

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann



Der Speicher- und Rezeptor-operierte Ca^{2+} -Einstrom in pulmonale arterielle glatte Muskelzellen und murine Lungenfibroblasten

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Larissa Bendiks

aus Starnberg

2021

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

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Alexander Dietrich
Mitberichterstatter:	PD Dr. Claudia Staab-Weijnitz
	Prof. Dr. Hans Zischka
	Prof. Dr. Franz Worek
	PD Dr. Petra Kameritsch
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	5.10.2021

Meiner Mutter Heidemarie Bendiks

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	X
Abbildungsverzeichnis.....	XV
Tabellenverzeichnis	XVIII
Zusammenfassung.....	XIX
Abstract.....	XXI
1 Einleitung.....	1
1.1 Ca ²⁺ als vielseitiges Signalmolekül	1
1.2 Der Ca ²⁺ -Einstrom in die Zelle	2
1.2.1 Der Speicher-operierte Ca ²⁺ -Einstrom (SOCE).....	2
1.2.1.1 „Stromal interaction molecule“ (STIM)1/2-Proteine.....	4
1.2.1.2 Orai-Kanäle.....	6
1.2.2 Der Rezeptor-operierte Ca ²⁺ -Einstrom (ROCE).....	8
1.2.2.1 Die Superfamilie der „transient receptor potential“ (TRP)-Kanäle.....	9
1.2.2.2 „Classical transient receptor potential“ (TRPC)-Kanäle	10
1.2.2.3 „Nuclear factor of activated t cells“ (NFAT) als Transkriptionsfaktor	12
1.2.2.4 Interaktion zwischen „classical transient receptor potential“ (TRPC)-Kanälen und „stromal interaction molecule“ (STIM1/2)-Proteinen /Orai-Kanälen	14
1.3 Funktion und Aufbau des humanen respiratorischen Systems	17
1.4 Das murine respiratorische System.....	19
1.5 Krankheitsbilder der Lunge	21
1.5.1 Pulmonale arterielle Hypertonie	21
1.6 Pathophysiologische Rolle des Speicher-operierten Ca ²⁺ -Einstroms (SOCE) und von „classical transient receptor potential“ (TRPC)1-, TRPC3- und TRPC6-Kanälen.....	28
1.7 Zielsetzung der Dissertation	32
2 Material und Methoden.....	34

2.1	Material	34
2.1.1	Mauslinien.....	34
2.1.2	Zellen und Zellkulturmedien.....	34
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	35
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	38
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	43
2.1.6	LaboraAusstattung und Geräte	44
2.1.7	Enzyme, Kits und Marker	46
2.1.8	Plasmide.....	46
2.1.9	Oligonukleotide.....	47
2.1.10	Antikörper	48
2.1.11	Softwareprogramme.....	49
2.2	Methoden	49
2.2.1	Mäusezucht und Mausmodelle	49
2.2.2	Das Cre/loxP-Rekombinationssystem.....	49
2.2.3	Genotypisierung.....	50
2.2.4	Zellbiologie.....	51
2.2.4.1	Zellkultur.....	51
2.2.4.2	Medienwechsel, Passagierung und Kryokonservierung	51
2.2.4.3	Isolation pulmonaler arterieller glatter Muskelzellen (PASMC).....	51
2.2.4.4	Isolation primärer murinen Lungenfibroblasten (pmLF).....	52
2.2.4.5	„Transforming growth factor“ (TGF)- β 1-Behandlung von pmLF	52
2.2.4.6	Produktion Lentiviren	52
2.2.4.7	Infektion von pmLF mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren	53
2.2.5	Molekularbiologie.....	53
2.2.5.1	Transformation.....	53
2.2.5.2	Plasmidisolierung.....	54

2.2.5.3	„Ribonucleic acid“ (RNA)-Isolation.....	54
2.2.5.4	Erststrangsynthese.....	54
2.2.5.5	Quantitative <i>real time</i> -Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	54
2.2.5.6	„Deoxyribonucleic acid“ (DNA)-Isolation aus Zellen	55
2.2.5.7	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	55
2.2.6	Proteinbiochemie	55
2.2.6.1	Proteinisolierung.....	55
2.2.6.2	Isolierung der nukleären Fraktion.....	56
2.2.6.3	„Sodium dodecyl sulfate“ -Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
2.2.6.4	Protein-Analyse mittels <i>Western Blot</i>	56
2.2.6.5	Immunfluoreszenz.....	57
2.2.7	Funktionelle Messmethoden	57
2.2.7.1	<i>Calcium Imaging</i> : Bestimmung der zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration mit Fura-2-AM	57
2.2.7.2	<i>Calcium Imaging</i> : Quantifizierung der internen Ca ²⁺ -Speicher mit Fura-2-FF.....	59
2.2.7.3	Kolorimetrische Bestimmung der Zellviabilität durch Quantifizierung der Stoffwechselfunktion	60
2.2.7.4	Analyse der Zellproliferation durch Quantifizierung der DNA-Synthese.....	60
2.2.7.5	Quantifizierung der Zellmigration	61
2.2.7.6	Statistik	61
3	Ergebnisse.....	62
3.1	Die Rolle der „stromal interaction molecule“ (STIM)1/2-Proteine und „classical transient receptor potential“ (TRPC)1/6- sowie TRPC1/3/6-Kanäle während des Rezeptor- und Speicher-operierten Ca ²⁺ -Einstroms (ROCE/SOCE)	62
3.1.1	Charakterisierung primärer muriner Lungenfibroblasten (pmLF) und Myofibroblasten sowie pulmonaler arterieller glatter Muskelzellen (PASMC)	62
3.1.1.1	Identifizierung von Lungen(myo)fibroblasten und PASMC	62
3.1.1.2	Cre-Rekombinase induzierte Deletion von <i>STIM1</i> - und <i>STIM2</i> -Genen.....	64

3.1.1.3	Genexpressions-Analyse.....	66
3.1.1.4	Analyse der Proteinexpression.....	68
3.1.2	Messung des Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstroms (ROCE) in pmLF.....	70
3.1.3	Messungen des Ca^{2+} -Einstroms nach Entleerung der Ca^{2+} -Speicher durch Endothelin-1 (Et-1).....	72
3.1.4	Quantifizierung der internen Ca^{2+} -Speicher in pmLF.....	73
3.1.5	Analyse des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) in pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF)	74
3.2	Untersuchungen zur Rolle des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) und der Funktion von „classical transient receptor potential“ (TRPC)1/6-Kanälen in primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF).....	77
3.2.1	Zellviabilität und -proliferation.....	77
3.2.2	Zellmigration.....	80
3.2.3	Quantifizierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor of activated T-cells“ (NFAT)	82
3.3	Analyse der Rolle des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) und der Funktion von „classical transient receptor potential“ (TRPC)1/6 während der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten nach „transforming growth factor“ (TGF)- β 1-Behandlung	84
3.3.1	Quantifizierung der mRNA-Expression typischer Fibrosemarker-Proteine.....	85
3.3.2	Untersuchung der Migration primärer muriner Lungenfibroblasten (pmLF) nach Inkubation mit TGF- β 1	87
3.3.3	Quantifizierung von glattem Muskelaktin α (α -SMA) und Aktinstressfasern in pmLF nach Applikation von TGF- β 1	89
4	Diskussion.....	93
4.1	Der Rezeptor- und Speicher-operierte Ca^{2+} -Einstrom (ROCE/ SOCE): Zwei voneinander unabhängige Signalwege in pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF).....	94
4.2	Zellfunktionen des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) und von „classical transient receptor potential“ (TRPC1/6)-Kanälen in primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF).....	99

4.3	Analyse der TRPC1/6- Funktion in pmLF nach TGF- β -Behandlung	102
4.4	Analyse der STIM1/2- Funktion in pmLF nach TGF- β -Behandlung.....	103
5	Fazit und Ausblick	105
	Literaturverzeichnis	106
	Danksagung.....	122
	Affidavit.....	124

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
AM	engl. acetoxymethylester
AP-1	engl. activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
AR	engl. ankyrin-like repeats
ASMC	engl. arterial smooth muscle cells
ATII-Zellen	alveolare Epithelzellen Typ II
ATI-Zellen	alveolare Epithelzellen Typ I
ATPase	Adenosintriphosphatase
AUC	engl. area under the curve, Fläche unter der Kurve
BCA	engl. bichinchoninic acid
BDNF	engl. brain-derived neurotrophic factor
bidest.	bidestilliert
BMP4-R	engl. bone morphogenic protein 4 receptor
Bp	Basenpaare
BSA	engl. bovine serum albumin, Kälberserum Albumin
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAD	engl. CRAC activation domain
CAR	engl. Ca ²⁺ accumulating region
CC	engl. coiled-coil
cDNA	komplementäre DNA
cEF	engl. canonical EF hand
cGMP	engl. cyclic guanosin monophosphate, zyklisches Guaninmonophosphat
CIRB	Calmodulin- and IP ₃ R-binding
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL1	Kollagen I
COOH	Carboxy
COPD	engl. chronic obstructive pulmonary disease
CRAC	engl. Calcium release-activated Calcium
Cre	engl. cyclization recombination
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CXCL	Chemokin-Ligand
CXCR	Chemokin-Rezeptor
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMEM/F12	Dulbecco's modified Eagle Medium/ Ham's Nutrient Mixture F-12
X	

Abkürzungsverzeichnis

DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>engl. desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EB1	<i>engl. end binding protein 1</i>
ECM	<i>engl. extracellular matrix, extrazelluläre Matrix</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EdU	<i>5-ethynyl-2' -desoxyuridine</i>
EGTA	<i>Ethylenglykol-bis-(aminoethylether)tetraessigsäure</i>
EMT	<i>endotheliale mesenchymale Transformation</i>
ER	<i>endoplasmatisches Retikulum</i>
Et-1	<i>Endothelin-1</i>
ET_A	<i>Endothelin-A</i>
ET_B	<i>Endothelin-B</i>
etc.	<i>et cetera</i>
ETON	<i>engl. extended transmembrane Orail NH₂-terminal</i>
F	<i>Fluor</i>
FCS	<i>engl. fetal calf serum, fetales Kälberserum</i>
FGF	<i>engl. fibroblast growth factor</i>
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanate</i>
flox	<i>flox</i>
floxed	<i>engl. flanked by loxP</i>
g	<i>Gramm</i>
Gd³⁺	<i>Gadolinium-Ionen</i>
Gn11	<i>engl. immortalized murine gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons</i>
GPCR	<i>G-Protein gekoppelter Rezeptor</i>
H⁺	<i>Wasserstoff-Ionen</i>
H₂O	<i>Wasser</i>
H₂O₂	<i>Wasserstoffperoxid</i>
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HCl	<i>Salzsäure</i>
HEK	<i>engl. human embryonic kidney</i>
HEK 293T	<i>engl human embryonic kidney cells 293T</i>
HEPES	<i>2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure</i>
HIV	<i>humaner Immundefizienz-Virus</i>
HRCT	<i>engl. high resolution computer tomographie</i>
HRP	<i>engl. horseradish peroxidase</i>
I.E.	<i>Internationale Einheiten</i>
I_{CRAC}	<i>engl. Calcium release-activated calium current</i>
ICRP	<i>International Commission for Radiological Protection</i>
ID	<i>engl. inactivation domain</i>
IgG	<i>Immunglobulin G</i>

Abkürzungsverzeichnis

IL	<i>Interleukin</i>
IP₃	<i>Inositoltriphosphat</i>
IP₃R	<i>Inositoltriphosphat-Rezeptor</i>
IPAH	<i>idiopathische pulmonale arterielle Hypertonie</i>
IPF	<i>engl. idiopathic pulmonary fibrosis, idiopathische Lungenfibrose</i>
IP-Rezeptor	<i>Prostazyklin-, Prostaglandin-Rezeptor</i>
iRNA	<i>Interferenz-RNA</i>
KCl	<i>Kaliumchlorid</i>
kDa	<i>kilo Dalton</i>
KH₂PO₄	<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>
KOH	<i>Kaliumhydroxid</i>
La³⁺	<i>Lanthan-Ionen</i>
LB-Medium	<i>engl. lysogeny broth</i>
loxp	<i>engl. locus of X-over of P1</i>
LPA	<i>Lysophosphatidsäure</i>
LV	<i>Lentiviren</i>
M	<i>Molar</i>
mg	<i>Milligramm</i>
MgCl₂	<i>Magnesiumchlorid</i>
min	<i>Minuten</i>
ml	<i>Milliliter</i>
mM	<i>Millimeter, Millimolar</i>
MMP	<i>Matrix-Metalloproteasen</i>
mRNA	<i>engl. messenger ribonucleic acid,</i>
N₂	<i>Stickstoff</i>
Na⁺	<i>Natrium-Ionen</i>
Na₂HPO₄	<i>Natriumhydrogenphosphat</i>
Na₂S₂O₃	<i>Natriumsulfit</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NADP	<i>Nicotinamideninukleotidphosphat</i>
NADPH	<i>reduzierte Form von Nicotinamideninukleotidphosphat</i>
NaOH	<i>Natriumhydroxid</i>
nEF	<i>engl. noncanonical EF hand</i>
NFAT	<i>engl. nuclear factor of activated t cells</i>
NFATc	<i>engl. cytoplasmatic nuclear factor of activated t cells</i>
NH₂	<i>Amino</i>
nM	<i>Nanometer, Nanometer, Nanomolar</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
NOMP-c	<i>engl. no mechanoreceptor potential C</i>
NOX4	<i>engl. nicotinamide adenine dinucleotidephosphate-oxidase 4</i>
O₂	<i>Sauerstoff</i>

Abkürzungsverzeichnis

OAG	<i>1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol</i>
P/S	<i>engl. proline-serine rich domain</i>
PA	<i>engl. phosphatidic acid, Phosphatidsäure</i>
PAH	<i>pulmonale arterielle Hypertonie</i>
PAI-1	<i>Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1</i>
PAP	<i>Phosphatidat-Phosphatasen</i>
PAPm	<i>pulmonalen arteriellen Mitteldruck</i>
PASMC	<i>engl. pulmonary arterial smooth muscle cells, präkapilläre arterielle glatte Muskelzellen</i>
PAWP	<i>pulmonaler arterieller Verschlussdruck</i>
PBD	<i>engl. polybasic domain</i>
PBS	<i>engl. phosphate-buffered saline</i>
PBST	<i>engl. phosphate-buffered saline with Tween 20</i>
PC	<i>Phosphatidylcholin</i>
PCR	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
PDE5	<i>Phosphodiesterase 5</i>
PDGF	<i>engl. platelet-derived growth factor</i>
PGI₂	<i>Prostazyklin, Prostaglandin I₂</i>
PH	<i>pulmonale Hypertonie</i>
PIP₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PLCβ	<i>Phospholipase Cβ</i>
PLD	<i>Phospholipase D</i>
PM	<i>Plasmamembran</i>
PMCA	<i>Plasmamembranständige Ca²⁺-ATPase</i>
pmLF	<i>primäre murine Lungenfibroblasten</i>
POX	<i>Peroxidase</i>
PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
PVR	<i>vaskulärer pulmonaler Widerstand</i>
RIPA	<i>engl. radioimmunoprecipitation assay</i>
ROCE	<i>Rezeptor-operierter Ca²⁺-Einstrom</i>
RT-qPCR	<i>quantitative</i>
S2	<i>Sicherheitsstufe 2</i>
SAM	<i>engl. sterile α motif</i>
SCID	<i>engl. severe combined immunodeficient</i>
SDS	<i>engl. Sodiumdodecylsulfate, Natriumlaurylsulfat</i>
SDS-PAGE	<i>engl. sodium dodecyl sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese</i>
SEM	<i>engl. standard error of the mean</i>
SERCA	<i>Pumpe der Ca²⁺-ATPase des sarko-und endoplasmatischen Retikulum</i>
sGC	<i>engl. soluble guanylate cyclase, lösliche Guanylatzyklase</i>
siRNA	<i>engl. short interfering RNA</i>
SMC	<i>engl. smooth muscle cells, glatte Muskelzellen</i>

Abkürzungsverzeichnis

SOAR	<i>engl. STIM1 Orail Activating Region</i>
SOCE	<i>Speicher-operierter Ca²⁺-Einstrom</i>
SP	<i>engl. signal peptide</i>
SR	<i>sarkoplasmatisches Retikulum</i>
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
TBS	<i>engl. tris-buffered saline</i>
TBST	<i>engl. tris-buffered saline with Tween 20</i>
TE	<i>engl. Tris-EDTA</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylendiamin</i>
Tg	<i>Thapsigargin</i>
TGF-β	<i>engl. transforming growth factor β</i>
TM	<i>Transmembran</i>
TNFα	<i>Tumornekrosefaktor alpha</i>
TP-Rezeptor	<i>Thromboxan A₂-Rezeptor</i>
TRITC	<i>Tetramethylrhodamine-isothiocyanat</i>
TRP	<i>engl. transient receptor potential</i>
TRPA	<i>engl. transient receptor potential ankyrin</i>
TRPC	<i>engl. classical transient receptor potential</i>
TRPM	<i>engl. transient receptor potential melastatin</i>
TRPML	<i>engl. transient receptor potential mucolipin</i>
TRPN	<i>engl. transient receptor potential no mechanoreceptor potential C</i>
TRPP	<i>engl. transient receptor potential polycystic</i>
TRPV	<i>engl. transient receptor potential vanilloid</i>
TxA₂	<i>Thromboxan A₂</i>
USA	<i>engl. United States of America</i>
WST	<i>engl. water soluble tetrazolium</i>
Wt	<i>Wildtyp</i>
α-SMA	<i>engl. alpha smooth muscle actin, alpha glattes Muskelaktin</i>
μl	<i>Mikroliter</i>
μm	<i>Mikromolar, Mikrometer</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Speicher-operierte Ca^{2+} -Einstrom (SOCE).....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung spezifischer/ funktioneller STIM1- und STIM2-Domänen.	5
Abbildung 3: Hypothetische Darstellung der Vorgänge von der Speicherentleerung bis hin zur STIM-Orai-Koppelung.....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des humanen Orai1-Proteins und der hexameren Struktur des Orai-Kanals.....	7
Abbildung 5: Der Rezeptor-operierte Ca^{2+} -Einstrom (ROCE).....	8
Abbildung 6: Übersicht der „ <i>transient receptor potential</i> “ (TRP)-Superfamilie sowie repräsentativer Mitglieder.	10
Abbildung 7: Repräsentative Struktur des „ <i>canonical transient receptor potential</i> “ (TRPC)-Kanal-Proteins.	11
Abbildung 8: Übersicht der Aktivierung des Ca^{2+} / Calcineurin/ <i>nuclear factor of activated T cells</i> (NFAT)-Signalwegs.	13
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Orai und TRPC Aktivierung durch STIM-Proteine anhand des Beispiels eines unter chronischer Hypoxie verursachten Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) in glatten Muskelzellen (<i>smooth muscle cells</i> , SMC).....	14
Abbildung 10: Schematische Darstellungen von STIM-TRPC-Orai-Komplexen.....	16
Abbildung 11: Modell zur TRPC6-Kanal-Aktivierung durch den Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE).....	17
Abbildung 12: Anatomie des humanen respiratorischen Systems nach der „ <i>International Commission for Radiological Protection</i> “ (ICRP).....	19
Abbildung 13: Schematische Darstellung des murinen Respirationssystems und des Lungenepithels.	20
Abbildung 14 nach [117]: Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten und mögliche Therapien der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH).	24
Abbildung 15: Überblick der möglichen Rekrutierung von Fibroblasten während der Entwicklung einer idiopathischen Lungenfibrose.....	26
Abbildung 16 modifiziert nach [70]: Schematische Darstellung der konditionalen Gen-Deletion von <i>Stim1</i> und <i>Stim2</i> in der Maus.	50
Abbildung 17: Fluoreszenz-Exzitationsspektrum des Ca^{2+} -Indikators Fura-2 bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen.	59
Abbildung 18: Strukturformel von Fura-2-AM ($\text{R}_1:\text{H}$; $\text{R}_2:\text{CH}_3$) und Fura-2-FF-AM ($\text{R}_1:\text{F}$; $\text{R}_2:\text{F}$)	60
Abbildung 19: Phasenkontrastbilder isolierter primärer muriner Lungenzellen mit dazugehörigen schematischen Zellzeichnungen.....	63
Abbildung 20: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen als Nachweis von α -SMA und F-Aktin-Stressfasern in Wt-Lungenfibroblasten (pmLF) und ausdifferenzierten Myofibroblasten nach TGF- β 1-Behandlung.....	64
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Deletion des Exons auf dem <i>STIM1-</i> oder <i>STIM2</i> -Gen durch Cre-Rekombinase exprimierende Lentiviren.....	65
Abbildung 22: Repräsentative Bilder von Agarosegelen mit aufgetrennten DNA-Fragmenten als Nachweis der Deletion der codierenden Exone in <i>STIM1-</i> und <i>STIM2</i> -Genen durch die Cre-Rekombinase.	66

Abbildung 23: Genexpressionsanalyse von STIM1-2 und Orai1-3 in PASMIC.....	67
Abbildung 24: Genexpressionsanalyse von STIM1-2 und Orai1-3 in primären Lungenfibroblasten (pmLF).....	67
Abbildung 25: Genexpressionsanalyse von TRPC1- bis TRPC7-mRNA in primären Lungenfibroblasten (pmLF).....	68
Abbildung 26: Nachweis der Protein-Expression von STIM1 und STIM2 in primären Lungenfibroblasten (pmLF).....	69
Abbildung 27: Messung des Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstroms in STIM1/2 ^{ΔpmLF} - (a), TRPC1/6 ^{-/-} , STIM1/2 ^Δ TRPC1/6 ^{-/-} (b) sowie TRPC1/3/6 ^{-/-} -pmLF (c) im Vergleich zu Wt-pmLF und mit Cre-Rekombinase-exprimierenden, Lentiviren infizierten Wt-pmLF (Wt Cre).	71
Abbildung 28: Messung des LPA-initiierten Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstroms in pmLF.....	72
Abbildung 29: Rezeptor-operierter Ca^{2+} -Einstrom in pmLF nach Speicherentleerung.	73
Abbildung 30: Messung und Quantifizierung der Ca^{2+} -Konzentrationen interner Ca^{2+} -Speicher in STIM1/2 ^{ΔpmLF} -, TRPC1/6 ^{-/-} -pmLF und Wt-Kontrollzellen (Wt- und Wt-pmLF, die mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren infiziert wurden (Wt Cre -pmLF)).....	74
Abbildung 31: Speicher-operierter Ca^{2+} -Einstrom in TRPC1/6 ^{-/-} (a) und TRPC1/3/6 ^{-/-} -PASMIC (b) im Vergleich zu Wt-PASMIC.....	75
Abbildung 32: Analyse des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms in pmLF.	76
Abbildung 33: Charakterisierung des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) mittels Berechnung des initialen Ca^{2+} - Einstroms und der Kurvenmaxima.....	77
Abbildung 34: Zellviabilitäts-Kurven der Lungenfibroblasten unterschiedlicher Genotypen nach Analyse mit Hilfe des <i>Water soluble tetrazolium -1 (WST)</i> -Assays.	78
Abbildung 35: Repräsentative Bilder der mit EdU-(grün)-Fluoreszenz/ Hoechst-(blau)-Farbstoff gefärbten pmLF.	79
Abbildung 36: Quantifizierung der DNA-Syntheseraten durch Berechnung der EdU-Fluoreszenz im Verhältnis zu mit Hoechst-Farbstoff gefärbten pmLF-Zellkernen.	80
Abbildung 37: Repräsentative Bilder und Quantifizierung der Zellmigration in Wt- und TRPC1/6 ^{-/-} -pmLF.....	81
Abbildung 38: Repräsentative Bilder und Quantifizierung der Zellmigration in STIM1/2-defizienten pmLF im Vergleich zu Wt Cre -pmLF	82
Abbildung 39: Nachweis von NFATc1 in nukleären Extrakten aus Lungenfibroblasten.	83
Abbildung 40: Nachweis von NFATc3 in nukleären Extrakten aus Lungenfibroblasten.	84
Abbildung 41: Analyse der α -SMA-Expressionsrate in pmLF entweder nach Zugabe von TGF- β 1 oder Lösungsmittel (Kontrolle).....	86
Abbildung 42: Analyse der COL1-Expression in pmLF entweder nach Zugabe von TGF- β 1 oder Lösungsmittel (Kontrolle).....	87
Abbildung 43: Repräsentative Bilder und Quantifizierung der Zellmigration in Wt- und TRPC1/6 ^{-/-} -pmLF nach 48-stündiger TGF- β 1-Behandlung.	88
Abbildung 44: Repräsentative Bilder und Quantifizierung der Zellmigration in STIM1/2 ^{ΔpmLF} - und Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren) nach 48-stündiger TGF- β 1-Behandlung.	89

Abbildung 45: Quantifizierung von alpha-glatten Muskelaktin (α-SMA) in pmLF nach Zugabe von TGF-β1 oder Lösungsmittel.	91
Abbildung 46: Quantifizierung der Aktinstressfaser-Expression in pmLF nach Zugabe von TGF-β1 oder Lösungsmittel.	92
Abbildung 47: Schematische Darstellung der STIM-Orai-Interaktion und möglicher Hypothesen zum molekularen Mechanismus des Speicher-operierten Ca^{2+}-Einstroms.	95

Die Genehmigung zur Verwendung und zum Abdruck der Abbildungen dieser Doktorarbeit liegt von den jeweiligen Verlagen und Rechteinhabern vor.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabelle nach Simmoneau	22
Tabelle 2: Mauslinien	34
Tabelle 3: Zelllinien	34
Tabelle 4: Primäre Zellen	34
Tabelle 5: Zellkulturlösungen.....	34
Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien	35
Tabelle 7: Puffer und Lösungen	38
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien.....	43
Tabelle 9: Laborausstattung und Geräte	44
Tabelle 10: Enzyme und Kits.....	46
Tabelle 11: Marker	46
Tabelle 12: Plasmide.....	46
Tabelle 13: Oligonukleotide <i>qRT-PCR</i> (Polymerasekettenreaktion)	47
Tabelle 14: Primersequenzen PCR	48
Tabelle 15: Antikörper	48
Tabelle 16: Charakteristische Eigenschaften von Fura-2-AM und Fura-2-FF-AM	60

Zusammenfassung

Ca^{2+} trägt zur Aufrechterhaltung essentieller Zellfunktionen bei und spielt als „*second messenger*“ während physiologischer Prozesse eine wichtige Rolle. Die Steuerung dieser Funktionen erfolgt über verschiedene Signalwege, die durch Änderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration initiiert werden. Sowohl der Speicher- als auch der Rezeptor-operierte Ca^{2+} -Einstrom stehen für die Aufnahme von Ca^{2+} in die Zelle zur Verfügung. Durch eine Dysregulation der Ca^{2+} -Signalwege und der damit einhergehenden gestörten Ca^{2+} -Homöostase kann es zu pathologischen Veränderungen in pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) kommen.

Als Ca^{2+} -Sensor der internen Ca^{2+} -Speicher wird das „*stromal interaction molecule*“ (STIM)-Protein nach einem Absinken der Ca^{2+} -Konzentration aktiv und bindet an die plasmamembranständigen Orai-Ionenkanäle, wodurch es zu einem Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) in die Zelle kommt. Die Diacylglycerol (DAG)-vermittelte Aktivierung von „*classical transient receptor potential*“ (TRPC)-Kanälen führt hingegen zu einem Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstrom (ROCE). Einige Veröffentlichungen zeigen jedoch eine Beteiligung von TRPC-Kanälen am SOCE in verschiedenen Zelltypen. Aus diesem Grund wurde der Ca^{2+} -Einstrom in TRPC1/6-, TRPC1/3/6- und STIM1/2-defiziente PASMC und pmLF analysiert, um einen möglichen Einfluss von TRPC-Kanälen zu untersuchen. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit wichtige Zellfunktionen sowie die Rolle von STIM1/2-Proteinen und TRPC1/6-Kanälen während der Differenzierung zu Myofibroblasten untersucht.

Zur Generierung von STIM1/2-defizienten Zellen wurden STIM1/2^{flox/flox}-pmLF mit Lentiviren infiziert, welche Cre-Rekombinasen exprimierten und zu einer Deletion der STIM-Gene führten. Wie erwartet konnte in STIM1/2-defizienten pmLF ein signifikant reduzierter SOCE gemessen werden, während TRPC1/6- und TRPC1/3/6-defiziente pmLF einen verminderten ROCE aufwiesen. Im Gegensatz dazu kam es weder für den ROCE in STIM1/2-defizienten pmLF noch für den SOCE in TRPC1/6- oder TRPC1/3/6-defizienten pmLF im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einem signifikanten Unterschied [1]. Die Analyse des Rezeptor- und Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms in PASMC ergab ähnliche Ergebnisse wie in pmLF. Auf Grund dieser Daten erscheint eine Beteiligung von TRPC-Kanälen am SOCE in pmLF und PASMC eher unwahrscheinlich. Während STIM1/2-defiziente pmLF, wie erwartet, einen reduzierten Ca^{2+} -Gehalt in den internen Speichern des endoplasmatischen Retikulums aufwiesen, konnte in TRPC1/6-defizienten Zellen erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen in den internen Speichern im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden.

In Abwesenheit von STIM1/2-Proteinen zeigten pmLF eine reduzierte Zellproliferation und -migration sowie eine verminderte Translokation der Transkriptionsfaktoren „*nuclear factor of activated T-cells*“ c1 und c3 (NFATc1 and c3) in den Zellkern. Im Gegensatz dazu zeigten TRPC1/6-defiziente pmLF im Vergleich zu den Kontrollzellen eine signifikant erhöhte Zellproliferation und -migration.

Nach der Behandlung mit „*transforming-growth-factor β 1*“ (TGF- β 1) wiesen STIM1/2-defiziente pmLF weder eine signifikant erhöhte Expression von alpha glattem Muskelaktin (α -SMA) noch von Aktinstressfasern im Vergleich zu den Kontrollzellen auf. Demgegenüber wurden in mit TGF- β 1 behandelten Myofibroblasten in Abwesenheit von TRPC1/6-Kanälen sowohl eine reduzierte Expressionen von α -SMA als auch von Aktinstressfasern im Vergleich zu den ebenfalls behandelten „*Wildtyp*“ (Wt)-pmLF gefunden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum einen, dass TRPC1/6-Kanälen in PASMC und pmLF nicht am SOCE beteiligt sind und zum anderen, dass eine STIM1/2-Defizienz die Proliferation und Migration der primären Lungenfibroblasten vermindert [1].

Abstract

As an ubiquitous messenger Ca^{2+} maintains cell functions and plays an important role during physiological processes. These functions are regulated by different Ca^{2+} signaling pathways initiated by alterations of the intracellular Ca^{2+} concentrations. Both the store- and the receptor-operated Ca^{2+} entry present basic processes to generate Ca^{2+} signals. Dysregulated Ca^{2+} signaling pathways and disturbed Ca^{2+} -homeostasis can lead to pathological alterations in certain cell types, e.g. in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) and primary lung fibroblasts (pmLF).

Stromal interaction molecules (STIM) 1 and 2 proteins are acting as sensors for Ca^{2+} in intracellular stores and activate Orai channels at the plasma membrane for store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), while classical transient receptor potential (TRPC) channel mediate receptor-operated Ca^{2+} entry (ROCE). However, several reports indicate a role for TRPC in SOCE in certain cell types. Therefore, Ca^{2+} influx was analyzed in TRPC1/6 and TRPC1/3/6 deficient (TRPC1/6^{-/-}, TRPC1/3/6^{-/-}) pmLF and PASMC as well as STIM1/2 deficient (STIM1/2^{ΔpmLF}) pmLF to investigate any possible contributions of TRPC channels. Moreover, cell functions of STIM1/2 proteins and TRPC1/6 channels as well as their functions during the transition from pmLF to myofibroblasts were studied. As expected, SOCE was decreased in STIM1/2 deficient pmLF and ROCE was decreased in TRPC1/6^{-/-} and TRPC1/3/6^{-/-} pmLF compared to control cells. By contrast, SOCE was not significantly different in TRPC1/6^{-/-} and TRPC1/3/6^{-/-} pmLF and ROCE was similar in STIM1/2 deficient pmLF compared to control cells [1]. Along these lines, experiments with PASMC showed similar results. In consequence, an interaction to mediate the SOCE in these cells seems unlikely between STIM and TRPC1/6 as well as TRPC1/3/6 channels.

While the Ca^{2+} content in the internal cell stores of the endoplasmatic reticulum (ER) was lower in STIM1/2 deficient pmLF, TRPC1/6 deficient pmLF showed increased Ca^{2+} levels. Most interestingly, cell proliferation, migration and nuclear localization of the transcription factors *nuclear factor of activated T-cells* c1 and c3 (NFATc1 and c3) were decreased after ablation of STIM1/2 proteins in pmLF. In clear contrast to these results, lack of TRPC1/6 channels increased cell proliferation and migration. After treatment with „transforming-growth-factor β 1“ (TGF- β 1) STIM1/2 deficient pmLF showed no significant differences in the expression of alpha smooth muscle actin (α -SMA) or actin stress fibers in comparison to control cells. However, TRPC1/6 deficient pmLF demonstrated significantly less expression of α -SMA and actin stress fibers.

In conclusion, TRPC1/6 channels are not involved in SOCE in pmLF as well as PASMC and STIM1/2 deficiency resulted in decreased cell proliferation and migration in pmLF [1].

1 Einleitung

1.1 Ca^{2+} als vielseitiges Signalmolekül

„Ja, Kalzium das ist alles.“ Mit diesen Worten drückte der Nobelpreisträger Otto Loewi bereits im Jahr 1959 die Allgegenwertigkeit von Kalzium beziehungsweise Ca^{2+} -Ionen aus (zusammengefasst in [2]). Er war sich schon damals sicher, dass die Funktion von Kalzium/ Ca^{2+} -Ionen weit über die Beteiligung an der Muskelkontraktion hinausgehen würde. Über 60 Jahre später sind sich Forscher einig, dass Ca^{2+} -Ionen essentiell für viele weitere Zellfunktionen sind. Neben der Muskelkontraktion ist Ca^{2+} unter anderem an der Proliferation, Apoptose, Exozytose und dem Zellwachstum, beteiligt. Unter den „*second messenger*“ gilt Ca^{2+} daher als der vielseitigste. Um diese Vielseitigkeit zu erreichen, existieren verschiedene Wege der Signalübertragung durch Ca^{2+} -Ionen (zusammengefasst in [3, 4]). Zur Generierung dieser Signalwege bedarf es einer Änderung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma. Während die Ca^{2+} -Konzentration innerhalb einer Zelle bei ca. 100 nM liegt, ist im Extrazellulären Raum eine etwa 10000-fach höhere Ca^{2+} -Konzentration von 1 mM vorzufinden. In den Ca^{2+} -Speichern der Zelle, beispielsweise im endo- oder sarkoplasmatischen Retikulum (ER/SR), sind je nach Zellfunktion ebenfalls erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen von 0,1 mM bis 0,5 mM vorzufinden. Um die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase aufrecht zu erhalten, existieren einerseits Transporter und Austauschere sowie andererseits Pumpen und verschiedene Ionenkanäle. Im ruhenden Zustand steht die Plasmamembran ständige Ca^{2+} -Adenosintriphosphatase (ATPase) (PMCA) als Transportprotein und der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher für die Wiederherstellung des Ca^{2+} -Gleichgewichts zur Verfügung [5]. Zusätzlich existiert die Pumpe der Ca^{2+} -ATPase des sarko- und endoplasmatischen Retikulums (SERCA), um die Speicher wieder mit Ca^{2+} -Ionen zu befüllen.

Zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration stehen im wesentlichen zwei Wege zur Verfügung, entweder ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum in das Zytosol und/oder die Speicherentleerung der Ca^{2+} -Speicher des endo-/ sarkoplasmatischen Retikulums (ER/SR) [3]. Neben spannungsabhängigen Ca^{2+} -Ionenkanälen existieren weitere Ionenkanäle, die über eine Rezeptor- oder Speicher-vermittelte Aktivierung einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle ermöglichen. Je nach Zelltyp werden in der Plasmamembran unterschiedliche Ca^{2+} -Kanäle exprimiert [4]. In erregbaren Zellen, wie zum Beispiel Nerven- und Muskelzellen, treten neben spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanälen überwiegend spannungsunabhängige Rezeptor-operierte Ca^{2+} -Kanäle und weniger Speicher-operierte Ca^{2+} -Kanäle auf. Im

Gegensatz dazu weisen nicht erregbare Zellen, wie beispielsweise Immunzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten, zum größten Teil Speicher-operierte und Rezeptor-operierte Ca^{2+} -Kanäle auf (zusammengefasst in [6, 7]).

1.2 Der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle

1.2.1 Der Speicher-operierte Ca^{2+} -Einstrom (SOCE)

Der Speicher-operierte Ca^{2+} -Einstrom wurde erstmals durch James Putney im Jahr 1986 als kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom entdeckt (zusammengefasst in [8]). Damals beschrieb James Putney den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom ursprünglich als kontinuierliche Be- und Entladung der Ca^{2+} -Speicher und verglich diese mit einem elektrischen Stromkreis [9]. Zunächst wurde angenommen, dass die Agonisten-aktivierte, Inositoltriphosphat (IP_3)-vermittelte Speicherentleerung den Hauptweg des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms darstellt. Diese Hypothese wurde durch neue Experimente mit Hilfe des Ca^{2+} -Indikators Fura-2 und Thapsigargin (Tg), einem Blocker der sarko- und endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)-Pumpe, weiter vorangetrieben. Anhand der dadurch möglichen zytosolischen Ca^{2+} -Messungen kam es nach der Speicherentleerung durch Tg zur Öffnung von membranständigen Ionenkanälen und folglich zu einem direkten Ca^{2+} -Einstrom in das Zellinnere [10]. Darüber hinaus wurden ein paar Jahre später (1992) die Ionenströme des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms von Hoth und Penner eindeutig als „*Calcium release-activated Calcium*“ (I_{CRAC}) nachgewiesen [11]. Dieser Ionenstrom wurde als nicht spannungsabhängig, nach innen gerichtet und selektiv für Ca^{2+} -Ionen definiert [12]. Letztendlich wurde anhand dieser Studien bewiesen, dass es sich bei dem kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom um einen Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) handelt und die Bezeichnung wurde dementsprechend abgeändert.

Um einen SOCE zu initiieren bedarf es einer vorab induzierten Speicherentleerung, beispielsweise physiologisch durch Inositoltriphosphat (IP_3) oder experimentell mit Hilfe von Tg (zusammengefasst in [12]). Nach einer Agonisten-initiierten Aktivierung von G_q -Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) kommt es zum Beispiel zur Aktivierung von Phospholipase C (PLC), welches Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3) spaltet. IP_3 aktiviert wiederum IP_3 -Rezeptoren an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), wodurch es zu einer Speicherentleerung des ERs kommt (zusammengefasst in [7, 13]). Im Gegensatz dazu agiert Tg als SERCA-Blocker [10] und wird zur graduellen Speicherentleerung verwendet. Das Absinken der gemessenen Ca^{2+} -Konzentrationen im ER wird durch das „*stromal interaction molecule*“ (STIM)-Protein

registriert. Nach einer Konformationsänderung aktiviert STIM anschließend Orai-Kanäle, wodurch es zu einem Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle kommt (siehe Abbildung 1). Neben der Ca^{2+} -abhängigen Funktion des SOCE zur Auffüllung der Speicher und der Weiterleitung von Ca^{2+} -Oszillationen und -Wellen besitzt der SOCE essentielle Funktionen, wie zum Beispiel im Rahmen der Proliferation, Gentranskription und der Apoptose [12]. Darüber hinaus konnten mit Hilfe von genetisch modifizierten Mäusen und anhand von funktionellen Analysen spezifische Funktionen des SOCEs, zum Beispiel innerhalb des Immunsystems sowie in Muskeln und Teilen des Nervensystems, nachgewiesen werden [14].

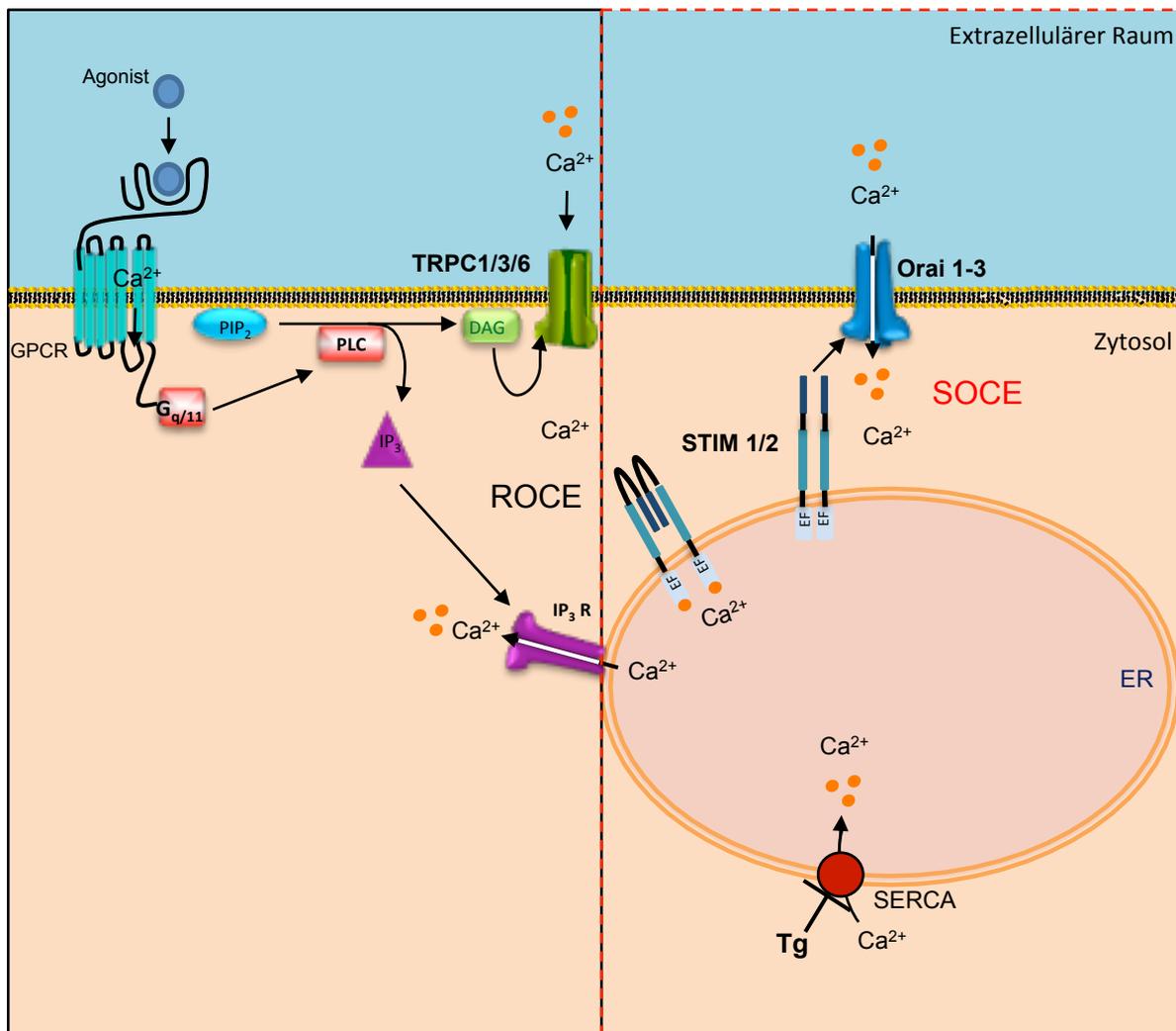


Abbildung 1: Der Speicher-operierte Ca^{2+} -Einstrom (SOCE). Im Gegensatz zum Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstrom (ROCE) setzt der SOCE eine Agonisten-induzierte Speicherentleerung, zum Beispiel durch Inositoltriphosphat (IP_3), voraus. IP_3 aktiviert IP_3 -Rezeptoren, die an der endoplasmatischen Retikulum (ER)-Membran lokalisiert sind, und initiiert dadurch eine Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem ER. Durch das Absinken der Ca^{2+} -Konzentration im ER werden STIM1/2-Proteine, die als Ca^{2+} -Sensoren dienen, aktiviert. Sobald STIM1/2 den Verlust des an der luminalen EF-Hand von STIM1/2 gebundenen Ca^{2+} registriert wandert STIM1/2 unter einer Konformationsänderung entlang der ER-Membran in Richtung Plasmamembran und aktiviert dort Orai-Kanäle. Durch die Interaktion zwischen STIM und Orai kommt es zu einem zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, der sowohl als SOCE als auch als „Calcium release-activated Calcium“ I_{CRAC} -Ionenstrom bezeichnet wird. Um die Ca^{2+} -Speicher des ER/ sarkoplasmatischen

Retikulums (SR) wieder aufzufüllen steht eine sarko- und endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)-Pumpe zur Verfügung, welche Ca^{2+} unter ATP Verbrauch aus dem Zytosol wieder in das ER/SR zurück pumpt. Als spezifischer Blocker der SERCA-Pumpe dient Thapsigargin (Tg). Der ROCE wird im Folgenden jeweils im Text und unter Abbildung 2 im Detail beschrieben. G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR); Phospholipase C (PLC); Phosphatidinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2); Diacylglycerol (DAG); klassische transiente Rezeptorpotential Kanäle (TRPC) 1/3/6.

