channels in the vasculature. Physiol Rev 95:645–690. doi: 10.1152/physrev.00026.2014
84. Elíes J, Yáñez M, Pereira TMC et al. (2020) An Update to Calcium Binding Proteins. Adv Exp Med Biol 1131:183–213. doi: 10.1007/978-3-030-12457-1_8
85. Elwing J, Panos RJ (2008) Pulmonary hypertension associated with COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 3:55–70. doi: 10.2147/copd.s1170
86. Estacion M, Sinkins WG, Jones SW et al. (2006) Human TRPC6 expressed in HEK 293 cells forms non-selective cation channels with limited Ca2+ permeability. J Physiol (Lond) 572:359–377. doi: 10.1113/jphysiol.2005.103143
87. Fahy JV, Dickey BF (2010) Airway mucus function and dysfunction. N Engl J Med 363:2233–2247. doi: 10.1056/NEJMra0910061
88. Fedorenko OA, Popugaeva E, Enomoto M et al. (2014) Intracellular calcium channels: inositol-1,4,5-trisphosphate receptors. Eur J Pharmacol 739:39–48. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.074
89. Fernandez RA, Wan J, Song S et al. (2015) Upregulated expression of STIM2, TRPC6, and Orai2 contributes to the transition of pulmonary arterial smooth muscle cells from a contractile to proliferative phenotype. Am J Physiol , Cell Physiol 308:C581-93. doi: 10.1152/ajpcell.00202.2014
90. Ferrer E, Peinado VI, Díez M et al. (2009) Effects of cigarette smoke on endothelial function of pulmonary arteries in the guinea pig. Respir Res 10:76. doi: 10.1186/1465-9921-10-76
91. Finney-Hayward TK, Popa MO, Bahra P et al. (2010) Expression of transient receptor potential C6 channels in human lung macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol 43:296–304. doi: 10.1165/rcmb.2008-0373OC
92. Fleig A, Penner R (2004) The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. Trends Pharmacol Sci 25:633–639. doi: 10.1016/j.tips.2004.10.004
93. Frank KF, Bölck B, Brixius K et al. (2002) Modulation of SERCA: implications for the failing human heart. Basic Res Cardiol 97 Suppl 1:I72-8. doi: 10.1007/s003950200033

94. Freeman CM, Martinez FJ, Han MK et al. (2009) Lung dendritic cell expression of maturation molecules increases with worsening chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 180:1179–1188. doi: 10.1164/rccm.200904-0552OC
95. Froghi S, Grant CR, Tandon R et al. (2021) New Insights on the Role of TRP Channels in Calcium Signalling and Immunomodulation: Review of Pathways and Implications for Clinical Practice. Clin Rev Allergy Immunol 60:271–292. doi: 10.1007/s12016-020-08824-3
96. Fujita M (2014) The Role of MMPs in the Progression of Chronic Lung Inflammatory Diseases. In: Ong KC (ed) Lung Inflammation. InTech
97. Galán C, Dionisio N, Smani T et al. (2011) The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the Ca2+ channel subunits Orai1 and TRPC1. Biochem Pharmacol 82:400–410. doi: 10.1016/j.bcp.2011.05.017
98. Gao W, Li L, Wang Y et al. (2015) Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? Respirology 20:722–729. doi: 10.1111/resp.12542
99. Garcia RL, Schilling WP (1997) Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. Biochem Biophys Res Commun 239:279–283. doi: 10.1006/bbrc.1997.7458
100. Gaudet R (2008) A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. Mol Biosyst 4:372–379. doi: 10.1039/b801481g
101. Ge H, Huang M, Yao X et al. (2006) Cyclin D1 and its association with airway remodeling in a murine model of asthma. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi 29:607–611
102. Geppetti P, Materazzi S, Nicoletti P (2006) The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. Eur J Pharmacol 533:207–214. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.063
103. Ghata J, Cowley BD (2017) Polycystic Kidney Disease. Compr Physiol 7:945–975. doi: 10.1002/cphy.c160018
104. Gianni D, Chan J, Gwathmey JK et al. (2005) SERCA2a in heart failure: role and therapeutic prospects. J Bioenerg Biomembr 37:375–380. doi: 10.1007/s10863-005-9474-z

105. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD: 2019 report [accessed 17.03.2020]. https://goldcopd.org/
106. Goll DE, Thompson VF, Li H et al. (2003) The calpain system. Physiol Rev 83:731–801. doi: 10.1152/physrev.00029.2002
107. Graat-Verboom L, Wouters EFM, Smeenk FWJM et al. (2009) Current status of research on osteoporosis in COPD: a systematic review. Eur Respir J 34:209–218. doi: 10.1183/09031936.50130408
108. Grace M, Birrell MA, Dubuis E et al. (2012) Transient receptor potential channels mediate the tussive response to prostaglandin E2 and bradykinin. Thorax 67:891–900. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-201443
109. Grace MS, Belvisi MG (2011) TRPA1 receptors in cough. Pulm Pharmacol Ther 24:286–288. doi: 10.1016/j.pupt.2010.11.002
110. Grinstein S, Klip A (1989) Calcium homeostasis and the activation of calcium channels in cells of the immune system. Bull N Y Acad Med 65:69–79
111. Grizzle WE, Bell WC, Sexton KC (2010) Issues in collecting, processing and storing human tissues and associated information to support biomedical research. CBM 9:531–549. doi: 10.3233/CBM-2011-0183
112. Grolez GP, Gordiendko DV, Clarisse M et al. (2019) TRPM8-androgen receptor association within lipid rafts promotes prostate cancer cell migration. Cell Death Dis 10:652. doi: 10.1038/s41419-019-1891-8
113. Groneberg DA, Niimi A, Dinh QT et al. (2004) Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. Am J Respir Crit Care Med 170:1276–1280. doi: 10.1164/rccm.200402-174OC
114. Grzela K, Litwiniuk M, Zagorska W et al. (2016) Airway Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma: the Role of Matrix Metalloproteinase-9. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 64:47–55. doi: 10.1007/s00005-015-0345-y
115. Guo H, Carlson JA, Slominski A (2012) Role of TRPM in melanocytes and melanoma. Exp Dermatol 21:650–654. doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01565.x
116. Hadri L, Kratlian RG, Benard L et al. (2013) Therapeutic efficacy of AAV1.SERCA2a in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. Circulation 128:512–523. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001585

117. Hajna Z, Csekő K, Kemény Á et al. (2020) Complex Regulatory Role of the TRPA1 Receptor in Acute and Chronic Airway Inflammation Mouse Models. Int J Mol Sci 21. doi: 10.3390/ijms21114109
118. Halling DB, Aracena-Parks P, Hamilton SL (2006) Regulation of voltage-gated Ca2+ channels by calmodulin. Sci STKE 2006:er1. doi: 10.1126/stke.3182006er1
119. Hara J, Fujimura M, Ueda A et al. (2008) Effect of pressure stress applied to the airway on cough-reflex sensitivity in Guinea pigs. Am J Respir Crit Care Med 177:585–592. doi: 10.1164/rccm.200703-457OC
120. Harteneck C (2005) Function and pharmacology of TRPM cation channels. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 371:307–314. doi: 10.1007/s00210-005-1034-x
121. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM et al. (1997) Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. Science 277:2002–2004. doi: 10.1126/science.277.5334.2002
122. Hayashi R, Yamashita N, Matsui S et al. (2000) Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms. European Respiratory Journal 16:452–458. doi: 10.1034/j.1399-3003.2000.016003452.x
123. Helyes Z, Pintér E, Sándor K et al. (2009) Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. Proc Natl Acad Sci U S A 106:13088–13093. doi: 10.1073/pnas.0900681106
124. Herold G (2018) Innere Medizin 2019. Eine vorlesungsorientierte Darstellung: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis, 348-354. Herold Gerd, Köln
125. Herrmann TL, Morita CT, Lee K et al. (2005) Calmodulin kinase II regulates the maturation and antigen presentation of human dendritic cells. J Leukoc Biol 78:1397–1407. doi: 10.1189/jlb.0205105
126. Hoenderdos K, Condliffe A (2013) The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Cell Mol Biol 48:531–539. doi: 10.1165/rcmb.2012-0492TR
127. Hoenderop JGJ, Voets T, Hoefs S et al. (2003) Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca2+ channels TRPV5 and TRPV6. EMBO J 22:776–785. doi: 10.1093/emboj/cdg080

128. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M et al. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. Nature 397:259–263. doi: 10.1038/16711
129. Hofmann K, Fiedler S, Vierkotten S et al. (2017) Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1863:560–568. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.12.002
130. Hogg JC (2004) Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. The Lancet 364:709–721. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16900-6
131. Hogg JC, Timens W (2009) The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. Annu Rev Pathol 4:435–459. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092145
132. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S et al. (2004) The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med 350:2645–2653. doi: 10.1056/NEJMoa032158
133. Hogg JC, Paré PD, Hackett T-L (2017) The Contribution of Small Airway Obstruction to the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Physiol Rev 97:529–552. doi: 10.1152/physrev.00025.2015
134. Holleman DR (1995) Does the Clinical Examination Predict Airflow Limitation? JAMA 273:313. doi: 10.1001/jama.1995.03520280059041
135. Hong W, Peng G, Hao B et al. (2017) Nicotine-Induced Airway Smooth Muscle Cell Proliferation Involves TRPC6-Dependent Calcium Influx Via α7 nAChR. Cell Physiol Biochem 43:986–1002. doi: 10.1159/000481651
136. Hovnanian A (2007) SERCA pumps and human diseases. Subcell Biochem 45:337–363. doi: 10.1007/978-1-4020-6191-2_12
137. Howarth PH, Knox AJ, Amrani Y et al. (2004) Synthetic responses in airway smooth muscle. J Allergy Clin Immunol 114:32-50. doi: 10.1016/j.jaci.2004.04.041
138. Howe AK (2011) Cross-talk between calcium and protein kinase A in the regulation of cell migration. Current Opinion in Cell Biology 23:554–561. doi: 10.1016/j.ceb.2011.05.006
139. Hu Y, Fu J, Xue X (2019) Association of the proliferation of lung fibroblasts with the ERK1/2 signaling pathway in neonatal rats with hyperoxia-induced lung fibrosis. Exp Ther Med 17:701–708. doi: 10.3892/etm.2018.6999
140. Huang K-P (1989) The mechanism of protein kinase C activation. Trends Neurosci 12:425–432. doi: 10.1016/0166-2236(89)90091-x

141. Huetsch J, Jiang H, Shimoda L (2020) CaMKII is Necessary for Proliferation and Migration of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. FASEB j 34:1. doi: 10.1096/fasebj.2020.34.s1.03105
142. Ihn H (2002) Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. Curr Opin Rheumatol 14:681–685. doi: 10.1097/00002281-200211000-00009
143. Illario M, Cavallo AL, Bayer KU et al. (2003) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. Journal of Biological Chemistry 278:45101–45108. doi: 10.1074/jbc.M305355200
144. Inoue R, Jensen LJ, Shi J et al. (2006) Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. Circ Res 99:119–131. doi: 10.1161/01.RES.0000233356.10630.8a
145. Jain PP, Lai N, Xiong M et al. (2021) TRPC6, a therapeutic target for pulmonary hypertension. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 321:L1161-L1182. doi: 10.1152/ajplung.00159.2021
146. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R et al. (2011) The discovery of α1-antitrypsin and its role in health and disease. Respir Med 105:1129–1139. doi: 10.1016/j.rmed.2011.02.002
147. Janssen R, Piscaer I, Franssen FME et al. (2019) Emphysema: looking beyond alpha-1 antitrypsin deficiency. Expert Rev Respir Med 13:381–397. doi: 10.1080/17476348.2019.1580575
148. Jaquemar D, Schenker T, Trueb B (1999) An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. J Biol Chem 274:7325–7333. doi: 10.1074/jbc.274.11.7325
149. Jeffery PK (1998) Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. Thorax 53:129–136. doi: 10.1136/thx.53.2.129
150. Jeffery TK, Wanstall JC (2001) Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. Pharmacol Ther 92:1–20. doi: 10.1016/s0163-7258(01)00157-7
151. Jeong J, VanHouten JN, Dann P et al. (2016) PMCA2 regulates HER2 protein kinase localization and signaling and promotes HER2-mediated breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 113:E282-90. doi: 10.1073/pnas.1516138113
152. Jeske NA, Diogenes A, Ruparel NB et al. (2008) A-kinase anchoring protein mediates TRPV1 thermal hyperalgesia through PKA phosphorylation of TRPV1. Pain 138:604–616. doi: 10.1016/j.pain.2008.02.022

153. Jewell SD, Srinivasan M, McCart LM et al. (2002) Analysis of the molecular quality of human tissues: an experience from the Cooperative Human Tissue Network. Am J Clin Pathol 118:733–741. doi: 10.1309/VPQL-RT21-X7YH-XDXK
154. Jian M-Y, King JA, Al-Mehdi A-B et al. (2008) High vascular pressure-induced lung injury requires P450 epoxygenase-dependent activation of TRPV4. Am J Respir Cell Mol Biol 38:386–392. doi: 10.1165/rcmb.2007-0192OC
155. Jiang X, Lautermilch NJ, Watari H et al. (2008) Modulation of CaV2.1 channels by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. Proc Natl Acad Sci U S A 105:341–346. doi: 10.1073/pnas.0710213105
156. Jiang H-N, Zeng B, Zhang Y et al. (2013) Involvement of TRPC channels in lung cancer cell differentiation and the correlation analysis in human non-small cell lung cancer. PLoS One 8:e67637. doi: 10.1371/journal.pone.0067637
157. Jiang Y, Zhou Y, Peng G et al. (2019) TRPC channels mediated calcium entry is required for proliferation of human airway smooth muscle cells induced by nicotine-nAChR. Biochimie 158:139–148. doi: 10.1016/j.biochi.2018.12.004
158. Johnson M, Trebak M (2019) ORAI channels in cellular remodeling of cardiorespiratory disease. Cell Calcium 79:1–10. doi: 10.1016/j.ceca.2019.01.005
159. Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 298:1911–1912. doi: 10.1126/science.1072682
160. Johnson MT, Xin P, Benson JC et al. (2022) STIM1 is a core trigger of airway smooth muscle remodeling and hyperresponsiveness in asthma. Proc Natl Acad Sci U S A 119. doi: 10.1073/pnas.2114557118
161. Jones JG, Lawler P, Crawley J et al. (1980) Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. The Lancet 315:66–68. doi: 10.1016/S0140-6736(80)90493-6
162. Jones PW, Harding G, Berry P et al. (2009) Development and first validation of the COPD Assessment Test. Eur Respir J 34:648–654. doi: 10.1183/09031936.00102509
163. Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest 119:1420–1428. doi: 10.1172/JCI39104
164. Kaminska B (2005) MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. Biochim Biophys Acta 1754:253–262. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.08.017

165. Kamp TJ, Hell JW (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. Circ Res 87:1095–1102. doi: 10.1161/01.res.87.12.1095
166. Kannler M, Lüling R, Yildirim AÖ et al. (2018) TRPA1 channels: expression in non-neuronal murine lung tissues and dispensability for hyperoxia-induced alveolar epithelial hyperplasia. Pflugers Arch 470:1231–1241. doi: 10.1007/s00424-018-2148-6
167. Keshet Y, Seger R (2010) The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions. In: Seger R (ed) MAP Kinase Signaling Protocols, vol 661. Humana Press, Totowa, NJ, pp 3–38
168. Khalid S, Murdoch R, Newlands A et al. (2014) Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonism in patients with refractory chronic cough: a double-blind randomized controlled trial. J Allergy Clin Immunol 134:56–62. doi: 10.1016/j.jaci.2014.01.038
169. Kim H, Zamel R, Bai X-H et al. (2013) PKC activation induces inflammatory response and cell death in human bronchial epithelial cells. PLoS One 8:e64182. doi: 10.1371/journal.pone.0064182
170. Kim HC, Mofarrahi M, Hussain SNA (2008) Skeletal muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 3:637–658. doi: 10.2147/copd.s4480
171. Kim JH (2018) The Emerging Role of TRPV1 in Airway Inflammation. Allergy Asthma Immunol Res 10:187–188. doi: 10.4168/aair.2018.10.3.187
172. Kobayashi Y, Hirawa N, Tabara Y et al. (2012) Mice lacking hypertension candidate gene ATP2B1 in vascular smooth muscle cells show significant blood pressure elevation. Hypertension 59:854–860. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.165068
173. Kong T, Liu M, Ji B et al. (2019) Role of the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling Pathway in Ischemia-Reperfusion Injury. Front Physiol 10:1038. doi: 10.3389/fphys.2019.01038
174. Korosec B, Glavac D, Rott T et al. (2006) Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer. Cancer Genet Cytogenet 171:105–111. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2006.06.016

175. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S et al. (2009) Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. Eur Respir J 34:888–894. doi: 10.1183/09031936.00145608
176. Kovacs L, Su Y (2017) Redox-Dependent Calpain Signaling in Airway and Pulmonary Vascular Remodeling in COPD. Adv Exp Med Biol 967:139–160. doi: 10.1007/978-3-319-63245-2_9
177. Kovalevskaya NV, Bokhovchuk FM, Vuister GW (2012) The TRPV5/6 calcium channels contain multiple calmodulin binding sites with differential binding properties. J Struct Funct Genomics 13:91–100. doi: 10.1007/s10969-012-9128-4
178. Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. Physiol Rev 81:807–869. doi: 10.1152/physrev.2001.81.2.807
179. Lalloo UG, Fox AJ, Belvisi MG et al. (1995) Capsazepine inhibits cough induced by capsaicin and citric acid but not by hypertonic saline in guinea pigs. J Appl Physiol 79:1082–1087. doi: 10.1152/jappl.1995.79.4.1082
180. Lapperre TS, Postma DS, Gosman MME et al. (2006) Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. Thorax 61:115–121. doi: 10.1136/thx.2005.040519
181. Lapperre TS, Sont JK, van Schadewijk A et al. (2007) Smoking cessation and bronchial epithelial remodelling in COPD: a cross-sectional study. Respir Res 8:85. doi: 10.1186/1465-9921-8-85
182. Lee J, Taneja V, Vassallo R (2012) Cigarette Smoking and Inflammation: Cellular and Molecular Mechanisms. J Dent Res 91:142–149. doi: 10.1177/0022034511421200
183. Lewit-Bentley A, Réty S (2000) EF-hand calcium-binding proteins. Current Opinion in Structural Biology 10:637–643. doi: 10.1016/S0959-440X(00)00142-1
184. Li N, He Y, Yang G et al. (2019) Role of TRPC1 channels in pressure-mediated activation of airway remodeling. Respir Res 20:91. doi: 10.1186/s12931-019-1050-x
185. Li D, Liu Z, Ning G (2020) Expression of CDC25A in non-small cell lung cancer and its relationship with let-7 gene. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 40:1622–1627. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.11.13

186. Lim PS, Sutton CR, Rao S (2015) Protein kinase C in the immune system: from signalling to chromatin regulation. Immunology 146:508–522. doi: 10.1111/imm.12510
187. Lin M-J, Leung GPH, Zhang W-M et al. (2004) Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca2+ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. Circ Res 95:496–505. doi: 10.1161/01.RES.0000138952.16382.ad
188. Lin J, Taggart M, Borthwick L et al. (2021) Acute cigarette smoke or extract exposure rapidly activates TRPA1-mediated calcium influx in primary human airway smooth muscle cells. Sci Rep 11:9643. doi: 10.1038/s41598-021-89051-4
189. Lin MY, Zal T, Ch'en IL et al. (2005) A pivotal role for the multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in T cells: from activation to unresponsiveness. J Immunol 174:5583–5592. doi: 10.4049/jimmunol.174.9.5583
190. Lindemann O, Rossaint J, Najder K et al. (2020) Intravascular adhesion and recruitment of neutrophils in response to CXCL1 depends on their TRPC6 channels. J Mol Med (Berl) 98:349–360. doi: 10.1007/s00109-020-01872-4
191. Liou J, Kim ML, Heo WD et al. (2005) STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. Curr Biol 15:1235–1241. doi: 10.1016/j.cub.2005.05.055
192. Liou J, Fivaz M, Inoue T et al. (2007) Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca2+ store depletion. Proc Natl Acad Sci U S A 104:9301–9306. doi: 10.1073/pnas.0702866104
193. Lis A, Peinelt C, Beck A et al. (2007) CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca2+ channels with distinct functional properties. Current Biology 17:794–800. doi: 10.1016/j.cub.2007.03.065
194. Lishko PV, Procko E, Jin X et al. (2007) The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. Neuron 54:905–918. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.027
195. Little R, Cartwright EJ, Neyses L et al. (2016) Plasma membrane calcium ATPases (PMCAs) as potential targets for the treatment of essential hypertension. Pharmacol Ther 159:23–34. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.01.013

196. Liu X-R, Liu Q, Chen G-Y et al. (2013) Down-regulation of TRPM8 in pulmonary arteries of pulmonary hypertensive rats. Cell Physiol Biochem 31:892–904. doi: 10.1159/000350107
197. Lopez JJ, Jardin I, Sanchez-Collado J et al. (2020) TRPC Channels in the SOCE Scenario. Cells 9. doi: 10.3390/cells9010126
198. López-Campos JL, Tan W, Soriano JB (2016) Global burden of COPD. Respirology (Carlton, Vic.) 21:14–23. doi: 10.1111/resp.12660
199. Lorenzo IM, Liedtke W, Sanderson MJ et al. (2008) TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 105:12611–12616. doi: 10.1073/pnas.0803970105
200. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie, 6., vollständig überarbeitete Auflage. Thieme, Stuttgart
201. Lundbäck B, Lindberg A, Lindström M et al. (2003) Not 15 but 50% of smokers develop COPD? Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. Respir Med 97:115–122. doi: 10.1053/rmed.2003.1446
202. Lytton J, Westlin M, Burk SE et al. (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. J Biol Chem 267:14483–14489
203. Ma W, Han W, Greer PA et al. (2011) Calpain mediates pulmonary vascular remodeling in rodent models of pulmonary hypertension, and its inhibition attenuates pathologic features of disease. J Clin Invest 121:4548–4566. doi: 10.1172/JCI57734
204. Magee F, Wright JL, Wiggs BR et al. (1988) Pulmonary vascular structure and function in chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 43:183–189. doi: 10.1136/thx.43.3.183
205. Mahn K, Hirst SJ, Ying S et al. (2009) Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodelling in bronchial asthma. Proc Natl Acad Sci U S A 106:10775–10780. doi: 10.1073/pnas.0902295106
206. Majo J, Ghezzo H, Cosio MG (2001) Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. European Respiratory Journal 17:946–953. doi: 10.1183/09031936.01.17509460

207. Mak D-OD, Foskett JK (2015) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. Cell Calcium 58:67–78. doi: 10.1016/j.ceca.2014.12.008
208. Malczyk M Die Rolle von TRPC-Kanälen in der chronisch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in der Maus
209. Malczyk M, Veith C, Fuchs B et al. (2013) Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med 188:1451–1459. doi: 10.1164/rccm.201307-1252OC
210. Malczyk M, Erb A, Veith C et al. (2017) The Role of Transient Receptor Potential Channel 6 Channels in the Pulmonary Vasculature. Front Immunol 8:707. doi: 10.3389/fimmu.2017.00707
211. Mannino DM, Buist AS (2007) Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. The Lancet 370:765–773. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61380-4
212. Mannino DM, Thorn D, Swensen A et al. (2008) Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. Eur Respir J 32:962–969. doi: 10.1183/09031936.00012408
213. Mantovani A, Sica A, Sozzani S et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol 25:677–686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015
214. Marno P, Bryden C, Bird W et al. (2006) How different measures of cold weather affect chronic obstructive pulmonary disease (COPD) hospital admissions in London. European Respiratory Review 15:185–186. doi: 10.1183/09059180.00010126
215. Maroto R, Raso A, Wood TG et al. (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. Nat Cell Biol 7:179–185. doi: 10.1038/ncb1218
216. Martin E, Dahan D, Cardouat G et al. (2012) Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. Pflugers Arch 464:261–272. doi: 10.1007/s00424-012-1136-5
217. Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep 6:13. doi: 10.12703/P6-13
218. Mathers CD, Loncar D (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med 3:12. doi: 10.1371/journal.pmed.0030442
219. Mayser CD Die Rolle des klassischen transienten Rezeptorpotential 3 Kanalproteins bei der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Maus