1.2.1.1 „Stromal interaction molecule“ (STIM)1/2-Proteine

Auf der Suche nach den molekularen Mechanismen des SOCE identifizierten zwei Arbeitsgruppen im Jahr 2005 unabhängig voneinander die bereits bekannten „stromal interaction molecule“ (STIM)-Proteine [15, 16]. Mit Hilfe von „high throughput screenings“ und unter Verwendung von „short interfering“ RNA (siRNA) charakterisierte die Arbeitsgruppe um Tobias Meyer STIM1/2-Proteine in HeLa-Zellen als Mediatoren des SOCE. Währenddessen zeigte das Labor von Kenneth Stauderman unter Verwendung von RNAInterferenz(i) in Drosophila S2-Zellen eine Beteiligung des STIM1-Proteins am SOCE. Damit wurde ein essentieller Teil des SOCE aufgeschlüsselt und die Funktion von STIM-Proteinen als Ca^{2+} -Sensor entdeckt. Während STIM-Proteine in Säugetieren zwei ubiquitäre Isoformen, STIM1 und STIM2, exprimieren, wurde in Drosophila ursprünglich nur eine Isoform des *Stim*-Gens entdeckt. Der Genlocus von STIM1 befindet sich im Menschen auf Chromosom 11 [17] und in der Maus auf Chromosom 7 [18]. Das *Stim2*-Gen ist im humanen Genom auf Chromosom 4 angesiedelt während es in der Maus auf Chromosom 5 vorzufinden ist [19]. STIM-Proteine sind an der endoplasmatischen Retikulum (ER)-Membran lokalisiert, besitzen eine „sterile α motif“ (SAM)-Domäne und eine EF-Hand als Ca^{2+} -Bindungsdomäne auf der luminalen Seite des ER sowie eine zytosolische „coiled-coil“ (CC)-Bindungsdomäne am COOH (Carboxy)-Terminus (siehe Abbildung 2). Die Amino- und vor allem die Carboxy- terminalen Sequenzen von STIM1 und STIM2 unterscheiden sich nur in ihrer Länge und sind bis zu 61 % identisch [20]. STIM1/2-Proteine sind ubiquitär exprimiert, wobei STIM1 in zahlreichen Zelltypen stärker als STIM2 exprimiert wird und als Haupteffektor für den SOCE verantwortlich ist [21]. Auch wenn STIM2-Proteine im Vergleich zu STIM1-Proteinen zwar nur einen abgeschwächten SOCE auslösen können, wurde STIM2 als wichtiger Regulator der basalen Ca^{2+} -Konzentration beschrieben [zusammengefasst in 22]. Nichtsdestotrotz wurde in glatten Muskelzellen bei Abwesenheit von STIM1 für STIM2 eine Art „Rettungsfunktion“ gezeigt, da STIM2 die Zellfunktionen von STIM1 teilweise ersetzen konnte [23]. Des Weiteren demonstrierte die Arbeitsgruppe um Indu Ambudkar eine essentielle Rolle von STIM2 während der Interaktion zwischen STIM1 und Orai1-Kanälen in der ER-Plasmamembran (PM) [24]. STIM2 trägt durch eine

Aktivierung des C-Terminus von STIM1 essentiell zur STIM1/Orai1-Koppelung bei. Im Ruhezustand liegen STIM1-Proteine als Dimere vor. Bei einem Absinken der Ca^{2+} -Konzentration im ER registriert die EF-Hand der Ca^{2+} -Bindungsdomäne von STIM einen erniedrigten Ca^{2+} -Spiegel und initiiert eine Translokation und Oligomerisierung [25] von acht STIM1-Proteinen entlang der ER-Membran in Richtung Orai-Kanäle und ER-Plasmamembran [26, 27]. Während der Gruppierung der STIM1-Proteine kommt es zu einer Konformationsänderung (siehe Abbildung 3). Die zytosolischen „*STIM1 Orai1 Activating Region*“ (SOAR)-Bindungsdomänen erstrecken sich über CC2-CC3-Verbindungen und aktivieren die Ca^{2+} -selektiven Orai1-Kanäle an der Plasmamembran, was wiederum zu einem SOCE führt [28, 29].

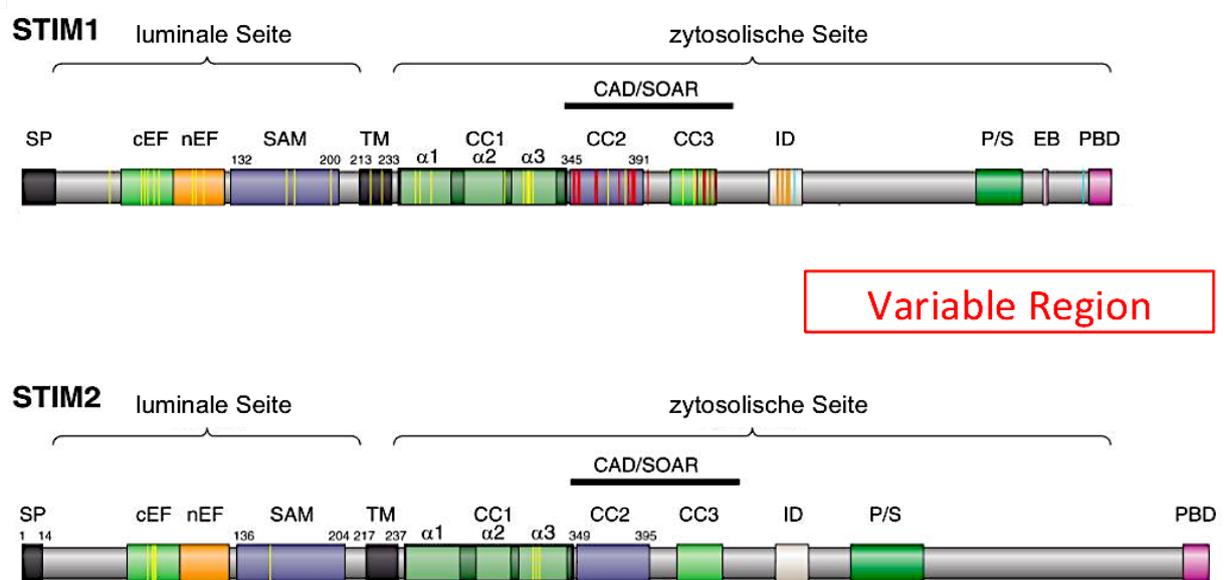


Abbildung 2: Schematische Darstellung spezifischer/ funktioneller STIM1- und STIM2-Domänen. Gefärbte Abschnitte kennzeichnen strukturelle und funktionelle Domänen (*signal peptide* (SP); *canonical EF hand* (cEF); *noncanonical EF hand* (nEF); *sterile alpha motif* (SAM); *transmembrane domain* (TM); *coiled-coil domains* 1–3 (CC1–3); *CRAC activation domain* (CAD); *STIM-Orai activating region* (SOAR); *inactivation domain* (ID); *proline-serine rich domain* (P/S); *EB1 binding domain* (EB); *polybasic domain* (PBD)). Senkrechte, gefärbte Linien markieren Mutationsstellen in STIM1 und STIM2. Modifiziert nach [30].

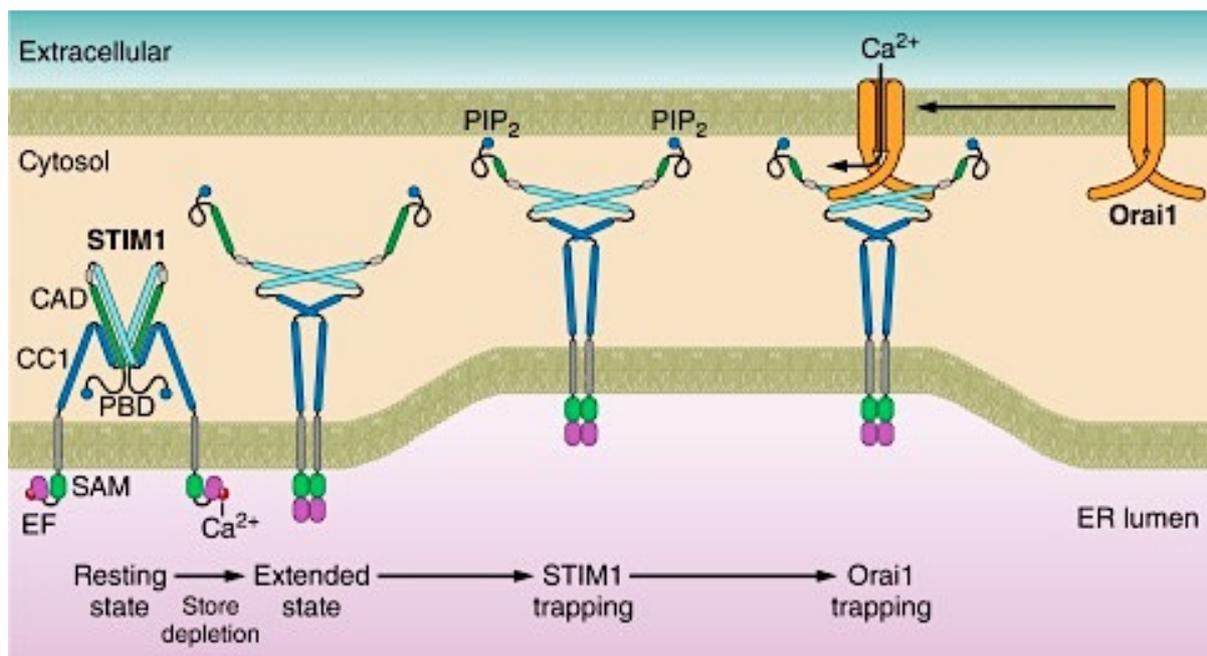


Abbildung 3: Hypothetische Darstellung der Vorgänge von der Speicherentleerung bis hin zur STIM1-Orai1-Koppelung [30]. Die Abbildung illustriert STIM1 ganz links zunächst in einem ruhenden, frei diffundierten Zustand mit gebundenem Ca^{2+} . STIM1 ist als Dimer mit der „CRAC activated domain“ (CAD)-Konformation nach der veröffentlichten Kristallstruktur abgebildet [29]. Die Ca^{2+} -Speicherentleerung und die ungebundene EF-Hand von STIM1 führen zu einer Konformationsänderung der zytosolischen STIM1-Domäne. Diese Veränderung ermöglicht es der „polybasic domain“ (PBD) an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in der Plasmamembran zu binden, um STIM1 in der ER und Plasmamembran (PM) zu verankern. Währenddessen bewegen sich die „coiled-coil“ 2 (CC2)-Helices von STIM1 in eine antiparallele Konfiguration und die CC3-Helices lösen sich von CC2, um an die Orai1 COOH-Termini zu binden [31]. Die Koppelung an STIM1 fixiert und aktiviert den Orai1-Kanal zugleich. Zur Vereinfachung wurde nur ein einzelnes STIM1-Dimer und keine Oligomerisierung von STIM1 abgebildet. Für die vollständige Aktivierung des hexameren Orai1-Kanals wird ein Vielfaches an STIM1-Dimeren benötigt.

1.2.1.2 Orai-Kanäle

Bereits ein Jahr nach der Entdeckung von STIM1 wurden Orai1-Kanäle als Speicher-operierte Ca^{2+} -Kanäle und damit als das fehlende Glied des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms entdeckt. Zunächst gelang es der Arbeitsgruppe um Anjana Rao [32] mutierte Orai1-Kanäle in „severe combined immunodeficient“ (SCID)-Patienten zu identifizieren. Mit Hilfe von Interferenz (i)-RNA in *Drosophila* kam es auf der Suche nach weiteren Regulatoren des SOCE zur Entdeckung von Orai1. Zudem stieß die Arbeitsgruppe bei Untersuchungen von genetischen Mutationen von SCID-Patienten auf eine Punktmutation im Exon1 des Orai1-Gens. Nach der Komplementation des Gendefekts in T-Zellen von SCID-Patienten konnte sowohl ein funktionierender SOCE als auch ein CRAC-Kanal-Ionenstrom wiederhergestellt werden. Kurz darauf bestätigten zwei weitere Arbeitsgruppen zum einen die Interaktion von STIM1 und Orai1 und zeigten zum Anderen die Funktion von Orai-Kanälen als Ca^{2+} -

selektive, plasmamembranständige I_{CRAC} -Kanäle [33, 34]. Neben der Funktion von STIM1- und Orai1-Proteinen über kurze Wege zu kommunizieren und miteinander Komplexe bilden gelten diese als elementare Bestandteile des SOCE [26].

Lange wurde angenommen, dass Orai-Proteine eine tetramere Struktur aus jeweils zwei Dimeren [34] bilden bis die Kristallstruktur von funktionellen Orai-Kanälen im Jahr 2012 veröffentlicht wurde [35]. Anhand der Kristallstruktur war nun zu erkennen, dass der Kanal aus jeweils drei Dimeren besteht und dadurch eine hexamere Kanalstruktur besitzt. Orai-Kanäle besitzen 3 humane Isoformen, Orai1-3 [36], mit vier Transmembran (TM)-Domänen sowie zytosolischen NH_2 - und $COOH$ -Termini [35] (Abbildung 4). Während die vier TM-Einheiten der drei Isoformen 81 - 87 % übereinstimmende Sequenzen besitzen, ist die funktionelle TM1-Domäne in allen Isoformen identisch. Trotz der weitgehend übereinstimmenden Sequenzen resultiert der SOCE vorwiegend durch die Interaktion zwischen Orai1- und STIM1-Proteinen (zusammengefasst in [20]). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass Orai3 in Abwesenheit von Orai1 dessen Funktion im SOCE übernehmen konnte [37].

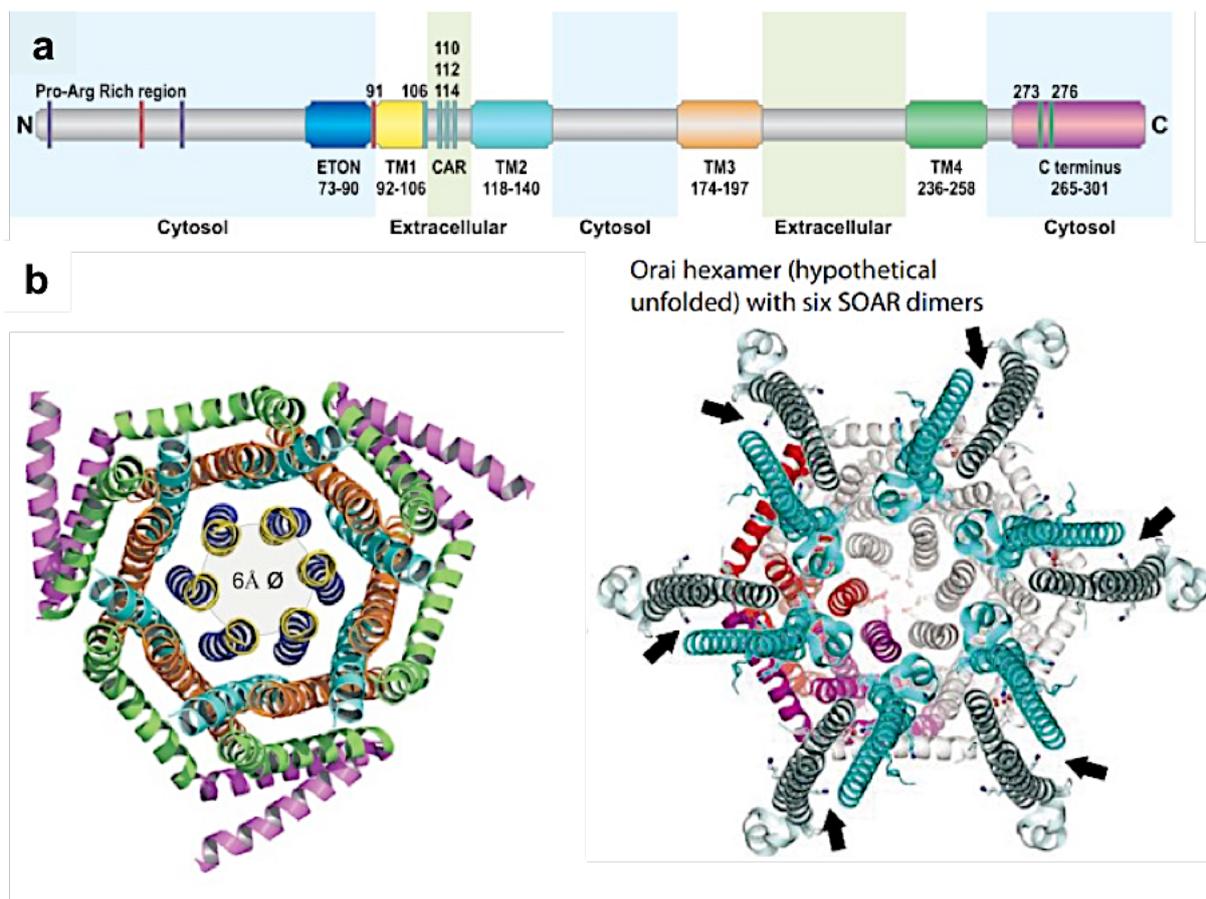


Abbildung 4: Schematische Darstellung des humanen Orai1-Proteins und der hexameren Struktur des Orai-Kanals [20]. a) Gefärbte Abschnitte stellen funktionelle Einheiten des Orai1-Proteins dar. Ein Orai-Monomer besitzt vier Transmembran (TM)-Domänen, einen zytosolischen NH_2 (N)-Terminus mit einer „extended transmembrane Orai1 NH_2 -terminal“ (ETON) Einheit (blau) und einem $COOH$ (C)-Terminus (lila) sowie einer „ Ca^{2+} accumulating region“

(CAR)-Domäne (gelb). b links) Darstellung des Orai-1-Kanalkomplexes anhand der Orai-Kristallstruktur von *Drosophila*. TM1 bildet die Ionenpore als inneren Ring um den Kanal während die anderen TM-Domänen (türkis, orange, grün) der sechs Orai-Untereinheiten einen konzentrischen Ring um die Pore bilden. b rechts) Theoretische Anordnung der sechs SOAR-STIM-Domänen (türkis) mit sechs TM4-Helices (rot) in einer entfalteten, hexameren Kanalstruktur von oben betrachtet [38].

Aufgrund der vorgestellten Daten aus den Publikationen konnte ein molekulares Modell entwickelt werden, in dem STIM1- und Orai1-Proteine die Effektoren des SOCE darstellen und direkt miteinander agieren.

1.2.2 Der Rezeptor-operierte Ca^{2+} -Einstrom (ROCE)

Im Gegensatz zum Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) steht während des Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstroms (ROCE) der Ca^{2+} -Einstrom die Rezeptoraktivierung im Vordergrund und nicht der Ca^{2+} -Einstrom mittels Speicherentleerung. Der ROCE benötigt eine Agonisten-induzierte Rezeptoraktivierung, wodurch es zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) kommt. Diese generiert unter Abspaltung von Inositoltriphosphat (IP_3) Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2). Während IP_3 im SOCE zu einer Speicherentleerung führt aktiviert DAG plasmamembranständige Ionenkanäle, zum Beispiel „classical transient receptor channel“ 3/6/7 (TRPC3/6/7)-Kanäle [39] (Abbildung 5). Dadurch kommt es unabhängig von der Speicherentleerung zu einem Ca^{2+} -Einstrom mittels TRPC-Ionenkanäle in die Zelle.

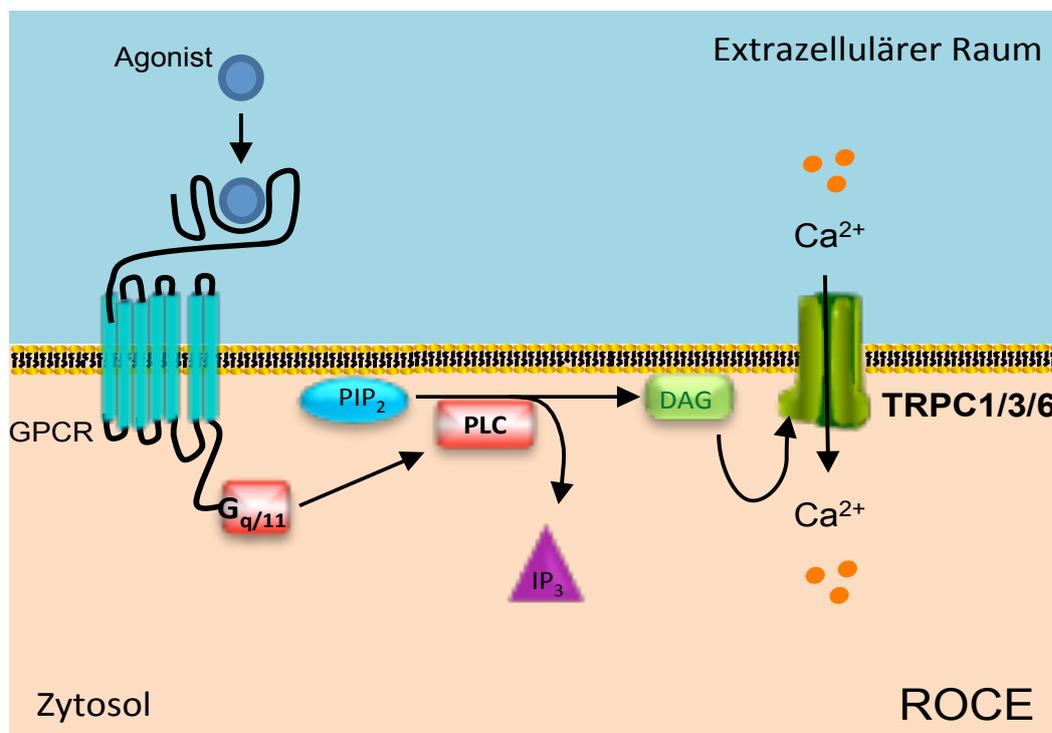


Abbildung 5: Der Rezeptor-operierte Ca^{2+} -Einstrom (ROCE). Ein Agonist, beispielsweise Endothelin-1, aktiviert einen G_q -Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Nach der GPCR-

Aktivierung kommt es durch Phospholipase C (PLC) zur Hydrolyse von Phosphatidlinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃). Im Gegensatz zum Speicher-operierten Ca²⁺-Einstrom bedarf es für die Initiierung des ROCE keiner Speicherentleerung, sondern einer Aktivierung von „classical transient receptor channel“ (TRPC) 1/3/6 mit Hilfe von DAG [39].

Im Unterschied zum SOCE handelt es sich bei diesen Ionenkanälen nicht um selektive Ca²⁺-Kanäle sondern um Kationenkanäle, die ebenfalls für andere Ionen wie zum Beispiel Na⁺ permeabel sind [40]. Durch den Einstrom von Na⁺-Ionen in die Zelle kommt es zu einer Depolarisation der Plasmamembran, wodurch es beispielweise in glatten Muskelzellen [41] zur Aktivierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen kommen kann. Folglich bedient der ROCE ähnliche Funktionen wie der SOCE sowohl in erregbaren als auch nicht erregbaren Zellen [42].

1.2.2.1 Die Superfamilie der „transient receptor potential“ (TRP)-Kanäle

Der Name der „transient receptor potential“ (TRP)-Kanäle leitet sich von dem transienten Rezeptorpotential im Elektro-Retinogramm des Facettenauges einer *Drosophila* Mutante nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Lichtreizen ab. Während die Photorezeptoren der Mutante bei längerer Belichtung in Form eines transienten Rezeptorpotentials und mit einer vorübergehenden „Erblindung“ reagierten, zeigte die Wildtyp *Drosophila* ein anhaltendes Rezeptorpotential ohne visuelle Einschränkungen [43]. Erst 20 Jahre später kam es mit der Klonierung und Sequenzierung des *trp*-Gens zur molekularen Charakterisierung des *trp*-Genlocus in *Drosophila*. Die Analyse der TRP-Proteinsequenz ergab ein 1275 Aminosäuren großes Protein, welches mit acht Transmembran-Domänen einem typischen Ionenkanal entspricht [44]. Nach der Entdeckung der TRP-Kanäle in *Drosophila* wurde der erste TRP-Kanal (TRP1 jetzt TRPC1) in Säugetieren von drei verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen [45-47].

Die Superfamilie der TRP-Kanäle lässt sich je nach homologer Aminosäuresequenz in sieben Familien gliedern: „classic“ oder „canonical“ (TRPC)-, „vanilloid“ TRP (TRPV)-, „melastatin“ TRP (TRPM)-, „ankyrin“ TRP (TRPA)-, „no mechanoreceptor potential C“ (NOMP-c) TRP (TRPN)-, „polycystic“ TRP (TRPP)- und „mucolipin“ TRP (TRPML)-Kanäle (Abbildung 6). In Säugetieren sind alle Familien bis auf den NOMP-c-Kanal vorzufinden, denn dieser wird nur in Invertebraten und Fischen (Zebrafisch) exprimiert (zusammengefasst in [48]). Alle Familien der TRP-Kanäle besitzen sechs Transmembran-Domänen mit einer kanalbildenden Pore zwischen dem fünften und sechsten Segment sowie jeweils intrazelluläre NH₂- und COOH-Termini. TRP-Kanäle sind Liganden-gesteuerte, nicht selektive Ca²⁺-Kanäle und besitzen je nach Familie unterschiedliche Permeabilitäten für

Kationen, verschiedene Aktivierungsmechanismen sowie vielfältige, physiologische und zelluläre Funktionen. Im Allgemeinen werden TRP-Ionenkanälen zwar in zahlreichen Geweben und in einer Vielzahl an Zelltypen exprimiert, jedoch ergeben sich deutliche Unterschiede in den jeweiligen Expressionsmustern (zusammengefasst in [49]). Neben der Reaktion auf physiologische Reize gelten TRP-Kanäle auch als Sensoren für Temperatur, Schmerz, Geschmack, Pheromone und andere Reize [50].

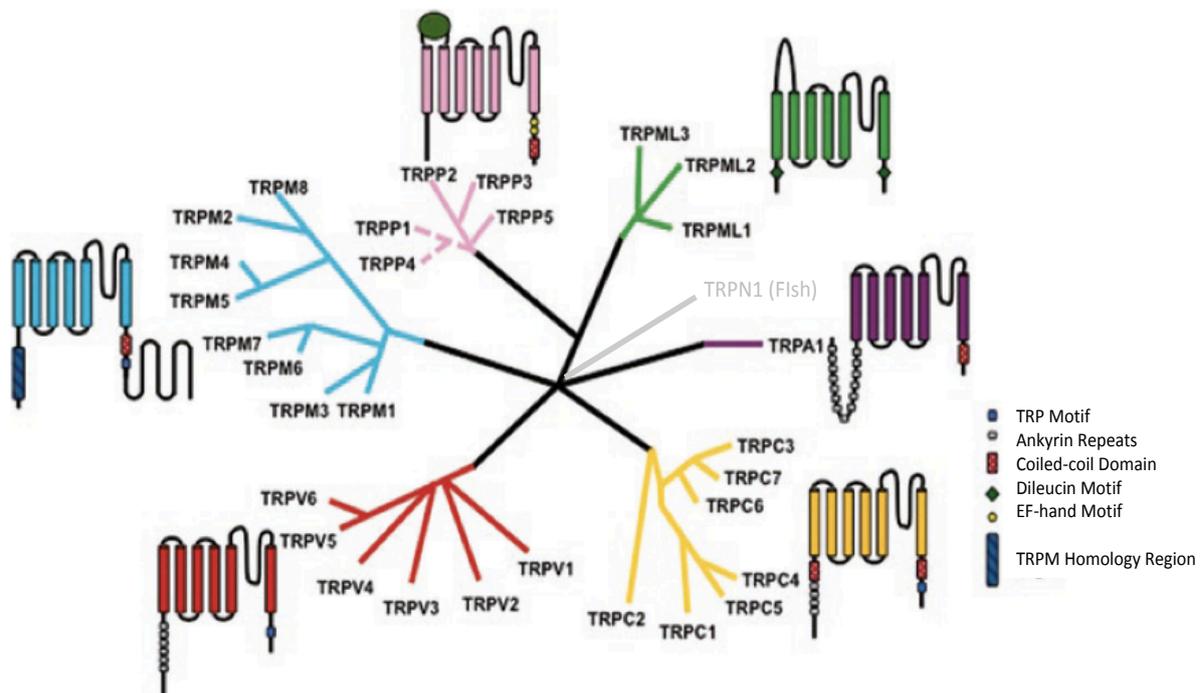


Abbildung 6: Übersicht der „transient receptor potential“ (TRP)-Superfamilie sowie repräsentativer Mitglieder. Die einzelnen Zweige der Abbildung entsprechen einer Familie und der jeweiligen Kanalstruktur: TRPC (*canonical*), TRPV (*vanilloid*), TRPM (*melastin*), TRPA (*ankyrin*), TRPML (*mucoipin*) und TRPP (*polycystic*). Der Vollständigkeit halber wurde TRPN (*no mechanoreceptor potential C* (NOMP-c)) ebenfalls abgebildet, obwohl dieser nicht in Säugetieren exprimiert wird. TRPC2 stellt im Menschen ein Pseudogen dar. Die Struktur der TRP-Kanäle weist je nach Subfamilie bestimmte charakteristische, funktionelle Sequenzdomänen auf (siehe Legende rechts). Modifiziert nach [51].

1.2.2.2 „Classical transient receptor potential“ (TRPC)-Kanäle

Die Familie der TRPC-Kanäle wird entweder als „classical“ oder als „canonical“ „transient receptor potential“ (TRP)-Kanal beschrieben, da dieser circa 40 % übereinstimmende Sequenzen zum *trp*-Gen von *Drosophila* aufweist. Auf Grund dieser Ähnlichkeit und der fast ubiquitären Expression wurde der TRPC1-Kanal 1995 als erstes Mitglied der Familie kloniert [45-47]. Während das humane TRPC1-Gen auf Chromosom 3 liegt, ist es in Mäusen auf Chromosom 9 lokalisiert. Im Allgemeinen gibt es sieben TRPC-Kanäle, jedoch stellt TRPC2 im Menschen nur ein sogenanntes Pseudogen dar, das nicht funktionell exprimiert wird.

Während TRPC1 und TRPC2 sich in Ihren Aminosäuresequenzen stark unterscheiden, besitzen TRPC3, TRPC6 und TRPC7 zwischen 70 % bis 80 % sowie TRPC4 zu TRPC5 bis zu 65 % an homologen Sequenzen. Die gemeinsame Proteinstruktur aller TRPC-Kanäle besteht aus sechs Transmembran-Domänen, drei bis vier „Ankyrin Repeats“, „coiled-coil“-Domänen am NH₂- und COOH-Terminus, einer porenbildenden Einheit zwischen dem fünften und sechsten Segment des Kanals, einem TRP-„Motif“ und einer „Calmodulin- and IP₃R-binding“ (CIRB)-Domäne (Abbildung 6 und Abbildung 7). Obwohl der TRPC1-Kanal den ersten homolog klonierten TRP-Kanal darstellt, bleibt die molekulare Struktur des nativen TRPC1-Kanals und seine Funktion immer noch weitgehend unklar (zusammengefasst in [52, 53]). Während TRPC1-Kanäle ubiquitär exprimiert werden, sind TRPC3/6/7-Kanäle vermehrt im Gehirn, in der Lunge, Niere und in Muskel- sowie Endothelzellen des vaskulären Systems vorzufinden [39]. Dort sind die TRPC-Kanäle an Ca²⁺-abhängigen Signalkaskaden und deren Regulation beteiligt [40, 54].

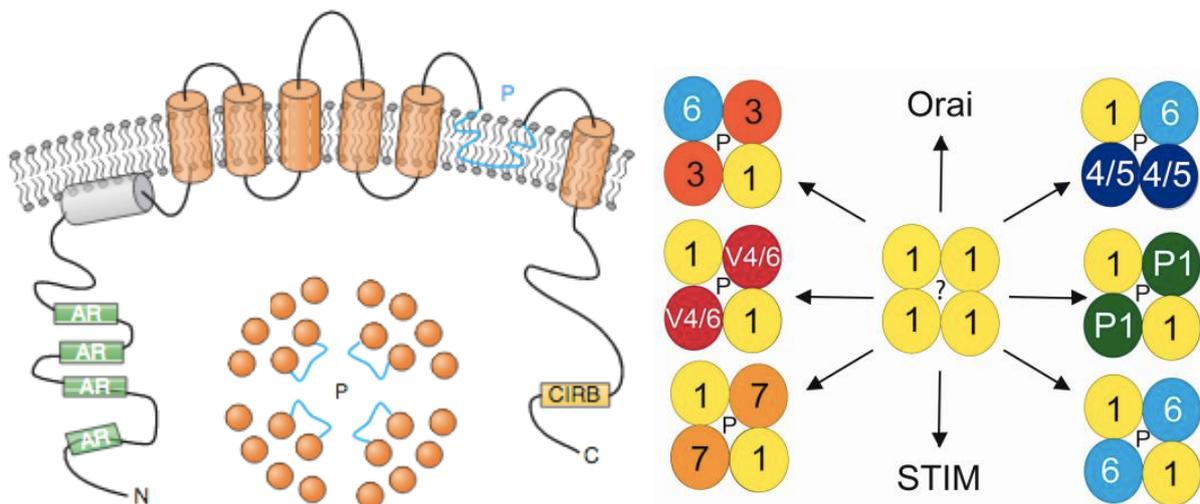


Abbildung 7: Repräsentative Struktur des „canonical transient receptor potential“ (TRPC)-Kanal-Proteins. Links: Abbildung der TRPC-Kanal-Untereinheiten (von TRPC3) und der tetrameren Kanalstruktur. Der Kanal besteht aus sechs Transmembran (TM)-Domänen (orange) und einem hydrophoben, porenbildenden Segment (P, blau) zwischen TM5 und TM6. Die Region des NH₂ (N)-Terminus besitzt vier „ankyrin-like repeats“ (AR) und neben dem COOH (C)-Terminus ein Segment für die Bindung an die „Calmodulin- and IP₃R-binding“ (CIRB)-Domäne. Zur Darstellung eines funktionellen TRPC-Kanals werden vier Untereinheiten mit den sechs TM-Domänen (orange) sowie einer Pore aus den vier P Segmenten (blau) benötigt, die als tetramere Struktur von oben abgebildet ist [55]. Rechts: Mögliche homomere und heteromere TRP-Komplexe mit TRPC1. TRPC1 kann sowohl mit allen Mitgliedern der TRPC-Familie als auch mit TRPP1 (P1) und TRPV4/6 (V4/6) einen heteromeren Kanalkomplex eingehen. Die Formation eines homomeren TRPC1-Komplexes gilt als umstritten. [53]

Außerdem unterscheiden sich die jeweiligen TRPC-Kanäle in ihrer Selektivität für Kationen (Ca²⁺, Na⁺) [40, 56]. TRPC-Kanäle sind in der Lage homomere sowie heteromere Tetramere, wie beispielsweise TRPC1/4/5 und TRPC3/6/7, zu bilden [39, 57]. Zudem wurden heteromere

Tetramere aus TRPC1 und anderen TRP-Familien, wie zum Beispiel mit TRPP und TRPV [53] nachgewiesen (siehe Abbildung 7). Während alle anderen TRPC-Subtypen als homomere Tetramere agieren, ist die Bildung eines homomeren, funktionellen TRPC1-Kanals in der Plasmamembran umstritten [53, 57]. TRPC1 scheint in heteromeren TRP-Kanälen eher als Kanalregulator zu fungieren, da es die Ionenströme in heteromeren TRPC5-Tetrameren modifiziert [57] und die Ca^{2+} -Permeabilität in heteromeren TRPC4/5/6/7-Kanälen reduziert [58]. Während TRPC3/6/7-Kanäle als Rezeptor-operierte Ca^{2+} -Kanäle gelten [39, 59] und durch Diacylglycerol (DAG) in Folge einer Stimulation von G_q -Protein gekoppelten Rezeptoren und Phospholipase C aktiviert werden, ist die Aktivierung von homo- und heteromeren TRPC1/4/5-Kanälen noch nicht klar [53]. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass auch TRPC4- und TRPC5-Kanäle prinzipiell durch DAG aktivierbar sind [60]. Es könnte jedoch auch eine Interaktion zwischen TRPC-Kanälen und STIM-Proteinen oder Orai-Kanälen eine Rolle spielen [51].

1.2.2.3 „Nuclear factor of activated t cells“ (NFAT) als Transkriptionsfaktor

Der Transkriptionsfaktor „*Nuclear factor of activated t cells*“ (NFAT) wurde ursprünglich als putativer Regulator in T-Zellen zur Genexpression von Zytokinen (z.B. Interleukin (IL)-2) entdeckt [61, 62]. Nach der Identifizierung aller NFAT-Proteine wurde jedoch klar, dass NFAT-Proteine nicht nur für die Regulation von Zytokinen in T-Zellen von Bedeutung sind, sondern in vielen anderen Zelltypen und Organen ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Die Familie der NFAT-Proteine besteht aus fünf Mitgliedern: NFAT1 (NFATp, NFATc2), NFAT2 (NFATc, NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx, NFATc3) und NFAT5. Die ersten vier Isoformen (NFAT1-NFAT4) kommen nur in Vertebraten vor und werden durch intrazelluläre Ca^{2+} -Signale aktiviert [63]. Auch wenn die Aktivierung der Signalkaskade über verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel über die Aktivierung von Tyrosinkinase mit oder ohne Rezeptoren, durch Ionenkanäle und G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), stattfinden kann, sind die intrazellulären Ca^{2+} -Signale der maßgebende Schritt in der nachfolgenden Signalkaskade zur Aktivierung von NFAT-Transkriptionsfaktoren [64]. Nach einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt es zu einer Ca^{2+} / Calmodulin-vermittelten Aktivierung der Serin/ Threonin Phosphatase Calcineurin. Das aktivierte Calcineurin spaltet wiederum die Phosphatgruppen am N-Terminus der zytoplasmatischen Untereinheit von NFAT (NFATc) ab, sodass die nukleäre Translokation von NFATc in den Zellkern zur NFAT-vermittelten Genexpression führt [63, 64] (Abbildung 8). In diesem Zusammenhang spielt der Speicher-operierte Ca^{2+} -Einstrom [65, 66] eine entscheidende Rolle für die Generierung von Ca^{2+} und der Ca^{2+} -

vermittelten NFAT-Signalkaskade. Darüber hinaus stehen Defekte im Ca^{2+} / Calcineurin-NFAT-vermittelte Signalweg in Verbindung mit Erkrankungen des Immunsystems beispielsweise sowie bei der Entstehung von Tumoren und Entzündungsprozessen (zusammengefasst in [67, 68]). Neben dem SOCE wurde auch eine Beteiligung von TRPC-Kanälen im Rahmen von pathophysiologischen Prozessen, insbesondere bei kardiopulmonalen Erkrankungen, nachgewiesen (zusammengefasst in [53, 54, 69]).

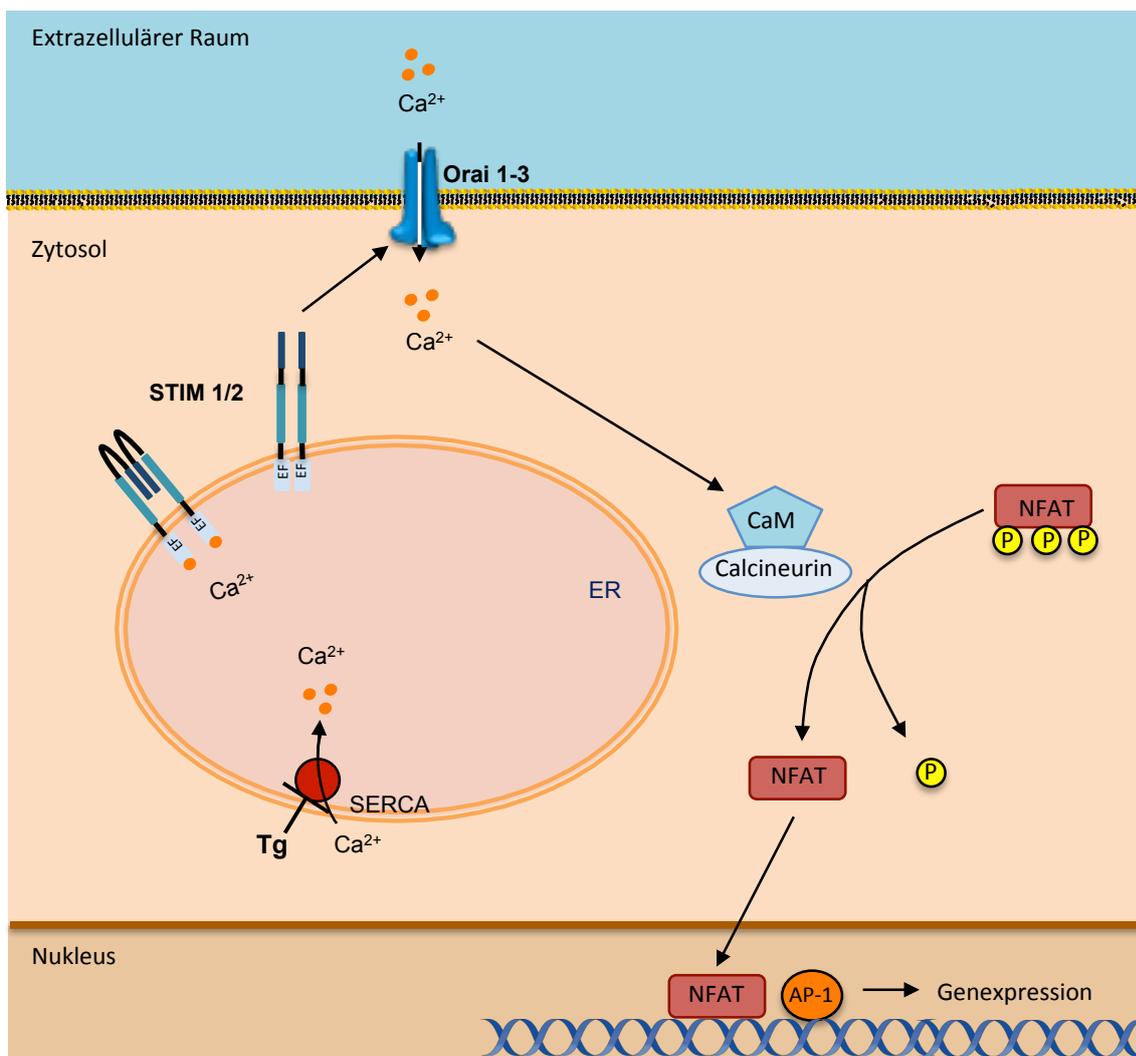


Abbildung 8: Übersicht der Aktivierung des Ca^{2+} / Calcineurin/ *nuclear factor of activated T cells* (NFAT)-Signalwegs. Durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, z.B. durch den Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom nach Aktivierung von *stromal interaction molecule* (STIM1/2)-Proteinen und der anschließenden Öffnung von Orai-Kanälen in der Plasmamembran, kommt es zur vermehrten Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin (CaM). Die Ca^{2+} /Calmodulin-vermittelte Aktivierung der Serin/ Threonin Phosphatase Calcineurin zur Abspaltung der Phosphatgruppen am N-Terminus von NFAT. Die Dephosphorylierung von NFAT resultiert in einer Konformationsänderung, die mit einer raschen Translokation von NFAT in den Zellkern einhergeht. Anschließend kommt es durch die nukleäre Translokation von NFAT und mit Hilfe von *activator protein 1* (AP-1) zur NFAT-vermittelten Genexpression. AP-1 fungiert als Transkriptionspartner von NFAT, bindet mit NFAT an die DNA und reguliert gemeinsam mit NFAT als Komplex die Genexpression von Zytokinen in T-Zellen.

1.2.2.4 Interaktion zwischen „classical transient receptor potential“ (TRPC)-Kanälen und „stromal interaction molecule“ (STIM1/2)-Proteinen /Orai-Kanälen

Auf der Suche nach den molekularen Mechanismen des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) stellten TRPC-Kanäle erste und damals aussichtsreiche Kandidaten dar. Nach ihrer Entdeckung [43] wurde zunächst angenommen, dass es sich bei den TRPC-Kanälen um die lang ersehnten SOCE-Kanäle handelte [45]. Allerdings zeigten die TRPC-Kanäle nicht die Ca^{2+} -selektiven Eigenschaften eines I_{CRAC} und schienen spätestens nach dem Nachweis des Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstroms (ROCE) anhand der Aktivierung von TRPC3/6/7-Kanälen durch DAG aus dem Rennen ausgeschieden zu sein [39]. Trotz der Identifizierung von Orai-Kanälen [32] als Ca^{2+} -selektive I_{CRAC} -Ionenkanäle [11] und STIM-Proteinen [70] als Mediator des SOCE, wird eine Beteiligung von TRPC-Kanälen am SOCE bis heute kontrovers diskutiert.

In diesem Zusammenhang zeigten vor allem die drei Arbeitsgruppen um Shmuel Muallem, Lutz Birnbaumer und Indu Ambudkar eine Beteiligung von TRPC-Kanälen am SOCE durch Interaktionen von TRPC-Kanälen mit entweder STIM1/2- [71-73] oder Orai1/2/3-Proteinen [74-76] (zusammengefasst in [77-79]).

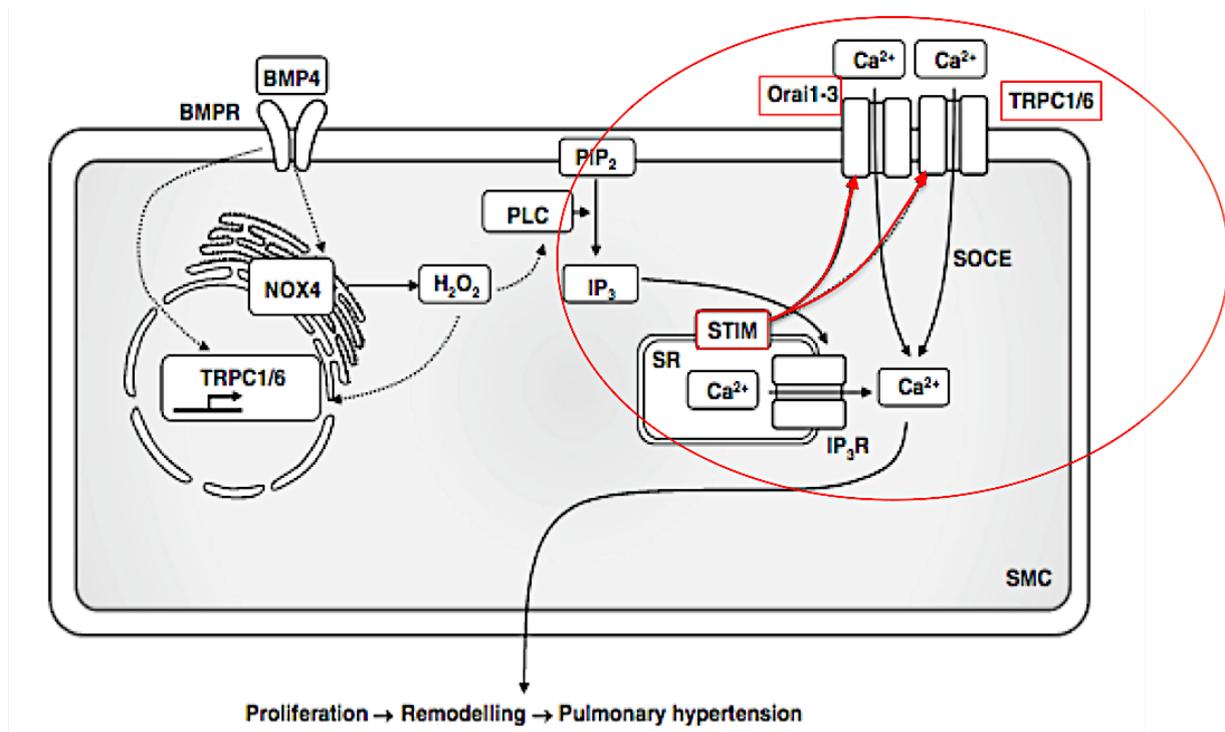


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Orai und TRPC Aktivierung durch STIM-Proteine anhand des Beispiels eines unter chronischer Hypoxie verursachten Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) in glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) (modifiziert nach [80]). Eine direkte Aktivierung von Orai- und TRPC-Kanälen durch STIM-Proteine wird von der Arbeitsgruppe von Shmuel Muallem vorgeschlagen, während die Forschergruppe von Lutz Birnbaumer einen heteromeren Orai/TRPC-Komplex favorisiert (siehe Text). Unter hypoxischen Bedingungen führt die Aktivierung von „bone morphogenic protein 4 receptor“ (BMP4-R) zu einer vermehrten Produktion von

H_2O_2 durch die „*nicotinamide adenine dinucleotidephosphate-oxidase 4*“ (NOX4). Nach der H_2O_2 -vermittelten Spaltung von PIP_2 durch Phospholipase C (PLC) führt die mit Hilfe von Inositoltriphosphat (IP3)-vermittelte Speicherentleerung sowohl zur direkten Aktivierung von Orai- als auch von TRPC-Kanälen. Der dadurch induzierte SOCE in SMC (in rot) führt einerseits zu einer vermehrten Proliferation sowie andererseits zu einem verstärkten Gefäßumbau („*Remodelling*“). Diese pathophysiologischen Prozesse sind für die Entwicklung und Entstehung der pulmonalen Hypertonie mitverantwortlich. [80]

Shmuel Muallems Arbeitsgruppe vertritt die Hypothese, dass heteromere TRPC-Komplexe aus TRPC1-6 existieren, die von STIM direkt aktiviert werden, und so zu einem SOCE führen [71] (Abbildung 9). Sie konnten zeigen, dass der COOH-Terminus von STIM1 nicht nur den SOCE initiiert sondern auch mittels elektrostatischer Interaktionen mit TRPC-Kanälen interagiert. Laut der Arbeitsgruppe ist hierfür nicht die Lysin Domäne von STIM1 sondern der enge Kontakt zwischen den „*STIM1 Orai1 Activating Region*“ (SOAR)-Regionen von STIM1 und den „*coiled-coil*“-Domänen von TRPC notwendig [81-83].

Eine Beteiligung von TRPC1-Kanälen am SOCE wurde bisher nur in Azinuszellen des Pankreas [84] und in Speicheldrüsenzellen [85] beschrieben, während eine Beteiligung in glatten Muskelzellen der Blutgefäße [86] und in Blutplättchen [87] nicht nachgewiesen werden konnte. Die Arbeitsgruppe von Indu Ambudkar (Abbildung 10a) spezialisierte sich auf die Rolle des TRPC1-Kanals in Speicheldrüsenzellen und identifizierte einen dreiteiligen, dynamischen Komplex aus TRPC1-STIM1-Orai1-Proteinen. Hierbei konnten sie durch sogenannte „*Knockdowns*“ der einzelnen TRPC1-STIM1-Orai1-Komponenten zeigen, dass der SOCE nur durch das Zusammenspiel aller drei Proteine induziert werden konnte [88]. Eine wichtige Rolle könnten laut den Autoren auch Mikrodomänen und Ca^{2+} -Signalproteine, wie zum Beispiel die sarko-/ endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)- und Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA)-Pumpe, Phospholipase $C\beta$ (PLC β), der IP $_3$ -Rezeptor und Calmodulin, spielen [89, 90]. In heteromeren TRPC-Komplexen mit TRPC1 zeigten TRPC1/3 in humanen Ohrspeicheldrüsenzellen [91] sowie in H19-7 Zelllinien aus dem Hippocampus der Ratte [92] eine Beteiligung am SOCE. In vaskulären glatten Muskelzellen [93] konnte ebenfalls ein SOCE durch TRPC1/5-Kanalkomplexen nachgewiesen werden, während Endothelzellen einen TRPC1/4-vermittelten SOCE aufwiesen [94]. Ein heteromerer Komplex aus den in HEK-Zellen heterolog exprimierten drei TRPC-Kanälen TRPC1/3/7 zeigte ebenfalls eine Beteiligung am SOCE [95].

Die Arbeitsgruppe von Lutz Birnbaumer (Abbildung 10b) vertritt die Hypothese, dass TRPC- mit Orai-Kanälen heteromere Komplexe bilden und sowohl im ROCE als auch im SOCE involviert sind (zusammengefasst in [78]). Anhand von Ko-Immunopräzipitationsversuchen identifizierten sie eine funktionelle Interaktion, zum Beispiel zwischen NH_2 - und $COOH$ -

Termini von TRPC3 und TRPC6 mit Orai1 [74]. Darüber hinaus zeigten sowohl TRPC3- als auch TRPC6-überexprimierende Zelllinien nach Transfektion mit Orai1-3 einen erhöhten SOCE während Gd^{3+} als SOCE-Blocker und die Verwendung einer negativen Orai1-Mutanten (G91W) einen verminderten ROCE in HEK-Zellen erzeugten. Die gleiche Orai1-Mutante zeigte in HEK-Zellen, die stabile oder transiente TRPC3-Kanäle exprimierten, einen reduzierten OAG-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom [96]. Laut der Arbeitsgruppe könnten sogenannte „*Lipid Rafts*“ als Lipid Mikrodomänen auch eine wichtige Rolle für den ROCE und SOCE in heteromeren TRPC-Orai-Komplexen spielen. Demnach könnte TRPC1 entweder nach Aktivierung durch STIM1 in „*Lipid Rafts*“ vorgefunden werden oder ohne STIM1 in Verbindung mit anderen TRPC-Proteinen Rezeptor-operierte Kanäle bilden [79].

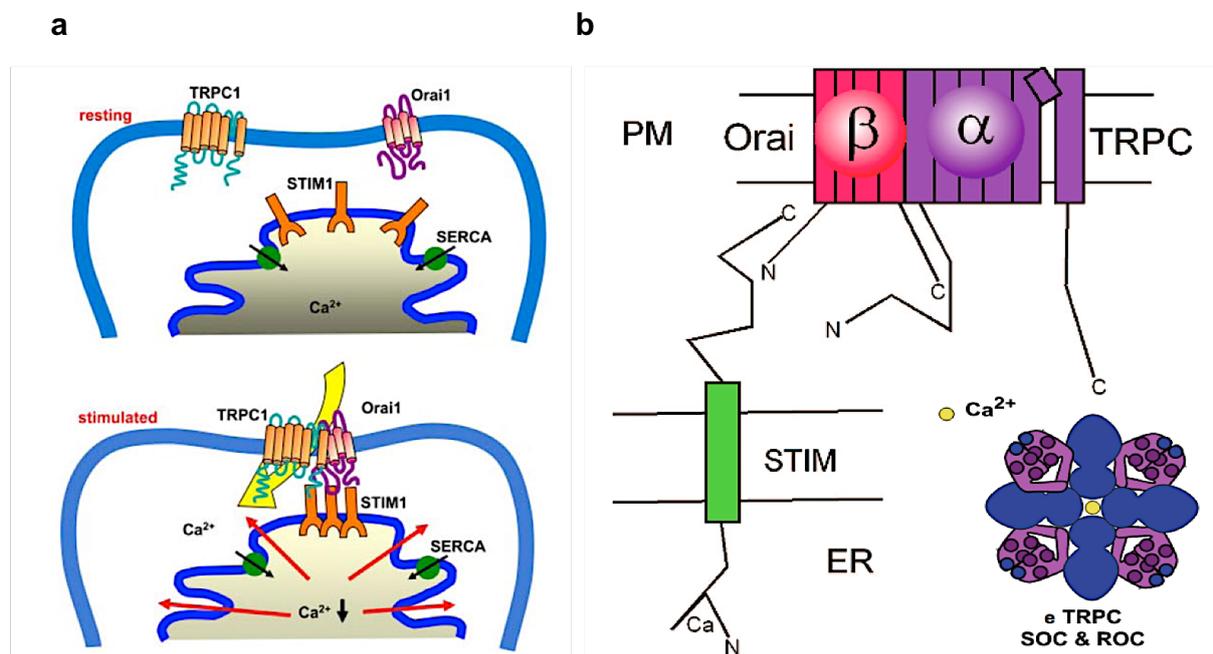


Abbildung 10: Schematische Darstellungen von STIM-TRPC-Orai-Komplexen. **a:** Abbildung des dreiteiligen Komplexes aus STIM1-, TRPC1- und Orai1-Proteinen in stimulierten und ruhenden Zellen nach der Hypothese von Indu Ambudkars Arbeitsgruppe. Nach der Entleerung der Ca^{2+} -Speicher kommt es zu einer Oligomerisierung von STIM1-Proteinen, welche an Orai1- und TRPC1-Kanäle koppeln und durch bisher noch unbekannte Mechanismen einen dreiteiligen Speicher-operierten Kanalkomplex bilden [88]. **b:** Vereinfachte Darstellung eines möglichen heteromeren Komplexes aus Orai- und TRPC-Kanälen auf Basis der Hypothese um die Arbeitsgruppe von Lutz Birnbaumer [74]. Der Ca^{2+} -Sensor STIM registriert einen Ca^{2+} -Konzentrationsabfall im endoplasmatischen Retikulum (ER) und aktiviert Orai-Kanäle als Untereinheit von TRPC-Ionenkanälen in der Plasmamembran (PM). Unten rechts ist eine hypothetische Anordnung eines heteromeren TRPC-Orai-Komplexes mit funktionellen Rezeptor- und Speicher-operierten Kanal (ROC/SOC) abgebildet. Das dargestellte oktamere Heteromer besteht aus jeweils vier Orai-Dimeren zusammen mit einem TRPC-Tetramer. Heteromere TRPC-Orai-Kanäle mit weniger als vier Orai-Dimeren fungieren als Rezeptor-operierter Kanalkomplex [74, 78].

Die Arbeitsgruppe von Attila Braun vertritt als mögliche Interaktion zwischen TRPC- und STIM/Orai-Proteine eine weitere Hypothese für den TRPC6-Kanal. Durch einen signifikant reduzierten SOCE in TRPC6- und Orai1-defizienten murinen Blutplättchen im Vergleich zu

Orai1-defizienten Zellen, demonstrierte die Arbeitsgruppe eine indirekte Beteiligung von TRPC6-Kanälen am SOCE in murinen Blutplättchen [97]. In Blutplättchen kann Diacylglycerol (DAG) grundsätzlich auf zwei Wege generiert werden. Zum einen durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) nach der Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und zum anderen durch Phospholipase D (PLD), welche Phosphatidylcholin (PC) in Phosphatidsäure (PA) und dieses durch Phosphatidat-Phosphatasen (PAP) in DAG umwandelt. Mit Hilfe von PLC- und PLD-Funktionstests wurde in Orai1-defizienten Blutplättchen eine reduzierte Aktivität von PLC und PLD gemessen. Diese Signalmechanismen könnten durch einen Orai1-induzierten SOCE den DAG-vermittelten ROCE verstärken (siehe Abbildung 11).

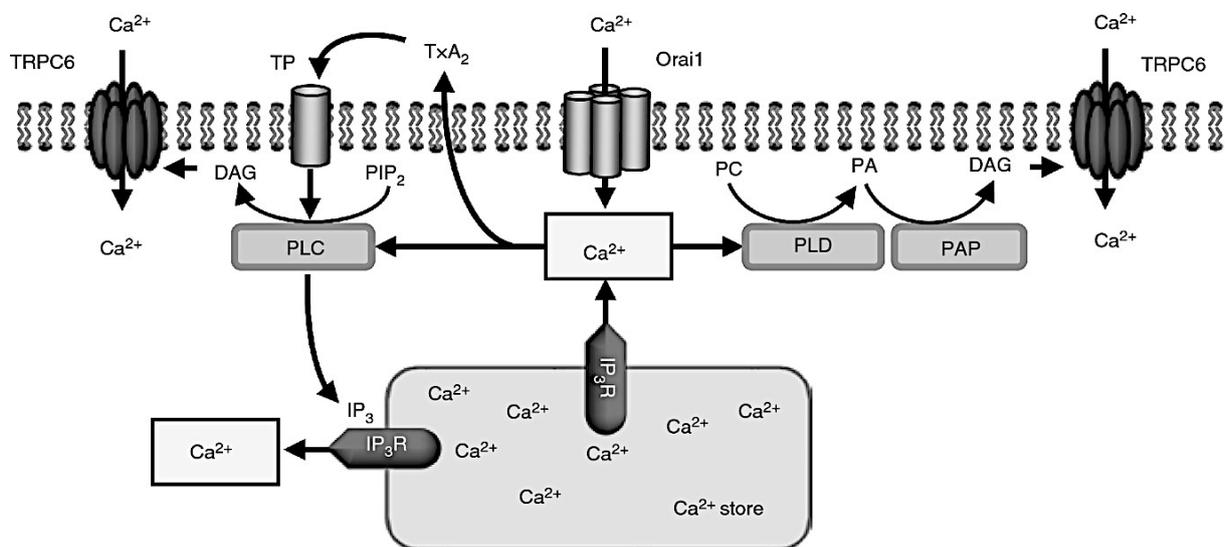


Abbildung 11: Modell zur TRPC6-Kanal-Aktivierung durch den Speicher-operierten Ca²⁺-Einstroms (SOCE) [97]. Durch den Ca²⁺-Einstrom über Orai-Kanäle erhöht sich die Aktivität von Phospholipase C und D (PLC/PLD). Infolgedessen kommt es zum einen über PLC direkt und zum anderen über PLD unter Umsetzung von Phosphatidsäure (PA) mit Hilfe von Phosphatidat-Phosphatasen (PAP) indirekt zur Produktion von Diacylglycerol (DAG). Die Thromboxan (TxA₂)-Produktion kann die PLC-Aktivität durch Rezeptoraktivierung weiter erhöhen. Eine vermehrte Produktion von DAG aktiviert TRPC6-Kanäle und führt zu einem zusätzlichen Ca²⁺-Einstrom in die Zelle. Inositoltriphosphat (IP₃); Inositoltriphosphat-Rezeptor (IP₃R); Phosphatidylcholin (PC); Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂); Thromboxan A₂-Rezeptor (TP)

Auf Grund der vorgestellten Daten zum SOCE in homomeren und heteromeren TRPC-Kanälen in Abhängigkeit von der Expression, muss die Funktion von TRPC-Kanälen als ROCE oder SOCE in den zu untersuchenden Zellen jeweils unabhängig voneinander analysiert werden.

1.3 Funktion und Aufbau des humanen respiratorischen Systems

Das respiratorische System dient der Atmung, um den Gasaustausch zwischen der umgebenden Luft und dem Blutkreislauf zu gewährleisten. Während Sauerstoff (O₂) über die

Alveolen in die Blutkapillaren diffundiert, wird im gleichen Zug Kohlenstoffdioxid (CO₂) in die Umgebung ausgeschieden. Neben der Atmung besitzt das respiratorische System noch weitere wichtige Funktionen wie beispielsweise die Regulierung des pH-Wertes, die Immunabwehr von inhalierten Pathogenen und die Erzeugung von Luftströmen für die Produktion von Tönen [98].

Das respiratorische System kann anhand der Anatomie oder der Funktion in zwei Abschnitte eingeteilt werden. Topographisch besteht das Atmungssystem neben den Knochen und Muskeln des Thorax und des Abdomens aus den oberen und unteren Atemwegen. Während der obere Respirationstrakt den Mund, die Nasenhöhle, den Rachen und den Kehlkopf (Larynx) umfasst, gliedert sich der untere Respirationstrakt in Luftröhre (Trachea) und das Bronchialsystem der Lunge. Die funktionelle Gliederung unterteilt das respiratorische System in einen luftleitenden und einen gasaustauschenden Abschnitt [99]. Eine detaillierte Aufteilung erfolgte nach der *“International Commission for Radiological Protection”* (ICRP) in vier anatomische Teile: die extra- und intrathorakale, bronchiolare und alveolär-interstitielle Region [100] (Abbildung 12). Die extrathorakale Region dient neben der Reinigung der Luft auch zur Luftaufnahme und entspricht der Aufteilung der oberen Atemwege. Der intrathorakale Abschnitt gliedert sich in Trachea und die bronchiale Region, bestehend aus Haupt-, Lappen-, Segmentbronchien, auf. Die Trachea gliedert sich in einen linken und rechten Hauptbronchus (Bronchi principales), welche jeweils in den Hilus des linken oder rechten Lungenflügels münden. Während der linke Lungenflügel aus nur zwei Lappen (Ober- und Unterlappen) besteht, weist der rechte Lungenflügel drei Lappen (Ober-, Mittel-, und Unterlappen) auf. Die Lungenflügel teilen sich weiter in jeweils acht und zehn Segmente auf. Insgesamt gliedert sich die Lunge anhand des Bronchialbaums in bis zu 23 dichotome Verzweigungen auf. Innerhalb der respiratorischen Epithelstruktur der intrathorakalen Region sind vor allem flüssigkeitsproduzierende und muköse Zellen, wie beispielsweise Clubzellen (früher als Clara-Zellen bezeichnet), Becherzellen, Basalzellen und neuroendokrine Zellen vorzufinden. Die bronchiale Region, welche nur noch aus einem einschichtigen respiratorischen Epithel besteht, verzweigt sich aus den Lappenbronchien in weitere Untersegmente (Segmentbronchien) bis hin zu den Endbronchiolen (Bronchioli terminales) auf. Von dort aus geht der Bronchialast in die feinste Struktur des gasaustauschenden Systems, dem alveolär-interstitiellen Teil über. Dieser besitzt keine Knorpel und Drüsen mehr und besteht aus den respiratorischen Bronchiolen (Bronchioli respiratorii), dem Alveolargang (Ductus alveolares), den Alveolarsäckchen (Saccus

alveolares) zusammen mit deren Alveolen und dem interstitiellen Bindegewebe [99, 101-103]

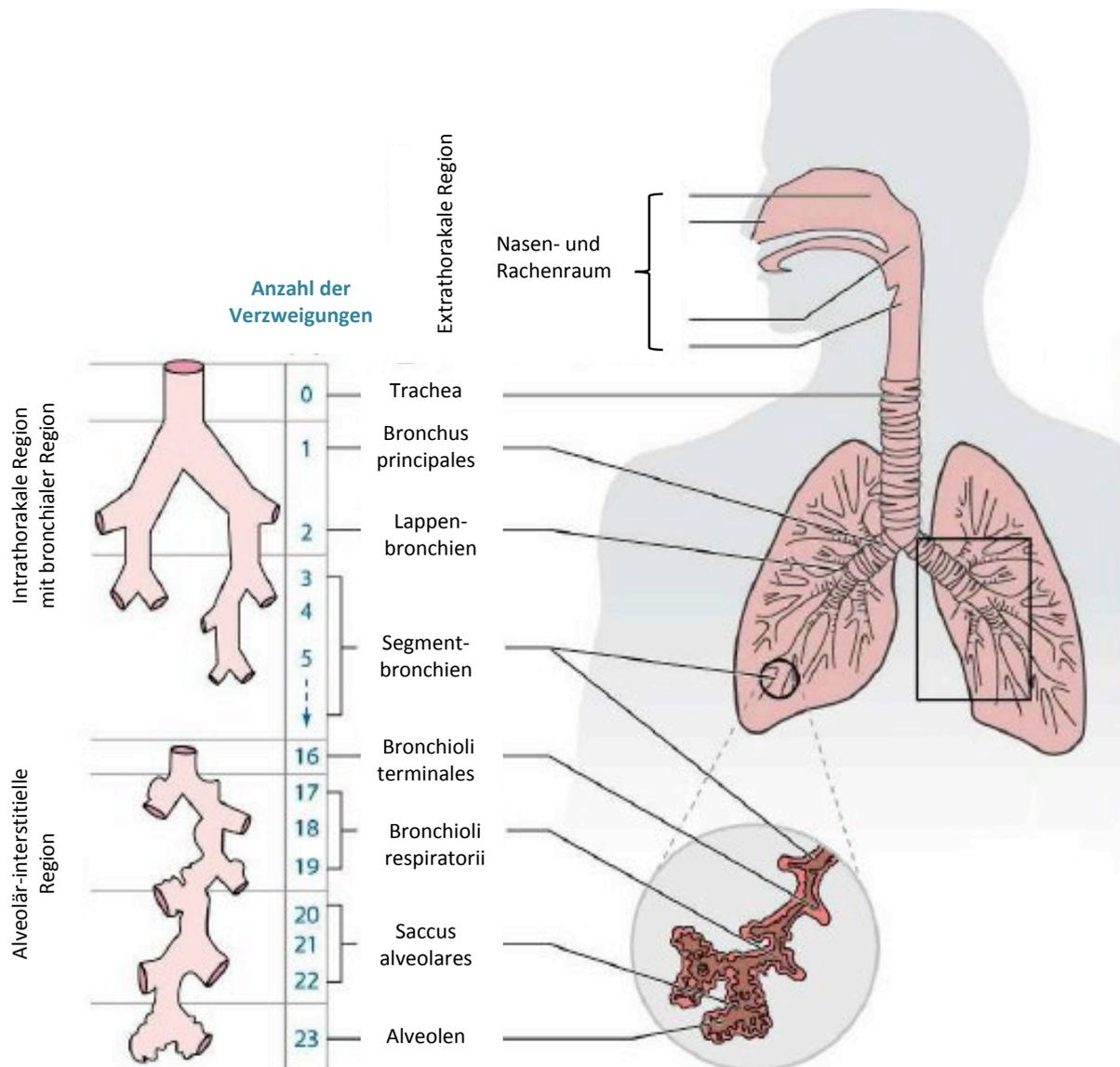


Abbildung 12: Anatomie des humanen respiratorischen Systems nach der „International Commission for Radiological Protection“ (ICRP). Die Aufteilung des respiratorischen Systems erfolgt demnach in vier Regionen: Die Extrathorakale und intrathorakale Region sowie die bronchiale und alveolär-interstitielle Region, welche als Teile der intrathorakale Region gelten. Die einzelnen Strukturen der jeweiligen Regionen sind dem Text zu entnehmen und wurden in dieser Abbildung schematisch zugeordnet. Modifiziert nach [104].

1.4 Das murine respiratorische System

Im Vergleich zum humanen respiratorischen System weist das Respirationssystem der Maus nur wenige abweichende charakteristische Merkmale auf. Die Lungen beider Systeme setzen sich zwar aus jeweils fünf Lungenlappen zusammen, jedoch unterscheidet sich die Anordnung der Lungenlappen. Im Gegensatz zur menschlichen Lunge besteht die Lunge der Maus aus einem linken Lungenflügel mit nur einem Lungenlappen und einem rechten Lungenflügel aus vier Lungenlappen. Während sich der Bronchialbaum im Menschen dichotom aufspaltet, teilt

sich dieser in der Maus monopodial auf. Mit 23 Verzweigungen weist das humane Bronchialsystem im Vergleich zum murinen System mit nur 15-20 Verzweigungen ein stärker verzweigtes System auf [105]. Daraus lassen sich auch Unterschiede in der Zusammensetzung und Struktur des Lungenparenchyms ableiten. Während das murine Lungenparenchym aus 18 % der Lunge besteht, entspricht das humane Lungenparenchym nur 12 % des Lungenvolumens.

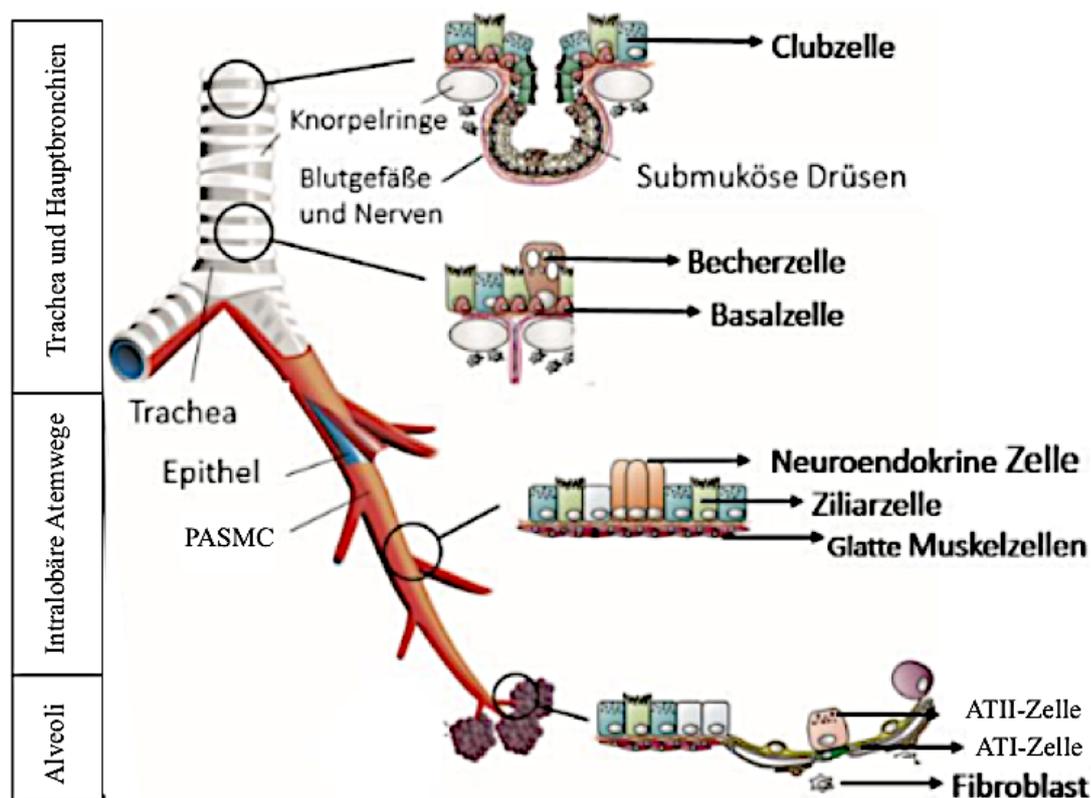


Abbildung 13: Schematische Darstellung des murinen Respirationssystems und des Lungenepithels. Die Aufteilung der murinen Lunge erfolgt in drei Abschnitte: die Trachea zusammen mit den beiden Hauptbronchien, die intralobären Atemwege und die Alveolen. Die Beschreibungen der jeweiligen Strukturen des Lungenepithels sind im Text beschrieben. Modifiziert nach [106, 107].

Das murine Respirationssystem (Abbildung 13) setzt sich im Bereich der knorpelhaltigen Luftwege mit Trachea und Hauptbronchien aus einem mehrschichtigen Lungenepithel mit sekretorischen Zellen (Clubzellen und Becherzellen), submukösen Drüsen sowie Basalzellen zusammen. Das Zellepithel der intralobären Atemwege beinhaltet keine Knorpelringe mehr und besteht vermehrt aus neuroendokrinen Zellen sowie Ziliarzellen und arteriellen glatten Muskelzellen (*arterial smooth muscle cells*, ASMC). Im Alveolarbereich besteht das Epithel vor allem aus den alveolaren Epithelzellen Typ I- (ATI) und Typ II- (ATII) Zellen. Während die dünnen, lang gestreckte ATI-Zellen sowohl den Gasaustausch erleichtern als auch als Zellbarriere für eindringende Mikroorganismen und schädliche Flüssigkeiten dienen, bilden

ATII-Zellen das lebenswichtige „*Surfactant*“ zur Herabsetzung der Oberflächenspannung. An den Verzweigungen des alveolären Kapillarnetzes sind pulmonale arterielle glatte Muskelzellen (PASMC) vorzufinden, welche zur Regulation des Blutdrucks in der Lunge beitragen. In dem umgebenden interstitiellen Raum sind Lungenfibroblasten für die Produktion extrazellulärer Matrixproteine, wie beispielsweise Kollagen und Fibronectin, als Teil des stützenden Bindegewebes zuständig [106, 108]. Auf Grund der ähnlichen Lungenarchitektur eignen sich Mäuse als Modellsysteme, um respiratorische Erkrankungen „*in-vivo*“- und „*in-vitro*“ zu untersuchen [109].

1.5 Krankheitsbilder der Lunge

1.5.1 Pulmonale arterielle Hypertonie

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) ist gekennzeichnet durch einen progressiven Gefäßumbau („*Remodelling*“) der distalen pulmonalen Arterien, wodurch es zu einem erhöhten Blutdruck und Lungengefäßwiderstand kommt. Es wird von einer globalen Prävalenz der PAH von 1 % der erwachsenen Gesamtbevölkerung ausgegangen, die bei über 65-jährigen Patienten auf einen Anteil von 10 % ansteigt [110]. Ohne adäquate Behandlung führt die als selten eingestufte kardiovaskuläre Erkrankung zu einem Rechtsherzversagen und schließlich zum Tod [111]. Die pulmonale Hypertonie (PH) wird mit einem in Ruhe vorherrschenden chronisch erhöhten pulmonalen arteriellen Mitteldruck (PAPm) von $p \geq 25$ mmHg definiert. Zusätzlich wird die Definition der PAH um die Werte des normalen pulmonal arteriellen Verschlussdruck (PAWP) von ≤ 15 mmHg und des vaskulären pulmonalen Widerstand (PVR) von $> 240 \text{ dyn} \times \text{s} \times \text{cm}^{-5} / 3$ Wood-Einheiten ergänzt [112]. Nach der klinischen Klassifikation der „*European Society of Cardiology*“ und der „*European Respiratory Society*“ wird die PAH in vier Gruppen unterteilt: die idiopathische PAH (IPAH), die genetisch bedingte PAH, die medikamentös oder toxisch induzierte PAH, und die mit anderen Erkrankungen assoziierte PAH. Diese Einteilung wurde um die PAH bei Patienten mit Langzeitbehandlung durch Ca^{2+} -Kanal-Blocker, unter einer offensichtlichen Beteiligung des venösen und kapillaren Systems sowie der langanhaltenden PH durch das Neugeborenen-Syndrom erweitert [113] (Tabelle 1).

Tabelle 1: Tabelle nach Simmoneau [113]:

1. Pulmonale arterielle Hypertonie (PAH)
1.1. Idiopathische PAH
1.2. Genetisch-bedingte/ familiäre PAH (Mutationen, z.B. BMPR2)
1.3. Medikamentöse oder toxisch induzierte PAH
1.4 PAH assoziiert mit
1.4.1. Kollagenosen
1.4.2. HIV-Infektion
1.4.3. Portale Hypertonie
1.4.4. Kongenitale Herzerkrankungen
1.4.5. Schistosomiasis
1.5. PAH durch Langzeitanwendung von Ca ²⁺ -Kanal-Blockern
1.6. PAH unter venös-okklusiver oder kapillarer Beteiligung (PVOD/PCH)
1.7 Persistierende PAH bei Neugeborenen

Zu den Risikofaktoren, die zur Entstehung einer PAH beitragen, zählen zum Beispiel chronisch obstruktive [114] (z.B. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) und fibrosierende Lungenerkrankungen (z.B. die idiopathische Lungenfibrose) [115], die Einnahme von Appetitzügler (z.B. Aminorex) [116], genetische Disposition (z.B. Mutationen) [117] oder veränderte Endothelin-Expressionen [118]. Im Rahmen der PAH kommt es neben der erhöhten Vasokonstriktion im pulmonalen vaskulären Gefäßsystem und dem Anstieg des Gefäßwiderstands zu einer verstärkten Proliferation von pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Dadurch findet eine Umstrukturierung der Arterienwände in Form einer Muskularisierung der peripheren Gefäße, einer Verdickung der muskulären Arterien und einer vermehrten Neointima-Bildung statt, welche sowohl zu einer Verengung der Gefäße als auch zum Verlust von kleinen präkapillären Gefäßen führt. [117, 119]. Zu den proliferierenden Muskelzellen, die maßgeblich an der Entstehung einer PAH beteiligt sind, gehören pulmonale arterielle glatte Muskelzellen (PASMC) [117]. PASMC sind an den feinen Verzweigungen der kleinen pulmonalen präkapillären Arterien vorzufinden. Diese Arterien besitzen einen Durchmesser von <500 µm [120], regulieren den Gefäßtonus und stellen somit den Gefäßwiderstand zur Regulation des Blutdrucks dar. PASMC treten entweder in Form eines kontraktilen, vaskulären oder proliferativen, migratorischen Phänotyps auf. Während

der kontraktile Phänotyp den vaskulären Tonus reguliert, ist der proliferative Typ an der pathophysiologischen Veränderung der Gefäßwand beteiligt [121].

In diesem Zusammenhang gilt Endothelin-1 (Et-1) als einer der stärksten vasokonstriktorisches Regulatoren im humanen kardiovaskulären System. Das Peptid Endothelin-1 bindet mit gleicher Affinität entweder an G-Protein-gekoppelte Endothelin-A (ET_A)- oder Endothelin-B (ET_B)-Rezeptoren [122]. Während ET_A-Rezeptoren überwiegend in glatten Muskelzellen und Fibroblasten vorzufinden sind und eine vasokonstriktorische Wirkung erzielen, treten ET_B-Rezeptoren sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Endothelzellen auf. Auch wenn die Stimulation von ET_B-Rezeptoren in PASMC zu einer vasokonstriktorisches Wirkung führt zeigen diese in Endothelzellen eine gegensätzliche Wirkung in Form einer bronchodilatatorischen Relaxation. [123, 124]. Nach der Aktivierung von ET_A-Rezeptoren kommt es neben der vasokonstriktorisches Wirkung zur Proliferation von pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen. Im Blutplasma von PAH-Patienten wurden bereits erhöhte Et-1-Werte gefunden, die neben dem vasokonstriktorisches Effekt von Et-1 auch einen Einfluss auf den pulmonalen Blutfluss und das Herzzeitvolumen hatten [125]. Laut der aktuellen Leitlinie [126] zur Behandlung der PAH werden neben Kalziumkanalantagonisten Arzneimittel verwendet, die entweder in den Et-1- [127], Stickstoffmonoxid (NO)- [128] oder in den Prostazyklin-Signalweg [129] eingreifen (Abbildung 14). Diese drei Signalwege sind zum einen an der Regulation des vaskulären Tonus durch vasodilatatorischen Mediatoren, wie zum Beispiel NO und Prostazyklin, und zum anderen an der Proliferation von Muskelzellen beteiligt [117]. Um der vasokonstriktorisches Wirkung von Et-1 entgegenzuwirken existieren selektive und unselektive ET_A- und ET_B-Antagonisten (z.B. Bosentan, Sitaxan und Ambrisentan), die zu einer Relaxation des Gefäßendothels führen. Darüber hinaus werden NO-freisetzende Substanzen, Phosphodiesterase 5 (PDE5)-Hemmer (z.B. Sildenafil) und Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase (sGC) (z.B. Riociguat) eingesetzt, um die Konzentration an NO beziehungsweise zyklischem Guaninmonophosphat (cGMP) zu erhöhen. Neben NO besitzt cGMP ebenfalls einen vasodilatatorischen Effekt und führt zur Relaxation glatter Muskelzellen. Prostanoiden (z.B. Iloprost, Epoprostenol) und Prostazyklin (IP)-Rezeptor-Agonisten (z.B. Selexipag) unterstützen die vasodilatatorische sowie die antiproliferative und antientzündlichen Wirkung von Prostazyklinen, die endogen mit Hilfe der Cyclooxygenase aus Arachidonsäure gewonnen werden [117].

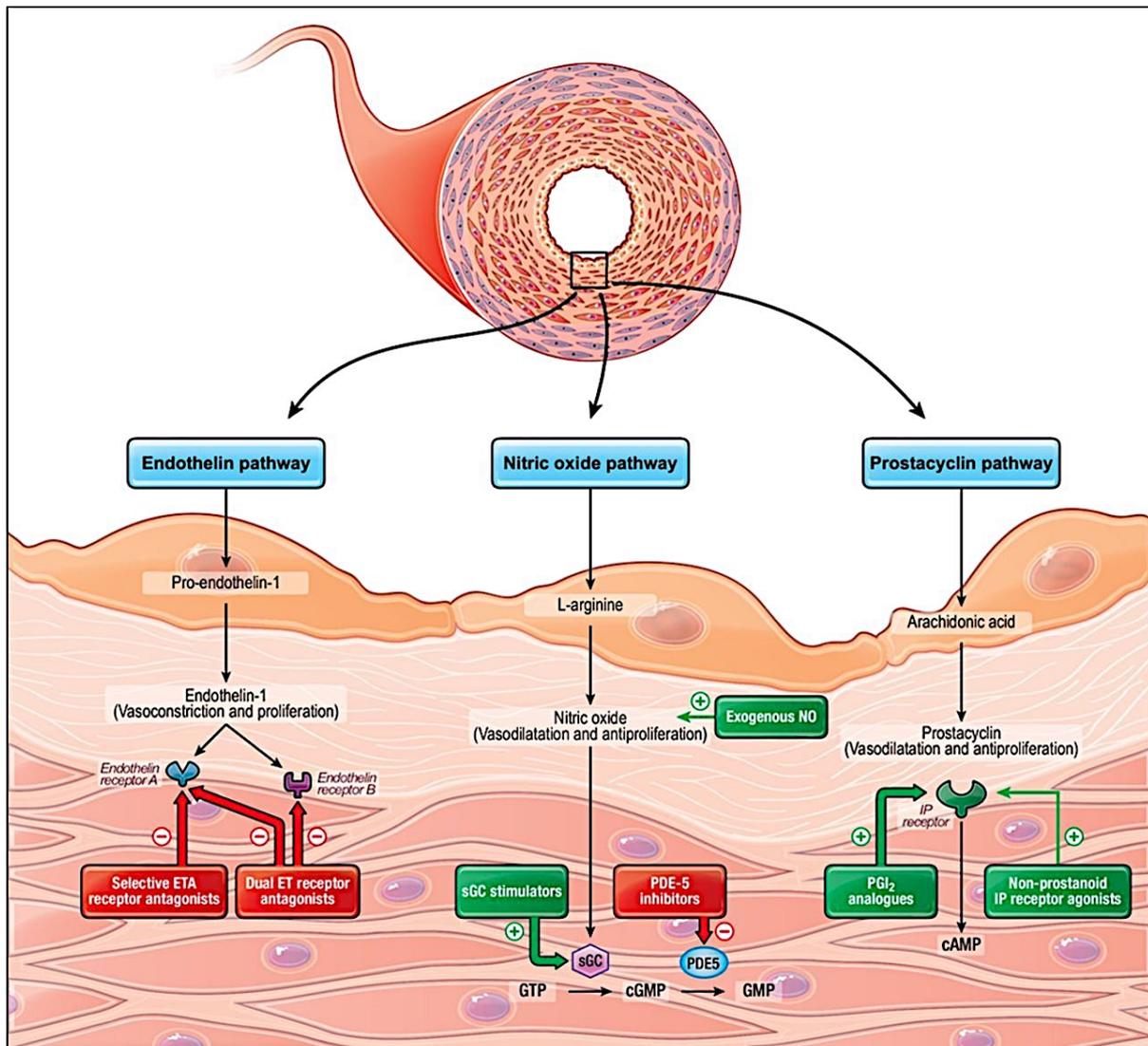


Abbildung 14 nach [117]: Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten und mögliche Therapien der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH). Die drei abgebildeten Signalwege: Endothelin-1 (*Endothelin pathway*), Stickstoffmonoxid (NO, *nitric oxide pathway*) und Prostazyklin (PGI_2 , *Prostacyclin pathway*) stellen die Hauptwege der Regulation des vaskulären Tonus dar und dienen im Rahmen der Therapie als Zielstrukturen für Arzneimittel zur Behandlung der PAH. Bei einer endothelialen Dysfunktion kommt es einerseits zu einer geringeren Produktion an vasodilatatorischen Mediatoren (NO und Prostazyklin) und andererseits zu einer Erhöhung der Endothelin-1-Werte, wodurch es zur Vasokonstriktion und vermehrten Proliferation von glatten Muskelzellen kommt. Der Endothelin-1-Signalweg kann mit Hilfe von selektiven ET_A - oder ET_B -Rezeptor-Antagonisten geblockt werden. Um den NO-Signalweg zu unterstützen werden entweder NO-Donatoren direkt gegeben oder Phosphodiesterase Typ 5 (PDE-5)-Blocker, die neben den Stimulatoren der löslichen Guanylatzyklase (sGC) einen erhöhten Spiegel an zyklischen Guaninmonophosphat (cGMP) erzeugen. Der Prostazyklin-Signalweg kann durch die Verwendung von Prostanoiden (PGI_2 Analoga) oder nicht prostanoiden Prostaglandin (IP)-Rezeptor-Agonisten (z.B. Selexipag) verstärkt werden.