220. Mazzone SB, Undem BJ (2016) Vagal Afferent Innervation of the Airways in Health and Disease. Physiol Rev 96:975–1024. doi: 10.1152/physrev.00039.2015
221. McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. Nature 416:52–58. doi: 10.1038/nature719
222. McLeod RL, Fernandez X, Correll CC et al. (2006) TRPV1 antagonists attenuate antigen-provoked cough in ovalbumin sensitized guinea pigs. Cough 2:10. doi: 10.1186/1745-9974-2-10
223. McNally BA, Somasundaram A, Jairaman A et al. (2013) The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels. J Physiol (Lond) 591:2833–2850. doi: 10.1113/jphysiol.2012.250456
224. Medrek SK, Sharafkhaneh A, Spiegelman AM et al. (2017) Admission for COPD Exacerbation Is Associated with the Clinical Diagnosis of Pulmonary Hypertension: Results from a Retrospective Longitudinal Study of a Veteran Population. COPD 14:484–489. doi: 10.1080/15412555.2017.1336209
225. Meents JE, Fischer MJM, McNaughton PA (2017) Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. PLoS One 12:e0170097. doi: 10.1371/journal.pone.0170097
226. Melville Z, Hernández-Ochoa EO, Pratt SJP et al. (2017) The Activation of Protein Kinase A by the Calcium-Binding Protein S100A1 Is Independent of Cyclic AMP. Biochemistry 56:2328–2337. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00117
227. Mercer BA, D'Armiento JM (2006) Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 1:137–150. doi: 10.2147/copd.2006.1.2.137
228. Mercer BA, Kolesnikova N, Sonett J et al. (2004) Extracellular Regulated Kinase/Mitogen Activated Protein Kinase Is Up-regulated in Pulmonary Emphysema and Mediates Matrix Metalloproteinase-1 Induction by Cigarette Smoke. J Biol Chem 279:17690–17696. doi: 10.1074/jbc.m313842200
229. Milara J, Peiró T, Serrano A et al. (2013) Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke. Thorax 68:410–420. doi: 10.1136/thoraxjnl-2012-201761
230. Milici A, Talavera K (2021) TRP Channels as Cellular Targets of Particulate Matter. Int J Mol Sci 22. doi: 10.3390/ijms22052783
231. Minke B, Cook B (2002) TRP channel proteins and signal transduction. Physiol Rev 82:429–472. doi: 10.1152/physrev.00001.2002

232. Mitchell JE, Campbell AP, New NE et al. (2005) Expression and characterization of the intracellular vanilloid receptor (TRPV1) in bronchi from patients with chronic cough. Exp Lung Res 31:295–306. doi: 10.1080/01902140590918803
233. Montell C (2005) The TRP superfamily of cation channels. Sci STKE 2005:re3. doi: 10.1126/stke.2722005re3
234. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V et al. (2002) A Unified Nomenclature for the Superfamily of TRP Cation Channels. Molecular Cell 9:229–231. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00448-3
235. Moosmang S, Schulla V, Welling A et al. (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. EMBO J 22:6027–6034. doi: 10.1093/emboj/cdg583
236. Möröy T, Geisen C (2004) Cyclin E. Int J Biochem Cell Biol 36:1424–1439. doi: 10.1016/j.biocel.2003.12.005
237. Mu Y-P, Lin D-C, Zheng S-Y et al. (2018) Transient Receptor Potential Melastatin-8 Activation Induces Relaxation of Pulmonary Artery by Inhibition of Store-Operated Calcium Entry in Normoxic and Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertensive Rats. J Pharmacol Exp Ther 365:544–555. doi: 10.1124/jpet.117.247320
238. Muik M, Schindl R, Fahrner M et al. (2012) Ca2+ release-activated Ca2+ (CRAC) current, structure, and function. Cell Mol Life Sci 69:4163–4176. doi: 10.1007/s00018-012-1072-8
239. Mulier M, Vriens J, Voets T (2017) TRP channel pores and local calcium signals. Cell Calcium 66:19–24. doi: 10.1016/j.ceca.2017.04.007
240. Nadolni W, Zierler S (2018) The Channel-Kinase TRPM7 as Novel Regulator of Immune System Homeostasis. Cells 7. doi: 10.3390/cells7080109
241. Nagashima H, Nakamura Y, Kanno H et al. (2011) Effect of genetic variation of IL-13 on airway remodeling in bronchial asthma. Allergol Int 60:291–298. doi: 10.2332/allergolint.10-OA-0259
242. Nassenstein C, Kwong K, Taylor-Clark T et al. (2008) Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. J Physiol (Lond) 586:1595–1604. doi: 10.1113/jphysiol.2007.148379
243. Nassini R, Pedretti P, Moretto N et al. (2012) Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation. PLoS One 7:e42454. doi: 10.1371/journal.pone.0042454

244. Nathan SD, Barbera JA, Gaine SP et al. (2019) Pulmonary hypertension in chronic lung disease and hypoxia. Eur Respir J 53. doi: 10.1183/13993003.01914-2018
245. Naumov DE, Kotova OO, Gassan DA et al. (2021) Effect of TRPM8 and TRPA1 Polymorphisms on COPD Predisposition and Lung Function in COPD Patients. JPM 11:108. doi: 10.3390/jpm11020108
246. Newton AC (2018) Protein kinase C: perfectly balanced. Crit Rev Biochem Mol Biol 53:208–230. doi: 10.1080/10409238.2018.1442408
247. Ng CSH, Hui CWC, Wan S et al. (2010) Lung ischaemia-reperfusion induced gene expression. Eur J Cardiothorac Surg 37:1411–1420. doi: 10.1016/j.ejcts.2010.01.001
248. Nguyen T-N, Siddiqui G, Veldhuis NA et al. (2021) Diverse Roles of TRPV4 in Macrophages: A Need for Unbiased Profiling. Front Immunol 12:828115. doi: 10.3389/fimmu.2021.828115
249. Nilius B, Owsianik G (2011) The transient receptor potential family of ion channels. Genome Biol 12:218. doi: 10.1186/gb-2011-12-3-218
250. Nilius B, Prenen J, Janssens A et al. (2005) The selectivity filter of the cation channel TRPM4. J Biol Chem 280:22899–22906. doi: 10.1074/jbc.M501686200
251. Nilius B, Owsianik G, Voets T et al. (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. Physiol Rev 87:165–217. doi: 10.1152/physrev.00021.2006
252. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. Nature 316:440–443. doi: 10.1038/316440a0
253. O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA et al. (2004) Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. Thorax 59:837–842. doi: 10.1136/thx.2003.019349
254. Owsianik G, Talavera K, Voets T et al. (2006) Permeation and selectivity of TRP channels. Annu Rev Physiol 68:685–717. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406
255. Pacifico F, Ulianich L, Micheli S de et al. (2003) The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation. J Mol Endocrinol 30:399–409. doi: 10.1677/jme.0.0300399

256. Pain M, Bermudez O, Lacoste P et al. (2014) Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. Eur Respir Rev 23:118–130. doi: 10.1183/09059180.00004413
257. Pan Z, Yang H, Reinach PS (2011) Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels. Hum Genomics 5:108–116. doi: 10.1186/1479-7364-5-2-108
258. Parenti A, Logu F de, Geppetti P et al. (2016) What is the evidence for the role of TRP channels in inflammatory and immune cells? Br J Pharmacol 173:953–969. doi: 10.1111/bph.13392
259. Park CY, Hoover PJ, Mullins FM et al. (2009) STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. Cell 136:876–890. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.014
260. Patergnani S, Danese A, Bouhamida E et al. (2020) Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. Int J Mol Sci 21. doi: 10.3390/ijms21218323
261. Peinado VI, Barbera JA, Ramirez J et al. (1998) Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. Am J Physiol 274:L908-13. doi: 10.1152/ajplung.1998.274.6.L908
262. Pelaia C, Vatrella A, Gallelli L et al. (2021) Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Asthma and COPD: Pathogenic Aspects and Potential Targeted Therapies. Drug Des Devel Ther 15:1275–1284. doi: 10.2147/DDDT.S300988
263. Periasamy M, Kalyanasundaram A (2007) SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. Muscle Nerve 35:430–442. doi: 10.1002/mus.20745
264. Petit A, Knabe L, Khelloufi K et al. (2019) Bronchial Epithelial Calcium Metabolism Impairment in Smokers and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Decreased ORAI3 Signaling. Am J Respir Cell Mol Biol 61:501–511. doi: 10.1165/rcmb.2018-0228OC
265. Pezzuto A, Citarella F, Croghan I et al. (2019) The effects of cigarette smoking extracts on cell cycle and tumor spread: novel evidence. Future Sci OA 5:FSO 394. doi: 10.2144/fsoa-2019-0017
266. Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J (2006) Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. Pharmacol Ther 112:440–456. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.04.010

267. Pratt PF, Bonnet S, Ludwig LM et al. (2002) Upregulation of L-type Ca2+ channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. Hypertension 40:214–219. doi: 10.1161/01.hyp.0000025877.23309.36
268. Proost I de, Brouns I, Pintelon I et al. (2007) Pulmonary expression of voltage-gated calcium channels: special reference to sensory airway receptors. Histochem Cell Biol 128:301–316. doi: 10.1007/s00418-007-0318-2
269. Putcha N, Drummond MB, Wise RA et al. (2015) Comorbidities and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Prevalence, Influence on Outcomes, and Management. Semin Respir Crit Care Med 36:575–591. doi: 10.1055/s-0035-1556063
270. Putney JW (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. Cell Calcium 7:1–12. doi: 10.1016/0143-4160(86)90026-6
271. Qiao L, Xu Y, Liu X et al. (2008) Role of protein kinase C alpha and cyclin D1 in the proliferation of airway smooth muscle in asthmatic rats. Chin Med J (Engl) 121:2070–2076
272. Qu J, Mei Q, Niu R (2019) Oxidative CaMKII as a potential target for inflammatory disease (Review). Mol Med Rep 20:863–870. doi: 10.3892/mmr.2019.10309
273. Railwah C, Lora A, Zahid K et al. (2020) Cigarette smoke induction of S100A9 contributes to chronic obstructive pulmonary disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 319:L1021-L1035. doi: 10.1152/ajplung.00207.2020
274. Rajakulendran S, Kaski D, Hanna MG (2012) Neuronal P/Q-type calcium channel dysfunction in inherited disorders of the CNS. Nat Rev Neurol 8:86–96. doi: 10.1038/nrneurol.2011.228
275. Rajan S, Schremmer C, Weber J et al. (2021) Ca2+ Signaling by TRPV4 Channels in Respiratory Function and Disease. Cells 10. doi: 10.3390/cells10040822
276. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. Annu Rev Physiol 68:619–647. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431
277. Ravenhall C, Guida E, Harris T et al. (2000) The importance of ERK activity in the regulation of cyclin D1 levels and DNA synthesis in human cultured airway smooth muscle. Br J Pharmacol 131:17–28. doi: 10.1038/sj.bjp.0703454
278. Renda T, Baraldo S, Pelaia G et al. (2008) Increased activation of p38 MAPK in COPD. Eur Respir J 31:62–69. doi: 10.1183/09031936.00036707
279. Repine JE, Bast A, Lankhorst ID (1997) Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med 156:341–357. doi: 10.1164/ajrccm.156.2.9611013

280. Rode B, Bailey MA, Marthan R et al. (2018) ORAI Channels as Potential Therapeutic Targets in Pulmonary Hypertension. Physiology (Bethesda) 33:261–268. doi: 10.1152/physiol.00016.2018
281. Rodman DM, Reese K, Harral J et al. (2005) Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. Circ Res 96:864–872. doi: 10.1161/01.RES.0000163066.07472.ff
282. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV et al. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function. J Cell Biol 169:435–445. doi: 10.1083/jcb.200502019
283. Roxlau ET, Pak O, Hadzic S et al. (2023) Nicotine promotes e-cigarette vapour-induced lung inflammation and structural alterations. Eur Respir J 61. doi: 10.1183/13993003.00951-2022
284. Rüschoff JH, Brandenburger T, Strehler EE et al. (2012) Plasma membrane calcium ATPase expression in human colon multistep carcinogenesis. Cancer Invest 30:251–257. doi: 10.3109/07357907.2012.657817
285. Rutgers SR, Postma DS, Hacken NH ten et al. (2000) Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. Thorax 55:12–18. doi: 10.1136/thorax.55.1.12
286. Rydell-Törmänen K, Johnson JR (2019) The Applicability of Mouse Models to the Study of Human Disease. In: Bertoncello I (ed) Mouse Cell Culture, vol 1940. Springer New York, New York, NY, pp 3–22
287. Sabnis AS, Shadid M, Yost GS et al. (2008) Human Lung Epithelial Cells Express a Functional Cold-Sensing TRPM8 Variant. Am J Respir Cell Mol Biol 39:466–474. doi: 10.1165/rcmb.2007-0440OC
288. Sabnis AS, Reilly CA, Veranth JM et al. (2008) Increased transcription of cytokine genes in human lung epithelial cells through activation of a TRPM8 variant by cold temperatures. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295:L194-200. doi: 10.1152/ajplung.00072.2008
289. Saco TV, Breitzig MT, Lockey RF et al. (2018) Epigenetics of Mucus Hypersecretion in Chronic Respiratory Diseases. Am J Respir Cell Mol Biol 58:299–309. doi: 10.1165/rcmb.2017-0072TR
290. Sadofsky LR, Ramachandran R, Crow C et al. (2012) Inflammatory stimuli up-regulate transient receptor potential vanilloid-1 expression in human bronchial fibroblasts. Exp Lung Res 38:75–81. doi: 10.3109/01902148.2011.644027

291. Saetta M, Turato G, Baraldo S et al. (2000) Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation. Am J Respir Crit Care Med 161:1016–1021. doi: 10.1164/ajrccm.161.3.9907080
292. Sakao S, Voelkel NF, Tatsumi K (2014) The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations. Eur Respir Rev 23:350–355. doi: 10.1183/09059180.00007913
293. Salvi SS, Barnes PJ (2009) Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. The Lancet 374:733–743. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61303-9
294. Sana A, Somda SMA, Meda N et al. (2018) Chronic obstructive pulmonary disease associated with biomass fuel use in women: a systematic review and meta-analysis. BMJ Open Resp Res 5:e000246. doi: 10.1136/bmjresp-2017-000246
295. Sankhe S, Manousakidi S, Antigny F et al. (2017) T-type Ca2+ channels elicit pro-proliferative and anti-apoptotic responses through impaired PP2A/Akt1 signaling in PASMCs from patients with pulmonary arterial hypertension. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1864:1631–1641. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.06.018
296. Santos S, Peinado VI, Ramírez J et al. (2002) Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. Eur Respir J 19:632–638. doi: 10.1183/09031936.02.00245902
297. Santos S, Peinado VI, Ramirez J et al. (2003) Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary arteries of smokers and patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 167:1250–1256. doi: 10.1164/rccm.200210-1233OC
298. Santus P, Pecchiari M, Tursi F et al. (2019) The Airways' Mechanical Stress in Lung Disease: Implications for COPD Pathophysiology and Treatment Evaluation. Can Respir J 2019:3546056. doi: 10.1155/2019/3546056
299. Sathish V, Thompson MA, Bailey JP et al. (2009) Effect of proinflammatory cytokines on regulation of sarcoplasmic reticulum Ca2+ reuptake in human airway smooth muscle. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 297:L26-34. doi: 10.1152/ajplung.00026.2009
300. Sato S, Fujita N, Tsuruo T (2004) Involvement of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in the MEK/MAPK signal transduction pathway. Journal of Biological Chemistry 279:33759–33767. doi: 10.1074/jbc.M402055200