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF) gehört zur Gruppe der diffusen parenchymalen/interstitiellen Lungenerkrankungen und ist durch einen progredienten, auf die Lunge beschränkten, fibrosierenden Verlauf unbekannter Ursache charakterisiert. Als chronisch verlaufende und irreversible Pneumonie stellt die IPF die häufigste Form der Lungenfibrose

dar [130]. Die Prävalenz der IPF schwankt in epidemiologischen Studien zwischen 2-29 Fällen pro 100.000 Personen der Gesamtbevölkerung. Während die Erkrankung mehr Männer als Frauen betrifft, nimmt der prozentuale Anteil ab einem Lebensalter von 65 Jahren deutlich zu [131]. Anhand der Prävalenz der epidemiologischen Daten wird die IPF als seltene Erkrankung mit einer Überlebensprognose von 3-5 Jahren eingestuft. Die Diagnose der IPF erfolgt nach Ausschluss anderer Erkrankungen anhand der Identifizierung charakteristischer Muster der interstitiellen Pneumonie (Honigwabenstruktur) in „*high resolution computer tomography*“ (HRCT)-Aufnahmen oder Lungenbiopsien [130, 132]. Trotz der unbekanntem Ursache der IPF gilt das Rauchen von Zigaretten neben der Einatmung von Metall- und Holzstaub als größter potentieller Risikofaktor zur Entwicklung einer Lungenfibrose. Darüber hinaus stellen genetische Faktoren und Komorbiditäten, wie zum Beispiel ein abnormaler gastroösophagealer Reflux oder die pulmonale arterielle Hypertonie, weitere Risikofaktoren dar [131]. Des Weiteren existieren Studien, die durch Nachweise von Virus-DNA und -Protein in Lungenbiopsien von IPF-Patienten einen kausalen Zusammenhang zwischen der IPF und viralen Infektionen, wie beispielsweise durch das Epstein-Barr- oder Hepatitis C-Virus, nachweisen konnten [133, 134].

Auch wenn der genaue Pathomechanismus der IPF noch weitgehend ungeklärt ist, weisen Studien auf ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren und Signalwege hin. Neben Entzündungsprozessen tragen Epithel-abhängige Signalkaskaden unter Beteiligung von (Myo)Fibroblasten und einer Akkumulierung von extrazellulärer Matrix (ECM)-Proteine zur Pathogenese der IPF bei. Im Verlauf der IPF kommt es nach Schädigungen durch äußere Umwelteinflüsse (z.B. Zigarettenrauch, Viren, etc.) auf Grund einer alters- oder genetisch bedingten anfälligen Lungenstruktur zu Mikrorissen in der Epithelschicht der Lunge. Diese Mikrorisse führen einerseits zwar zu einem Absterben von alveolaren Epithelzellen Typ I und Typ II (ATI und ATII), und andererseits zu einer vermehrten Proliferation und Einwanderung der alveolaren Epithelzellen auf Grund einer chronischen Dysregulation von ATII-Zellen. Im Rahmen der IPF sezernieren ATII-Zellen vermehrt Wachstumsfaktoren (z.B. Matrix-Metalloproteasen) und Zytokine (z.B. „transforming growth factor“ (TGF- β)). Die Sekretion von TGF- β führt neben der Aktivierung und Einwanderung von Fibroblasten zur Transformation von Fibroblasten zu kontraktile Myofibroblasten und zu deren Rekrutierung (zusammengefasst in [130, 132]). Myofibroblasten können ebenso auf andere Weise [135] (Abbildung 15), wie beispielsweise aus mesenchymalen Zellen, Perizyten [136] aus dem Lungeninterstitium, Fibrozyten [137] oder durch die epitheliale- oder endotheliale mesenchymale Transformation (EMT) entstehen [138, 139].

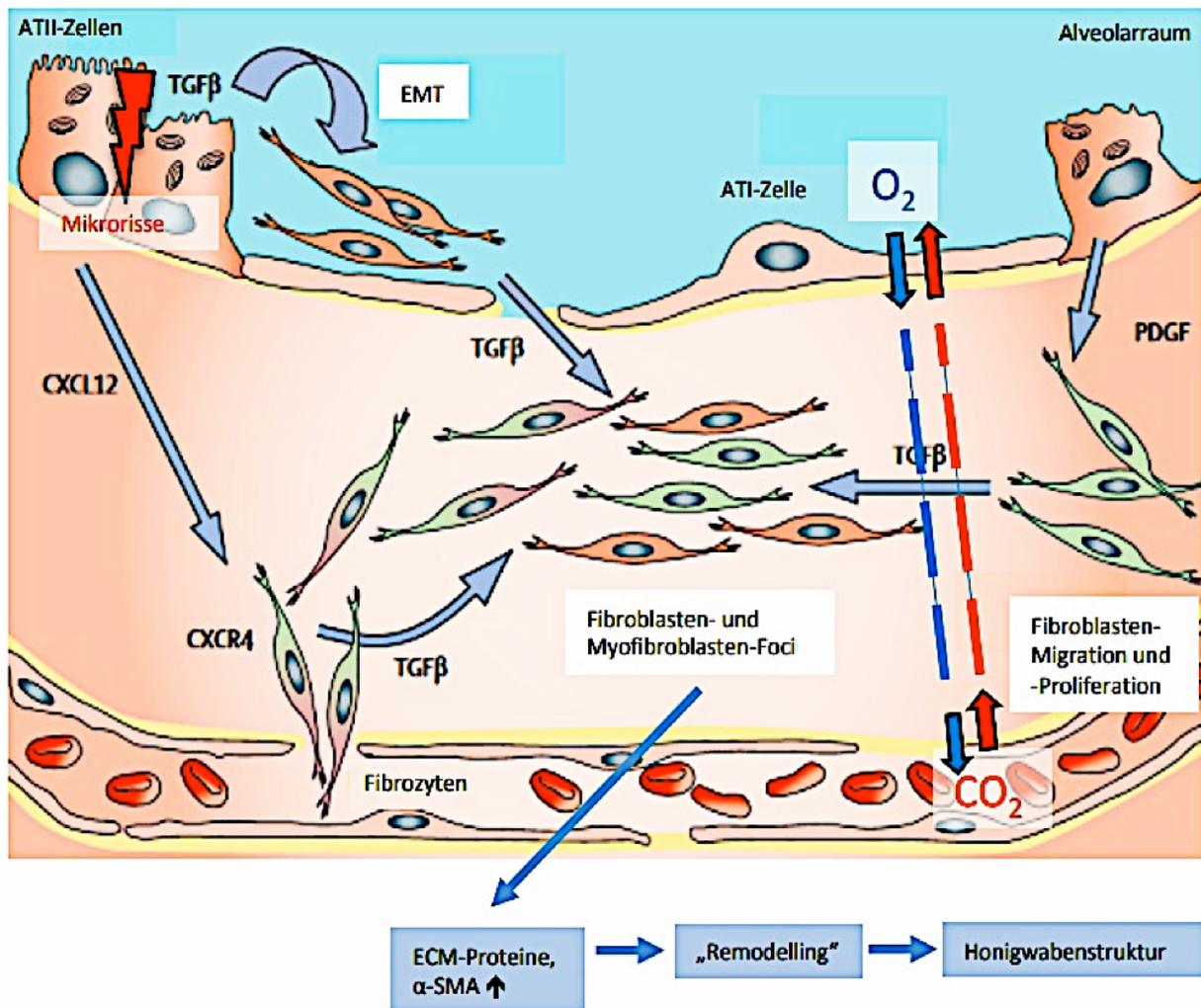


Abbildung 15: Überblick der möglichen Rekrutierung von Fibroblasten während der Entwicklung einer idiopathischen Lungenfibrose. Durch externe Umwelteinflüsse (z.B. Zigarettenrauch, Virusinfektion, etc.) entstandene Mikrorisse führen zur Aktivierung von alveolaren Epithelzellen Typ II (ATII-Zellen) und zur Sekretion von Chemokin-Ligand 12 (CXCL12). Dieses stimuliert den Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4), wodurch es zur Einwanderung von Fibrozyten in das geschädigte Gewebe kommt. Zudem sezernieren ATII-Zellen starke chemotaktische und mitogene Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel den „platelet-derived growth factor“ (PDGF)-Wachstumsfaktor. Dieser induziert wiederum die Migration und Proliferation von Fibroblasten aus mesenchymalen Zellen. Unter bestimmten Voraussetzungen und einer Stimulation mit „transforming growth factor β“ (TGF-β1) können ATII-Zellen auch einer epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) unterzogen werden und sich dabei in Fibroblasten umwandeln. In dieser Umgebung schließen sich Fibroblasten zu „Fibroblasten-Foci“ zusammen und differenzieren sich vermehrt zu kontraktile, profibrotischen Myofibroblasten. Modifiziert nach [132].

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten liegt in der Expression von alpha glattem Muskelaktin (α -SMA) [140]. TGF-β trägt neben der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten auch maßgeblich zu einer erhöhten Expression von α -SMA und Aktinstressfasern in Myofibroblasten bei, was wiederum zu einer erhöhten Kontraktilität führt [141]. Auf Grund des unkontrollierten Wundheilungsprozess und der erhöhten Ausschüttung von TGF-β kommt es neben einer Ansammlung von

(Myo)Fibroblasten in sogenannten „*Foci*“ zu einer vermehrten Produktion von extrazellulären Matrix (ECM)-Proteinen, um die Mikrorisse wieder zu verschließen. Neben Kollagen 1 und Kollagen 3 werden durch fibrotische Prozesse auch Glykoproteine und Proteoglykane, wie beispielsweise Fibronectin, vermehrt produziert [141, 142]. Der Serin-Protease-Inhibitor Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) kontrolliert unter anderem die Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen (MMP), welche während der Entwicklung einer Lungenfibrose eine wichtige Rolle spielen und als diagnostische Biomarker dienen [143].

Die abnormale Produktion von extrazellulären Matrixproteinen (ECM) und die Entstehung von „(Myo)Fibroblasten-Foci“ tragen wesentlich zur Pathogenese der IPF durch ein „*Remodelling*“ der Lungenstruktur in Form einer Honigwabenstruktur bei. Diese Umstrukturierung führt zu einer Verdickung sowie Versteifung des Lungengewebes, welche in einem limitierten Gasaustausch zwischen Alveolarraum und Blutgefäßen sowie mit einer Unterversorgung der Organe einhergeht [132]. Neben der Beteiligung von Endothelin-1 (Et-1) an der Entwicklung einer pulmonalen arteriellen Hypertonie könnte Et-1 ebenfalls eine wichtige Rolle während der Ausbildung einer Lungenfibrose spielen. In Studien mit IPF-Patienten konnten sowohl erhöhte Et-1-Level im Plasma als auch ein kausaler Zusammenhang zwischen Et-1 und fibrotischen Prozessen in der Lunge detektiert werden [144, 145]. Neben TGF- β aktiviert Endothelin-1 ebenfalls Fibroblasten und führt zu einer vermehrten Proliferation sowie Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Der molekulare Mechanismus ist allerdings bisher noch nicht geklärt. Es gibt jedoch Hinweise auf einen antiapoptotischen Effekt von Et-1 auf Fibroblasten mit profibrotische Auswirkungen auf die Expression von Fibronectin und einem synergistischen Effekt mit TGF- β [146].

Auf Grund einer schlechten Studienlage wird eine Triple-Therapie aus antientzündlichen Medikamenten (z.B. Prednisolon, Azathioprin und N-Acetylcystein) zur Behandlung der IPF nach aktuellen Richtlinien nicht mehr empfohlen sondern eine antifibrotische Therapie mit Pirfenidon oder Nintedanib [147]. Auch wenn der genaue Wirkungsmechanismus von Pirfenidon noch nicht aufgeklärt wurde, gelten inhibitorische Effekte auf TGF- β -assoziierte Wirkungen (z.B. Kollagenproduktion) sowie entzündliche Prozesse durch Tumornekrosefaktor und Interleukine als gesichert. Währenddessen führt Nintedanib als Tyrosinkinase-Inhibitor zu einer verminderten Expression von profibrotischen Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel TGF- β , und Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten und Fibroblasten (PDGF, FGF) [148]. Sowohl Pirfenidon als auch Nintedanib wurden in Studien erfolgreich eingesetzt und trugen wesentlich zu einer Verlangsamung des Krankheitsverlaufs sowie zu einer Verbesserung der Überlebensrate bei [149].

Nichtsdestotrotz stellt die Lungentransplantation die einzige kausale Therapie der IPF mit einer medianen Überlebensprognose von 3-5 Jahren dar [131].

1.6 Pathophysiologische Rolle des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) und von „classical transient receptor potential“ (TRPC)1-, TRPC3- und TRPC6-Kanälen

Die essentielle Bedeutung des Speicher- und Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE/ROCE) spiegelt sich sowohl in physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen wider. In der Literatur sind eine Reihe von Störungen in Ca^{2+} -Signalwegen auf Grund einer Dysregulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen in pathophysiologischen Prozessen nachgewiesen worden [7, 150]. Neben der Entdeckung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Ionenkanälen als potentielle Zielstrukturen zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen [151, 152] wurden die Ionenkanäle des Speicher- und Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstroms ebenfalls als mögliche Zielstrukturen untersucht [153-155]. Mit der Entdeckung der Orai-Kanäle anhand von Mutationen in immunsupprimierten, sogenannten „*severe combined immunodeficiency*“ (SCID)-Patienten wurde auch ihre Rolle in pathophysiologischen Prozessen des Immunsystems bekannt [32]. Patienten mit STIM1-Mutationen zeigten einen ähnlich klinischen Phänotyp wie SCID-Patienten mit Orai1-Mutationen [156]. Anhand der Daten von mindestens vier SCID-Patientenfamilien wurde die zentrale Rolle des SOCE in T- und B-Lymphozyten sowie in Fibroblasten im Immunsystem entdeckt [157]. Neben dem Nachweis einer Muskelschwäche in SCID-Patienten konnte für STIM1 auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion von Muskeln und Muskelzellen nachgewiesen werden [158]. Außerdem scheinen STIM1-Proteine bei immunsupprimierten Patienten eine wichtige Funktion während der Adipogenese für die Entwicklung und Funktionalität von Adipozyten zu besitzen [157] und spielen eine essentielle Rolle bei der Tumorgenese verschiedener Krebserkrankungen [157, 159]. Da STIM1/2-defiziente Mäuse nicht lebensfähig sind [70, 160] oder bereits ein paar Wochen nach der Geburt [161] sterben, wird die wichtige Funktion dieser Proteine auch in genmodifizierten Tiermodellen deutlich. Gleichermaßen zeigten Patienten mit Orai1-Mutationen Hypoplasien der Schweißdrüsen- sowie Haut- und Haarzellen [153]. Darüber hinaus wurden pathophysiologische Veränderungen auf Grund eines gestörten SOCE in weiteren Zelltypen, wie zum Beispiel in Blutplättchen, Zellen des Pankreas oder neurologischen Zellen, nachgewiesen (zusammengefasst in [13]). In der Lunge wurde die Rolle des SOCE bisher nur in „*in-vitro*“ Studien im Rahmen von allergischen Erkrankungen [162], beispielsweise

Asthma [163] oder der nasalen Polyposis [164], untersucht. Hierbei zeigten die Studien eine erhöhte Aktivierung von Mastzellen sowie eine vermehrte Histamin-Ausschüttung und Produktion von Leukotrienen. Durch den simultanen Einsatz eines Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten und von La^{3+} , einem unspezifischen SOCE-Blocker, konnte die gestörte Mastzellaktivierung „*in-vitro*“ unterdrückt und eine mögliche, zukünftige Therapieoption zur Behandlung von allergischen Krankheitsbildern aufgezeigt werden [164]. Im Verlauf einer pulmonalen Hypertonie kommt es auf Grund von dysfunktionalen Ca^{2+} -Signalwegen einerseits zu einer erhöhten Muskelkontraktion und -proliferation und andererseits zu einer gestörten endothelialen Zellfunktion [165]. Außerdem findet sowohl eine verminderte NO-vermittelte Relaxation der Gefäßmuskulatur als auch eine vermehrte Ausschüttung von vasokonstriktorisches Mediatoren statt. Diese Mechanismen führen letztendlich zu einer Muskularisierung und Verengung der Gefäße [166]. In diesem Zusammenhang wurden STIM1- und Orai1-Expressionen sowie die Rolle des SOCE und von I_{CRAC} -Kanälen in Endothelzellen untersucht [167, 168]. Im Krankheitsbild der chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen und von Asthma bronchiale sind diese chronisch entzündlichen Prozesse und Umstrukturierungen von Gefäßstrukturen ebenfalls vorzufinden [165]. Durch die Sekretion von Zytokinen kommt es zur Aktivierung von Immunzellen (z.B. Mastzellen), die zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (z.B. Histamin) führen. Daraus entstehen signifikante Veränderung der Atemwegstrukturen in Form einer Angiogenese und Verdickung der Atemwegswände unter Beteiligung von arteriellen glatten Muskelzellen sowie Epithel- und Becherzellen. Diese progressive Umstrukturierung hat eine Verengung der Atemwege zur Folge, welche sich in einer verminderten Atemfunktion wider spiegelt [169]. In Studien mit asthmatischen Mäusen wurden erhöhte STIM1- und Orai1-Protein-Expressionen gezeigt sowie eine Inositoltriphosphat (IP_3)-vermittelte bronchokonstriktorische Wirkung unter Beteiligung eines SOCE [170]. Neben trivalenten Kationen wie La^{3+} und Gd^{3+} existieren weitere Verbindungen, wie zum Beispiel 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB), SKF96365 und Capsaicin, die in Zellversuchen zur Blockade des SOCE eingesetzt wurden. Allerdings sind die verfügbaren SOCE-Blocker in ihrer Selektivität limitiert, da sie ebenfalls andere Ionenkanäle wie beispielsweise TRP-Kanäle blockieren [13].

Trotz der Expression von TRPC-Kanälen in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen und Geweben, stellte sich die Analyse der (patho)physiologischen Funktion einzelner TRPC-Kanälen zunächst als Herausforderung dar. Dies lag unter anderem daran, dass TRPC-Kanäle homo- und heteromere Kanalkomplexe bilden und es bis heute an spezifischen Kanalblockern fehlt [54]. Im Laufe der Zeit gelang es jedoch anhand von genmodifizierten Tiermodellen

[171] sowie unter Verwendung von „*small interfering*“ RNAs (siRNAs) und gewebespezifischen Untersuchungen eine Rolle für TRPC-Kanäle in einer Reihe von Krankheitsbildern nachzuweisen [172]. Auf Grund der überwiegenden Expression von TRPC1, TRPC3 und TRPC6 in Geweben des Gehirns, des Herzens, der Lunge, des kardiovaskulären Systems und der Niere [39, 49] sind diese TRPC-Kanäle überwiegend in den dort lokalisierten, (patho)physiologischen Prozessen vorzufinden [154, 173]. Neben einer Beteiligung von TRPC-Kanälen am Krankheitsbild der Hypertrophie und Wachstum von Nervenzellen [174] wurden Mutationen des TRPC6-Kanals in Patienten mit einer fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) entdeckt [175].

Im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen spielen TRPC-Kanäle auf Grund ihrer ausgeprägten Expression und Funktion eine wichtige Rolle. Die drei TRPC-Subtypen, TRPC1, TRPC3 und TRPC6, sind sowohl in vaskulären als auch glatten Muskelzellen sowie in Endothelzellen im Gefäßsystem der Lunge vorzufinden und dort am Ca^{2+} -Einstrom beteiligt [176]. In Gewebeproben von Patienten mit pulmonaler Hypertonie (PH) zeigten sich erhöhte Expressionen von TRPC3- und TRPC6-Kanälen in pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) [177] und „*single nucleotide polymorphisms*“ (SNPs) im TRPC6-Promotor [178]. Darüber hinaus konnte eine Beteiligung von TRPC1- und TRPC6-Kanälen in PASMC auch in Studien mit Mäusen und Ratten, die unter Hypoxie eine chronische pulmonale Hypertonie zeigten, identifiziert werden [179, 180]. PASMC proliferieren während einer pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) vermehrt und führen neben einer Muskularisierung auch zu einem sogenannten „*Remodeling*“ des kardiovaskulären Gefäßsystems [171]. In TRPC6-defiziente Mäuse konnte im Gegensatz zu Wt-Mäusen keine akute hypoxische Vasokonstriktion, wie sie in Patienten mit Sepsis oder akuten Verletzungen der Lunge zur Kompensation einer arteriellen Hypoxämie beobachtet wird, nachgewiesen werden [181]. Interessanterweise zeigten TRPC1/6-defiziente Mäuse unter chronischer Hypoxie jedoch sowohl eine Abnahme der PH als auch eine verringerte Muskularisierung der Lungengefäße [182] (zusammengefasst in [183]). Des Weiteren zeigte sich in TRPC6-defizienten Mäusen eine erhöhte Allergie-induzierte Bronchokonstriktion auf Grund einer kompensatorischen Zunahme der Expression von TRPC3-Kanälen [184]. Neben einer Agonisten-initiierten, erhöhten Aktivität des TRPC3-Kanals zeigte die Behandlung mit Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$), einem Asthma-Mediator, eine erhöhte Expression an TRPC3-mRNA und -Protein [185]. Darüber hinaus spielen TRPC3-Kanäle während der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes eine wichtige Rolle. In Abwesenheit von TRPC3-

Kanälen, die überwiegend im Gehirn exprimiert werden, konnte eine verringerte Bildung von „*brain-derived neurotrophic factor*“ (BDNF) gezeigt werden [186].

Auf Grund der umstrittenen Funktion von TRPC1 als klassischer Ionenkanal oder als Kanalregulator in heteromeren Kanalkomplexen, werden (patho)physiologische Funktionen des Proteins noch kontrovers diskutiert [53]. TRPC1-Kanäle spielen in einer Reihe verschiedener Zelltypen eine wichtige Rolle, jedoch zeigte sich vor allem bei gleichzeitiger Abwesenheit von weiteren TRPC-Kanälen eine deutlich veränderte Wirkung. Während der Ausbildung einer kardialen Hypertrophie wurde eine Beteiligung von TRPC1-Kanälen vermutet, da sich sowohl nach Applikation von TRPC1-spezifischen siRNAs in Kardiomyozyten als auch in TRPC1-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wt-Mäusen eine signifikant geringere Hypertrophie nachweisen lies [187] (zusammengefasst in [185]). Darüber hinaus zeigten weitere Arbeitsgruppen eine Beteiligung von TRPC3-, TRPC4- und TRPC6-Kanälen, was wiederum nicht auf die Bildung von heteromeren Kanalkomplexen hindeutet (zusammengefasst in [53]). Des Weiteren zeigten pulmonale Immunzellen aus TRPC6-defizienten Mäusen [188], ähnlichen wie in Abwesenheit von TRPC1 [189], eine verringerte Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen. Außerhalb des kardio-pulmonalen Bereichs spielen TRPC1-Kanäle unter anderem auch in Schweiß- und Bauchspeicheldrüsenzellen eine wichtige Rolle (zusammengefasst in [79]). Hierbei zeigte sich ein verminderter Ca^{2+} -Einstrom in TRPC1-defizienten Zellen, welcher zu einer verringerten Sekretion in Speicheldrüsenzellen führte [85]. Obwohl TRPC1-Kanäle in Blutplättchen vermehrt exprimiert sind, zeigten weder TRPC1-defiziente Mäuse noch entsprechende TRPC1-defiziente Blutplättchen Unterschiede in der Blutgerinnung und Thrombusbildung [87].

In der Lunge sind TRPC-Kanäle ebenfalls in Endothel- und Epithelzellen vorzufinden. Diese Zellen sind unter anderem wichtig für die Barrierefunktion und den Austausch zwischen Gefäßsystem und umliegenden Gewebe. TRPC6-defiziente Mäuse zeigten im Gegensatz zu TRPC1-defizienten Mäusen in Ischämie-Reperfusion-Versuchen eine geringere Ödembildung [181]. Die Rolle von TRPC6-Kanälen während der Ausbildung einer Lungenfibrose wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits intensiv anhand von „*in-vitro*“- und „*in-vivo*“-Versuchen analysiert. In Zellversuchen mit primären murinen Lungenfibroblasten zeigte sich in ausdifferenzierten Myofibroblasten nach TGF- β -Behandlung eine signifikant erhöhte Expression von TRPC6-Kanälen im Vergleich zu unbehandelten Lungenfibroblasten. Im „*in-vivo*“ Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose blieben die Lungen der TRPC6-defizienten Mäuse teilweise vor der Ausbildung einer Lungenfibrose geschützt. Dies

spiegelte sich in Form einer verbesserten Lungenfunktion und einer reduzierten Kollagenproduktion in primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) der TRPC6-defizienten Mäuse wider [190].

Je nach Tumorgewebe, zum Beispiel in Brust- [191], Eierstock- [192] oder Prostata-Tumorzellen [193], kann die Expression von TRPC-Kanälen sehr stark variieren. In Lungenkarzinomzellen wurde beispielsweise eine Expression von TRPC1-, TRPC3-, TRPC4- und TRPC6-Kanälen nachgewiesen, welche nach weiteren Zelldifferenzierungen signifikant anstieg. Durch die Verwendung von spezifischen Antikörper gegen TRPC1-, TRPC4- und TRPC6-Proteine konnten antiproliferative Effekte im Tumorwachstum gezeigt werden [194]. Auch wenn zur Blockade von TRPC-Kanälen bereits einige Verbindungen zur Verfügung stehen, gilt deren Selektivität, ähnlich wie für die SOCE-Blocker, als umstritten [183]. Während SKF96365 und 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) als unspezifische SOCE- und TRPC-Blocker gelten, stehen optimierte Pyrazol-Derivate (Pyr3 und Pyr10) als partiell selektive Antagonisten zur Blockade von TRPC3-Kanälen zur Verfügung. Im Gegensatz dazu werden die Anilin-Thiazole der Firma Glaxo-Smith-Kline (GSK) sowohl als TRPC3- als auch als TRPC6-Blocker eingesetzt. Als bisher selektivste TRPC6-Blocker gelten Larixyl-Derivate [195, 196] (Urban Cell Calcium) und eine Aminoindan-Verbindung der Firma Sanofi [197]. Aktuell wird ein neuer TRPC6-Inhibitor der Firma Boehringer Ingelheim (BI 764198) in einer klinischen Phase-2-Studie zur Therapie von Atemwegskomplikationen in Patienten nach einer SARS-CoV-2-Infektion getestet [198].

1.7 Zielsetzung der Dissertation

Auf Grund der in der Einleitung beschriebenen kontroversen Diskussion zur Rolle von TRPC-Kanälen am Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) wurde in der vorliegenden Dissertation der SOCE in TRPC1/3/6-, TRPC1/6- und STIM1/2-defizienten pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und primären Fibroblasten der Mauslunge (pmLF) im Vergleich zu unveränderten, sogenannten Wildtypzellen analysiert. Dazu wurden die entsprechenden Zellen aus TRPC1/6- und TRPC1/3/6-defizienten sowie STIM1/2^{flox/flox} und STIM1/2^{flox/flox} TRPC1/6^{-/-} Mäuselungen isoliert. Während TRPC-defiziente Zellen direkt in funktionellen Versuchen analysiert werden konnten, wurden die STIM1/2-Gene in STIM1/2^{flox/flox}-Zellen erst durch die Infektion mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren inaktiviert. Zur Analyse sollten Zellfunktionen anhand des Ca^{2+} Einstroms, der Zellproliferation, Viabilität und Migration sowie die Ca^{2+} -abhängige Translokation des Transkriptionsfaktor „*nuclear factor of activated T-cells*“ (NFAT) untersucht werden. Wie bereits in der Einleitung erläutert sind PASMC in pathophysiologischen Veränderungen der

Lunge während der Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie (PH) involviert, während pmLF an der Ausbildung einer Lungenfibrose beteiligt sind. Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb therapeutische Zielstrukturen in den genannten Zellen für innovative Therapien der PH und der Lungenfibrose zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mauslinien

Tabelle 2: Mauslinien

Mauslinien	Genetischer Hintergrund
STIM1/2 ^{flox/flox} [70]	C57BL/6J
STIM1/2 ^{flox/flox} TRPC1/6 ^{-/-} [70, 86, 184]	C57BL/6J
TRPC1/6 ^{-/-} , [86, 184]	C57BL/6J
TRPC1/3/6 ^{-/-} [86, 184, 199]	C57BL/6J
Wildtyp (aus der gleichen Kolonie)	C57BL/6J

2.1.2 Zellen und Zellkulturmedien

Tabelle 3: Zelllinien

Zelllinie	Zellkulturmedium	Zusätze
HEK 293T	DMEM	10 % FCS
LentiX		1 % Penicillin/ Streptomycin

Tabelle 4: Primäre Zellen

Primärzellen	Zellkulturmedium	Zusätze
Primäre murine Lungenfibroblasten (pmLF)	DMEM/F12	20 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
Pulmonale arterielle glatte Muskelzellen (PASMOC)	<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium</i> 2	<i>Supplement Mix</i> 1 % Penicillin/Streptomycin 1 ml Normocin

Tabelle 5: Zellkulturösungen

Zellkulturösungen	Hersteller
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Lonza, Basel, Schweiz
DMEM/F12	Lonza, Basel, Schweiz
FCS (<i>Fetal calf serum</i>)	Invitrogen, Carlsbad, USA
HBSS (<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>) 1x	Lonza, Basel, Schweiz

HBSS, ohne Ca ²⁺	Lonza, Basel, Schweiz
Normocin (50mg/ml)	InvivoGen, Sorrento, USA
PBS (<i>Phosphate-buffered saline</i>) 1x	Lonza, Basel, Schweiz
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Basel, Schweiz
Plasmocin (25 mg/ml)	InvivoGen, San Diego, USA
<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2</i>	PromoCell, Heidelberg
Trypsin-EDTA	Lonza, Basel, Schweiz

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt	A0949
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe	2267.4
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe	K029.1
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	215589
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Deisenhofen	B0126
BSA (Kälber Serum Albumin)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	9418
CaCl ₂ × 2H ₂ O	Sigma Aldrich, Deisenhofen	C3306
Kollagenase Typ I	Merck Millipore, Darmstadt	C 1-28
Kollagenase	Sigma Aldrich, Deisenhofen	C5138
DMSO steril	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	D2650-5X5MI
DTT	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	D0632-5G
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe	CN06.2
EGTA	Carl Roth, Karlsruhe	3054.2
Endothelin-1	Calbiochem (Merck), Darmstadt	05-23-3800
Essigsäure	Merck Millipore, Darmstadt	107961
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe	UN2789
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe	5054.3
Formaldehyd	Sigma Aldrich, Deisenhofen	E4391

Fura-2, AM	Sigma Aldrich, Deisenhofen	47989
Fura-2-FF, AM	Biomol, Hamburg	ABD-21027
Glukose	Merck Millipore, Darmstadt	8337
Glycerin 87%	Merck Millipore, Darmstadt	1.04091
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe	0079.4
HCl	Merck Millipore, Darmstadt	1.003U7
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe	2363.3
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen	126/317126
HEPES/ 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure	Carl Roth, Karlsruhe	9105.3
Hoechst 33342 [10 mg/ml]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA	62249
Igepal CA 630	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	18896
Isofluran	Delta Select, Pfullingen	0670308
Isopropanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen	6752.3
Kaliumchlorid/ KCl	Carl Roth, Karlsruhe	6781.1
Ketamin 10%	Medistar, Ascheberg	04-03-92-64/23
KH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe	6875.2
KOH	Carl Roth, Karlsruhe	2526.1
Kupfer-II-Sulfat	Sigma Aldrich, Deisenhofen	C8027
Lysophosphatidsäure (LPA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	L7260
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe	T145.2
Magnesiumchlorid/ MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe	KK36.2
Magnesiumchlorid Hexahydrat/ MgCl ₂ × 6H ₂ O	Sigma Aldrich, Deisenhofen	M2393
Mercaptoethanol	Merck Millipore, Darmstadt	805740
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe	P717.1
<i>Midori Green Advance</i>	Nippon Genetics, Dueren	MG04
Nagellack, klar	Wild Shine, Basingstoke, GB	E4063

Natriumacetat	Merck Millipore, Darmstadt	106268
Natrium Azid	Sigma Aldrich, Deisenhofen	822335
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe	HN01.1
Natriumchlorid/ NaCl	Carl Roth, Karlsruhe	9265.1
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich, Deisenhofen	16026
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth, Karlsruhe	T876.1
Natriumlaurylsulfat/ SDS	Sigma Aldrich, Deisenhofen	L4390
Na ₂ S ₂ O ₃	Sigma Aldrich, Deisenhofen	S6672-500G
Normocin	InvivoGen, San Diego, USA	Ant-nr-2
Phosphataseinhibitor-Tabletten <i>PHosSTOP</i>	Roche, Basel, Schweiz	4906845001
Plasmocin	InvivoGen, San Diego, USA	Ant-mpp/ ant-pc
<i>Polyethyleneglycol</i> <i>Aprecipitationsolution</i>	BioCat, Heidelberg	LV825
Polybrene	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	107689
Ponceau S	Applichem/ Panreac, Darmstadt	A2935
Proteaseinhibitor-Tabletten <i>cOmplete</i>	Roche, Basel, Schweiz	05892970001
Rompun (Xylazin)	Bela pharm, Vechta	L4390
Rotiphorese Gel	Carl Roth, Karlsruhe	3029.1
Salzsäure konz. (37% = 12 M)	Merck Millipore, Darmstadt	100317
Stickstoff (N ₂) flüssig	Linde, München	N2 flüssig
<i>SuperSignal West Femto Maximum</i> <i>Sensitivity Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA	34095
<i>SuperSignal West Pico PLUS</i> <i>Chemiluminescent Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA	34577
TEMED/ Tetramethylethyldiamin	Carl Roth, Karlsruhe	2367.1
TGF-β1, rekombinant, human	R&D Systems, Minneapolis, USA	240-B-002/CF
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	T9033
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe	AE15.2
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe	3051.2

Tween 20	Sigma Aldrich, Deisenhofen	2287
<i>Vectashield Antifade</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA	H-1000
WST-1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	5015944001
Ziegen Serum	Bio-West	S2000-100

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Puffer	Verwendung
CaCl ₂	Kalziumphosphatpräzipitation/ LV-Produktion
HEPES gepuffertes Wasser	Kalziumphosphatpräzipitation/ LV-Produktion
HEPES gepufferte Saline (HeBS), 2x	Kalziumphosphatpräzipitation/ LV-Produktion
Laemmli-Puffer, 6x	Proteinlysate-Herstellung
Laufpuffer, 10x	SDS-Gelelektrophorese
LB Medium	Plasmidpräparation (Midi Prep)
PBS, 10x und 1x	Western Blot, Immunfluoreszenz
PBST, 1x (0,1% und 0,02 %)	Western Blot, Immunfluoreszenz
RIPA-Lysepuffer	Proteinlysate Herstellung
TAE-Puffer, 50x	Gelelektrophorese
TBS, 10 x	Western Blot
TBST, 1x (0,1%)	Western Blot
TE-Puffer, 1x	Lentiviren-Produktion
Transferpuffer, 10x	Western Blot
Tris-SDS-Puffer pH 6,8 (4x)	SDS-Gelelektrophorese
Tris-SDS-Puffer pH 8,8 (4X)	SDS-Gelelektrophorese

Der Abschnitt zur Herstellung von Puffer und Lösungen für die Produktion der Lentiviren wurde aus der Dissertation von Frau Jana Demleitner [200] übernommen:

Cave: Bei allen Puffern und Lösungen muss der pH-Wert bei der jeweiligen Verwendungstemperatur eingestellt werden, oder vor Verwendung nachgemessen werden. Gegebenenfalls muss nachjustiert werden.

CaCl₂ zur Calciumphosphatpräzipitation

9,18 g CaCl₂ x 2H₂O (Molekulargewicht: 147 g/mol)

- Einwiegen der Chemikalie in einen 50 ml Erlenmeyerkolben.
- Mit *bidest.* Wasser auf 25 ml auffüllen.
- Mit dem Magnetrührer rühren bis sich alles gelöst hat.
- Steril filtrieren durch einen 0,22 µm Filter.
- Aliquotieren und bei 4°C lagern.

Cave: Unbedingt *bidest.* Wasser aus der Distille verwenden, da ansonsten die Calciumphosphatpräzipitation nicht in ausreichender Qualität abläuft.

HEPES-gepuffertes Wasser zur Calciumphosphatpräzipitation

125 µl HEPES 1M pH 7,3 [2,5 mM]

- Einfüllen von 50 ml *bidest.* H₂O in ein 50 ml Probengefäß.
- Zugabe der HEPES- Lösung.
- Vortexen.
- Lagerung im Kühlschrank für mehrere Wochen möglich.

Cave: Für Calciumphosphatpräzipitation/ LV-Produktion immer *bidest.* Wasser verwenden, da sonst keine einwandfreie Präzipitationsbildung möglich ist.

HeBS (2x) zur Calciumphosphatpräzipitation

16,36 g NaCl [0,28 M]

11,9 g Hepes [0,05 M]

0,213 g Na₂HPO₄ [1,5 mM]

- Einwiegen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit *bidest.* Wasser auf 800 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren bis sich alles gelöst hat.
- pH 7,00 mit 10 M NaOH einstellen (so exakt wie möglich).
- Mit *bidest.* Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- pH 7,00 überprüfen und gegebenenfalls nachjustieren.
- Filtrieren durch einen 0,22 µm Sterilfilter.
- In 50 ml Probengefäße aliquotieren.
- Lagerung für mehrere Wochen im Kühlschrank oder bei -70 °C bis zu 2 Jahre.

Cave: Der pH-Wert muss exakt stimmen. Unter einem pH-Wert von 6,95 oder über 7,05 werden die Kristallnadeln nicht in ausreichender Qualität gebildet, wodurch die

Transfektionseffizienz stark reduziert wird. Außerdem ist das Verwenden von *bidest.* Wasser für die einwandfreie Präzipitatbildung unumgänglich.

TE- Puffer (1x) (Tris-EDTA-Puffer)

10 ml Tris 1 M pH 8,0 [10,0 mM]

2 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 [1,0 mM]

- Einfüllen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit *bidest.* Wasser auf 800 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer mehrerer Minuten rühren bis alles gut vermischt ist.
- pH 8,0 mit NaOH/HCl einstellen.
- Mit *bidest.* Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Erneut mehrere Minuten mit dem Magnetrührer durchmischen.
- pH-Wert kontrollieren und gegebenenfalls nachjustieren.
- Autoklavieren oder durch einen 0,45 µm Nitrozellulosefilter steril filtrieren (Für Calciumphosphatpräzipitation/LV-Produktion nicht autoklavieren).

Cave: Für Calciumphosphatpräzipitation/LV-Produktion immer *bidest.* Wasser verwenden, da sonst keine einwandfreie Präzipitationsbildung möglich ist!

Alle weiteren aufgelisteten Puffer und deren Herstellung wurden ebenfalls aus der Dissertation von Frau Jana Demleitner entnommen und wurden wie folgt beschrieben:

Laemmli-Puffer (6x)

6,0 ml 4-fach Tris/SDS-Puffer pH 6,8 [375 mM]

48,0 g Glycerin [48 %]

6,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat)[6 %]

0,03 g Bromphenolblau [0,03 %]

9,0 ml β-Mercaptoethanol [9 %]

- Einwiegen / Einmessen der Chemikalien (bis auf β-Mercaptoethanol) und Puffer in eine 100 ml Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 100 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren bis sich alles gelöst hat.
- β-Mercaptoethanol zugeben und kurz weiter rühren (alternativ Zugabe vor Gebrauch).
- Aliquotieren und zur Lagerung bei -20 °C einfrieren.

Cave: Unter dem Abzug arbeiten, da β-Mercaptoethanol sehr giftig ist.

Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese (10x)

30,2 g Tris Base [250 mM]

144,0 g Glycin [1,920 M]

10,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [35 mM, 1 %]

- Einwiegen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren bis sich alles gelöst hat.
- Zur Verwendung 1:10 mit VE-Wasser verdünnen.

Phosphate-buffered saline (PBS) (10x)

80,0 g NaCl [1,37 M]

2,0 g KCl [27 mM]

14,4 g Na₂HPO₄ [101 mM]

2,4 g KH₂PO₄ [18 mM]

- Einwiegen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren, bis die Lösung klar ist.
- Zur Verwendung 1:10 verdünnen.

Radio-immuno-precipitation Assay (RIPA)- Lysepuffer

1 % Igepal CA 630

0,5 % Na-deoxycholat

0,1 % SDS

1x PBS ad 500 ml

- Einwiegen der Chemikalien in eine 500 ml Glasflasche.
- Mit 1x PBS auf 500 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren bis sich alles gelöst hat.
- Vor Gebrauch: Phosphatase- und Protease-Inhibitor zugeben (jeweils 1 Tablette pro 10 ml).
- Gut lösen, aliquotieren und bis zu 1 Monat bei -20 °C einfrieren.

TAE- Puffer (50x) (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

242 g Trisbase [2,00 M]

57,1 ml konz. Essigsäure [1,00 M]

37,2 g EDTA [127 mM]

- Einwiegen/ Einfüllen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Mit einem Magnetrührer rühren, bis sich alles gelöst hat.

Transferpuffer (Transfer von SDS-Gelen auf Membranen)(10x)

30,2 g Tris Base [250 mM]

144,0 g Glycin [1,920 M]

2,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [7 mM, 0,2 %]

- Einwiegen der Chemikalien in eine 1 Liter Glasflasche.
- Mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren bis sich alles gelöst hat.
- Zur Verwendung wie folgt 1:10 verdünnen:

100 ml 10x Transferpuffer + 200 ml Methanol + 700 ml VE-Wasser

Tris/SDS Puffer pH 6,8 (4x)

6,05 g Tris Base [500 mM]

0,40 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [1 mM, 0,4 %]

- Einwiegen der Chemikalien in eine 100 ml Glasflasche.
- Mit VE-Wasser zuerst auf 50 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren bis die Lösung klar ist.
- Einstellen des pH-Wertes mit NaOH/HCl auf pH 6,8.
- Mit VE-Wasser auf 100ml auffüllen.
- Lagerung im Kühlschrank oder bei 4 °C für einige Monate möglich.

Tris/SDS-Puffer pH 8,8 (4x)

91 g Tris Base [1,50 mM]

2 g SDS (Natriumlaurylsulfat) [14 mM, 0,4 %]

- Einwiegen der Chemikalien in eine 500 ml Glasflasche.
- Mit VE-Wasser zuerst auf 300 ml auffüllen.
- Auf einem Magnetrührer rühren bis die Lösung klar ist.
- Einstellen des pH-Wertes mit NaOH/HCl auf pH 8,8.

Cave: pH 8,8 soll bei Verwendungstemperatur eingestellt sein.

- Mit VE-Wasser auf 500 ml auffüllen.
- Lagerung im Kühlschrank oder bei 4 °C für einige Monate möglich.

Neu verwendete Pufferlösungen:

LB-Medium

10 g Pepton/Trypton (1 %)

5 g Hefeextrakt (0,5 %)

10 g NaCl [171 mM]

- Mit Millipore H₂O auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren

Tris-buffered Saline (TBS) (10x)

24 g Tris Base [200 mM]

88 g NaCl [1,5 M]

- Mit Millipore H₂O auf 900 ml auffüllen, Lösung auf pH= 7,6 einstellen und mit Millipore H₂O auf einen Liter auffüllen

TBS + Tween (TBST (0,1 %)) (1x)

100 ml TBS 10x

900 ml Millipore H₂O

1 ml Tween 20

PBS + Tween 20 (PBST (0,1% und 0,02 %)) (1x)

100 ml PBS 10x

900 ml Millipore H₂O

1 ml/ 0,2 ml Tween 20

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Die Liste der Verbrauchsmaterialien wurde aus der Dissertation von Frau Susanne Fiedler [201] entnommen.

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma	Artikelnummer
3-Well Silikoneinsätze mit zellfreiem Spalt	Ibidi, Planegg	80209

Deckgläser 18x18 mm	Neolab, Heidelberg	1-6230
Deckgläser 30 mm	Neolab, Heidelberg	1-6292
Flügelkanüle	TERUMO Surflo®, Leuven, Belgien	SV-2132
Kanüle 21G/ 30G	Braun, Melsungen	2050806/4656300
Kimtech Feintücher	Kimberly-Clark, Irving, USA	7558
Kryogefäße 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht	72.379
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe	H868
Parafilm	PARAFILM MIS, Neenah, USA	PM-992
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht	70.1130.210/70.7600.002/70.762
PVDF Membran Roti®	Carl Roth, Karlsruhe	T8301
Skalpelle Cutfix®	Braun, Melsungen	130285_v
Spritze 1ml / 10ml	Braun, Melsungen	91660178 / 4606108V
Sterilfilter 70 µm	Corning®, New York, USA	431751
Spritzen-Sterilfilter 0,2 µm	GE Healthcare®, Little Chalfont; UK	M10462200
Zellkulturschalen 35 / 100 / 150 mm	Sarstedt, Nümbrecht	83.900.300 / 83.3902.300 / 83.3903
Zentrifugenröhrchen 50 ml / 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht	62.548.009 / 62.554.502

2.1.6 Laborausstattung und Geräte

Die Liste der Laborausstattung inklusive der verwendeten Geräte wurde aus der Dissertation von Frau Susanne Fiedler [201] übernommen und um fehlende Ausrüstung ergänzt.

Tabelle 9: Laborausstattung und Geräte

Geräte	Firma
Ca²⁺-Imaging Polychrom V Monochromator	TILL-Photonics, Gräfelfing
Ca²⁺-Imaging Filtersets	AHF Analysetechnik, Tübingen
CO₂-Inkubator Heracell150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dokumentationssystem für DNA-Gelelektrophorese	Peqlab, Erlangen

Elektrophoresekammer Proteine	Peqlab, Erlangen
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX70	Olympus, Hamburg
Infinite 200 Pro NanoQuant	Tecan, Männedorf, Schweiz
Konfokalmiskroskop LSM 880	Carl Zeiss, Jena
Kryokonservierungsbox	Nalgene, Sigma Aldrich, Deisenhofen
Lightcycler®480 II	Roche, Basel, Schweiz
MEGA STAR 1.6 R Zentrifuge	VWR, Darmstadt
Nanophotometer (Nanodrop)	Implen, München
Odyssey®Fc Western Blot Imaging	LI-COR, Lincoln, USA
OP-Besteck	FST, Berlin
PCR Thermocycler	Peqlab, Erlangen
pH-Elektrode SenTix 81	WTW, Weilheim
pH-Meter Inolab pH7110	WTW, Weilheim
Photometer	Tecan, Crailsheim
Pipetten	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipetus® Junior	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Prycellys® Homogeniser	Peqlab, Erlangen
Spannungsquelle Peqpower	Peqlab, Erlangen
Sterilwerkbank/ Laminarflow	Heraeus, Hanau
Thermomix Proben temperierer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 22R Labfuge	Hettich, Tuttingen
Transferkammer Western Blot	Biorad, München
Verstärker EPC10	HEKA, Lambrecht
Vortexgerät Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zellkulturmikroskop Wilover AFL 40 Phako	Hund, Wetzlar

2.1.7 Enzyme, Kits und Marker

Tabelle 10: Enzyme und Kits

Produkt	Firma	Bestellnummer
<i>ABsolute qPCR SYBR® Green Mix</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte	AB/ 1158
<i>BCA Assay Pierce</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte	23225
<i>Click-it TUNEL Assay EdU</i>	Life Technologies, Darmstadt	C10245DNA
EconoTaq Polymerase	Lucigen, Middleton	F93481-1
<i>GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit</i>	Sigma Aldrich, Deisenhofen	G1N350
<i>Invitrap® Spin Universal RNA Mini Kit</i>	Stratec Molecular, Berlin	1060100300
<i>LentiX-GoStix</i>	Clontec, Mountain View, USA	PT5185-2
<i>Nuclear Extract Kit</i>	Active Motif, Carlsbad, USA	40010
<i>NucleoBond® Xtra Plasmid Midiprep EF Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren	740420.50
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	P1951
<i>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits</i>	Fermentas, Waltham, USA	K1831

Tabelle 11: Marker

Produkt	Firma	Bestellnummer
<i>GeneRuler 100bp/ 1kb</i>	Fermentas, Waltham, USA	SM0241/ SM0312
SDS-Gel-Marker	Fermentas, Waltham, USA	26616, 26625, 26634
<i>6x DNA Loading Dye</i>	Fermentas, Waltham, USA	R0611

2.1.8 Plasmide

Tabelle 12: Plasmide

Produkt	Plasmidgröße (bp)	Bestellnummer
pLOX-CW-CRE	9886	Addgene, Boston, 12238
pWPXL	10510	Addgene, Boston 12257
psPAX2	10703	Addgene, Boston 12260

pMD2.G	5824	Addgene, Boston 12257
--------	------	-----------------------

2.1.9 Oligonukleotide

Tabelle 13: Oligonukleotide *qRT-PCR* (Polymerasekettenreaktion)

Zielstruktur	Spezies	Vorwärts Primer (5'-3')	Rückwärts Primer (5'-3')
STIM1	Maus	AAG CTT ATC AGC GTG GAG GA	CCT CAT CCA CAG TCC AGT TGT
STIM2	Maus	GAG GGC GCA GAG TGT GAG	TTT AGA GCC ATG CGG ACC T
Orai1	Maus	TAC TTA AGC CGC GCC AAG	ACT TCC ACC ATC GCT ACC A
Orai2	Maus	GGA CCT CAG CCC TCC TGT	GGG TAC TGG TAC TTG GTC TCC A
Orai3	Maus	CAC ATC TGC TCT GCT GTC G	GGT GGG TAT TCA TGA TCG TTC T
TRPC1	Maus	TGA ACT TAG TGC TGA CTT AAA GGA AC	CGG GCT AGC TCT TCA TAA TCA
TRPC1F3/R3	Maus	GCA ACC TTT GCC CTC AAA G	AAC AGA GCA AAG CAG GTG C
TRPC3	Maus	TGG ATT GCA CCT TGT AGC AG	ACC CAG AAA GAT GAT GAA GGA G
TRPC4	Maus	GAT GAT ATT ACC GTG GGT CCT G	GAT TCC ACC AGT CAT GGA TGT
TRPC5	Maus	CTC TAC GCC ATC CGC AAG	TCA TCA GCG TGG GAA CCT
TRPC6_{ex7}	Maus	GCA GCT GTT CAG GAT GAA AAC	TTC AGC CCA TAT CAT GCC TA
TRPC7	Maus	AAT GGC GAT GTG AAC TTG C	CAG TTA GGG TGA GCA ACG AAC
β-Aktin	Maus	CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG	ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA
α-SMA	Maus	GCT GGT GAT GAT GCT CCC A	GCC CAT TCC AAC CAT TAC TCC
Kollagen1a1	Maus	CCA AG A AGA CAT CCC TGA AGT CA	TGC ACG TCA TCG CAC ACA

Tabelle 14: Primersequenzen PCR

Zielstruktur	Spezies	Sequenz 5' nach 3'
STIM1 <i>antisense</i> (AS)	Maus	GGCTCTGCTGACCTGGAAGTATAGTG
STIM1 Wt	Maus	CGATGGTCTCACGGTCTCCTAGTTTC
STIM1 KO	Maus	AACGTCTTGCAGTTGCTGTAGGC
STIM2 <i>antisense</i> (AS)	Maus	GGATGTCCTGGACTCACTCTGTAGACCA
STIM2 Wt	Maus	CATCAGAAGGTAAAAGTGTGCAGTGCTC
STIM2 KO	Maus	GCTGAACTGTGTGCTTGACTGTAGC

2.1.10 Antikörper

Tabelle 15: Antikörper

Antikörper	Wirt	Spezifität	Hersteller	Verdünnung
STIM1	Kaninchen	polyklonal	CellSignaling, Danvers, USA, #4916S	1:1000
STIM2	Kaninchen	polyklonal	CellSignaling, Danvers, USA, #4917S	1:1000
NFATc1	Maus	monoklonal	SantaCruz Biotechnology, Dallas, USA, sc-7294	1:500
NFATc3	Maus	monoklonal	SantaCruz Biotechnology, Dallas, USA, sc-8405	1:500
Anti-Maus IgG-HRP	Pferd	polyklonal	CellSignaling, Danvers, USA, #7076S	1:2000
β -Aktin POX	Maus	monoklonal	Sigma Aldrich, Deisenhofen, A3854	1:10000
Lamin B1	Kaninchen	polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, PA5-19468	1:5000
Anti-Kaninchen IgG-POX	Ziege	polyklonal	Sigma Aldrich, Deisenhofen, A6154	1:10000
α -SMA	Maus	monoklonal	Sigma Aldrich, Deisenhofen, A5228	1:2000
Anti-Maus IgG-FITC	Ziege	polyklonal	Sigma Aldrich, Deisenhofen, F9006	1:80

2.1.11 Softwareprogramme

Zur Analyse und Auswertung der generierten Daten wurden folgende Programme verwendet: *Image Studio Lite Ver 4.0*, *GraphPad Prism 7* und *8*, *LightCycler® 480 SW 1.5.1*, *ImageJ*, *Excel* und *ZEN Software*.

2.2 Methoden

2.2.1 Mäusezucht und Mausmodelle

Alle in Tabelle 2 aufgeführten Mauslinien wurden in der Tierhaltung vor Ort gezüchtet und gehalten. STIM1/2^{flox/flox}-Mäuse [70] wurden von Stefan Feske, New York, USA, zur Verfügung gestellt und mit TRPC1/6^{-/-}-Mäusen aus der eigenen Zucht verpaart, um STIM1/2^{flox/flox}TRPC1/6^{-/-}-Mäuse zu generieren. TRPC1/6^{-/-}-Mäuse wurden durch Verpaarungen von TRPC1^{-/-} [86] und TRPC6^{-/-} [184] Mäusen gewonnen. Da beide Gene auf demselben Chromosom 9 liegen, gelang dies erst nach einem sogenannten „*cross over event*“. Durch eine zusätzliche Kreuzung mit TRPC3^{-/-}-Mäusen [199] wurden TRPC1/3/6^{-/-}-Mäuse gezüchtet. Für alle durchgeführten Organentnahmen wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse in einem Alter von circa 12 Wochen verwendet. Alle Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) genehmigt.

2.2.2 Das Cre/loxP-Rekombinationssystem

STIM1/2-defiziente Mäuse sind embryonal lethal oder sterben kurz nach der Geburt [70]. Für die Herstellung von STIM1/2-defizienten Fibroblasten wurde deshalb das Cre/loxP-Rekombinationssystem [202] verwendet, das eine gewebsspezifische Exzision von jeweils einem Exon in dem STIM1- oder STIM2-Gen ermöglicht. Das als „*floxed*“ (*flanked by loxP*) bezeichnete Exon ist von beiden Seiten mit „*loxP*“ (*locus of X-over of P1*) Erkennungssequenzen flankiert. Diese Sequenzen werden von „*Cre*“ (*cyclization recombination*)-Rekombinasen erkannt und das flankierte Exon ausgeschnitten. Die Exzision des Exons durch Cre-Rekombinasen kann entweder *in-vivo* durch die Kreuzung mit einer entsprechenden gewebespezifischen Mauslinie, die die Cre-Rekombinase gewebespezifisch exprimiert, statt finden oder auch *in-vitro* durch die Zugabe von Lentiviren, die Cre-Rekombinasen exprimieren. Auf Grund des fehlenden Exons kommt es zu einer Translation nicht funktioneller Proteine und damit zur Generierung STIM1/2-defizienter Mäuse oder Zellen (siehe Abbildung 16).

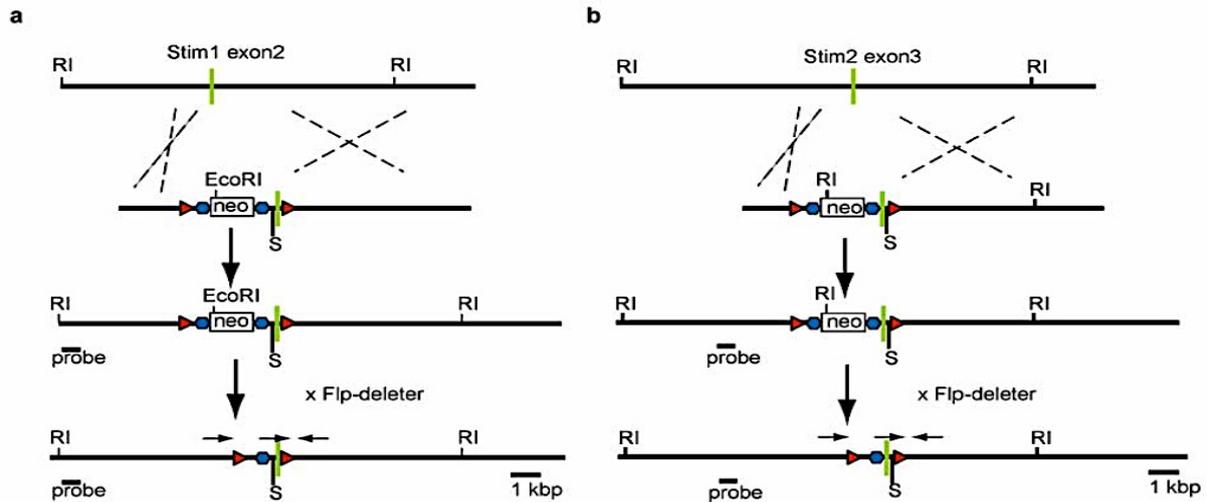


Abbildung 16 modifiziert nach [70]: Schematische Darstellung der konditionalen Gen-Deletion von *Stim1* und *Stim2* in der Maus. a, Während Exon 2 die Informationen für die Codierung der EF Hand Struktur von *Stim1* trägt, codiert Exon 3 für die Sequenzen des Carboxy-Terminus der EF Hand auf dem *Stim2*-Gen. Exon 2 und Exon 3 werden jeweils durch *loxP* Erkennungsstellen (rote Dreiecke) flankiert. Das Neomycin Resistenzgen wurde beiderseits durch *Frt* Erkennungssequenzen markiert (blaue Sechsecke). Durch die Deletion des jeweiligen Exons verschiebt sich das Leseraster so, dass sich das STOP-Codon verfrüht auf dem nächsten Exon befindet. Die jeweiligen Bindungsstellen der Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (siehe Tabelle 14) sind als Pfeile markiert.

2.2.3 Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurde den Mäusen nach dem Absetzen von den Eltern eine Schwanzbiopsie entnommen. Diese wurde nach Anleitung in 50 μ l 25 mM NaOH mit 2 mM EDTA für 25 min bei 95° C aufgeköcht, um die Zellstrukturen zu lysieren. Anschließend wurden 50 μ l einer 40 mM TRIS Lösung (pH=7,4) zu den abgekühlten Proben hinzugeben, um die enthaltene DNA zu isolieren. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden zu einer Mischung aus DNA Polymerase, Oligonukleotide (siehe Tabelle 14) und sterilem H₂O hinzu gegeben, um diese anschließend mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) zu vervielfältigen. Die entstanden PCR-Produkte wurden durch DNA-Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt, mit Kontrollen verglichen und anhand der jeweiligen Bandengrößen identifiziert. Die Genotypisierung der *STIM1/2*^{flox/flox}-Mäuse erfolgte nach dem ursprünglichen Protokoll [70] und wurde auch in der Dissertation von Frau Diana Stickel [203] detailliert beschrieben. Zur Bestimmung des Genotyps der *TRPC1/6*^{-/-} und *TRPC1/3/6*^{-/-}-Mäuse wurden ebenfalls die Anleitungen der Originalquellen [86, 184, 199] verwendet. Die Genotypisierungen wurden von unseren technischen Angestellten und wissenschaftlichen Hilfskräften routiniert und gewissenhaft durchgeführt.

2.2.4 Zellbiologie

2.2.4.1 Zellkultur

Wie bereits in der Dissertation von Frau Susanne Fiedler [201] beschrieben, wurden alle Zellkulturarbeiten mit den aufgelisteten Zelllinien (Tabelle 3) und Primärzellen (Tabelle 4) ausschließlich an einer Sterilbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt, um Kontaminationen möglichst zu vermeiden. Die Zellkulturen wurden unter optimalen Bedingungen bei 37° C, 5 % CO₂ und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert. Verwendete Medien, Lösungen und andere Substanzen (siehe Tabelle 5) wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt.

2.2.4.2 Medienwechsel, Passagierung und Kryokonservierung

Der Austausch des Mediums, das Überführen in die nächste Passage sowie die Kryokonservierung kultivierter Zellen erfolgten wie unter [201] beschrieben.

2.2.4.3 Isolation pulmonaler arterieller glatter Muskelzellen (PASMC)

Pulmonale arterielle glatte Muskelzellen (PASMC) wurden nach einem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll aus der Lunge einer Maus isoliert [203]. Das Protokoll diente ursprünglich der Isolation präkapillärer Blutgefäße in Ratten und wurde um die Isolation von PASMC in unserem Labor erweitert [204].

Nach der Narkotisierung der Maus durch 300 µl einer intraperitoneale Injektionslösung aus Heparin (500 I.E.), Ketamin [100 mg/ml] und Xylazin [125 mg/ml], wurde die Lunge über einen Zugang in den rechten Herzventrikel durch die Pulmonalarterie solange mit PBS gespült bis diese frei von Blutzellen war. Anschließend wurde die Lunge mit einer Eisen- Agarose-Lösung weiter gespült, um die kleinen Eisenpartikel bis in die präkapillären Enden der Lungengefäße zu bewegen. Nach trachealer Applikation der Agaroselösung wurde die gesamte Lunge mit Trachea aus dem Thorax entfernt. Alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur verrichtet. Die Lungenflügel wurden zunächst mechanisch zerkleinert und anschließend enzymatisch mit 0.1 mg/ml Kollagenase (C5138, SigmaAldrich) 1 Stunde bei 37° C im Inkubator verdaut. Nachdem die Verdauung durch eine DMEM M199 + FCS (10 %) Lösung abgestoppt und mehrmals durch eine Spritze mit einer 18G großen Nadel gedrückt wurde, wurde die Lösung mit den Eisenpartikeln in einem Probengefäß an einem Magnetständer befestigt. Dadurch wurden die Eisenpartikel mitsamt der kleinen Blutgefäße mit einem Durchmesser von 30-150 µm, in denen die Eisenpartikel hängen geblieben waren, vom restlichen Gewebe selektiert und dreimal mit PBS gewaschen. Abschließend wurde das Gewebe mit den kleinen Gefäßen auf runden Glasplättchen ausgesät,

sodass in den darauf folgenden 5 bis 6 Tagen PASMC aus den kleinen Gefäßen wachsen konnten. Die Identifizierung der PASMC erfolgte anschließend anhand spezifischer Marker (z.B. *α smooth muscle actin* (α -SMA) und schwere Kette des Myosin-Proteins) und wurde bereits beschrieben [181].

2.2.4.4 Isolation primärer murinen Lungenfibroblasten (pmLF)

Die Präparation primärer muriner Lungenfibroblasten (pmLF) wurde auf Basis des ursprünglichen Protokolls für primäre humane Lungenfibroblasten nach Staab-Wejnitz und Kollegen [205] durchgeführt und auf murine Lungenfibroblasten adaptiert [190]. Nach zervikaler Dislokation der Maus wurden die Lungenflügel über die rechte Herzkammer mit kalten, sterilen PBS gespült und aus dem Thorax entnommen. Anschließend wurde die Lunge in der Zellkultur mit Hilfe eines Skalpells in 1-2 cm² große Stücke zerkleinert und das Lungengewebe mit 1 mg/ml Kollagenase I (Biochrom, C-128) für 2 Stunden bei 37° C in einem Wärmeschüttler verdaut. Es folgte eine Filtration des verdauten Lungengewebes durch einen 70 µm Nylonfilter bevor das Lungengewebe mit PBS gewaschen und für 5 min zentrifugiert wurde. Die erhaltenen Zellen wurde in 10 ml Medium resuspendiert und anschließend auf einer 10 cm großen Zellkulturschale ausgesät. Das Medium wurde nach 2 Tagen gewechselt und die Zellen wurden aufgeteilt sobald diese eine Konfluenz von 80-90 % erreicht hatten. Für die beschriebenen Experimente wurden ausschließlich Fibroblasten der dritten bis vierten Passage verwendet. PmLF wurden neben der typischen Morphologie anhand von charakteristischen Markern, wie zum Beispiel „*α smooth muscle actin*“ (α -SMA), identifiziert.

2.2.4.5 „Transforming growth factor“ (TGF)- β 1-Behandlung von pmLF

Wie bereits beschrieben [190], wurden primären Lungenfibroblasten mit TGF- β 1 behandelt, um eine Ausdifferenzierung zu Myofibroblasten zu initiieren. Nach 24-stündigen Inkubation der Zellen im Fibroblasten-Medium mit einem reduzierten FCS Anteil von nur 0,1 % wurden pmLF entweder mit 2 ng/ ml TGF- β 1 oder in nur 0,1 % BSA (Lösungsmittel) für 48 Stunden behandelt.

2.2.4.6 Produktion Lentiviren

Die Produktion der rekombinanten Lentiviren wurde nach dem Originalprotokoll des Trono Labors (tronolab.epfl.ch) durchgeführt und bereits in der Promotionsarbeit von Jana Demleitner [200] unter 2.2.28 und in unserer Publikation [206] detailliert beschrieben. Alle damit verbundenen Arbeiten wurden in einem S2 Labor verrichtet, da Lentiviren von dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) abstammen und somit ein erhöhtes Sicherheitsrisiko

darstellen. Für die Produktion wurden LentiX 293T Zellen verwendet, die sich laut Hersteller besonders gut für Virusproduktionen eignen. Diese Zellen wurden via Kalziumpräzipitation mit den drei Plasmiden pWPXL, pMD2G und psPAX2 transfiziert, welche essentiell für die Produktion der Lentiviren sind. Hierbei diente pWPXL als Vektor für das jeweilige Zielgen, die Cre-Rekombinase (pLOX-CW-CRE), pMD2G trug die Informationen für das VSV-G Envelope-Protein und psPAX2 codierte für die viralen HIV Proteine Gag, Pol, Tat und Rev. Diese drei Vektoren führten in den infizierten Zellen dazu, dass die Wirtszellen die Lentiviren rekombinant produzierten und in den Überstand abgaben. Dieser Überstand wurde mehrmals abgeerntet, aufkonzentriert sowie aliquotiert und bei -80°C eingelagert. Abschließend wurde sowohl eine erfolgreiche Lentiviren-Produktion als auch die erhaltene Viruskonzentration anhand eines *LentiX Go Stix* Tests überprüft.

2.2.4.7 Infektion von pmLF mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren

Die produzierten Lentiviren wurden verwendet, um mit Hilfe der rekombinant exprimierten Cre-Rekombinase STIM1/2-defiziente pmLF zu generieren. Dazu wurden 150.000 Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und in 2 ml Fibroblasten-Medium in eine Kavität der 6-Lochplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden je nach Konzentration ca. 200 μl der Lentiviren-Lösung zusammen mit 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polybrene in insgesamt 2 ml Fibroblasten-Medium auf die Zellen gegeben. Diese Lösung wurde am nächsten Tag durch frisches Fibroblasten-Medium ersetzt und die Zellen wurden je nach Konfluenz noch am selben oder darauf folgenden Tag aufgeteilt bzw. für weitere Experimente ausgesät. Um eine ausreichende Deletion des Zielgens gewährleisten zu können, fanden die nachfolgenden Experimente erst am oder nach dem 5. Tag der Infektion mit Lentiviren statt. Als Nachweis für die erfolgreiche Deletion der jeweiligen Exons im Stim1- und Stim2-Gen wurde DNA aus pmLF isoliert, um diese anschließend mittels genomischer PCR und Agarose-Gelelektrophorese zu analysieren (siehe Abschnitt 2.2.5.7).

2.2.5 Molekularbiologie

2.2.5.1 Transformation

Die Übertragung der Plasmid-DNA in kompetente Bakterien wurde mit Hilfe hoch effizienter *NEB 10-beta kompetenten E. coli Bakterien* von New England Biolabs durchgeführt. Gemäß Herstellerprotokoll wurde die DNA der gewünschten Plasmide in die kompetenten Bakterien mittels Hitzeschockmethode gebracht. Als optimaler Bakteriennährboden wurde ein „lysogeny broth“ (LB)-Medium mit Antibiotikaresistenz (z.B. gegen Ampicillin) hergestellt und gleichmäßig auf Agarplatten verteilt. Auf diesen LB-Agarplatten wurden anschließend

die transformierten Bakterienzellen ausgestrichen. Über Nacht wuchsen auf den LB-Agarplatten ausschließlich Kolonien mit erfolgreich transformierten Plasmid an.

2.2.5.2 Plasmidisolierung

Zur Isolierung der Plasmide wurde eine Kolonie der mit Bakterien bewachsenen Agarplatten mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in LB-Medium inklusive Antibiotika über Nacht im Wärmeschüttler vermehrt. Die weiteren Schritte zur DNA-Gewinnung der Plasmide erfolgten mit Hilfe des *Nucleo Bond Midiprep Kit* der Firma Macherey-Nagel und wurden genau nach Anleitung durchgeführt. Abschließend wurde die DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt und als Präzipitat getrocknet, um dieses in TE-Puffer zu lösen und die Konzentration photometrisch zu bestimmen. Je nach Bedarf wurden die Bakterien in Bakterienmedium unter Zugabe von 87 %-igen Glycerin bei -80°C gelagert, um bei zukünftigen Durchführungen den Transformationsschritt überspringen zu können und sofort mit der Anzucht in LB-Medium zu beginnen.

2.2.5.3 „Ribonucleic acid“ (RNA)-Isolation

Die Gewinnung von RNA aus pmLF und PASC erfolgte über Säulen des *Invitrap Spin Universal RNA Mini Kits* von Stratec. Gemäß den Herstellerangaben wurden die Zellen zunächst ab zentrifugiert und mit Lysepuffer sowie DTT lysiert, um anschließend die enthaltene DNA und Proteine durch Affinitäts-Säulen abzutrennen. Nach Adsorption der RNA an die Spin-Säulen konnte diese nach mehrmaligen Waschschritten eluiert und photometrisch vermessen werden. Die gewonnene RNA wurde entweder bei -80°C gelagert oder direkt zur Erststrangsynthese verwendet. Die einzelnen Schritte zur RNA-Isolation können den Angaben des Herstellers entnommen werden.

2.2.5.4 Erststrangsynthese

Um die Expression eines Gens untersuchen zu können, wurde die isolierte einsträngige RNA mit Hilfe eines *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits* von Thermo-Fisher-Scientific in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. In einer ersten Reaktion wurde cDNA aus mRNA durch den Einsatz reverser Transkriptase und „*Random Primer*“ in einem Thermocycler, wie in [201] beschrieben, synthetisiert.

2.2.5.5 Quantitative *real time* -Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die synthetisierte cDNA wurde in einem zweiten Schritt durch den Einsatz einer quantitativen „*real time*“ -PCR (*RT-qPCR*) Messung analysiert, um die Genexpression im Vergleich zu einem Referenz- oder „Haushalts“ Gen, das nicht reguliert wurde (z.B. β -Aktin), zu

bestimmen. Der genaue Ablauf dieser Methode sowie benutzte Reagenzien und Programme wurden bereits in [201] beschrieben. Alle verwendeten Oligonukleotide sind in dieser Doktorarbeit in Tabelle 13 und 14 aufgelistet. Oligonukleotid-Dimere wurden anhand der Schmelzkurvenanalyse von der Auswertung ausgeschlossen. PCR-Produkte wurden mit Hilfe von DNA-Agarose-Gelelektrophorese, wie unter 2.2.5.7 beschrieben, identifiziert. Zur Auswertung wurden die von der *LightCycler Software* generierten „*Crossing points*“ für die Quantifizierung der relativen Genexpression einer Probe in Abhängigkeit von β -Aktin (Referenzgen) verwendet.

2.2.5.6 „Deoxyribonucleic acid“ (DNA)-Isolation aus Zellen

Zur Gewinnung von genomischer DNA aus pmLF und PASCs wurde das *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* von Sigma Aldrich verwendet. Gemäß der Anleitung des Herstellers wurden die Zellen zunächst trypsiniert, abgelöst und abzentrifugiert bevor sie mit Lysepuffer plus Proteinase K lysiert und für 10 min bei 90° C im Thermoschüttler inkubiert wurden. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von Affinitätssäulen, ähnlich wie bei der RNA-Isolation (siehe 2.2.5.3), durch mehrmalige Wasch- und Zentrifugationsschritte isoliert und abschließend eluiert. In einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) konnte aus der genomischen DNA nach Zugabe von Nukleotiden, spezifischer Oligonukleotiden (siehe Tabelle 14) und Taq-Polymerase, wie in der Literatur [70, 86, 184, 199] beschrieben, entsprechende Produkte amplifiziert werden.

2.2.5.7 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Um die genomische DNA der Zellen zu überprüfen, wurde diese mittels Agarose-Gelelektrophorese, wie bereits in [190] beschrieben, analysiert. Als DNA-Farbstoff wurde *Midori-Green* anstelle von Ethidiumbromid verwendet, da dieses laut Hersteller weniger mutagen sein soll.

2.2.6 Proteinbiochemie

2.2.6.1 Proteinisolierung

Zur Protein-Analyse wurden die Zellen zunächst in einer entsprechenden Menge an RIPA-Puffer, welcher Protease- und Phosphataseinhibitoren enthielt, lysiert und gemäß eines von unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokolls weiter behandelt [201]. Die Konzentration des isolierten Proteinlysats wurde anschließend gemäß den Angaben des Herstellers mit Hilfe eines *BCA (bicinchoninic acid) -Assays* und anhand einer BSA-Standardkurve photometrisch

bestimmt. Durch die Zugabe des 6-fach konzentrierten Laemmli-Puffers wurde das Proteinlysate für die weitere Analyse vorbereitet. [200]

2.2.6.2 Isolierung der nukleären Fraktion

Die Isolierung der nukleären Fraktion erfolgte mittels *Nuclear Extract Kit* von Activ Motif. Dabei wurde die Extraktion nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden bereits im Detail beschrieben [190].

2.2.6.3 „Sodium dodecyl sulfate“-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteine der Lysate näher zu analysieren, wurden diese zunächst über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Die verwendeten Puffer und Lösungen sowie eine Beschreibung der Methode wurden bereits in der Doktorarbeit von Frau Susanne Fiedler [201] aufgeführt. Zur Protein-Analyse größerer Proteine mit einer Molekülmasse über 130 kDa (z. B. NFATc1 und NFATc3) wurde ein 7,5 %-iges Trenngel anstelle des standardisierten 10 %-igen Trenngels verwendet, wodurch größere Proteine besser aufgetrennt und visualisiert werden konnten.

2.2.6.4 Protein-Analyse mittels *Western Blot*

Nach der Auftrennung der Proteine auf ein SDS-Gel erfolgte in einem nächsten Schritt die Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran durch elektronischen Transfer. Je nach Proteingröße und Erfahrungswerten aus der Literatur wurden die zu analysierenden Proteine entweder nach dem Standardprotokoll unserer Arbeitsgruppe bei einer geringeren Stromstärke von konstanten 20 mA über Nacht [201] auf die Membran übertragen oder bei einer höheren Stromstärke von konstanten 360 mA innerhalb einer 1 Stunde und 15 min (z.B. zur Bestimmung von NFAT). Nach dem Blocken der unspezifischen Bindestellen mit 5 % Milchpulver oder BSA in TBST wurde die Membran mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der mit „*horse radish peroxidase*“ (HRP)-gekoppelte Zweitantikörper auf die Membran gegeben und die Proteinbanden wurden nach Zugabe von Luminol-haltigen Detektionsreagenzien durch Chemilumineszenz detektiert. Die Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte dieser Methode wurde bereits bei Fiedler, S. ausführlich beschrieben [201]. Eine Liste aller verwendeten Erst- und Zweitantikörper inklusive deren Verdünnungen ist in Tabelle 15 dieser Arbeit aufgeführt. Die Proteinbanden wurden mit Hilfe der *Image Studio Lite Version 4.0 Software* quantifiziert und zur Auswertung auf die jeweilige Ladekontrolle normiert.

2.2.6.5 Immunfluoreszenz

Eine weitere Methode zur Detektion und Quantifizierung bestimmter Proteine in der Zelle ist die Immunfluoreszenz. Hierbei wurde neben dem spezifischen Antikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet ist, ein Fluorophor-gekoppelter Zweitantikörper verwendet, wodurch das Protein durch eine indirekte Fluoreszenz detektiert und analysiert werden konnte. Die einzelnen Arbeitsschritte zur Durchführung der Färbung von α -SMA (α glatten Muskelaktin) und des filamentösen Aktinskeletts (Aktin-Stressfasern) durch Phalloidin-Tetramethylrhodamine-isothiocyanat (TRITC) wurden bereits in der Doktorarbeit von Frau Katharina Hofmann [207] im Detail erläutert. Als fluoreszierender Zweitantikörper, der gegen den Fc-Teil des α -SMA-Antikörpers gerichtet ist, wurde ein anti-Maus-Fluoresceinisothiocyanate (FITC)-Antikörper verwendet. Eine zusätzliche Färbung der Zellkerne wurde mit Hilfe des Hoechst 33342-Farbstoffs durchgeführt. Die anschließende Messung der Expression des Zielproteins erfolgte durch die Analyse der Graustufenintensitäten. Zur Analyse wurden die Fluoreszenzbilder in Graustufenbilder umgewandelt und die Intensitäten einzelner Fibroblasten mit Hilfe des Programms der Firma Olympus analysiert. Die einzelnen Schritte der Messung wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt und bereits detailliert beschrieben [190].

2.2.7 Funktionelle Messmethoden

2.2.7.1 *Calcium Imaging*: Bestimmung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2-AM

Fura-2-AM wurde in den Experimenten zur Bestimmung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als Ca^{2+} -Indikator verwendet, um damit die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in verschiedenen Zelltypen der jeweiligen Maus-Genotypen zu messen und zu charakterisieren [190]. Als lipophile Esterverbindung gelangt Fura-2-AM durch die Zellmembran in das Zellinnere, jedoch wird der Ester anschließend intrazellulär abgespalten und das hydrophile Fura-2 bleibt somit in der Zelle eingeschlossen. Auf Grund der hohen Bindungsaffinität zu Ca^{2+} -Ionen bildet Fura-2 mit Ca^{2+} einen stabilen Komplex, der nach Exzitation bei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 510 nm emittiert.

Je nach Zelltyp wurden die jeweiligen Zellen so auf Glasplättchen ausgesät, dass diese am Tag der Messung eine Konfluenz zwischen 80-90 % aufwiesen. Die Zellen wurden mit HBSS-Puffer gewaschen und 30 Minuten in einer 2 μM Fura-2-AM-Lösung (in 0,1 % BSA/HBSS-Puffer gelöst) bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen mit HBSS

wurde das Glasplättchen in die Messapparatur eingespannt. In der Regel wurden 900 μl HBSS-Puffer vorab auf die Zellen gegeben, um bei anschließender Zugabe der jeweiligen Substanzen ein Mischverhältnis von 1:10 zu erhalten. Die zu vermessenden Zellen sowie der Hintergrund wurden im Softwareprogramm bereits vor Beginn der Messung bei 360 nm als „regions of interests“ markiert, wodurch eine entsprechende Messung jeder einzelnen markierten Zelle möglich war. Nach dem Starten der Messung wurden entweder 4 μM Endothelin-1 oder 50 μM LPA zu einer Ca^{2+} -haltigen Lösung hinzugegeben, um den Ca^{2+} Einstrom sowohl aus dem Extrazellulärraum als auch aus den internen Speichern zu messen. Im Gegensatz dazu wurde der isolierte Ca^{2+} -Ausstrom aus den internen Speichern in einer Ca^{2+} -freien HBSS-Messlösung unter Zugabe von 0,5 mM EGTA, welches extrazelluläres Ca^{2+} bindet, untersucht. Zur Bestimmung des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) wurden die internen Ca^{2+} -Speicher zunächst mit 1 μM Thapsigargin entleert und anschließend wurde 2 mM CaCl_2 ins Außenmedium hinzugegeben. Zusätzlich wurde der Ca^{2+} -Einstrom in Ca^{2+} -freiem Medium nach Applikation von 4 μM Endothelin-1 und Rekalzifizierung durch 2 mM CaCl_2 untersucht. Die intrazellulären Ca^{2+} -Einströme wurden mit Hilfe eines Polychrome V Monochromators (Till Photonics, Martinsried) und einer 14-bit EMCCD Kamera (iXON3 885, Andor, Belfast, UK), die an ein inverses Mikroskop (IX71 mit einem UPlanSApo 20 \times /0.85 Ölimmersionsobjektiv, Olympus, Hamburg) gekoppelt waren, nach Exzitation bei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm gemessen. Durch die Bindung an Ca^{2+} verschiebt sich das Exzitationsmaximum für Fura-2 von 380 nm auf eine Wellenlänge von 340 nm. Der isobestische Punkt liegt bei einer Wellenlänge von 360 nm und ist Ca^{2+} unabhängig. Die Emissionswellenlänge bleibt trotz der Verschiebung von 380 nm auf 340 nm annähernd unverändert bei 510 nm (Abbildung 17). Zur Auswertung des jeweiligen Ca^{2+} -Einstroms und folglich der Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden die emittierten Fluoreszenzintensitäten bei Anregungswellenlängen von 340 nm und 380 nm mit der entsprechenden Berechnung nach Grynkiewicz, G. [208] bestimmt. Die Quantifizierung der Ca^{2+} -Einströme erfolgte über die Berechnung der Fläche unter der Kurve mittels *Graph Pad Prism Software*.

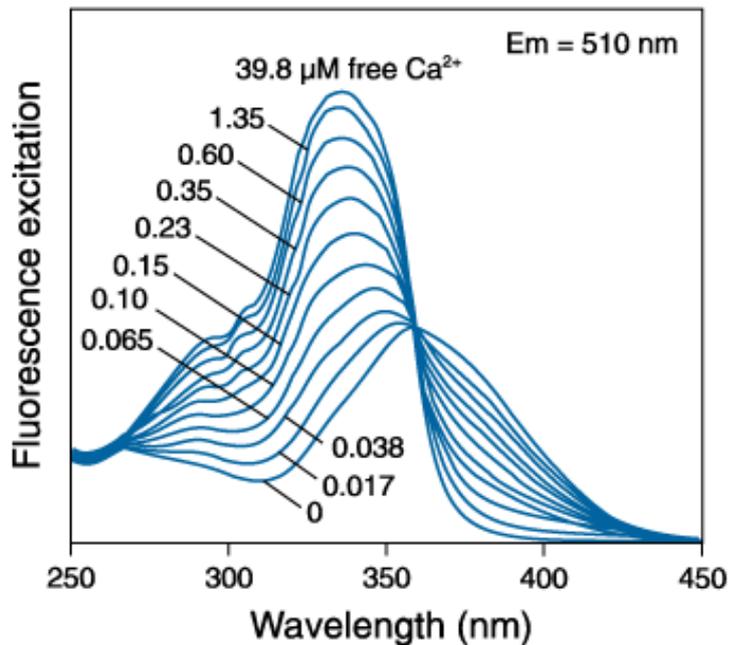


Abbildung 17: Fluoreszenz-Exzitationsspektrum des Ca^{2+} -Indikators Fura-2 bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen. Als Ca^{2+} -Chelator bindet Fura-2 an Ca^{2+} -Ionen und verschiebt sein Exzitationsmaximum im gebundenen Zustand auf eine Wellenlänge von 340 nm. Je höher die vorliegende Ca^{2+} -Konzentration, desto intensiver erscheint die Fluoreszenz von Fura-2. Der isobestische Punkt, welcher indifferent von der Ca^{2+} -Konzentration ist, liegt bei einer Wellenlänge von 360 nm. Im nicht gebundenen Zustand wird Fura-2 bei einer Wellenlänge von 380 nm angeregt und zeigt eine Ca^{2+} -abhängige, abnehmende Fluoreszenzintensität. Durch die Messung des Verhältnisses der beiden Fluoreszenz-Intensitäten bei Wellenlängen von 340 und 380 nm wird die absolute, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ berechnet [208]. Die Emissionswellenlänge bleibt unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration unverändert bei einer Wellenlänge von 510 nm. Modifiziert nach www.photometrics.com.

2.2.7.2 Calcium Imaging: Quantifizierung der internen Ca^{2+} -Speicher mit Fura-2-FF

Zur Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentrationen in den internen Ca^{2+} -Speichern der primären murinen Lungenfibroblasten wurde Fura-2-FF-AM verwendet. Diese Fura-Verbindung besitzt eine wesentlich geringere Bindungsaffinität als Fura-2-AM zu Ca^{2+} (siehe Tabelle 16) und wird somit in den Speichern nicht vollkommen mit Ca^{2+} -Ionen ab gesättigt.

Zur Versuchsdurchführung wurden pmLF auf Glasplättchen ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 80-90 % für die Messungen mit Fura-2-FF verwendet. Die Zellen wurden zunächst für 35 min mit 4 μM Fura-2-FF (gelöst in 0,1% BSA in HBSS) bei 37° C inkubiert, mit Ca^{2+} -freien HBSS gewaschen und wie unter 2.2.5.1 vermessen. Nach Zugabe von 900 μl Messlösung, bestehend aus Ca^{2+} -freien HBSS und 0,5 mM EGTA, wurden die zu vermessenden Zellen ebenfalls einzeln als „region of interests“ gekennzeichnet. Um die Ca^{2+} -Konzentration in den internen Speichern zu messen, wurden diese mit Hilfe von 2 μM Thapsigargin entleert und die Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration über die Zeit wurde bei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm aufgezeichnet. Die Emissionswellenlänge betrug wie bei Fura-2 510 nm. Die Berechnung der Ca^{2+} -Konzentrationen erfolgte wie bereits

beschrieben und wurde durch Start- und Endpunkt als Differenz der Ca^{2+} -Messungen quantifiziert.