301. Scharf SM, Iqbal M, Keller C et al. (2002) Hemodynamic characterization of patients with severe emphysema. Am J Respir Crit Care Med 166:314–322. doi: 10.1164/rccm.2107027
302. Schatzmann HJ (1966) ATP-dependent Ca++-extrusion from human red cells. Experientia 22:364–365. doi: 10.1007/BF01901136
303. Scheraga RG, Southern BD, Grove LM et al. (2020) The Role of TRPV4 in Regulating Innate Immune Cell Function in Lung Inflammation. Front Immunol 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.01211
304. Scheraga RG, Abraham S, Grove LM et al. (2020) TRPV4 Protects the Lung from Bacterial Pneumonia via MAPK Molecular Pathway Switching. J Immunol 204:1310–1321. doi: 10.4049/jimmunol.1901033
305. Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR et al. (2011) Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. Nat Rev Cardiol 8:443–455. doi: 10.1038/nrcardio.2011.87
306. Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M et al. (2007) TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. Biochim Biophys Acta 1772:813–821. doi: 10.1016/j.bbadis.2007.03.009
307. Segal LN, Martinez FJ (2018) Chronic obstructive pulmonary disease subpopulations and phenotyping. J Allergy Clin Immunol 141:1961–1971. doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.035
308. Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. FASEB j 9:726–735. doi: 10.1096/fasebj.9.9.7601337
309. Seimetz M, Parajuli N, Pichl A et al. (2011) Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. Cell 147:293–305. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.035
310. Shareef MA, Anwer LA, Poizat C (2014) Cardiac SERCA2A/B: therapeutic targets for heart failure. Eur J Pharmacol 724:1–8. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.12.018
311. Shaykhiev R, Krause A, Salit J et al. (2009) Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. J Immunol 183:2867–2883. doi: 10.4049/jimmunol.0900473
312. Shen T, Huang S (2012) The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. Anticancer Agents Med Chem 12:631–639. doi: 10.2174/187152012800617678

313. Sheppard BJ, Williams M, Plummer HK et al. (2000) Activation of voltage-operated Ca2+-channels in human small cell lung carcinoma by the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. Int J Oncol 16:513–518. doi: 10.3892/ijo.16.3.513
314. Shipman JG, Onyenwoke RU, Sivaraman V (2021) Calcium-Dependent Pulmonary Inflammation and Pharmacological Interventions and Mediators. Biology (Basel) 10. doi: 10.3390/biology10101053
315. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I et al. (2013) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. J Am Coll Cardiol 62:D34-41. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.029
316. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS et al. (2019) Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. Eur Respir J 53. doi: 10.1183/13993003.01913-2018
317. Skelding KA, Rostas JAP, Verrills NM (2011) Controlling the cell cycle: the role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. Cell Cycle 10:631–639. doi: 10.4161/cc.10.4.14798
318. Spinelli AM, González-Cobos JC, Zhang X et al. (2012) Airway smooth muscle STIM1 and Orai1 are upregulated in asthmatic mice and mediate PDGF-activated SOCE, CRAC currents, proliferation, and migration. Pflugers Arch 464:481–492. doi: 10.1007/s00424-012-1160-5
319. Spix B, Butz ES, Chen C-C et al. (2022) Lung emphysema and impaired macrophage elastase clearance in mucolipin 3 deficient mice. Nat Commun 13:318. doi: 10.1038/s41467-021-27860-x
320. Spruessel A, Steimann G, Jung M et al. (2004) Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. BioTechniques 36:1030–1037. doi: 10.2144/04366RR04
321. Stacey DW (2003) Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. Current Opinion in Cell Biology 15:158–163. doi: 10.1016/S0955-0674(03)00008-5
322. Stafford N, Wilson C, Oceandy D et al. (2017) The Plasma Membrane Calcium ATPases and Their Role as Major New Players in Human Disease. Physiol Rev 97:1089–1125. doi: 10.1152/physrev.00028.2016

323. Stănescu D, Sanna A, Veriter C et al. (1996) Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. Thorax 51:267–271
324. Stathopulos PB, Li G-Y, Plevin MJ et al. (2006) Stored Ca2+ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca2+ entry. J Biol Chem 281:35855–35862. doi: 10.1074/jbc.M608247200
325. Stathopulos PB, Le Zheng, Ikura M (2009) Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics. J Biol Chem 284:728–732. doi: 10.1074/jbc.C800178200
326. Strehler EE, Caride AJ, Filoteo AG et al. (2007) Plasma membrane Ca2+ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. Ann N Y Acad Sci 1099:226–236. doi: 10.1196/annals.1387.023
327. Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K et al. (2000) OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. Nat Cell Biol 2:695–702. doi: 10.1038/35036318
328. Sweeney M, McDaniel SS, Platoshyn O et al. (2002) Role of capacitative Ca2+ entry in bronchial contraction and remodeling. J Appl Physiol 92:1594–1602. doi: 10.1152/japplphysiol.00722.2001
329. Swert KO de, Joos GF (2006) Extending the understanding of sensory neuropeptides. Eur J Pharmacol 533:171–181. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.066
330. Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Horigane S-I et al. (2017) Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. J Neurochem 141:808–818. doi: 10.1111/jnc.14020
331. Takeyama K, Jung B, Shim JJ et al. (2001) Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 280:165-72. doi: 10.1152/ajplung.2001.280.1.L165
332. Takizawa H, Tanaka M, Takami K et al. (2001) Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Am J Respir Crit Care Med 163:1476–1483. doi: 10.1164/ajrccm.163.6.9908135
333. Talavera K, Gees M, Karashima Y et al. (2009) Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. Nat Neurosci 12:1293–1299. doi: 10.1038/nn.2379

334. Taniguchi A, Tsuge M, Miyahara N et al. (2021) Reactive Oxygen Species and Antioxidative Defense in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Antioxidants (Basel) 10. doi: 10.3390/antiox10101537
335. Tanner L, Single AB (2020) Animal Models Reflecting Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Related Respiratory Disorders: Translating Pre-Clinical Data into Clinical Relevance. J Innate Immun 12:203–225. doi: 10.1159/000502489
336. Taylor CW, Tovey SC, Rossi AM et al. (2014) Structural organization of signalling to and from IP3 receptors. Biochem Soc Trans 42:63–70. doi: 10.1042/BST20130205
337. Taylor-Clark TE, Nassenstein C, McAlexander MA et al. (2009) TRPA1: a potential target for anti-tussive therapy. Pulm Pharmacol Ther 22:71–74. doi: 10.1016/j.pupt.2008.12.019
338. Thorneloe KS, Cheung M, Bao W et al. (2012) An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure. Sci Transl Med 4:159ra148. doi: 10.1126/scitranslmed.3004276
339. Tønnesen P (2013) Smoking cessation and COPD. European Respiratory Review 22:37–43. doi: 10.1183/09059180.00007212
340. Tseng C-M, Chen Y-T, Ou S-M et al. (2013) The effect of cold temperature on increased exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a nationwide study. PLoS One 8:e57066. doi: 10.1371/journal.pone.0057066
341. Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV et al. (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. Trends Neurosci 11:431–438. doi: 10.1016/0166-2236(88)90194-4
342. Tsuji F, Aono H (2012) Role of transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and autoimmune diseases. Pharmaceuticals (Basel) 5:837–852. doi: 10.3390/ph5080837
343. Tsuji F, Murai M, Oki K et al. (2010) Effects of SA13353, a transient receptor potential vanilloid 1 agonist, on leukocyte infiltration in lipopolysaccharide-induced acute lung injury and ovalbumin-induced allergic airway inflammation. J Pharmacol Sci 112:487–490. doi: 10.1254/jphs.09295sc
344. Tuder RM, Yoshida T, Arap W et al. (2006) State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective. Proc Am Thorac Soc 3:503–510. doi: 10.1513/pats.200603-054MS