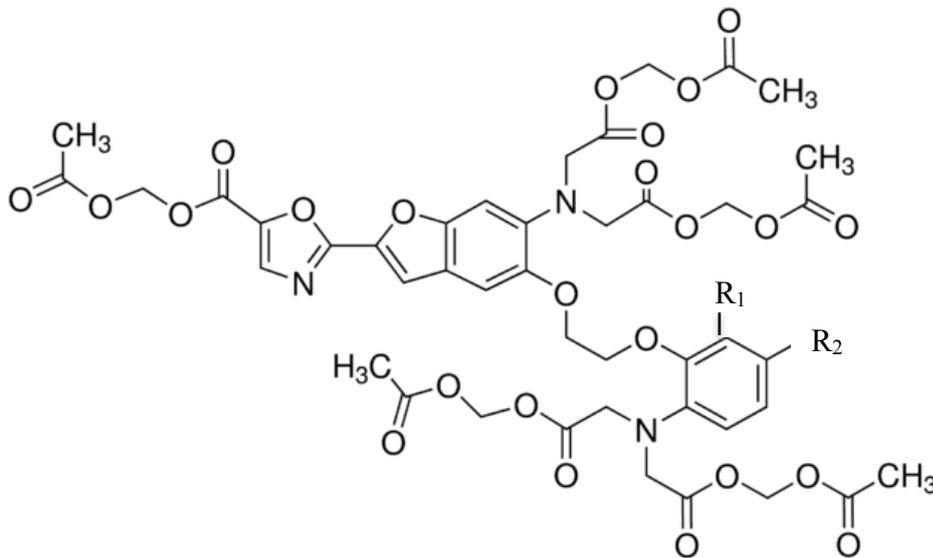


Abbildung 18: Strukturformel von Fura-2-AM ($\text{R}_1:\text{H}$; $\text{R}_2:\text{CH}_3$) und Fura-2-FF-AM ($\text{R}_1:\text{F}$; $\text{R}_2:\text{F}$) (modifiziert nach www.sigmaaldrich.com).

Tabelle 16: Charakteristische Eigenschaften von Fura-2-AM und Fura-2-FF-AM

Ca^{2+} -Indikator	K_d für Ca^{2+}	Exzitation (nm)	Emission (nm)	Referenz	R_1	R_2
Fura-2-AM	145 nM	363/335	510	[208-210]	H	CH_3
Fura-2-FF, AM	5500 nM	336/360	505	[211-213]	F	F

2.2.7.3 Kolorimetrische Bestimmung der Zellviabilität durch Quantifizierung der Stoffwechselfunktion

Um die Viabilität in primären murinen Fibroblasten zu bestimmen, wurde ein Zellviabilitätstest mit WST-1 (*Water soluble tetrazolium*) von Roche durchgeführt. Der resultierende Farbumschlag durch die Reduktionsreaktion von WST-1 zu Formazan wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (Tecan®) gemessen. Dieser Farbumschlag war direkt mit der Umsetzung von NADPH zu NADP in der mitochondrialen Atmungskette gekoppelt. Je mehr H^+ -Ionen abgespalten wurde, desto mehr WST-1 wurde in Formazan umgewandelt. Die gemessene Absorption korreliert folglich mit der Stoffwechselaktivität lebender Zellen. Der WST-1 Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und von unserer Arbeitsgruppe für die jeweiligen Versuche optimiert [201].

2.2.7.4 Analyse der Zellproliferation durch Quantifizierung der DNA-Synthese

Die Proliferation der Zellen wurde mit Hilfe eines *Click-iT 5-ethynyl-2'-desoxyuridine (EdU) Kits* anhand der DNA-Syntheserate quantifiziert. Als Thymidin-Analogon wurde EdU anstelle

von Thymidin während der DNA-Synthese in die neu entstehende DNA eingebaut und anschließend mittels „Click-iT“-Reaktion mit einem Alexa 488 Farbstoff detektiert. Die erfolgreich eingebauten und mit Fluorophor-gekoppelten EdU-Bausteine konnten anschließend mikroskopisch erfasst werden. Um alle Zellkerne detektieren zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Hoechst33342-Farbstoff gefärbt. Zur Quantifizierung der DNA-Syntheserate wurde die Ratio aus grün gefärbten EdU Zellkernen und mit Hoechst33342 gefärbten Zellkernen berechnet. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers und wurde bereits beschrieben [201]. In dieser Arbeit wurden die pmLF allerdings nur 3 Stunden mit EdU-Lösung inkubiert.

2.2.7.5 Quantifizierung der Zellmigration

Um das Migrationsverhalten von pmLF und nach Zusatz von TGF- β 1 von Myofibroblasten quantifizieren zu können, wurde ein Migrations-Assay der Firma Ibidi eingesetzt. Der Migrations-Assay wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt und an pmLF mit oder ohne TGF- β 1-Behandlung angepasst [201].

2.2.7.6 Statistik

Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe des Programmes *GraphPad Prism* durchgeführt. Alle zu analysierenden Daten wurden mittels *GraphPad Prism* durch Anwendung des *Shapiro-Wilk*- und *D'Agistino Pearson*-Tests auf eine Gauß'sche Normalverteilung überprüft. Je nach Ergebnis und Anzahl der zu vergleichenden Proben wurden die Daten anschließend weiter analysiert. Bei normalverteilten Proben wurde bei zwei zu vergleichenden Proben der „*Student's*“-T-test verwendet. Mehr als zwei Proben wurden durch einen *One-Way-ANOVA*- und bei Betrachtung eines zusätzlichen Faktors durch einen *Two-Way-ANOVA*-Test analysiert. Bei nicht normalverteilten Proben wurden nicht parametrische Analysen wie z.B. der *Mann-Whitney*-Test bei zwei zu vergleichenden Proben und der *Bonferroni*-Test bei mehr als zwei Proben eingesetzt.

Alle ermittelten Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean* (SEM)) aufgetragen. Die dazugehörigen Signifikanzen wurden durch Sternchen *, je nach erreichten p- Werten von $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) bis $p < 0,0001$ (****) gekennzeichnet. Für die Durchführung der Experimente wurden mindestens drei Mäuse pro Genotyp ($n=3$) in jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle der „stromal interaction molecule“ (STIM)1/2-Proteine und „classical transient receptor potential“ (TRPC)1/6- sowie TRPC1/3/6-Kanäle während des Rezeptor- und Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (ROCE/SOCE)

Um die Rolle des Rezeptor- und Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms in pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) zu charakterisieren, wurden die Funktionen von STIM1/2 sowie TRPC1, TRPC3 und TRPC6 in den jeweiligen Zelltypen analysiert. Zur Untersuchung wurden sowohl verschiedene Mausmodelle als auch unterschiedlich funktionelle Messmethoden verwendet. Da Mäuse ohne STIM1/2-Proteine nicht lebensfähig sind und bereits einige Tage nach der Geburt sterben [70], wurden STIM1/2^{flox/flox}-Mäuse (siehe 2.2.2) für die Experimente generiert. Diese Mäuse besitzen gegenüber der globalen Gen-defizienten „Knockout“ (KO)-Maus den Vorteil eines konditionalen und gewebespezifischen „Knockdowns“. Im Gegensatz dazu wiesen weder TRPC1/6- noch TRPC1/3/6-defiziente Mäuse lebensbedrohliche Veränderungen auf, sodass diese direkt als globale KO-Mäuse eingesetzt werden konnten (siehe 2.2.1).

3.1.1 Charakterisierung primärer muriner Lungenfibroblasten (pmLF) und Myofibroblasten sowie pulmonaler arterieller glatter Muskelzellen (PASMC)

3.1.1.1 Identifizierung von Lungen(myo)fibroblasten und PASMC

Nach der Isolation von PASMC und Lungenfibroblasten (siehe 2.2.4.3 und 2.2.4.4) wurden die Zellen neben ihrer eindeutig spindelförmigen Morphologie anhand von charakteristischen Markern identifiziert [214]. Abbildung 19 veranschaulicht die jeweiligen Eigenschaften der isolierten Zellen. Sowohl Lungen(Myo)fibroblasten (a und b) als auch PASMC (c) weisen eine spindelförmige Form sowie große Zellkerne auf. Daher sind die verschiedenen Zelltypen anhand der Morphologie kaum voneinander zu unterscheiden.

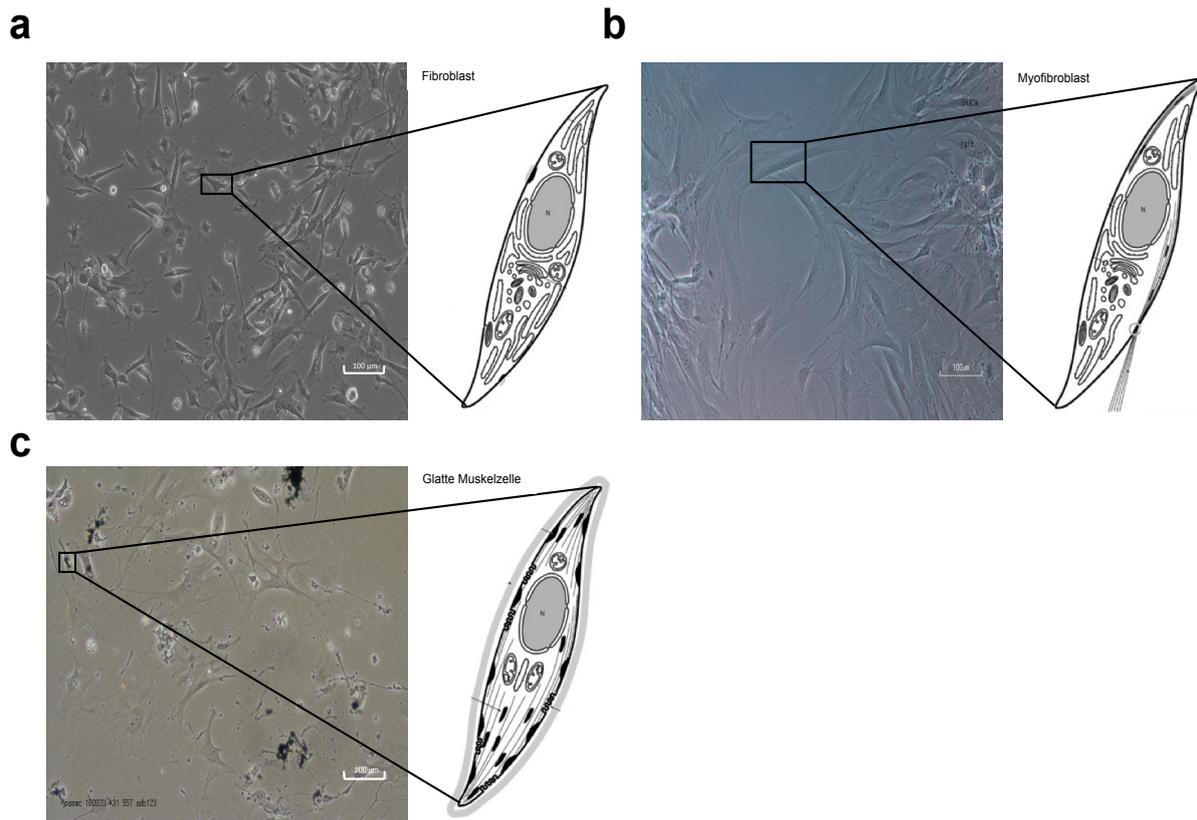


Abbildung 19: Phasenkontrastbilder isolierter primärer muriner Lungenzellen mit dazugehörigen schematischen Zellzeichnungen (modifiziert nach [214]). Oben links: Primäre murine Lungenfibroblasten (a) der dritten Passage. Oben rechts: Primäre murine Lungenmyofibroblasten (b) der dritten Passage nach 48 stündiger Behandlung mit TGF-β1. Unten links: Pulmonale präkapilläre arterielle glatte Muskelzellen (c) mit schwarzen Eisenpartikeln und Gefäßen nach 5 Tagen Kultivierung. Der Maßstab beträgt 100 µM.

Zur genauen Charakterisierung dienten intrazelluläre Marker und extrazelluläre Matrixproteine, wie beispielsweise α -glattes Muskelzell-Aktin (α -SMA für „*alpha-smooth muscle actin*“) und F-Aktin-Stressfasern [215]. Diese wurden durch spezifische, an Fluoreszenzmarker gekoppelte Antikörper, in Immunfluoreszenz-Färbungen nachgewiesen (Abbildung 20). Polymerisierte F-Aktinfilamente wurden durch das Toxin des Knollenblätterpilzes Phalloidin mit gekoppelten TRITC (Tetramethylrhodamine-isothiocyanat)-Farbstoff, angefärbt. Anhand der Färbungen wurden in pmLF, die durch TGF-β-Behandlung zu Myofibroblasten differenzierten, höhere Expressionsraten für α -SMA und Aktin-Stressfasern im Vergleich zu pmLF ohne TGF-β-Behandlung gemessen. PSMC, die nach dem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll isoliert wurden, konnten wie bereits beschrieben ebenfalls durch Immunfluoreszenzfärbungen von α -SMA charakterisiert werden [181, 216].

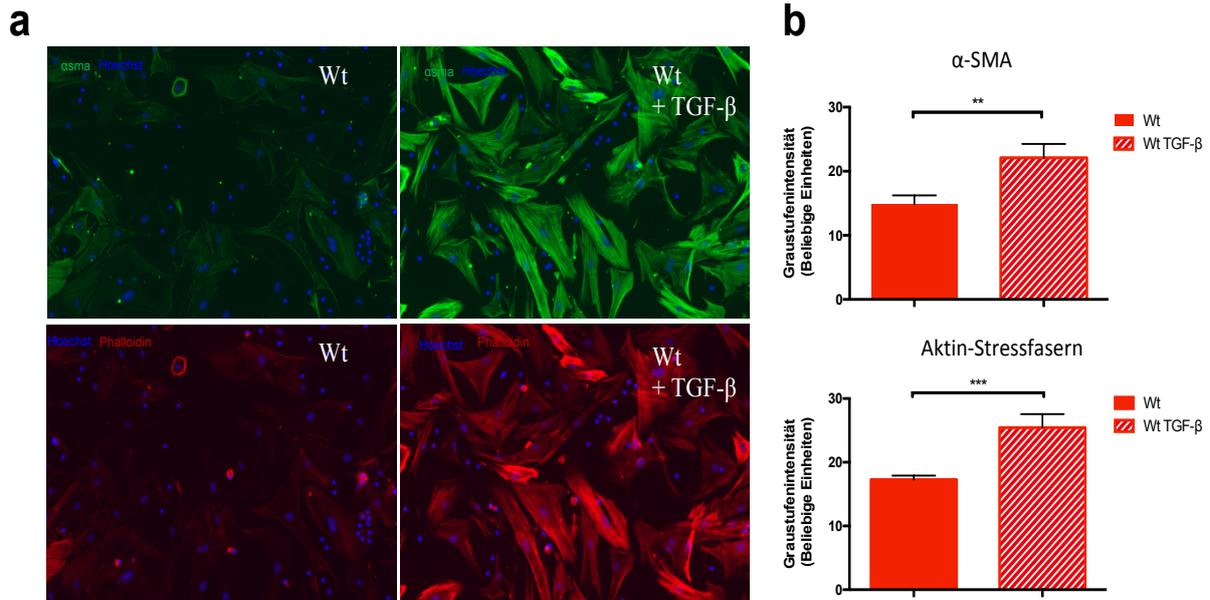


Abbildung 20: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen als Nachweis von α -SMA und F-Aktin-Stressfasern in Wt-Lungenfibroblasten (pmLF) und ausdifferenzierten Myofibroblasten nach TGF- β 1-Behandlung. Zellen wurden für 24 Stunden in Fibroblasten-Medium mit 0,1 % FCS inkubiert und anschließend für 48 Stunden entweder mit 2 ng/ml TGF- β 1 oder mit 0,1 % BSA in PBS (Lösungsmittel) behandelt. PmLF wurden in 4 %-iger Formaldehydlösung fixiert und mit α -SMA Antikörper sowie fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörper (a, oben in grün) inkubiert. Zusätzlich wurden Aktin-Stressfasern mit Phalloidin-TRITC (a, unten in rot) und Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff (blau) angefärbt. Graustufenintensitäten der einzelnen, gefärbten Zellen wurden gemessen, quantifiziert und als Mittelwert \pm SEM in Balkendiagrammen auf der rechten Seite (b) dargestellt. Die abgebildeten Balken entsprechen den Mittelwerten aus circa 20 Zellen pro Glasplättchen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Zellisolationen ($n > 3$).

Die mRNA-Expression extrazellulärer Matrixproteine, wie z. B. von Kollagen I, wurde neben α -SMA im späteren Verlauf der Doktorarbeit als Fibrosemarker mit Hilfe von quantitativer Echtzeit PCR („reverse transcription quantitative PCR“ (RT-qPCR)) -Messungen analysiert.

3.1.1.2 Cre-Rekombinase induzierte Deletion von *STIM1*- und *STIM2*-Genen

Zur Produktion von *STIM1/2*-defizienten Zellen wurden Lungenfibroblasten mit rekombinanten Lentiviren, die Cre-Rekombinasen exprimierten, infiziert und nach erfolgreicher Deletion von *STIM1/2*-Genen für weitere Versuche verwendet. Die in Lentiviren produzierte Cre-Rekombinase führte jeweils zur Deletion des von beiden Seiten mit loxP-Sequenzen flankierten Exons im *STIM1*- oder *STIM2*-Gen, wodurch es zur Translation nicht funktioneller STIM-Proteine kam (siehe Abbildung 21).

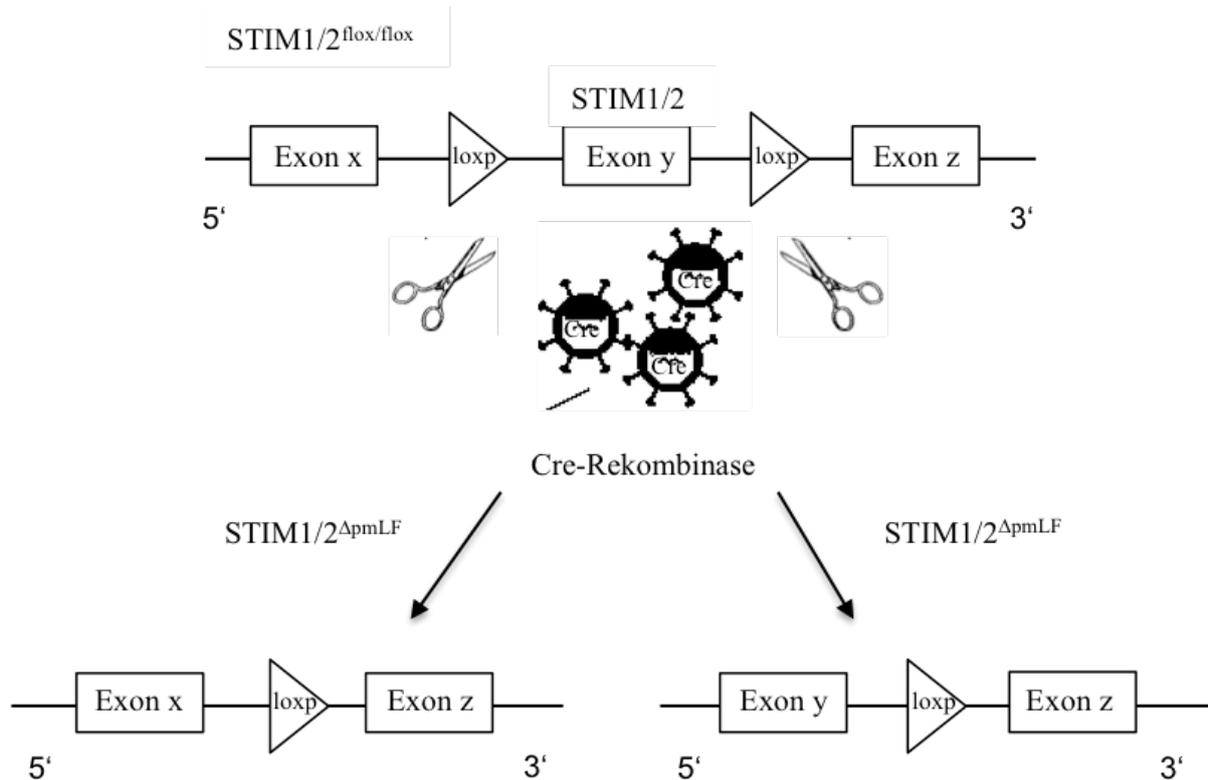


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Deletion des Exons auf dem *STIM1*- oder *STIM2*-Gen durch Cre-Rekombinase exprimierende Lentiviren. Exon y entspricht entweder Exon 2 auf dem *STIM1*-Gen oder dem Exon 3 auf dem *STIM2*-Gen. Loxp-Erkennungsstellen flankieren das jeweilige Exon. Die Cre-Rekombinase erkennt die loxp-Sequenz und schneidet das flankierte Exon y aus. Dadurch kommt es zur Produktion von *STIM1/2*-defizienten pmLF ($STIM1/2^{\Delta pmLF}$) mit nicht funktionellen STIM-Proteinen.

Die isolierte, genomische DNA der infizierten Zellen wurde mittels PCR und spezifischer Oligonukleotide sowie anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf eine erfolgreiche Deletion des codierenden Exons im *STIM1*- und *STIM2*-Gen überprüft. Abbildung 22a zeigt ein repräsentatives Agarosegel mit einem charakteristischen PCR-Produkt für $STIM1^{loxP/fl}$ -pmLF mit einer Größe von 399 Basenpaaren (Bp) sowie ein DNA-Fragment von 348 Bp für die Wt-pmLF. Auf dem zweiten repräsentativen Gel in Abbildung 22b wurden charakteristische PCR-Produkte mit einer Größe von 335 Bp für $STIM2^{loxP/fl}$ -pmLF und von 262 Bp für Wt-pmLF aufgetrennt. Nach erfolgreicher Deletion der *STIM1*- und *STIM2*-Exone durch die Cre-Rekombinase wurde mit spezifischen Oligonukleotiden in $STIM1^{\Delta}$ -pmLF ein 580 Bp großes und in $STIM2^{\Delta}$ -pmLF ein 683 Bp großes PCR-Produkt detektiert. Durch dieses Verfahren konnte eine erfolgreiche Deletion des Exons 2 auf dem *STIM1*-Gen sowie des Exons 3 auf dem *STIM2*-Gen überprüft und nachgewiesen werden.

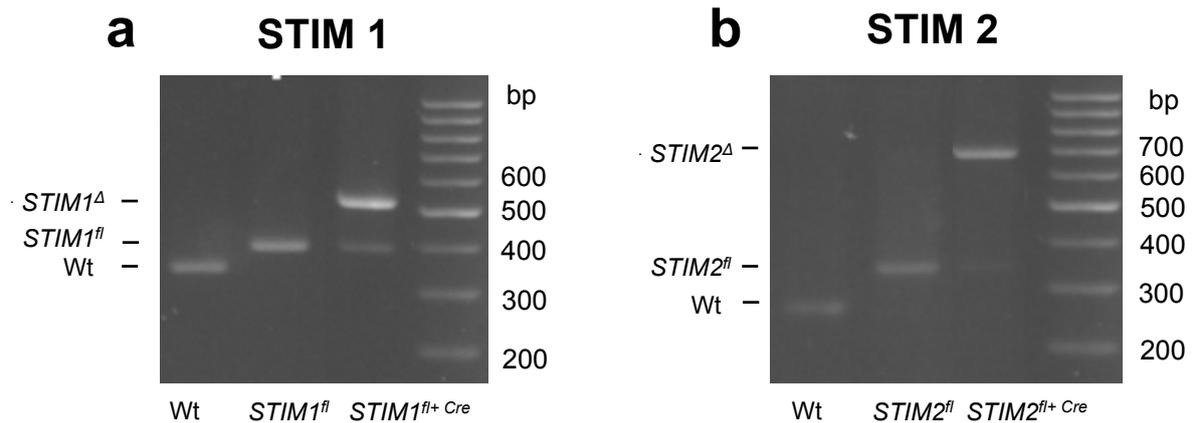


Abbildung 22: Repräsentative Bilder von Agarosegelen mit aufgetrennten DNA-Fragmenten als Nachweis der Deletion der codierenden Exone in *STIM1*- und *STIM2*-Genen durch die Cre-Rekombinase. Genomische DNA wurde aus Wildtyp (Wt)-, *STIM1/2*^{flx/flx}- und *STIM1/2*^{flx/flx}-pmLF, die mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren infiziert wurden, isoliert und mittels genomischer PCR mit spezifischen Oligonukleotiden (siehe Tabelle 14) amplifiziert. Die entstandenen PCR-Fragmente wurden anschließend auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen. a) Aufgetrennte DNA-Fragmente aus Wt-, *STIM1*^{fl}- und *STIM1*^{fl+Cre}-pmLF-DNA-Proben. b) Aufgetrennte PCR-Fragmente aus Wt-, *STIM2*^{fl}- und *STIM2*^{fl+Cre}-pmLF-DNA-Proben. DNA-Größenmarker wurden seitlich in Basenpaaren (bp) angegeben. Größe der erhaltenen DNA-Fragmente: *STIM1*: Wt ~348 bp, *STIM1*^{fl}~399 bp und *STIM1*^{fl+Cre}~580 bp; *STIM2*: Wt~262 bp, *STIM2*^{fl}~335 bp und *STIM2*^{fl+Cre}~683 bp.

3.1.1.3 Genexpressions-Analyse

Neben der Identifizierung wurden Lungenfibroblasten und PASMCMC mit Hilfe von *RT-qPCR*-Messungen auf *STIM*-, *Orai*- und *TRPC*-mRNA-Expression untersucht. Dies diente einerseits der Bestätigung des jeweiligen Genotyps und ermöglichte andererseits die Identifikation möglicher Kompensationsmechanismen. Die Analyse von *TRPC*-Kanälen in PASMCMC zeigte eine deutliche Expression von *TRPC1*- und *TRPC6*-Kanälen, während *TRPC3*-Proteine nur gering exprimiert wurden [181]. Ein ähnliches Expressionsmuster ergab sich auch für Lungenfibroblasten [190], sodass *TRPC1/6*- sowie *TRPC1/3/6*-defiziente Mäuse für die Experimente zur Untersuchung der Rolle von *TRPC*-Kanälen im Rezeptor- und Speicheroperierten Ca^{2+} -Einstrom verwendet wurden. Neben der *TRPC*-Expression wurden ebenfalls *STIM(1-2)*- und *Orai(1-3)*-mRNA in PASMCMC und Lungenfibroblasten analysiert. Als Referenz- oder Haushalts-Gen diente β -Aktin. Im Vergleich zu Wt-PASMCMC ergab die Genexpressionsanalyse von *STIM*- und *Orai*-mRNA weder für *TRPC1/6*^{-/-}- noch für *TRPC1/3/6*^{-/-}-PASMCMC kompensatorische Regulationen auf mRNA-Ebene (siehe Abbildung 23).

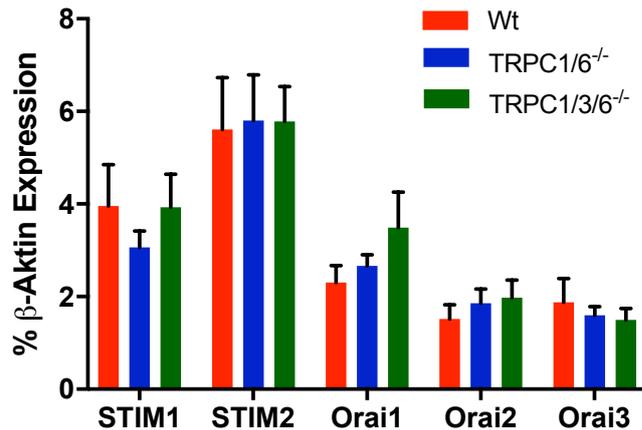


Abbildung 23: Genexpressionsanalyse von STIM1-2 und Orai1-3 in PASM. Aus Wt-, TRPC1/6^{-/-}- und TRPC1/3/6^{-/-}-PASM isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben, durch Zugabe spezifischer Oligonukleotide (Tabelle 13) amplifiziert und mittels „reverse transcription quantitative PCR“ (RT-qPCR) analysiert. Die mRNA-Expressionen wurden in Abhängigkeit von β-Aktin als relative Genexpression in % angegeben. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“ = SEM) aus mindestens drei voneinander unabhängigen PASM-Isolationen (n>3).

Währenddessen zeigte die Analyse der STIM(1-2)- und Orai(1-3)-mRNA-Genexpression in primären Lungenfibroblasten andere Resultate. Im Vergleich zu den Kontrollen aus Wt- und Wt Cre -pmLF, welche mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren infiziert wurden, wiesen TRPC1/3/6^{-/-}-pmLF keine signifikanten Veränderungen von STIM- und Orai-mRNA-Level auf. Wie in Abbildung 24 dargestellt wurden für TRPC1/6^{-/-}-pmLF lediglich gegenüber den Kontrollzellen eine signifikante Veränderung in der mRNA-Expression von STIM2 entdeckt. Die Analyse der Orai-Expressionen ergab für die beiden TRPC-defizienten Genotypen keine weiteren Veränderungen. Wie erwartet war die STIM1/2-mRNA-Expression in STIM1/2-defizienten pmLF signifikant reduziert.

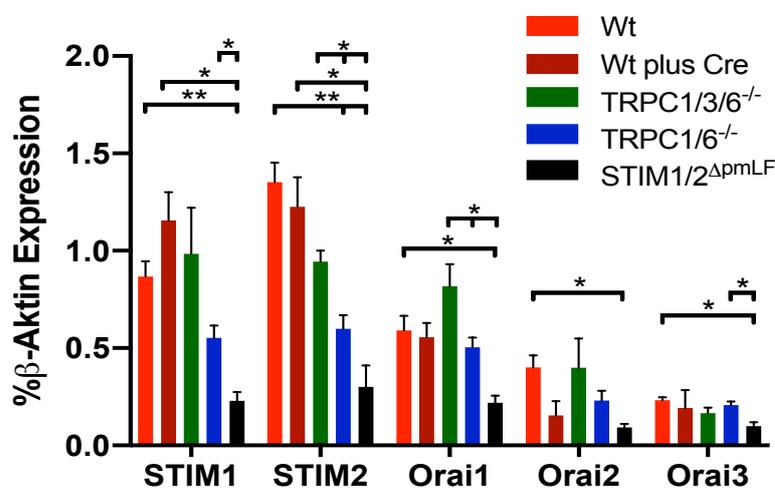


Abbildung 24: Genexpressionsanalyse von STIM1-2 und Orai1-3 in primären Lungenfibroblasten (pmLF). Aus Wt-, Wt Cre-, TRPC1/6^{-/-}-, TRPC1/3/6^{-/-}-pmLF und STIM1/2-defizienten pmLF isolierte RNA wurde in cDNA

umgeschrieben, durch Zugabe spezifischer Oligonukleotide (Tabelle 13) amplifiziert und mittels *reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)* analysiert. Die mRNA-Expression wurde in Abhängigkeit von β -Aktin als relative Genexpression angegeben. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts („*standard error of the mean*“ = *SEM*) aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten pmLF Isolationen ($n > 3$).

Neben STIM und Orai wurde auch die Expression von TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 und TRPC7 in STIM1/2-defizienten pmLF sowie in deren Wt-Kontrollzellen untersucht. Hierbei konnten keine signifikanten Veränderungen in der Expression der TRPC-mRNA zwischen STIM1/2 ^{Δ pmLF}- und den Wt-pmLF-Kontrollen festgestellt werden. Zudem wurde die Expression von TRPC1-6 in TRPC1/6^{-/-}-pmLF im Vergleich zu Wt-Zellen analysiert. Wie erwartet, waren in TRPC1/6^{-/-}-pmLF sowohl TRPC1- als auch TRPC6-mRNA im Verhältnis zur Wt-Kontrolle nur in sehr geringen Mengen vorhanden (siehe Abbildung 25).

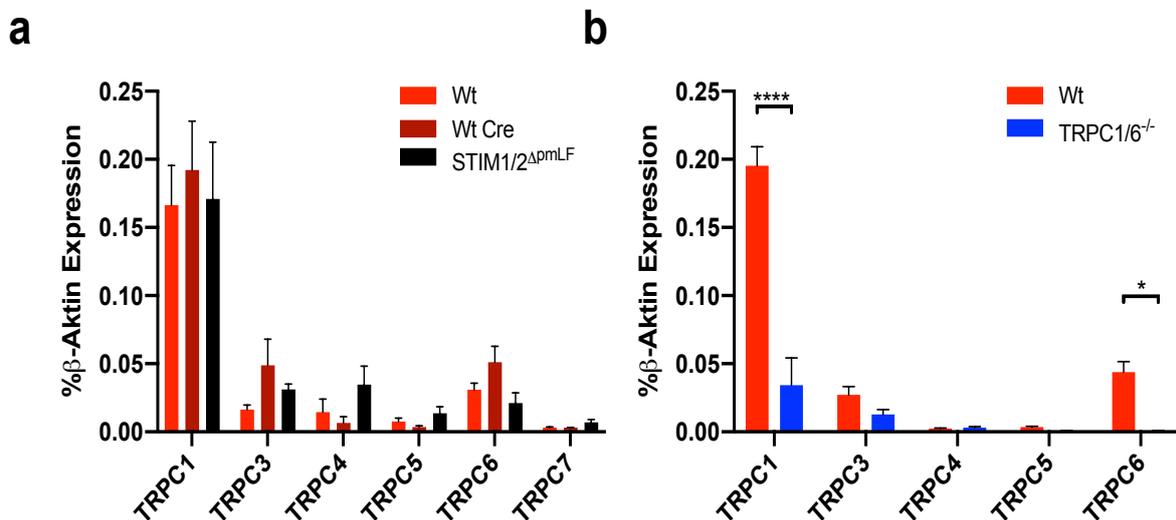


Abbildung 25: Genexpressionsanalyse von TRPC1- bis TRPC7-mRNA in primären Lungenfibroblasten (pmLF). Aus Wt-, Wt Cre-, TRPC1/6^{-/-}-pmLF und STIM1/2 ^{Δ pmLF}-pmLF isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben, durch Zugabe spezifischer Oligonukleotide (Tabelle 13) amplifiziert und mittels *reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)* analysiert. Die mRNA-Expression wurde in Abhängigkeit von β -Aktin als relative Genexpression angegeben. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts („*standard error of the mean*“ = *SEM*) aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten pmLF Isolationen ($n > 5$).

3.1.1.4 Analyse der Proteinexpression

Zusätzlich wurden die Expressionen von STIM1- und STIM2-Proteinen untersucht, um mögliche Kompensationsmechanismen in den für die Versuche verwendeten Lungenfibroblasten zu identifizieren. Dazu wurden Proteinlysate aus STIM1/2-, TRPC1/6-defizienten pmLF sowie STIM1/2^{fl ox /fl ox} - und Wt-pmLF hergestellt und nach der Auftrennung durch SDS-Gelelektrophorese mittels *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern analysiert (siehe Abbildung 26). In Wt-Proteinlysaten konnte sowohl eine Bande für STIM1-

bei 95 kDa als auch für STIM2-Proteine bei 85 kDa mit den jeweiligen Antikörpern detektiert werden. In TRPC1/3/6-defizienten Proteinlysaten ergaben sich für STIM2-Proteine keine signifikanten Veränderungen. In STIM1/2-defizienten Proteinlysaten konnte weder eine Expression von STIM1 noch von STIM2 auf Proteinebene detektiert werden. Als Ladekontrolle diente β -Aktin mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. Während der Gehalt an Orai2-Proteinen in allen pmLF-Genotypen unverändert war, konnten für Orai1- und Orai3-Proteine keine geeigneten Antikörper für einen Vergleich der Proteinexpression gefunden werden (unveröffentlichte Daten). Die entsprechenden Analysen der TRPC1/6-defizienten pmLF im Vergleich zu den Wt-pmLF wurden von Fabienne Geiger durchgeführt und ausgewertet.

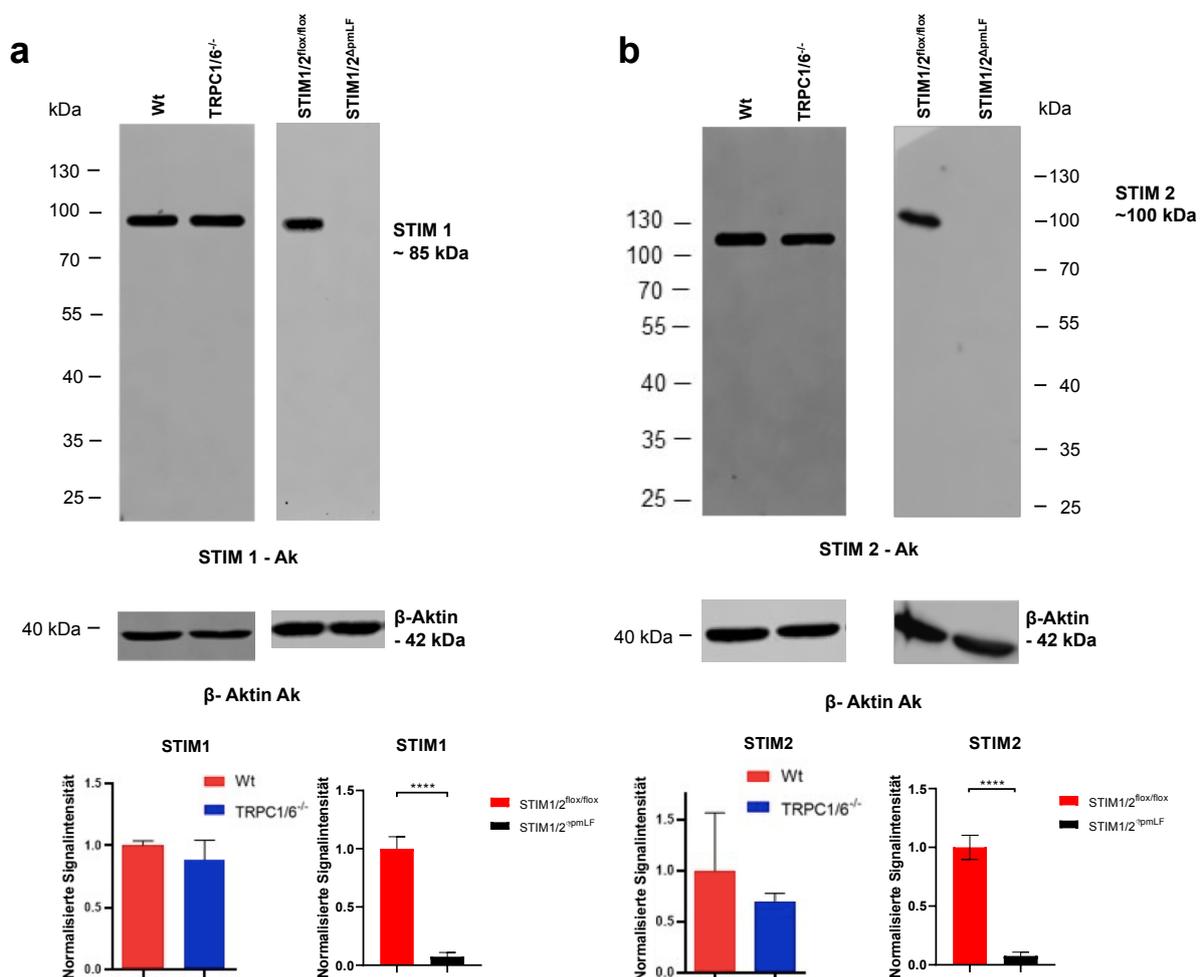


Abbildung 26: Nachweis der Protein-Expression von STIM1 und STIM2 in primären Lungenfibroblasten (pmLF). Aufgetrennte Proteinlysate aus Wt-, STIM1/2^{flox/flox}-pmLF sowie STIM1/2- und TRPC1/6-defizienten pmLF wurden mittels *Western Blot* und unter Verwendung von anti-STIM1- (a) und anti-STIM2- (b) Antikörpern (Ak) analysiert. Repräsentative *Blots* wurden mit den dazugehörigen Ladekontrollen abgebildet. Signalintensitäten wurden auf die Ladekontrolle (β -Aktin) normiert, mit der Expression der jeweiligen Kontrolle verglichen und anschließend als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts („*standard error of the mean*“ = SEM) dargestellt. Größenmarker sind jeweils auf der linken Seite in kDa angegeben. Der Vergleich zwischen Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF wurde von

Fabienne Geiger durchgeführt und ausgewertet. Proteinlysate stammen aus jeweils mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten pmLF-Isolationen. (n>3)

3.1.2 Messung des Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstroms (ROCE) in pmLF

Zur Untersuchung des intrazellulären Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstroms (ROCE) in Lungenfibroblasten (pmLF) wurden die Zellen zunächst mit Fura-2-AM beladen und mittels „*Calcium Imaging*“ Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vermessen. Um den ROCE zu initiieren wurde entweder 4 μM Endothelin-1 (Et-1) oder 50 μM Lysophosphatidsäure (LPA) in Ca^{2+} -haltiger HBSS-Messlösung auf die Zellen gegeben. Endothelin-1 aktiviert Endothelin-Rezeptoren während LPA an LPA-Rezeptoren bindet. Beide Rezeptoren stimulieren unter anderem G_q -Proteine [217], wodurch es zu einer Phospholipase C -vermittelten Produktion von Diacylglycerin (DAG) aus Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) kommt. DAG kann wiederum heteromere TRPC-Kanalkomplexe mit TRPC6-Monomeren öffnen und einen ROCE auslösen. Die absoluten Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden als Fläche unter der Kurve („*area under the curve*“ = *AUC*) quantifiziert.

In Abbildung 27a zeigte der mit Et-1 initiierte ROCE in STIM1/2-defizienten pmLF keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Wt-pmLF, welche mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren infiziert wurden (Wt Cre -pmLF), und Wt-pmLF ohne Cre-Rekombinase (Wt-pmLF). Im Gegensatz dazu war der ROCE in TRPC1/6- und TRPC1/3/6-defizienten pmLF gegenüber den Wt-Kontrollzellen deutlich reduziert (Abbildung 27b und c). Die Quantifizierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgte durch die Bestimmung der Maxima und Berechnung der *AUC* nach der Applikation von Endothelin-1 innerhalb der ersten 2,5 min sowie bis zum Ende der Messung bei 4,5 min (Abbildung 27d und e). Anhand der berechneten Maxima und der Gesamtflächen (*AUC*) unter den Kurven zeigten TRPC1/6- sowie TRPC1/3/6-defiziente pmLF im Vergleich zu Wt- und Wt Cre -pmLF geringere Zunahmen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nach Rezeptoraktivierung (siehe Abbildung 27). Lungenfibroblasten, die sowohl STIM1/2- als auch TRPC1/6-defizient waren, zeigten im Verhältnis zu Wt-pmLF ebenfalls eine reduzierte *AUC*. Diese Reduktion war jedoch nicht signifikant unterschiedlich zwischen TRPC1/6^{-/-}- und STIM1/2^{ΔpmLF}TRPC1/6^{-/-}-pmLF. Weder Wt- und Wt Cre -pmLF Kontrollzellen noch STIM1/2-defizienten pmLF zeigten signifikanten Veränderungen des ROCE.