345. Tzanakis N, Chrysofakis G, Tsoumakidou M et al. (2004) Induced sputum CD8+ T-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease. Respir Med 98:57–65. doi: 10.1016/j.rmed.2003.08.007
346. Ueda Y, Hirai Si, Osada Si et al. (1996) Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. Journal of Biological Chemistry 271:23512–23519. doi: 10.1074/jbc.271.38.23512
347. van der Toorn M, Rezayat D, Kauffman HF et al. (2009) Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 297:L109-14. doi: 10.1152/ajplung.90461.2008
348. van Pottelberge GR, Bracke KR, Demedts IK et al. (2010) Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD. Respir Res 11:35. doi: 10.1186/1465-9921-11-35
349. Vangeel L, Voets T (2019) Transient Receptor Potential Channels and Calcium Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol 11. doi: 10.1101/cshperspect.a035048
350. VanHouten J, Sullivan C, Bazinet C et al. (2010) PMCA2 regulates apoptosis during mammary gland involution and predicts outcome in breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 107:11405–11410. doi: 10.1073/pnas.0911186107
351. Vela J, Pérez-Millán MI, Becu-Villalobos D et al. (2007) Different kinases regulate activation of voltage-dependent calcium channels by depolarization in GH3 cells. Am J Physiol , Cell Physiol 293:C951-9. doi: 10.1152/ajpcell.00429.2006
352. Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP channels. Annu Rev Biochem 76:387–417. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819
353. Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL (2004) Control of TRPC and store-operated channels by protein kinase C. Novartis Found Symp 258:172-85; discussion 185-8, 263-6
354. Vicent S, López-Picazo JM, Toledo G et al. (2004) ERK1/2 is activated in non-small-cell lung cancer and associated with advanced tumours. Br J Cancer 90:1047–1052. doi: 10.1038/sj.bjc.6601644
355. Vig M, Kinet J-P (2009) Calcium signaling in immune cells. Nat Immunol 10:21–27. doi: 10.1038/ni.f.220
356. Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM et al. (2013) Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca2+ channel activity in pulmonary artery

by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 305:L154-64. doi: 10.1152/ajplung.00313.2012

357. Wang R, He G, Nelman-Gonzalez M et al. (2007) Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. Cell 128:1119–1132. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.053
358. Wang J, Chen Y, Lin C et al. (2014) Effects of chronic exposure to cigarette smoke on canonical transient receptor potential expression in rat pulmonary arterial smooth muscle. Am J Physiol , Cell Physiol 306:C364-73. doi: 10.1152/ajpcell.00048.2013
359. Wang W, Zhang X, Gao Q et al. (2014) TRPML1: an ion channel in the lysosome. Handb Exp Pharmacol 222:631–645. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2_24
360. Wang J, Xu C, Zheng Q et al. (2017) Orai1, 2, 3 and STIM1 promote store-operated calcium entry in pulmonary arterial smooth muscle cells. Cell Death Discov 3:17074. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.74
361. Wang C, Naruse K, Takahashi K (2018) Role of the TRPM4 Channel in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. Cells 7. doi: 10.3390/cells7060062
362. Wang M, Zhang Y, Xu M et al. (2019) Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke -induced airway epithelial cell injury model. Free Radic Biol Med 134:229–238. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.004
363. Wang J, Yang G, Li M et al. (2019) Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8)-Based Mechanisms Underlie Both the Cold Temperature-Induced Inflammatory Reactions and the Synergistic Effect of Cigarette Smoke in Human Bronchial Epithelial (16HBE) Cells. Front Physiol 10:285. doi: 10.3389/fphys.2019.00285
364. Wang X, Wang W, Liu C et al. (2020) Involvement of TRPC1 and Cyclin D1 in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Proliferation Induced by Cigarette Smoke Extract. Curr Med Sci 40:1085–1091. doi: 10.1007/s11596-020-2290-1
365. Wang J, He Y, Yang G et al. (2020) Transient receptor potential canonical 1 channel mediates the mechanical stress-induced epithelial-mesenchymal transition of human bronchial epithelial (16HBE) cells. Int J Mol Med 46:320–330. doi: 10.3892/ijmm.2020.4568

366. Wang J, Le Wang, Chen X et al. (2022) Cigarette smoke extract stimulates human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation: Role of inflammation and oxidative stress. Iran J Basic Med Sci 25:755–761. doi: 10.22038/IJBMS.2022.64170.14133
367. Wang KK, Wright LC, Machan CL et al. (1991) Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase from human erythrocytes. J Biol Chem 266:9078–9085
368. Weber J, Rajan S, Schremmer C et al. (2020) TRPV4 channels are essential for alveolar epithelial barrier function as protection from lung edema. JCI Insight 5. doi: 10.1172/jci.insight.134464
369. Wei J, Xiong X-F, Lin Y-H et al. (2015) Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. PeerJ 3:e1199. doi: 10.7717/peerj.1199
370. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B et al. (2006) Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. Proc Natl Acad Sci U S A 103:19093–19098. doi: 10.1073/pnas.0606728103
371. Weissmann N, Sydykov A, Kalwa H et al. (2012) Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice. Nat Commun 3:649. doi: 10.1038/ncomms1660
372. Weitzenblum E, Chaouat A, Canuet M et al. (2009) Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease and interstitial lung diseases. Semin Respir Crit Care Med 30:458–470. doi: 10.1055/s-0029-1233315
373. White TA, Xue A, Chini EN et al. (2006) Role of transient receptor potential C3 in TNF-alpha-enhanced calcium influx in human airway myocytes. Am J Respir Cell Mol Biol 35:243–251. doi: 10.1165/rcmb.2006-0003OC
374. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB et al. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol Rev 79:143–180. doi: 10.1152/physrev.1999.79.1.143
375. Winters CJ, Koval O, Murthy S et al. (2015) CaMKII inhibition in type II pneumocytes protects from bleomycin-induced pulmonary fibrosis by preventing Ca2+-dependent apoptosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 310:L86-94. doi: 10.1152/ajplung.00132.2015

376. World health organisation Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd). Accessed 08 Oct 2021
377. Wright JL, Churg A (1991) Effect of long-term cigarette smoke exposure on pulmonary vascular structure and function in the guinea pig. Exp Lung Res 17:997–1009. doi: 10.3109/01902149109064331
378. Wright JL, Tai H, Dai J et al. (2002) Cigarette smoke induces rapid changes in gene expression in pulmonary arteries. Lab Invest 82:1391–1398. doi: 10.1097/01.lab.0000032806.45023.08
379. Wright JL, Cosio M, Churg A (2008) Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295:L1-15. doi: 10.1152/ajplung.90200.2008
380. Wu S, Jian M-Y, Xu Y-C et al. (2009) Ca2+ entry via alpha1G and TRPV4 channels differentially regulates surface expression of P-selectin and barrier integrity in pulmonary capillary endothelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 297:L650-7. doi: 10.1152/ajplung.00015.2009
381. Wylam ME, Sathish V, VanOosten SK et al. (2015) Mechanisms of Cigarette Smoke Effects on Human Airway Smooth Muscle. PLoS One 10:e0128778. doi: 10.1371/journal.pone.0128778
382. Xaing M, Liu X, Zeng D et al. (2010) Changes of protein kinase Calpha and cyclin D1 expressions in pulmonary arteries from smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci.] 30:159–164. doi: 10.1007/s11596-010-0205-2
383. Xia C, Braunstein Z, Toomey AC et al. (2017) S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. Front Immunol 8:1908. doi: 10.3389/fimmu.2017.01908
384. Xia Y, Xia L, Lou L et al. (2018) Transient Receptor Potential Channels and Chronic Airway Inflammatory Diseases: A Comprehensive Review. Lung 196:505–516. doi: 10.1007/s00408-018-0145-3
385. Xiang M, Xu Y, Liu X et al. (2010) Cigarette smoke extract promotes human pulmonary artery smooth muscle cells proliferation through protein kinase C alpha-dependent induction of cyclin D1. Chin Med J (Engl) 123:3663–3670