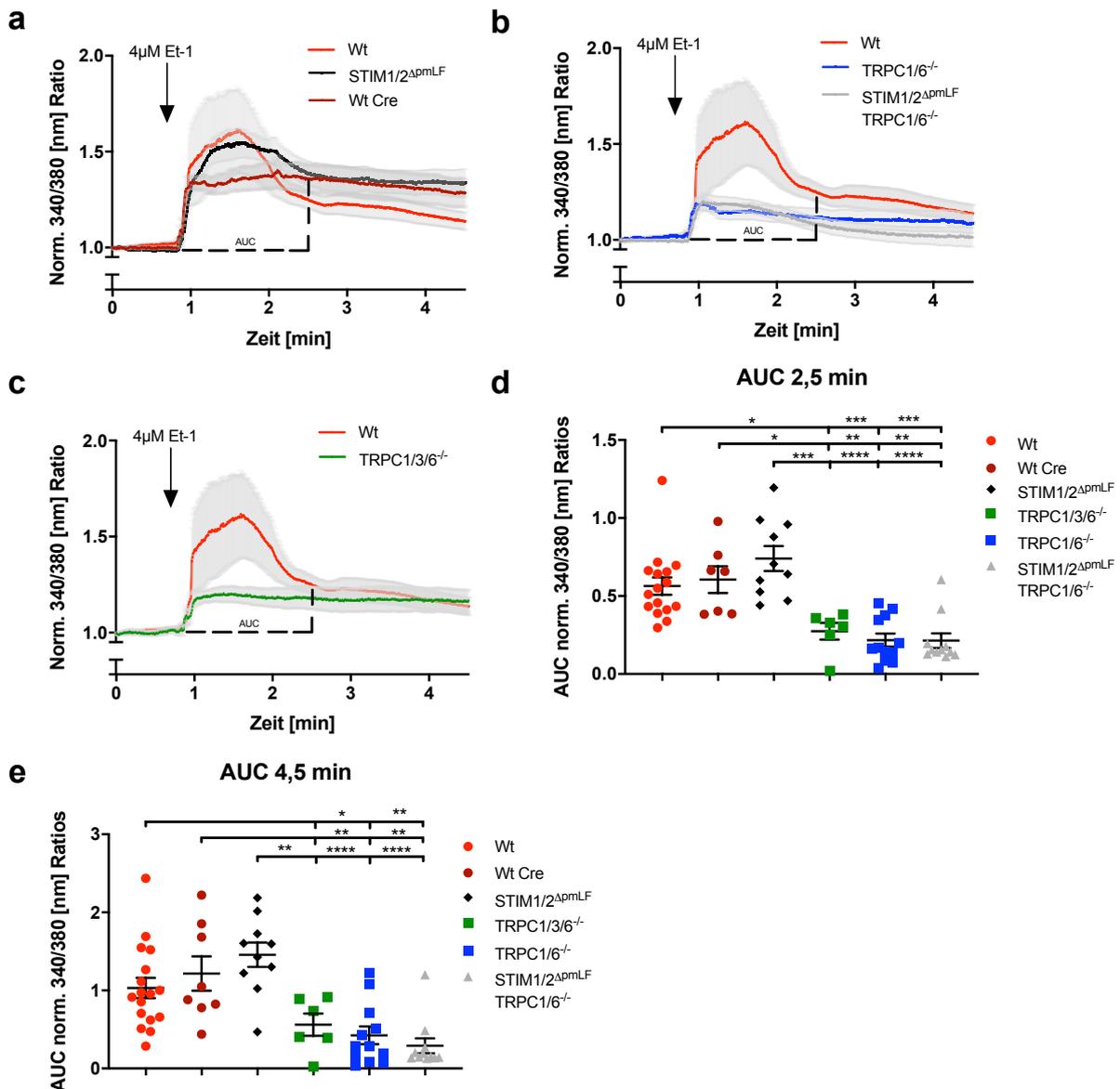


Abbildung 27: Messung des Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstroms in STIM1/2^{ΔpmLF}- (a), TRPC1/6^{-/-}, STIM1/2^ΔTRPC1/6^{-/-} (b) sowie TRPC1/3/6^{-/-}-pmLF (c) im Vergleich zu Wt-pmLF und mit Cre-Rekombinase-exprimierenden, Lentiviren infizierten Wt-pmLF (Wt Cre). PmLF wurden mit Fura-2-AM beladen und mittels *Calcium Imaging* nach Applikation von Endothelin-1 (Et-1) vermessen. Der Quotient der Messungen bei 340 nm und 380 nm wurde auf die Initialwerte der jeweils gemessenen Zellen normiert und als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“ = SEM) dargestellt. Die Mittelwerte bezogen sich auf mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche aus mindestens drei pmLF-Isolationen ($n > 3$). Zur Quantifizierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) nach circa 2,5 und 4,5 Minuten (min) (d,e) berechnet und dargestellt. Ein Punkt entspricht dem Mittelwert aus mindestens 20 gemessenen Fibroblasten. Pro Zellisolation wurden mindestens drei Messungen durchgeführt.

In gleicher Weise wurde der ROCE in mit Fura-2-AM beladenen Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF nach Applikation von LPA untersucht. TRPC1/6-defiziente pmLF zeigten gegenüber Wt-pmLF sowohl eine abgeflachte intrazelluläre Ca^{2+} -Kurve als auch eine signifikant reduzierte Fläche unter der Kurve (AUC) (Abbildung 28).

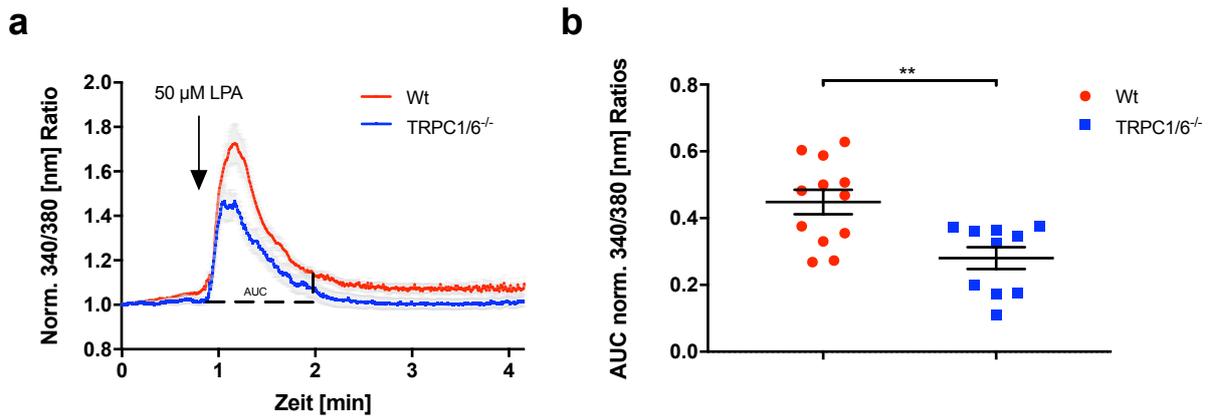


Abbildung 28: Messung des LPA-initiierten Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstroms in pmLF. Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF wurden mit Fura-2-AM beladen und nach Applikation von 50 μM LPA mittels *Calcium Imaging* bei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm vermessen. Der Quotient der Messungen bei 340 nm und 380 nm wurde auf die Initialwerte der jeweils gemessenen Zellen normiert und als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts („*standard error of the mean*“ = SEM) dargestellt (a). Die Mittelwerte bezogen sich auf mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen aus mindestens drei pmLF-Isolationen ($n > 3$). Zur Quantifizierung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) nach LPA-Applikation (b) berechnet und dargestellt. Ein Punkt entspricht dem Mittelwert aus mindestens 20 gemessenen Fibroblasten. Pro Zellisolation wurden mindestens drei Messungen durchgeführt.

3.1.3 Messungen des Ca^{2+} -Einstroms nach Entleerung der Ca^{2+} -Speicher durch Endothelin-1 (Et-1)

Zur weiteren Untersuchung des Ca^{2+} -Einstroms in TRPC1/6^{-/-}- und Wt-pmLF wurden die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen nach Entleerung der Ca^{2+} -Speicher durch 4 μM Endothelin 1 (Et-1) unter Applikation eines Ca^{2+} -Chelators (EGTA) und nach Zugabe von 2 mM CaCl_2 gemessen. Die Durchführung der Messungen erfolgte ebenfalls unter Verwendung der „*Calcium Imaging*“-Methode (siehe 2.2.7.1) und mit Hilfe des Ca^{2+} -Indikators Fura-2-AM. Die Messung fand in Ca^{2+} -freier HBSS-Lösung mit 0,5 mM EGTA-Zusatz statt, um das extrazelluläre Ca^{2+} zu binden. Die berechneten absoluten Ca^{2+} -Konzentrationen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind in Abbildung 29 zum einen als Messkurven und zum anderen als quantifizierte Ca^{2+} -Signale in Form der „*Area under the curve*“ (AUC), sowohl nach Zugabe von Et-1 als auch nach Applikation von CaCl_2 , graphisch dargestellt. Hierbei kam es nach Speicherentleerung durch Et-1 zunächst zu keinen signifikanten Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zwischen Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF. Nach Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} zeigte sich in TRPC1/6-defizienten pmLF jedoch ein signifikant reduzierter Ca^{2+} -Einstrom im Vergleich zu den Wt-Kontrollzellen.

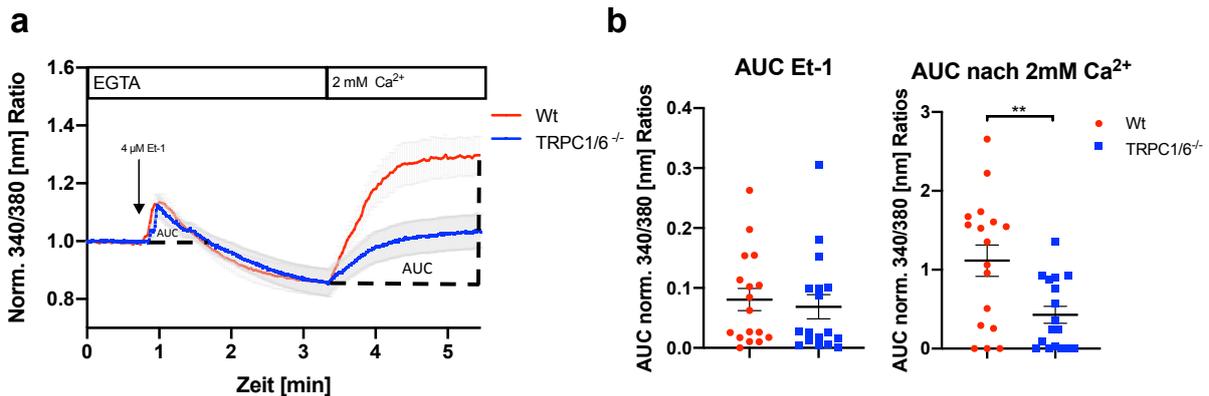


Abbildung 29: Rezeptor-operierter Ca^{2+} -Einstrom in pmLF nach Speicherentleerung. Mit Fura-2-AM beladene Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF wurden in Ca^{2+} -freier HBSS-Lösung mit 0,5 mM EGTA-Zusatz mittels *Calcium Imaging* bei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm vermessen. Nach Speicherentleerung mit 4 μM Et-1 wurden 2 mM CaCl_2 hinzugegeben. Aufgezeichnete Fluoreszenzsignale wurden auf den jeweiligen Ausgangswert normiert, als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts („*standard error of the mean*“ = SEM) der 340/380 Ratio berechnet und gegen die Zeit aufgetragen (a). Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen aus jeweils fünf unterschiedlichen pmLF-Zellisolationen ($n=5$). Die Flächen unter den Kurven (AUC) der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen wurden jeweils nach der Zugabe von Et-1 und CaCl_2 ermittelt (b). Ein Punkt entspricht dem Mittelwert aus mindestens 20 gemessenen Fibroblasten. Pro Zellisolation wurden mindestens drei Messungen durchgeführt.

3.1.4 Quantifizierung der internen Ca^{2+} -Speicher in pmLF

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Ca^{2+} -Konzentrationen der internen Ca^{2+} -Speicher in Lungenfibroblasten (pmLF) untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit Fura-2-FF beladen und die Speicher durch die Zugabe von 2 μM Thapsigargin (Tg) entleert. Die Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration in den internen Ca^{2+} -Speichern wurde über die Zeit nach der Exzitation bei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm gemessen und als Quotient dargestellt. Neben der signifikant erhöhten Ca^{2+} -Konzentration in den internen Speichern der TRPC1/6^{-/-}-pmLF war der deutlich geringere Ca^{2+} -Gehalt in STIM1/2 ^{Δ pmLF}-pmLF im Vergleich zu den Kontrollzellen (Wt-pmLF und Wt Cre -Kontrollzellen, die zusätzlich mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren behandelt wurden) (Abbildung 30a) auffallend. Während es einerseits zu einem erhöhten Ca^{2+} -Ausstrom aus den internen Speichern in TRPC1/6^{-/-}-pmLF kam, zeigte sich andererseits ein reduzierter Ca^{2+} -Ausstrom aus den STIM1/2-defizienten pmLF. (Abbildung 30b). In den Kontrollzellen kam es zu keinen signifikanten Unterschieden. Um die geringere Bindungsaffinität von Fura-2-FF zu Ca^{2+} und die Eignung zur Quantifizierung von Ca^{2+} in internen Speichern zu überprüfen, wurden Fura-2-FF-beladene Zellen im konfokalen Mikroskop untersucht. Abbildung 30c zeigt die Quantifizierung des Ca^{2+} -Gehalts der internen Ca^{2+} -Speicher mit Fura-2-FF.

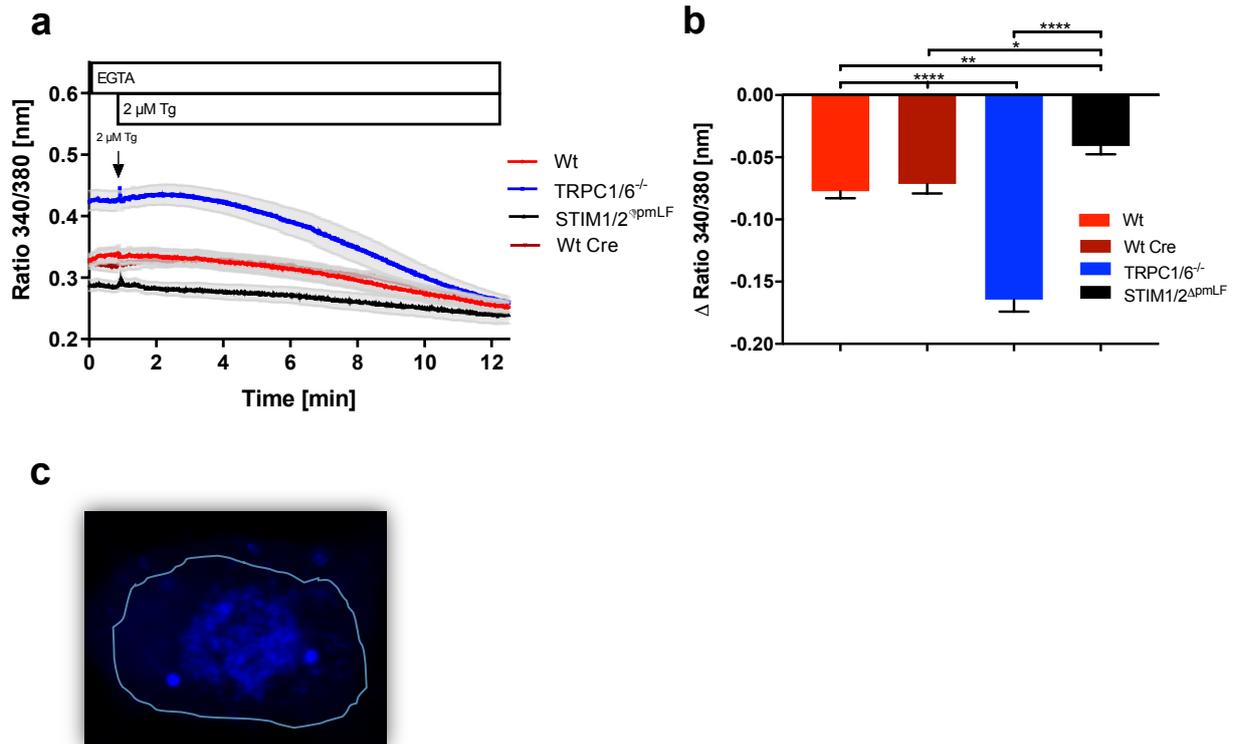


Abbildung 30: Messung und Quantifizierung der Ca^{2+} -Konzentrationen interner Ca^{2+} -Speicher in $\text{STIM1/2}^{\Delta\text{pmLF}}$ -, $\text{TRPC1/6}^{-/-}$ -pmLF und Wt-Kontrollzellen (Wt- und Wt-pmLF, die mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren infiziert wurden (Wt Cre -pmLF)). Mit Fura-2-FF AM beladene pmLF wurden in Ca^{2+} -freier HBSS-Lösung mit 0,5 mM EGTA-Zusatz mittels *Calcium Imaging* und nach Speicherentleerung mit Hilfe von 2 μM Thapsigargin (Tg) nach Exzitation bei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm vermessen. Aufgezeichnete Fluoreszenzsignale wurden auf den jeweiligen Ausgangswert normiert, als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“ = SEM) der 340/380 Ratio berechnet und gegen die Zeit aufgetragen (a). Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen aus jeweils mindestens drei unterschiedlichen pmLF-Zellisolationen ($n > 3$). Pro Zellisolation wurden mindestens drei Messungen mit mindestens 20 Zellen verwendet. Ca^{2+} -Konzentrationen der ER-Speicher wurden durch die Differenz der Ratio340/380 bei Beginn der Messung (0 min) und bei Messende (12,5 min) quantifiziert (b). c) Aufnahme einer mit Fura-2-FF beladenen Zelle im konfokalen Lasermikroskop. Die blau gefärbten Regionen repräsentieren an Fura-2-FF gebundene Ca^{2+} -Ionen in internen Speichern.

3.1.5 Analyse des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) in pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF)

Zur Analyse des SOCE wurden PASMC und pmLF mit Fura-2-AM beladen und mit 0,5 mM EGTA in HBSS ohne Ca^{2+} vermessen. Nach der Entleerung der Ca^{2+} -Speicher durch 1 μM Thapsigargin wurden 2 mM CaCl_2 hinzugegeben, um einen Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom zu generieren. Anhand der Messungen konnte weder ein signifikanter Unterschied zwischen Wt- und $\text{TRPC1/6}^{-/-}$ -PASMC noch zwischen Wt- und $\text{TRPC1/3/6}^{-/-}$ -PASMC festgestellt werden (Abbildung 31a und b). In Übereinstimmung mit den Messungen zeigten auch die quantifizierten Flächen unter der Kurve (AUC) der gemessenen Ca^{2+} -

Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen TRPC-defizienten PASMC und Wt-Kontrollzellen (c). Die Experimente zur Quantifizierung des ROCE in PASMC wurden bereits von Diana Stickel durchgeführt und in ihrer Doktorarbeit zusammengestellt [203]. Wie erwartet zeigten TRPC1/3/6-defiziente PASMC, jedoch nicht STIM1/2-defiziente Zellen, einen signifikant reduzierten ROCE im Vergleich zu Wt-PASMC.

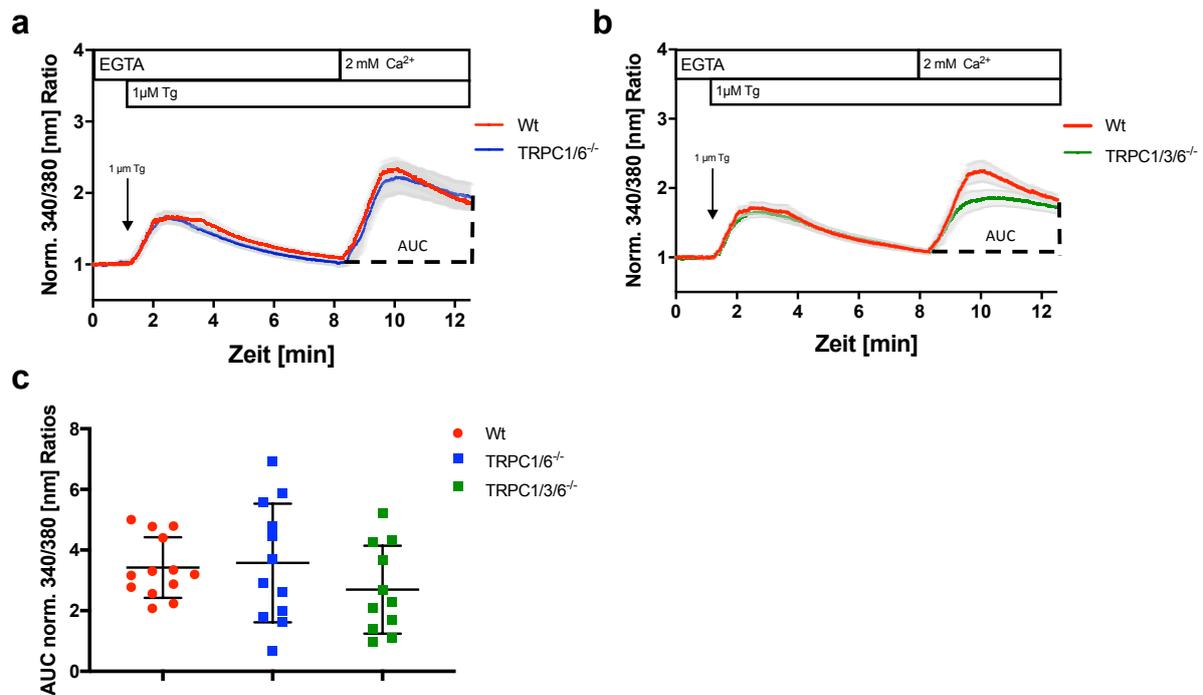


Abbildung 31: Speicher-operierter Ca²⁺-Einstrom in TRPC1/6^{-/-} (a) und TRPC1/3/6^{-/-}-PASMC (b) im Vergleich zu Wt-PASMC. Mit Fura-2-AM beladene Zellen wurden in Ca²⁺-freier HBSS-Lösung unter Zusatz von 0,5 mM EGTA mittels *Calcium Imaging* bei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm vermessen. Nach Speicherentleerung durch 1 µM Thapsigargin (Tg) wurden 2 mM CaCl₂ hinzugegeben. Aufgezeichnete Fluoreszenzsignale wurden auf den jeweiligen Ausgangswert normiert, als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“ = SEM) der 340/380 Ratio berechnet und gegen die Zeit aufgetragen (a, b). Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen aus jeweils drei unterschiedlichen PASMC-Isolationen (n>3). Die Flächen unter den Kurven (AUC) der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurden nach der Zugabe von CaCl₂ ermittelt (c). Ein Punkt entspricht dem Mittelwert aus mindestens 20 gemessenen PASMC. Pro Zellisolation wurden mindestens drei Messungen durchgeführt.

Die Ergebnisse der Messungen des SOCE in pmLF sind in Abbildung 32 dargestellt. Neben STIM1/2-, TRPC1/6- und TRPC1/3/6-defizienten pmLF wurden ebenso STIM1/2^{ΔpmLF}TRPC1/6^{-/-}-pmLF sowie Wt- und Wt Cre -pmLF, die mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren infiziert wurden, untersucht. Die Messungen des SOCE zeigten weder in TRPC1/6^{-/-}- noch in TRPC1/3/6^{-/-}-pmLF einen signifikanten Unterschied zu Wt-pmLF. Im Gegensatz dazu wiesen STIM1/2-defiziente pmLF einen deutlich reduzierten SOCE gegenüber den Wt Cre -Kontrollzellen auf. Interessanterweise zeigten

STIM1/2^{ΔpmLF}TRPC1/6^{-/-}-pmLF im Vergleich zu STIM1/2-defizienten pmLF keine weitere Reduktion des SOCE. Die Quantifizierung des Ca²⁺-Einstroms durch die Berechnung der Flächen unter der Kurve (*AUC*) konnte diese Beobachtungen bestätigen.

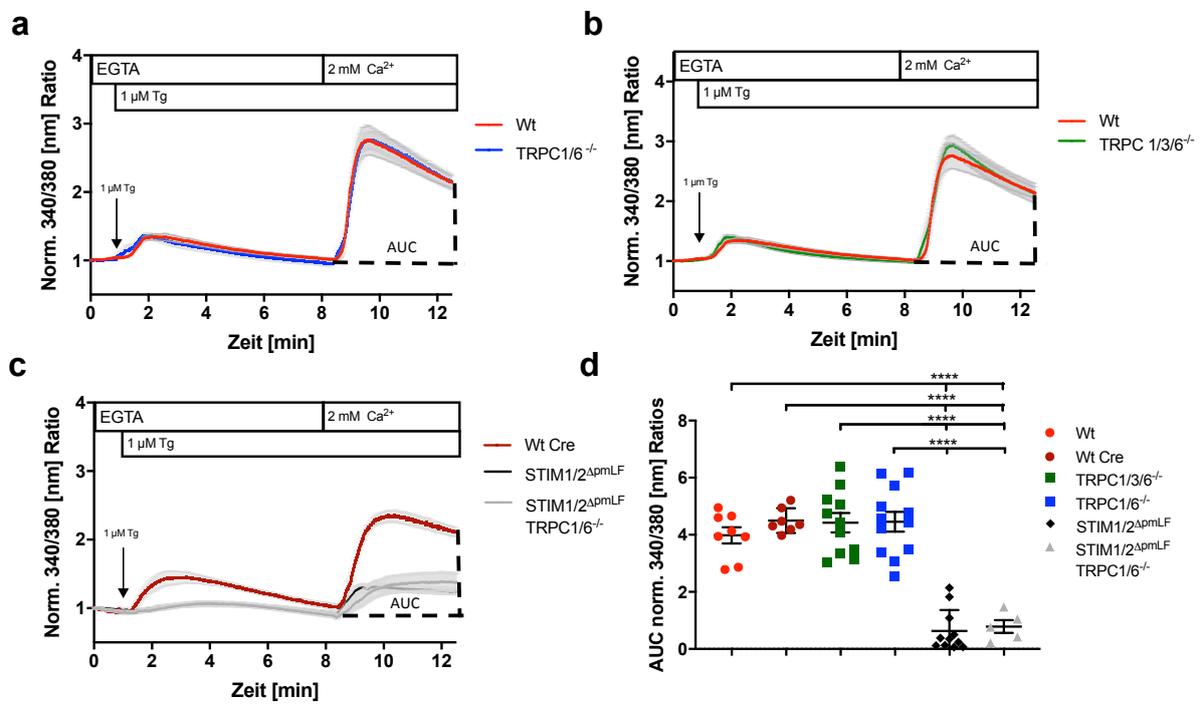


Abbildung 32: Analyse des Speicher-operierten Ca²⁺-Einstroms in pmLF. Mit Fura-2-AM beladene TRPC1/6^{-/-} (a), TRPC1/3/6^{-/-} (b), STIM1/2^{ΔpmLF}- und STIM1/2^{ΔpmLF}TRPC1/6^{-/-}-pmLF (c) wurden im Vergleich zu Wt-Kontrollzellen (Wt- und Wt-pmLF, die mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren infiziert wurden (Wt Cre -pmLF) in Ca²⁺-freier HBSS-Lösung mit 0,5 mM EGTA-Zusatz mittels *Calcium Imaging* bei Wellenlängen von 340 nm und 380 nm vermessen. Aufgezeichnete Fluoreszenzsignale wurden auf den jeweiligen Ausgangswert normiert, als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts („*standard error of the mean*“ = SEM) der 340/380 Ratio berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen aus jeweils mindestens drei unterschiedlichen pmLF-Zellisolationen (n>3). Die Flächen unter den Kurven (*AUC*) der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurden nach der Zugabe von CaCl₂ ermittelt (d). Ein Punkt entspricht dem Mittelwert aus mindestens 20 gemessenen Fibroblasten. Pro Zellisolation wurden mindestens drei Messungen durchgeführt.

Um die intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen weiter zu charakterisieren, wurde der initiale Ca²⁺-Einstrom sowie die Maxima der Kurven quantifiziert. Zur Berechnung der initialen Ca²⁺-Einstrome wurde die Steigung der Kurve durch die Bestimmung der 1. Ableitung bestimmt. Kurvenmaxima wurden durch die Analyse der Kurvenhöchstwerte berechnet (Abbildung 33). Die Auswertungen bestätigen die oben ermittelten Ergebnisse, da sowohl der initiale Ca²⁺-Einstrom als auch die Maxima signifikant in STIM1/2-defizienten pmLF und STIM1/2^{ΔpmLF}TRPC1/6^{-/-}-pmLF, jedoch nicht in TRPC1/6^{-/-}-pmLF, im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert sind.

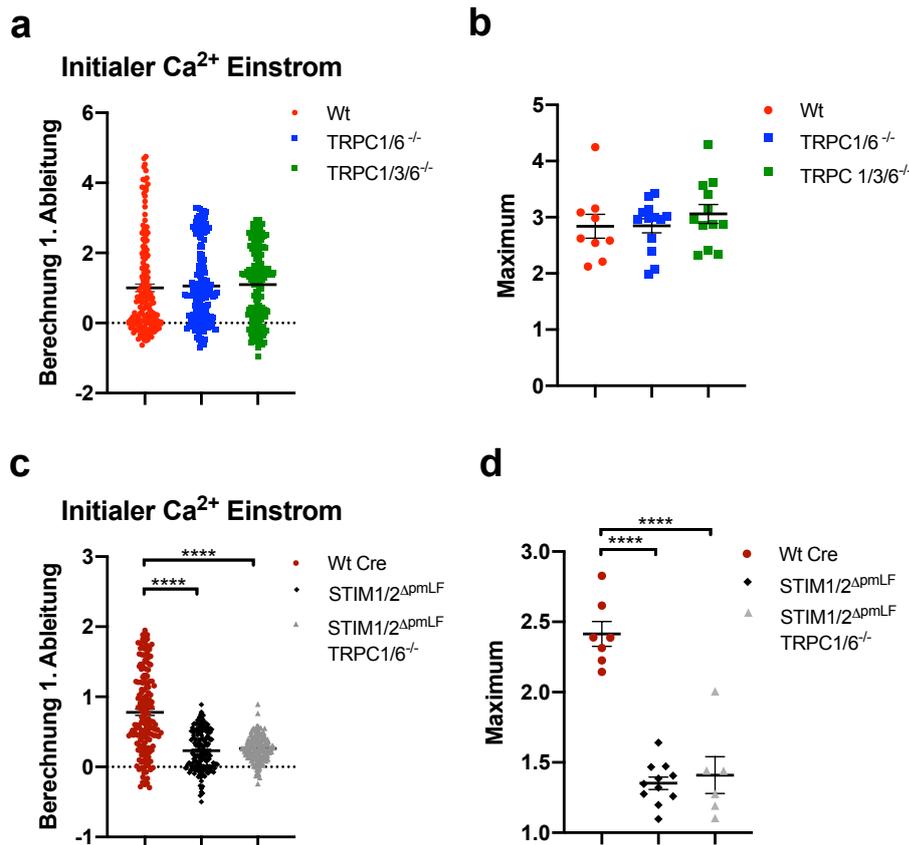


Abbildung 33: Charakterisierung des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) mittels Berechnung des initialen Ca^{2+} - Einstroms und der Kurvenmaxima. Die Messkurven der SOCE-Versuche aus Abbildung 29 in Wt-, $\text{TRPC1/6}^{-/-}$ - und $\text{TRPC1/3/6}^{-/-}$ -pmLF (a,b) sowie $\text{STIM1/2}^{\Delta\text{pmLF}}$ -, $\text{STIM1/2}^{\Delta\text{pmLF}}\text{TRPC1/6}^{-/-}$ - und Wt Cre -pmLF, die mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren infiziert wurden, wurden für die Analyse verwendet. Initiale Ca^{2+} -Einströme wurden durch die Bestimmung der 1. Ableitung der Kurve nach Zugabe von 2 mM CaCl_2 bis zum Kurvenmaximum berechnet (a,c). Maxima stammen aus der Analyse der Höchstwerte der jeweiligen, entstandenen Kurven nach Rekalzifizierung durch Applikation von CaCl_2 (b,d). Die berechneten Werte sind gemeinsam mit dem Standardfehler des Mittelwerts („*standard error of the mean*“ = SEM) abgebildet. (n>3)

3.2 Untersuchungen zur Rolle des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) und der Funktion von „classical transient receptor potential“ (TRPC)1/6-Kanälen in primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF)

3.2.1 Zellviabilität und -proliferation

Um die Rolle des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) und der TRPC1/6-Kanäle für die Zellfunktion in Lungenfibroblasten (pmLF) untersuchen zu können, wurde zunächst die Zellviabilität der einzelnen pmLF-Genotypen überprüft. Die gemessene Absorption des Zellüberstands wurde auf den jeweiligen Ausgangswert normiert und in Abbildung 34 als Viabilitätskurve dargestellt. Während die Analyse der $\text{TRPC1/6}^{-/-}$ -pmLF an Tag 6 und Tag 7 eine signifikant erhöhte Viabilitätsrate gegenüber den Wt-pmLF (a) zeigte, ergab die

Auswertung der Viabilitätsrate von STIM1/2-defizienten pmLF im Vergleich zu Wt Cre - pmLF, welche mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren infiziert waren, keinen signifikanter Unterschied (b). Es zeigte sich ebenfalls keine signifikante Veränderung zwischen Wt-pmLF, die entweder mit oder ohne Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren behandelt wurden (c). Dadurch konnte ein Einfluss der Infektion mit Lentiviren auf die Zellviabilität ausgeschlossen werden.

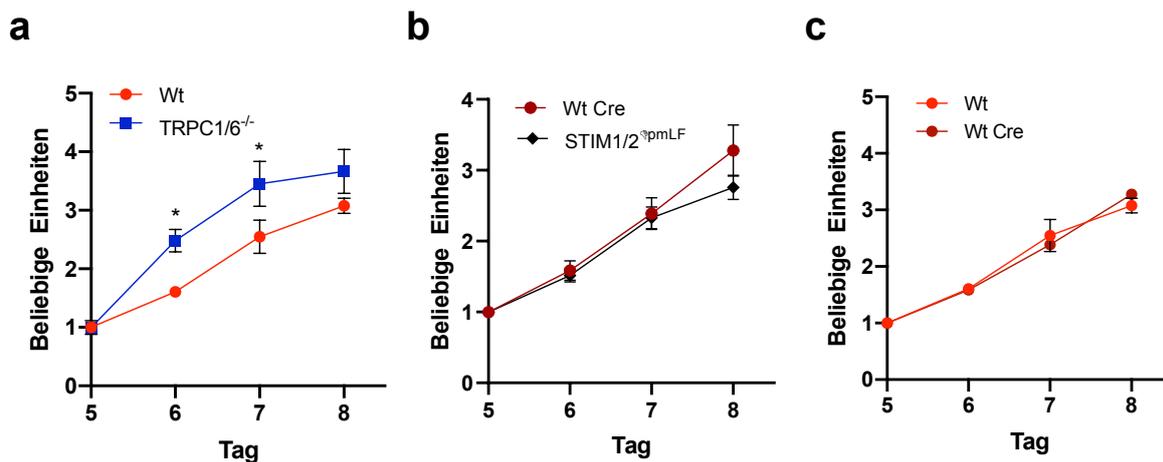


Abbildung 34: Zellviabilitäts-Kurven der Lungenfibroblasten unterschiedlicher Genotypen nach Analyse mit Hilfe des *Water soluble tetrazolium -1* (*WST*)-Assays. Neben Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF (a) wurden STIM1/2^{ΔpmLF}- und Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren) auf deren Viabilität untersucht. Am 5. Tag nach Infektion mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren der STIM1/2^{ΔpmLF}- und Wt Cre -pmLF wurde mit der Durchführung des *WST-1*-Assays begonnen. Der Zellüberstand der einzelnen Genotypen wurde alle 24 Stunden nach dreistündiger Inkubation mit *WST-1*-Reagenz kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm vermessen. Zellfreie Einheiten, die ausschließlich mit Zellmedium gefüllt waren, wurden ebenfalls mit *WST-1*-Reagenz für 3 Stunden inkubiert und als Leerwert verwendet. Die Messwerte wurden nach Abzug des Leerwerts auf die jeweiligen Ausgangswerte normiert und als Zellviabilität-Kurven +/- Standardfehler des Mittelwerts („*standard error of the mean*“ = SEM) dargestellt. Es wurden mindestens drei Messungen pro pmLF-Isolation aus mindestens drei Mäusen pro Genotyp analysiert und abgebildet (n>3).

Darüber hinaus wurde die Zellproliferation anhand der DNA-Syntheserate in pmLF mit Hilfe eines *Click-iT 5-ethynyl-2'-desoxyuridine* (*EdU*) *Imaging Kits* untersucht. EdU dient als Thymidin-Analogon, das während der DNA-Synthese als Base in diese einbaut und durch eine sogenannte „*Click-iT*“-Reaktion mit einem Fluorophor (Alexa Fluor 488) gekoppelt wird. Die Zellfärbungen wurden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen und mit den Ergebnissen in Abbildung 35 zusammengefasst. Anhand der Aufnahmen war zu erkennen, dass TRPC1/6^{-/-}-pmLF bereits nach drei Stunden Inkubation deutlich mehr EdU einbauten als Wt-pmLF. Währenddessen zeigten STIM1/2-defiziente pmLF im Verhältnis zu Wt Cre - Kontrollzellen deutlich weniger EdU-Einbau. Die DNA-Syntheserate wurde durch das Verhältnis von EdU-positiven Zellen zur Gesamtzahl der Zellen (mit Hoechst-Farbstoff

gefärbte Zellkerne) mit Hilfe der *ImageJ Software* quantifiziert und in Abbildung 36 dargestellt. Es bestätigte sich die Beobachtung, dass die DNA-Syntheseraten in TRPC1/6^{-/-}-pmLF Proben gegenüber Wt-Zellen signifikant erhöht und in STIM1/2-defizienten pmLF im Vergleich zu Wt Cre -pmLF signifikant vermindert waren.

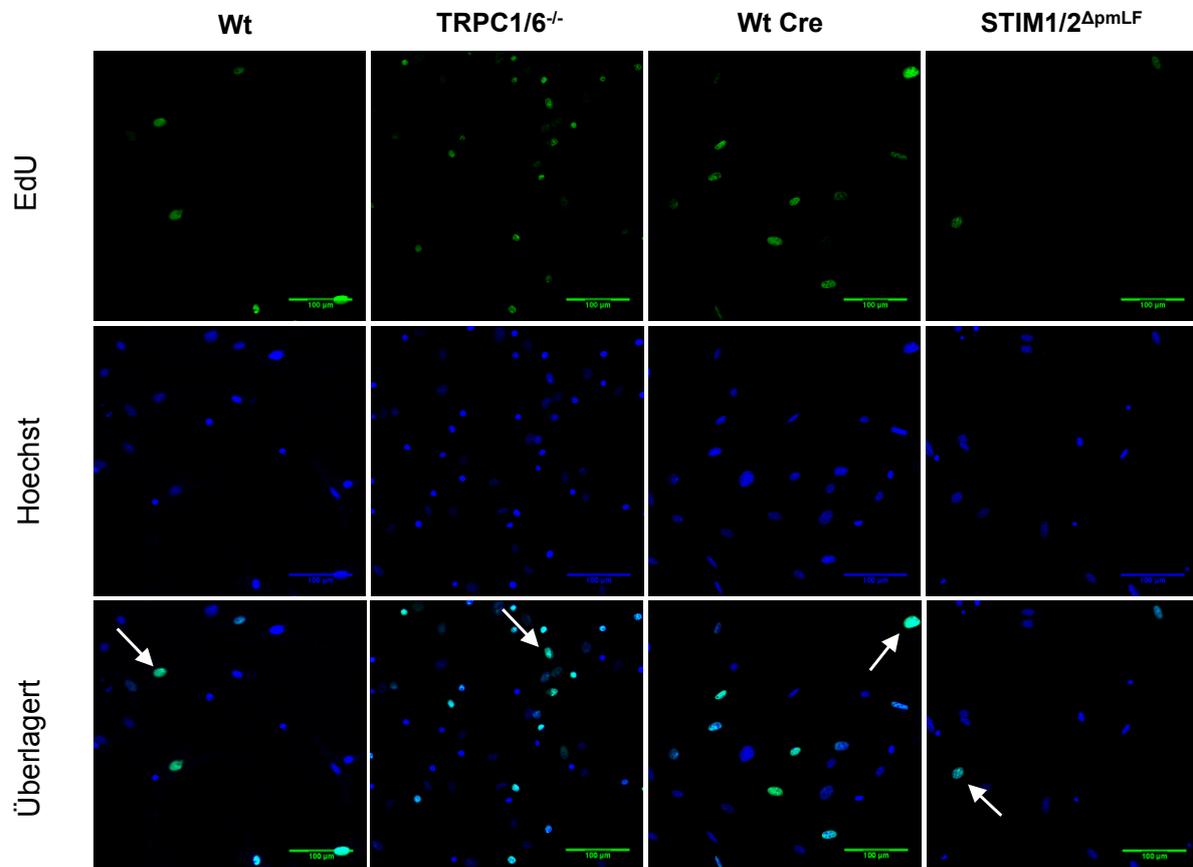


Abbildung 35: Repräsentative Bilder der mit EdU-(grün)-Fluoreszenz/ Hoechst-(blau)-Farbstoff gefärbten pmLF. Wt-, TRPC1/6^{-/-}-pmLF sowie STIM1/2-defiziente pmLF und Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektion mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren) wurden nach dreistündiger Inkubation mit EdU in Formaldehyd fixiert und mit Alexa Fluor 488 gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff (grün) über eine „Click-IT“-Reaktion gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff (blau) angefärbt und überlagerte Färbungen (grün) mittels *ImageJ Software* quantifiziert. Repräsentative Überlagerungen wurden mit Pfeilen markiert. Es wurden jeweils von mehr als drei pmLF-Isolationen pro Genotyp Bilder aufgenommen. (n>3) Der Messbalken markiert 100 µm.

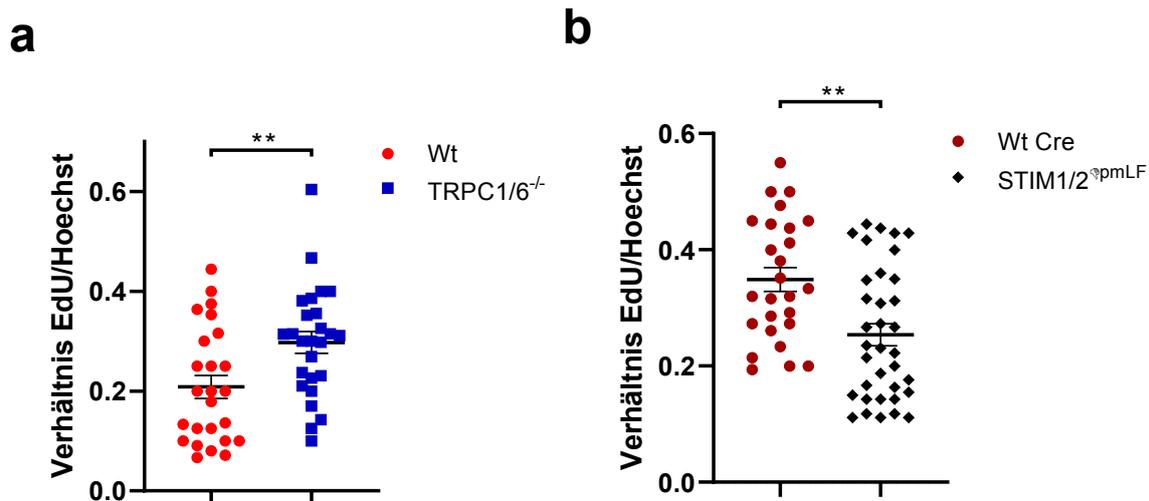


Abbildung 36: Quantifizierung der DNA-Syntheseraten durch Berechnung der EdU-Fluoreszenz im Verhältnis zu mit Hoechst-Farbstoff gefärbten pmLF-Zellkernen. Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF (a) sowie STIM1/2-defiziente pmLF (b) und Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren) wurden jeweils miteinander verglichen. Ein abgebildeter Punkt entspricht dem berechneten Mittelwert der EdU/Hoechst-Ratio +/- Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“ = SEM). Es wurden mindestens drei Messungen pro pmLF-Isolation aus mindestens drei Mäusen pro Genotyp analysiert und abgebildet. (n>3)

3.2.2 Zellmigration

Während einer Schädigung des Lungengewebes kommt es zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und einer Einwanderung von Immunzellen in das verletzte Gewebe. Lungenfibroblasten spielen während diesen Prozessen eine wichtige Rolle und tragen zur Wundheilung bei [218]. Um in diesem Zusammenhang eine mögliche Beteiligung des Speicher-operierten Ca²⁺-Einstroms (SOCE) und von TRPC1/6-Kanälen in Lungenfibroblasten (pmLF) untersuchen zu können, wurde die Migration von pmLF analysiert. Zur Bestimmung der Zellmigration von TRPC1/6- sowie STIM1/2-defizienten pmLF im Vergleich zu Wt- und Wt Cre -pmLF, welche mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren infiziert wurden, wurden 3-Kammer-Silikoneinsätze der Firma Ibidi verwendet. Die Quantifizierung der gemessenen Abstände zwischen den beiden Zellstreifen (Abbildung 37) ergab für TRPC1/6^{-/-}-pmLF eine vergleichsweise schnellere Migration in die Zelloücke als für Wt-pmLF. Jedoch kam es erst nach 24 Stunden zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Im Vergleich dazu zeigten STIM1/2-defiziente pmLF (Abbildung 38) eine deutlich verlangsamte Migration als Wt Cre -pmLF. Dieser Unterschied zeigte sich bereits nach 8 Stunden und wurde mit fortlaufender Zeit signifikant größer.