386. Xiong M, Wang J, Guo M et al. (2016) TRPM8 genetic variations associated with COPD risk in the Chinese Han population. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 11:2563–2571. doi: 10.2147/COPD.S109026
387. Xu X, Yamamoto H, Sakon M et al. (2003) Overexpression of CDC25A phosphatase is associated with hypergrowth activity and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. Clin Cancer Res 9:1764–1772
388. Xu F, Satoh E, Iijima T (2003) Protein kinase C-mediated Ca2+ entry in HEK 293 cells transiently expressing human TRPV4. Br J Pharmacol 140:413–421. doi: 10.1038/sj.bjp.0705443
389. Yan F, Gao H, Zhao H et al. (2018) Role of airway smooth muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. J Transl Med 16:262. doi: 10.1186/s12967-018-1635-z
390. Yang X-R, Lin M-J, McIntosh LS et al. (2006) Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290:L1267-76. doi: 10.1152/ajplung.00515.2005
391. Yang K, Hitomi M, Stacey DW (2006) Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. Cell Div 1:32. doi: 10.1186/1747-1028-1-32
392. Yang D, Luo Z, Ma S et al. (2010) Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. Cell Metab 12:130–141. doi: 10.1016/j.cmet.2010.05.015
393. Yang VW (2018) The Cell Cycle. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract. Elsevier, pp 197–219
394. Yao X, Kwan H-Y, Huang Y (2005) Regulation of TRP channels by phosphorylation. Neurosignals 14:273–280. doi: 10.1159/000093042
395. Yao Y, Zhou J, Diao X et al. (2019) Association between tumor necrosis factor-α and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. Ther Adv Respir Dis 13:1753466619866096. doi: 10.1177/1753466619866096
396. Yap JMG, Ueda T, Takeda N et al. (2020) An inflammatory stimulus sensitizes TRPA1 channel to increase cytokine release in human lung fibroblasts. Cytokine 129:155027. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155027
397. Yin Y, Wu M, Zubcevic L et al. (2018) Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8. Science 359:237–241. doi: 10.1126/science.aan4325

398. Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A (2004) Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. Chest 125:626–632. doi: 10.1378/chest.125.2.626
399. Youssef I, Ricort J-M (2019) Deciphering the Role of Protein Kinase D1 (PKD1) in Cellular Proliferation. Mol Cancer Res 17:1961–1974. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0125
400. Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV et al. (2004) Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A 101:13861–13866. doi: 10.1073/pnas.0405908101
401. Yu Y, Keller SH, Remillard CV et al. (2009) A Functional Single-Nucleotide Polymorphism in the TRPC6 Gene Promoter Associated with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. Circulation 119:2313–2322. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.782458
402. Yu M, Liu X, Wu H et al. (2013) ERK1/2 promotes cigarette smoke-induced rat pulmonary artery smooth muscle cells proliferation and pulmonary vascular remodeling via up-regulating cycline1 expression. J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci.] 33:315–322. doi: 10.1007/s11596-013-1117-8
403. Yu Q, Li M (2017) Effects of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) on the mechanical stretch-induced expression of airway remodeling-associated factors in human bronchial epithelioid cells. J Biomech 51:89–96. doi: 10.1016/j.jbiomech.2016.12.002
404. Yu M, Liu X, Wu H et al. (2017) Small interfering RNA against ERK1/2 attenuates cigarette smoke-induced pulmonary vascular remodeling. Exp Ther Med 14:4671–4680. doi: 10.3892/etm.2017.5160
405. Yue L, Peng JB, Hediger MA et al. (2001) CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. Nature 410:705–709. doi: 10.1038/35070596
406. Zeng B, Yuan C, Yang X et al. (2013) TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis. Curr Cancer Drug Targets 13:103–116
407. Zhang Y, Cardell L-O, Edvinsson L et al. (2013) MAPK/NF-κB-dependent upregulation of kinin receptors mediates airway hyperreactivity: a new perspective for the treatment. Pharmacol Res 71:9–18. doi: 10.1016/j.phrs.2013.02.004

408. Zhang J, Bai C (2018) The Significance of Serum Interleukin-8 in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Tanaffos 17:13–21
409. Zhang X, Ye L, Huang Y et al. (2019) The potential role of TRPV1 in pulmonary hypertension: Angel or demon? Channels (Austin) 13:235–246. doi: 10.1080/19336950.2019.1631106
410. Zhao L-M, Kuang H-Y, Zhang L-X et al. (2014) Effect of TRPV1 channel on proliferation and apoptosis of airway smooth muscle cells of rats. J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci.] 34:504–509. doi: 10.1007/s11596-014-1306-0
411. ZHOU S, Li M, Zeng D et al. (2015) Effects of basic fibroblast growth factor and cyclin D1 on cigarette smoke-induced pulmonary vascular remodeling in rats. Exp Ther Med 9:33–38. doi: 10.3892/etm.2014.2044
412. Zhu G, Gulsvik A, Bakke P et al. (2009) Association of TRPV4 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. Hum Mol Genet 18:2053–2062. doi: 10.1093/hmg/ddp111
413. Zhu J, Kovacs L, Han W et al. (2019) Reactive Oxygen Species-Dependent Calpain Activation Contributes to Airway and Pulmonary Vascular Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Antioxid Redox Signal 31:804–818. doi: 10.1089/ars.2018.7648
414. Zhu MX (2005) Multiple roles of calmodulin and other (Ca2+)-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. Pflugers Arch 451:105–115. doi: 10.1007/s00424-005-1427-1
415. Zierler S, Hampe S, Nadolni W (2017) TRPM channels as potential therapeutic targets against pro-inflammatory diseases. Cell Calcium 67:105–115. doi: 10.1016/j.ceca.2017.05.002
416. Zygmunt PM, Högestätt ED (2014) TRPA1. Handb Exp Pharmacol 222:583–630. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2_23
417. Zylinska L, Guerini D, Gromadzinska E et al. (1998) Protein kinases A and C phosphorylate purified Ca2+-ATPase from rat cortex, cerebellum and hippocampus. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1448:99–108. doi: 10.1016/S0167-4889(98)00128-1

13 Ehrenwörtliche Erklärung

„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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt 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

14 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zur Erstellung dieser Arbeit begleitet haben. Sowohl fachlich als auch menschlich durfte ich in dieser Zeit viel lernen und mich weiterentwickeln.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann. Vielen Dank dafür, dass Sie mir die Arbeit an diesem Projekt ermöglicht haben, ich bedanke mich für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes und der Materialen sowie für die Finanzierung.

Besonders hervorzuheben ist Frau Dr. Monika Brosien, die mich von der ersten Vorstellung des Projektes in der Laborküche, bis zur letzten Korrektur begleitet hat. Du hattest bei Fragen und Zweifeln immer ein offenes Ohr für mich und ich habe mich stets gut von dir betreut gefühlt. DANKE!

Bei der gesamten AG Weißmann möchte ich mich ebenfalls von Herzen bedanken, ich habe mich in der Zeit im Labor immer sehr wohlgefühlt. Insbesondere Kathrin Malkmus möchte ich hier erwähnen, danke dir, dass du mich in den ersten Wochen überall mitgenommen hast, mich in die Methoden eingeführt hast und ich mich bei allen Fragen und Sorgen bei dir melden konnte. Außerdem möchte ich mich bei den technischen Assistenten des Labors bedanken, bei Frau Carmen Homberger und Herrn Nils Schupp in der Zellkultur. Danke an Christine Veith, dass du für mich ansprechbar warst und ich mich bei Fragen auch an dich wenden durfte. In der Molekularbiologie, in der ich die meiste Zeit meiner Arbeit verbracht habe, geht ein ganz besonderer Dank an Frau Ingrid Breitenborn-Müller. „Darf ich dich noch ein letztes Mal kurz stören Ingrid?“ Ich möchte mich bei dir bedanken, dafür dass du mir die Methoden im Labor beigebracht hast, für all die kleinen und großen Probleme eine Lösung parat hattest, für die guten Gespräche und für die gute Laune am Morgen im Labor.

Auch all meinen Lieblingsmenschen, die mich während der letzten sechs Jahre begleitet haben und mir immer wieder bewusst machen, was im Leben wirklich zählt, möchte ich danke sagen. Vorneweg dir Janik, dass du unerschütterlich an meiner Seite bist und mit mir wirklich alle Höhen und Tiefen zusammen durchstehst. DANKE, dass du mich erdest, mir Mut und Vertrauen gibst und immer für mich da bist. Patricia möchte ich für die unzähligen Homeofficetage mit anregenden Gesprächen danke sagen. Danke an Paula fürs Korrekturlesen, meine vielen Rechtschreibfehler verbessern und einfach danke für die ganz besondere Zeit die wir miteinander geteilt haben. Außerdem möchte ich mich

bei Ilka, Nhu, Jana, Julia, Prabh und allen anderen bedanken, die dafür gesorgt haben, dass meine Zeit in Gießen zu einer ganz besonderen wurde.

Abschließend möchte ich mich natürlich auch noch bei meiner Familie bedanken, die mich stets unterstützt und für mich da ist. Danke, dass ihr mir das Gefühl gibt immer nach Hause kommen zu können.