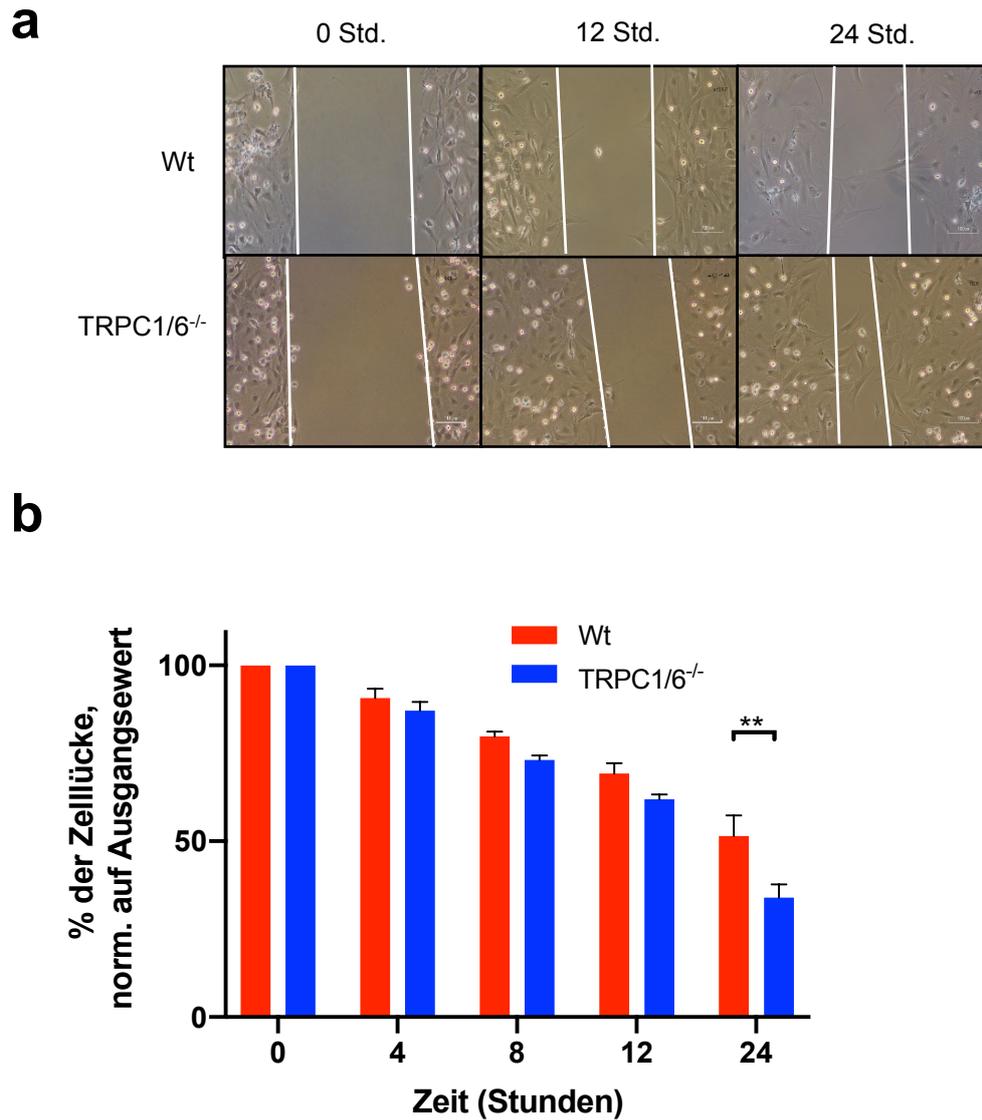


Abbildung 37: Repräsentative Bilder und Quantifizierung der Zellmigration in Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF. Die Fähigkeit von Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF eine zellfreie Lücke zu schließen wurde für 24 Stunden analysiert. (a) Aufnahmen von Phasenkontrastbilder des zellfreien Spalts nach jeweils vier Stunden. Repräsentative Bilder zeigen das jeweils typische Migrationsverhalten von Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF von 0 bis 24 Stunden nach Entfernung der Silikoneinsätze. Der Maßstab betrug 100 µm (b). Zur Quantifizierung wurde die Breite der zellfreien Lücke gemessen und auf den jeweiligen Ausgangswert normiert. Die Messungen sind als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“ = SEM) dargestellt. (n>3 pmLF-Isolationen aus mindestens 3 Mäusen)

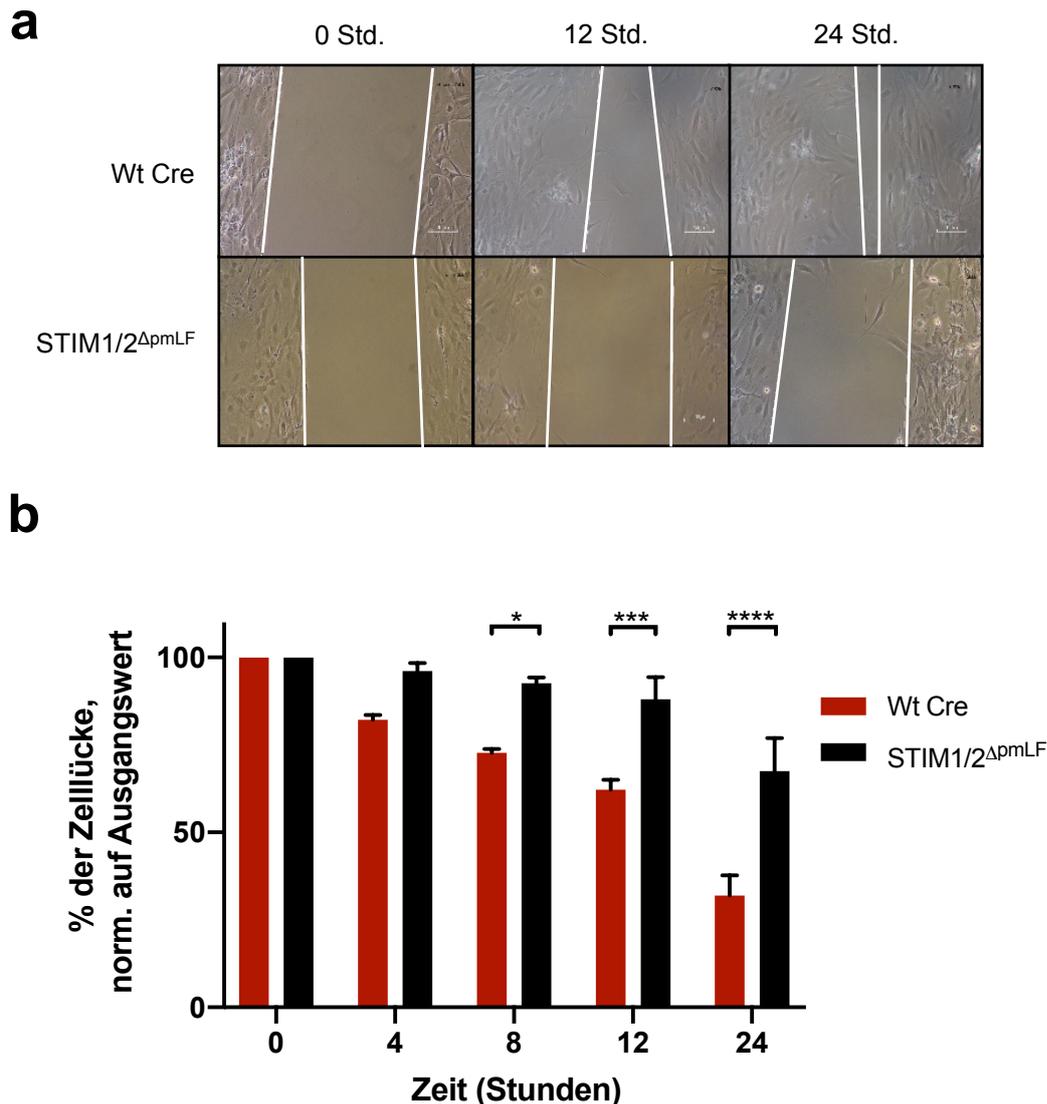


Abbildung 38: Repräsentative Bilder und Quantifizierung der Zellmigration in STIM1/2-defizienten pmLF im Vergleich zu Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren). Die Fähigkeit von STIM1/2-defizienten pmLF und Wt Cre -pmLF eine zellfreie Lücke zu schließen wurde für 24 Stunden analysiert. (a) Aufnahmen von Phasenkontrastbilder des zellfreien Spalts nach jeweils vier Stunden. Repräsentative Bilder zeigen das jeweils typische Migrationsverhalten von STIM1/2-defizienten pmLF im Vergleich zu Wt Cre -pmLF von 0 bis 24 Stunden nach Entfernung der Silikoneinsätze. Der Maßstab betrug 100 μ m (b). Zur Quantifizierung wurde die Breite der zellfreien Lücke gemessen, auf den jeweiligen Ausgangswert normiert und als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“ = SEM) dargestellt. (n>3 pmLF-Isolationen aus mindestens 3 Mäusen)

3.2.3 Quantifizierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor of activated T-cells“ (NFAT)

Zur weiteren Charakterisierung der Rolle des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) in pmLF wurde die Ca^{2+} -abhängige Translokation der Transkriptionsfaktoren NFATc1 und NFATc3 (für *nuclear factor of activated T-cells*) in den Zellkern untersucht. Dazu wurden

nukleäre Fraktionen von STIM1/2-defizienten pmLF und Wt Cre -pmLF mit Hilfe eines *Nuclear Extract Kit* isoliert, um anschließend mittels *Western Blot* -Methode die Proteinexpression von NFATc1 und NFATc3 im Zellkern zu quantifizieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 und Abbildung 40 dargestellt und zeigen für STIM1/2-defiziente pmLF sowohl für NFATc1- als auch für NFATc3-Proteine eine signifikant reduzierte Translokation in den Zellkern im Vergleich zu Wt-pmLF, die mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren infiziert wurden (Wt Cre -pmLF). Wie auf dem repräsentativen Blot zu erkennen ist, wurde in nukleären Extrakten von STIM1/2-defizienten pmLF-Proteinlysaten nur noch die NFATc1-Isoform mit einer Größe von 110 kDa von den drei NFATc1-Isoformen detektiert, die in Wt Cre -pmLF -Zellkernen vergleichsweise alle vorhanden waren. Die Untersuchung zur NFATc3-Expression ergab in nukleären Extrakten von STIM1/2-defizienten Proteinlysaten eine signifikant geringere Lokalisation der Isoform mit einer Größe von 130 kDa im Vergleich zu Wt Cre -pmLF Zellkernen. Die Signalintensitäten wurden mittels *LICOR Software* quantifiziert und auf die Ladekontrolle LaminB1 mit einer Größe von 66 kDa normiert.

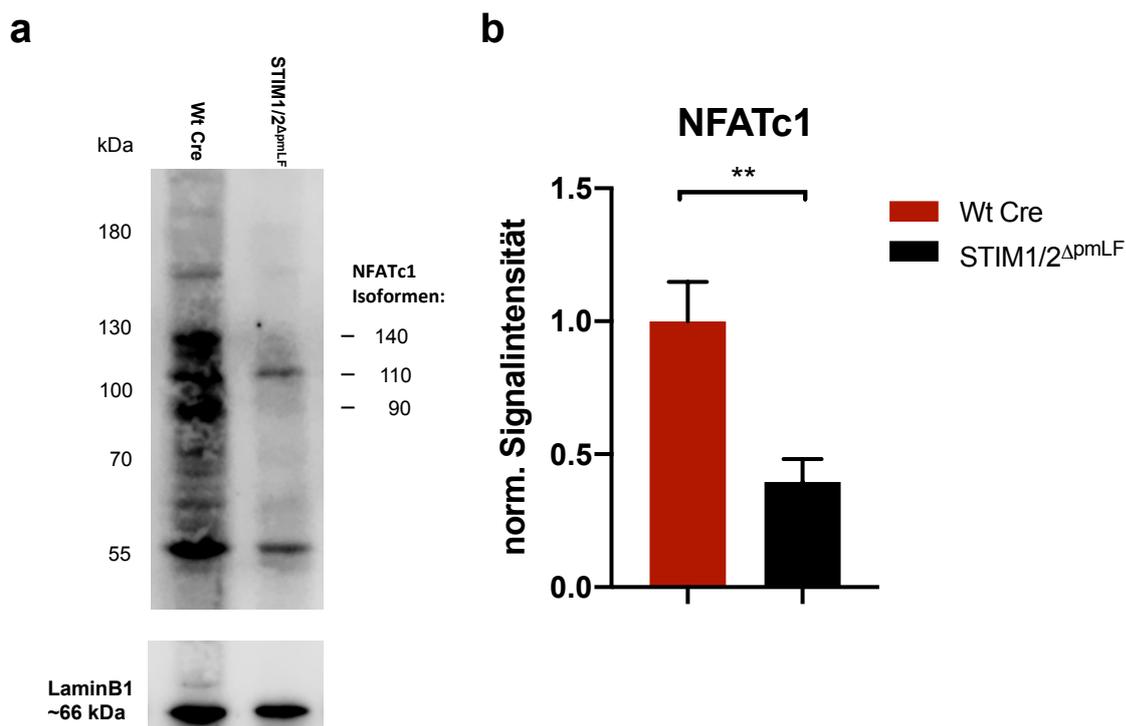


Abbildung 39: Nachweis von NFATc1 in nukleären Extrakten aus Lungenfibroblasten. (a) Proteine aus nukleären Zellfraktionen von STIM1/2 Δ pmLF-pmLF und Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren) wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und NFATc1-Isoformen mittels *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Ladekontrolle diente LaminB1 mit einer Größe von 66 kDa. (b) Auf die Ladekontrolle normierte Signalintensitäten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean = SEM*) dargestellt. (n>3 pmLF-Isolationen aus mindestens 3 Mäusen)

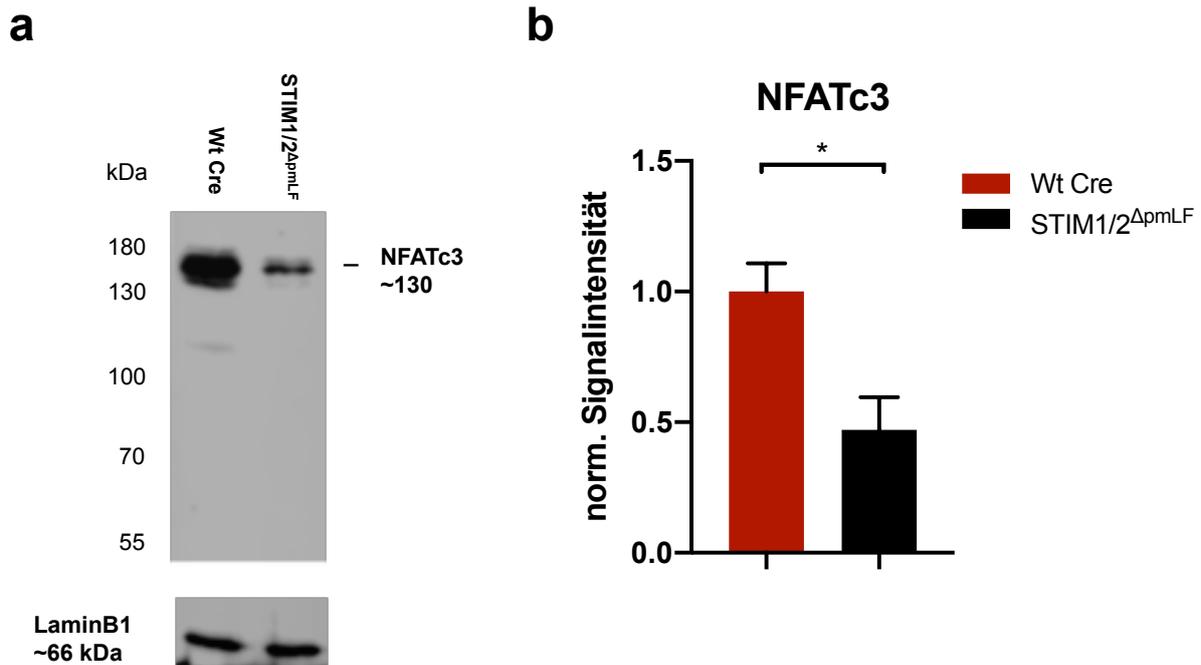


Abbildung 40: Nachweis von NFATc3 in nukleären Extrakten aus Lungenfibroblasten. (a) Proteine aus nukleären Zellfraktionen von STIM1/2 Δ pmLF-pmLF und Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektion mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren) wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und NFATc3-Isoformen mittels *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Ladekontrolle diente LaminB1 mit einer Größe von 66 kDa. (b) Auf die Ladekontrolle normierte Signalintensitäten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean = SEM*) dargestellt. ($n > 3$ pmLF-Isolationen aus mindestens 3 Mäusen)

3.3 Analyse der Rolle des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) und der Funktion von „classical transient receptor potential“ (TRPC)1/6 während der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten nach „transforming growth factor“ (TGF)- β 1-Behandlung

Während der Ausbildung einer Lungenfibrose kommt es auf Grund von Entzündungsprozessen und Schädigungen des Gewebes zu Umstrukturierungen der Lungenarchitektur [219]. An diesen Prozessen sind vor allem Fibroblasten beteiligt, welche sich vermehrt von Fibroblasten zu Myofibroblasten ausdifferenzieren. Neben „*in-vivo*“-Modellen stehen auch „*in-vitro*“-Zellmodelle, bei denen es durch „*transforming growth factor β 1*“ (TGF- β 1)-Behandlung zu einer Ausdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten kommt, zur Verfügung. Auf diese Art und Weise wurde die physiologische Funktion des SOCE und der TRPC1/6-Kanäle während der Ausbildung einer Lungenfibrose auf zellulärer Ebene genauer untersucht.

3.3.1 Quantifizierung der mRNA-Expression typischer Fibrosemarker-Proteine

Zur Überprüfung der Myofibroblasten-Differenzierung wurden Lungenfibroblasten (pmLF) mit „*transforming growth factor*“ (TGF)- β 1 behandelt, um eine Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu initiieren. Anschließend wurde die mRNA-Expression typischer Fibrosemarker-Proteine, beispielsweise von α -glattem Muskelaktin (*α smooth muscle actin* = α -SMA) oder Kollagen 1 (COL1), mit Hilfe von *RT-qPCR* quantifiziert. Diese Proteine dienen unter anderem als Marker zur Erkennung und Diagnose einer Lungenfibrose.

Glattes Muskelaktin α (α -SMA)

Während die Auswertung der mRNA-Expression von α -SMA in Wt- und Wt Cre- pmLF nach Behandlung mit TGF- β 1 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne TGF- β 1 einen signifikanten Anstieg ergab, zeigten STIM1/2-defiziente pmLF, die mit TGF- β 1 behandelt wurden, keine signifikante Veränderung zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 41a-c). Allerdings wiesen die jeweiligen Kontrollen sowie behandelten Zellen der verschiedenen Genotypen auch untereinander stark signifikante Unterschiede in der α -SMA-Expressionsrate auf. Wt Cre- und STIM1/2-defiziente Kontroll-pmLF zeigten deutlich höhere α -SMA-mRNA-Expressionsraten als die Wt-Kontrolle, die nicht mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren infiziert wurde. Mit TGF- β 1-behandelte Wt Cre- und STIM1/2-defiziente pmLF wiesen ebenso deutlich erhöhte mRNA-Expressionsraten an α -SMA im Gegensatz zu Wt-TGF- β 1-pmLF auf. Dabei kam es zusätzlich zu einer signifikanten Reduktion der α -SMA-mRNA-Expression in STIM1/2-defizienten pmLF nach TGF- β 1-Behandlung im Vergleich zu Wt Cre -TGF- β 1-pmLF.

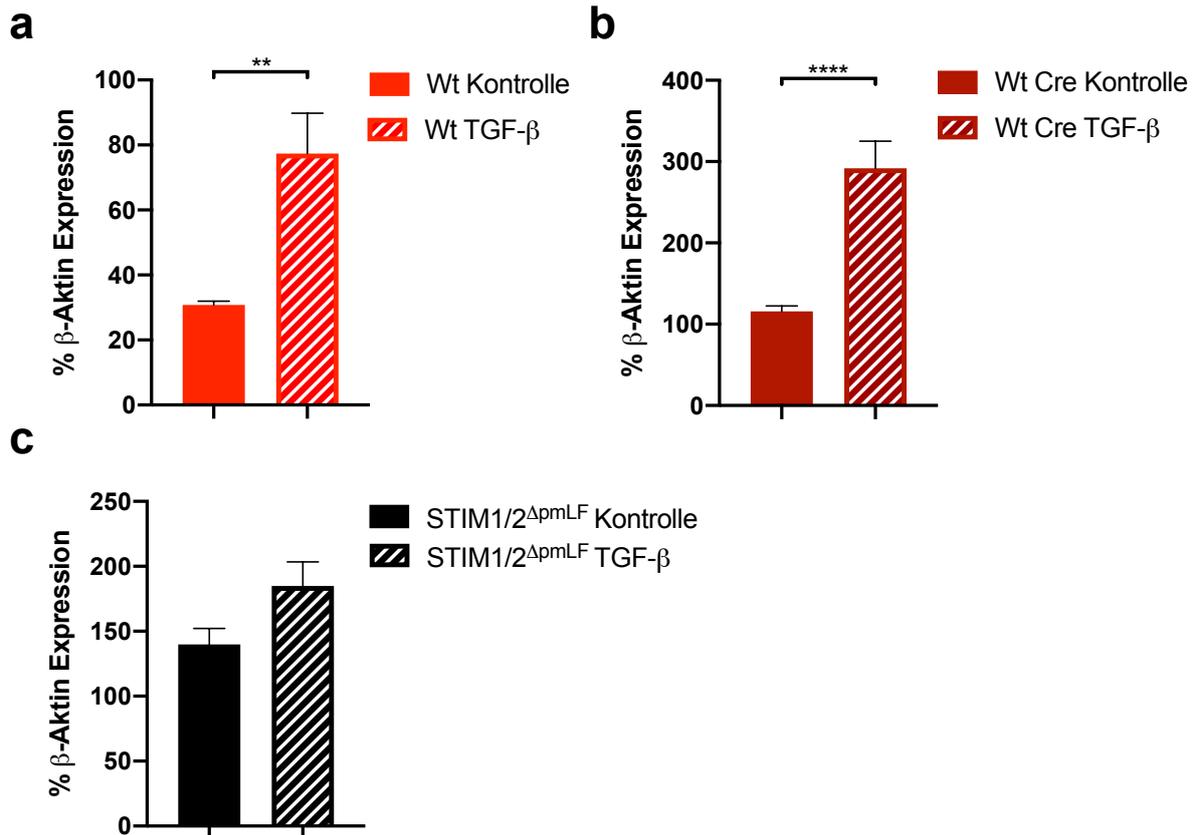


Abbildung 41: Analyse der α -SMA-Expressionsrate in pmLF entweder nach Zugabe von TGF- β 1 oder Lösungsmittel (Kontrolle). Wt-, Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektio mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren) und STIM1/2-defiziente pmLF wurden 48 Stunden mit 2 ng/ml TGF- β 1 oder Lösungsmittel (0,1% BSA in PBS) behandelt. Isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels *RT-qPCR* sowie spezifischer α -SMA-Oligonukleotide auf α -SMA-mRNA-Expression untersucht. Die abgebildeten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean = SEM*) des jeweiligen mit TGF- β 1-behandelten Genotyps und dessen Kontrolle in Relation zum Referenzgen β -Aktin. ($n > 3$ pmLF-Isolationen aus mindestens 3 Mäusen).

Kollagen 1 (COL1)

Darüber hinaus wurden die mRNA-Expressionsraten für den Fibrosemarker COL1 analysiert und die Ergebnisse sind in Abbildung 42 dargestellt. Hierbei kam es bei allen drei Genotypen zu einer signifikanten Erhöhung der COL1-Expression in pmLF, die mit TGF- β 1 behandelt wurden, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne TGF- β 1. Bei Betrachtung der Genotypen ohne TGF- β 1 zeigten STIM1/2-defiziente pmLF eine signifikant reduzierte mRNA-Expressionsrate für COL1 im Vergleich zu Wt- und Wt Cre -pmLF auf.

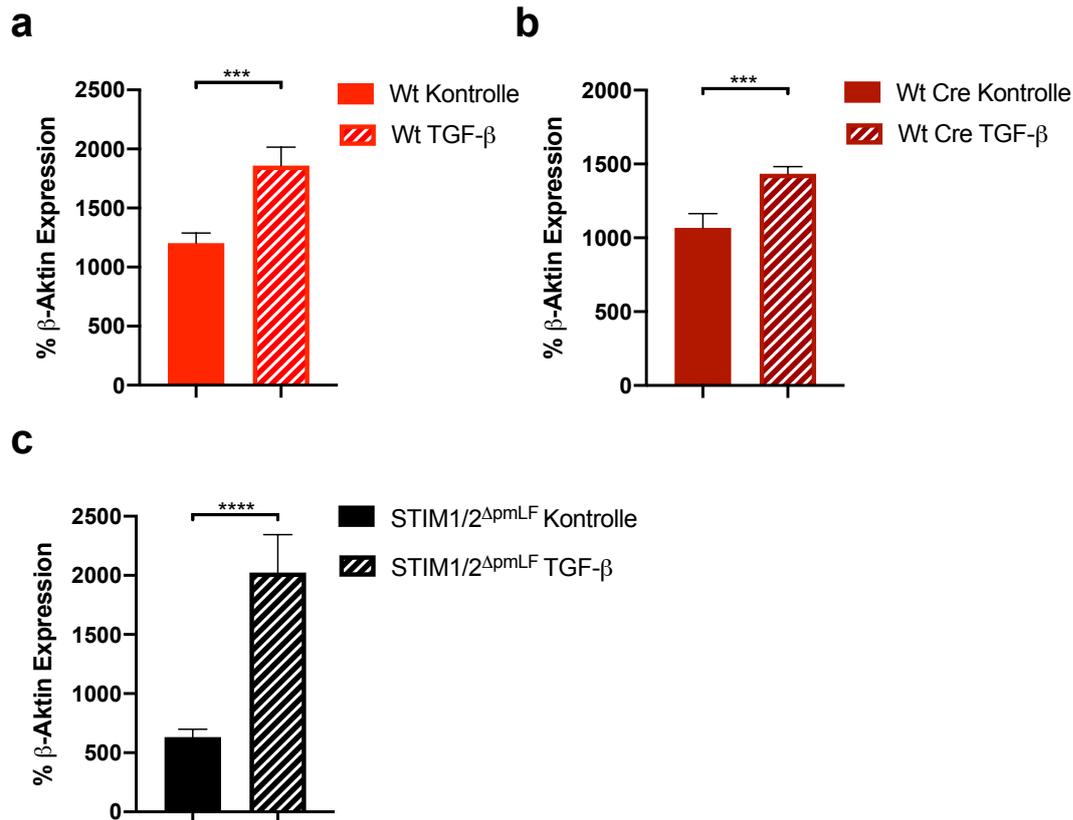


Abbildung 42: Analyse der COL1-Expression in pmLF entweder nach Zugabe von TGF- β 1 oder Lösungsmittel (Kontrolle). Wt-, Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren) und STIM1/2-defizienten pmLF wurden 48 Stunden mit 2 ng/ml TGF- β 1 oder Lösungsmittel (0,1% BSA in PBS) behandelt. Isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels *RT-qPCR* sowie spezifischer COL1-Oligonukleotide auf COL1-Expression untersucht. Die abgebildeten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean = SEM*) des jeweiligen mit TGF- β 1-behandelten Genotyps und dessen Kontrolle in Relation zum Referenzgen β -Aktin. ($n > 3$ pmLF-Isolationen aus mindestens 3 Mäusen).

3.3.2 Untersuchung der Migration primärer muriner Lungenfibroblasten (pmLF) nach Inkubation mit TGF- β 1

Zur Analyse des Migrationsverhaltens von pmLF nach Zugabe von TGF- β 1 wurde abermals der bereits vorgestellte Migrationstest (siehe 3.2.2.) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Zelllücken von TRPC1/6 $^{-/-}$ -pmLF, STIM1/2-defizienten pmLF und Wt- und Wt Cre -pmLF, welche mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren infiziert wurden. Während TGF- β -behandelte TRPC1/6 $^{-/-}$ -pmLF im Vergleich zu den Wt-Kontrollzellen keinen signifikanten Unterschied aufwiesen (Abbildung 43), migrierten STIM1/2-defiziente pmLF nach TGF- β -Behandlung signifikant schlechter als die Wt Cre -Kontrollzellen (Abbildung 44). Allgemein ließ sich feststellen, dass die Inkubation mit TGF- β 1 die Migration aller getesteten pmLF im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich reduzierte (siehe auch 3.2.2.).

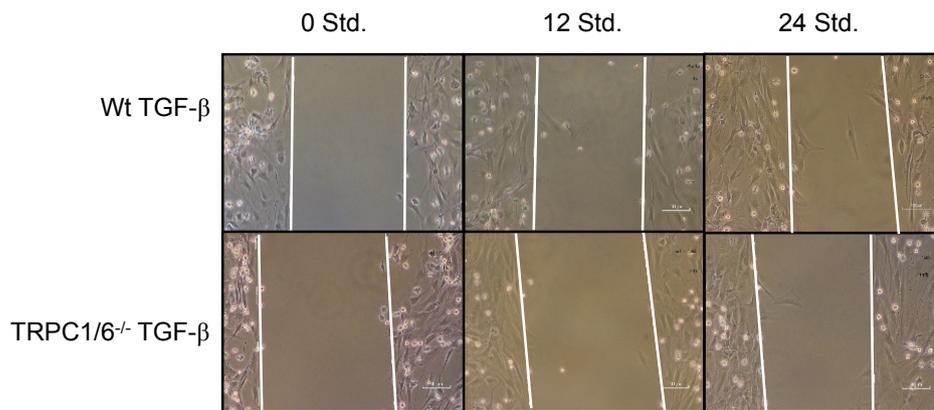
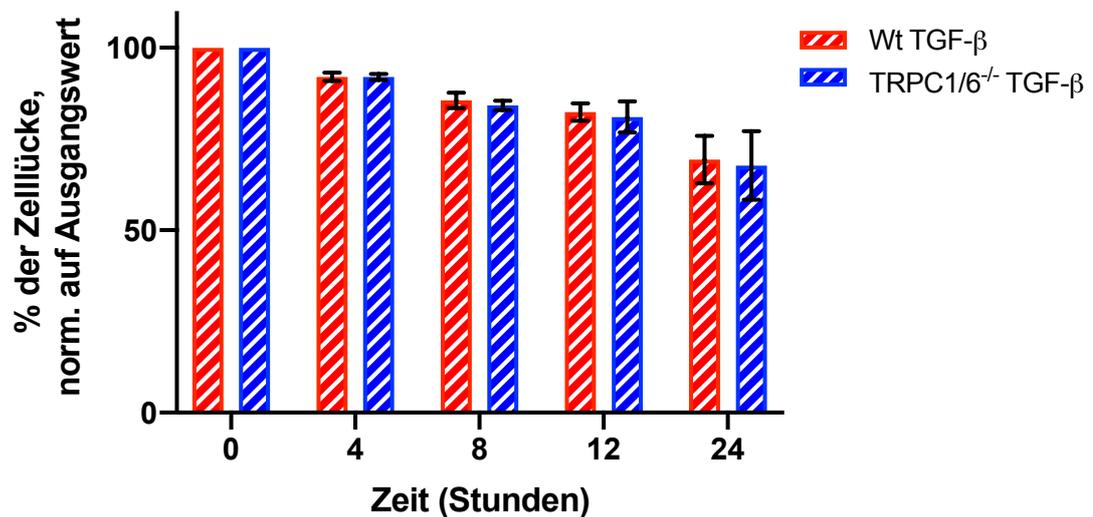
a**b**

Abbildung 43: Repräsentative Bilder und Quantifizierung der Zellmigration in Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF nach 48-stündiger TGF-β1-Behandlung. Die Fähigkeit von Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF eine zellfreie Lücke zu schließen wurde für 24 Stunden analysiert (b). Aufnahmen von Phasenkontrastbilder des zellfreien Spalts nach jeweils 12 Stunden. Repräsentative Bilder zeigen das jeweils typische Migrationsverhalten von Wt- und TRPC1/6^{-/-}-pmLF, die mit 2 ng/ml TGF-β1 behandelt wurden, von 0 bis 24 Stunden nach Entfernung der Silikoneinsätze. Der Maßstab betrug 100 μm (a). Zur Quantifizierung wurde die Breite der zellfreien Lücke gemessen und auf den Ausgangswert normiert. Die abgebildeten Balken stellen den Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean = SEM*) dar. (n>4 pmLF-Isolationen aus vier Mäusen)

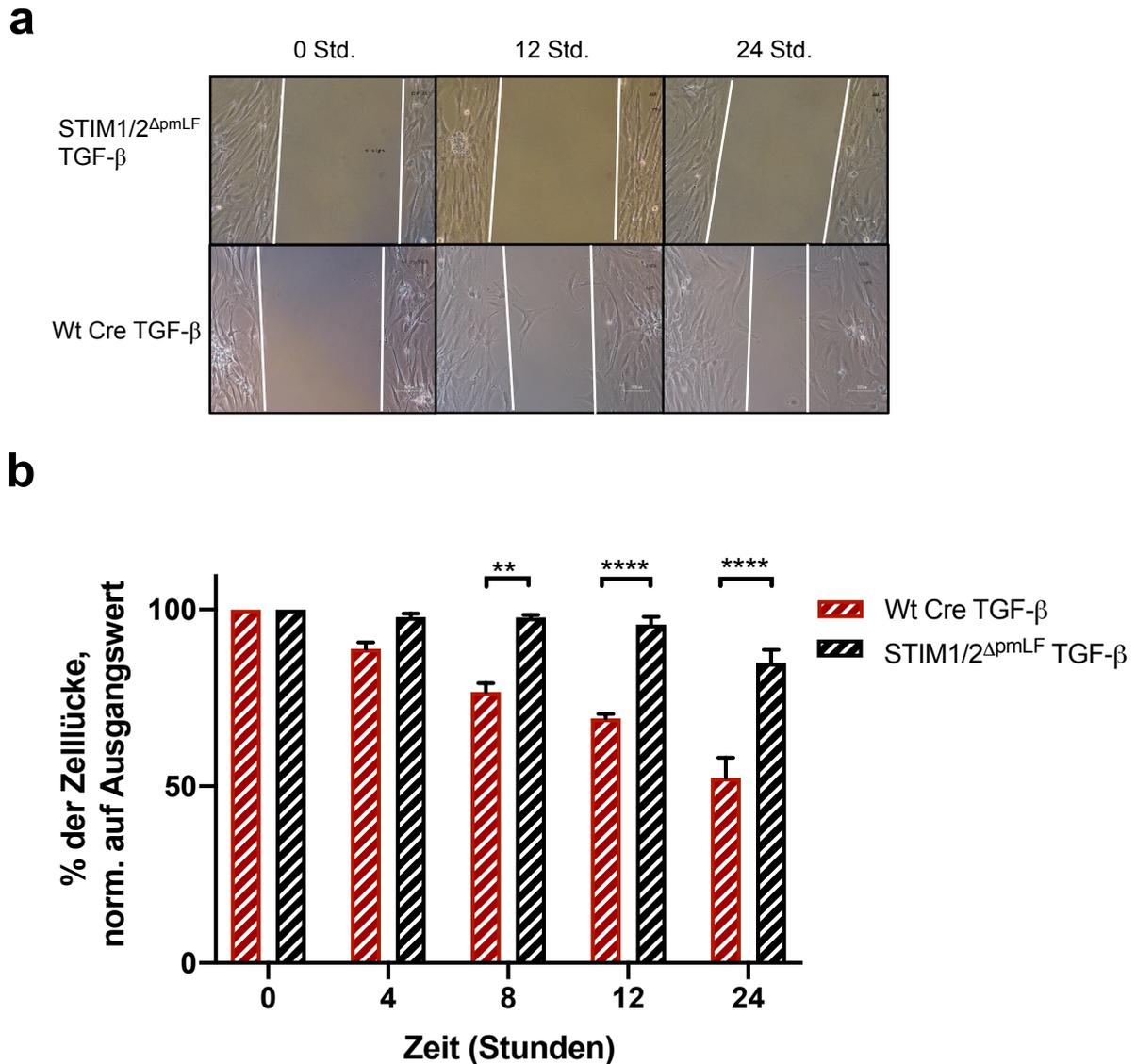


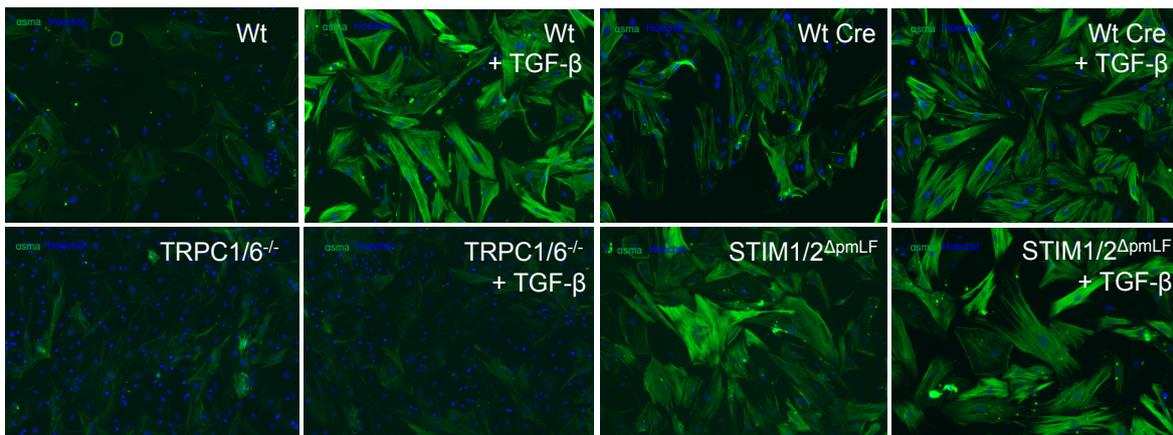
Abbildung 44: Repräsentative Bilder und Quantifizierung der Zellmigration in STIM1/2^{ΔpmLF}- und Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren) nach 48-stündiger TGF-β1-Behandlung. Die Fähigkeit von STIM1/2^{ΔpmLF}- und Wt Cre -pmLF eine zellfreie Lücke zu schließen wurde für 24 Stunden analysiert (b). Aufnahmen von Phasenkontrastbilder des zellfreien Spalts nach jeweils 12 Stunden. Repräsentative Bilder zeigen das jeweils typische Migrationsverhalten von STIM1/2-defizienten und Wt Cre -pmLF, die mit 2 ng/ml TGF-β1 behandelt wurden, von 0 bis 24 Stunden nach Entfernung der Silikoneinsätze. Der Maßstab betrug 100 μm (a). Zur Quantifizierung wurde die Breite der zellfreien Lücke gemessen und auf den Ausgangswert normiert. Die abgebildeten Balken stellen den Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean* = SEM) dar. (n>5 pmLF-Isolationen aus fünf Mäusen)

3.3.3 Quantifizierung von glattem Muskelaktin α (α -SMA) und Aktinstressfasern in pmLF nach Applikation von TGF-β1

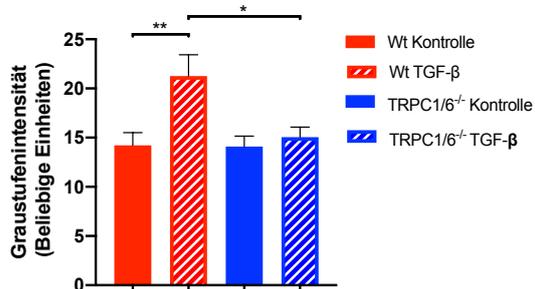
Die Expressionsraten von α -SMA und Aktinstressfasern wurden untersucht, um einerseits eine Ausdifferenzierung von Lungenfibroblasten zu Myofibroblasten unter TGF-β1-Behandlung zu bestätigen und andererseits um die Funktion von TRPC1/6 und STIM1/2 in

Lungenfibroblasten sowie -myofibroblasten zu analysieren. Durch den Einsatz einer indirekten Antikörperfärbung mit Hilfe von anti- α -SMA-Antikörpern und Fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin wurden die perforierten Zellen angefärbt und anhand der Graustufenintensitäten der aufgenommenen Bilder quantifiziert. Die Analyse der Graustufenintensitäten von α -SMA (Abbildung 45) ergab für Wt-pmLF, die mit TGF- β 1 behandelt wurden, einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Wt-Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu wiesen mit TGF- β 1-behandelte TRPC1/6^{-/-}-pmLF keine Veränderung gegenüber der zugehörigen Kontrolle und eine signifikant schwächere α -SMA-Expression als Wt-pmLF nach TGF- β 1-Behandlung auf. Wt Cre -pmLF, die sowohl mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren infiziert als auch mit TGF- β 1 behandelt wurden, verhielten sich ähnlich wie Wt-pmLF und zeigten eine signifikante Erhöhung der α -SMA-Level im Vergleich zu den Wt Cre-pmLF Kontrollzellen ohne TGF- β 1. Währenddessen ergab die Auswertung der α -SMA-Proteinkonzentration für STIM1/2-defiziente pmLF, die mit TGF- β 1 behandelt wurden, keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ohne TGF- β 1. Zwar zeigten sowohl mit als auch ohne TGF- β 1-behandelte STIM1/2-defiziente pmLF eine leichte Erhöhung der α -SMA-Expression gegenüber den jeweiligen Wt Cre -pmLF-Kontrollen, die jedoch jeweils nicht signifikant unterschiedlich war. Die Auswertung der jeweiligen Kontrollzellen sowie der mit TGF- β 1-behandelten pmLF ergab unter allen vier Genotypen bis auf einen signifikanten Unterschied zwischen TRPC1/6^{-/-}- und STIM1/2-defizienten pmLF mit TGF- β 1 keine weiteren signifikanten Veränderungen. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Expression von glattem Muskelaktin (α -SMA) durch TGF- β 1-Behandlung nur in Anwesenheit von TRPC1/6-Kanälen detektiert werden konnte. Ebenso zeigten STIM1/2-defiziente pmLF keine signifikante Erhöhung der α -SMA-Expression nach TGF- β 1-Zugabe. Allerdings kann hier keine eindeutige Aussage über die Bedeutung des SOCE getroffen werden, da die basale α -SMA-Expression nach Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren bereits erhöht war. Diese Beobachtung zeigte sich ebenfalls anhand der Auswertung der mRNA-Expression von α -SMA in Wt-, Wt Cre - und STIM1/2-defizienten pmLF mit und ohne TGF- β 1-Behandlung.

a



b



c

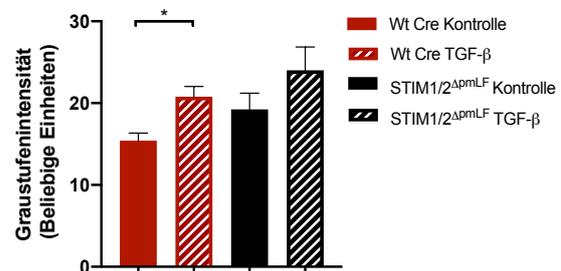
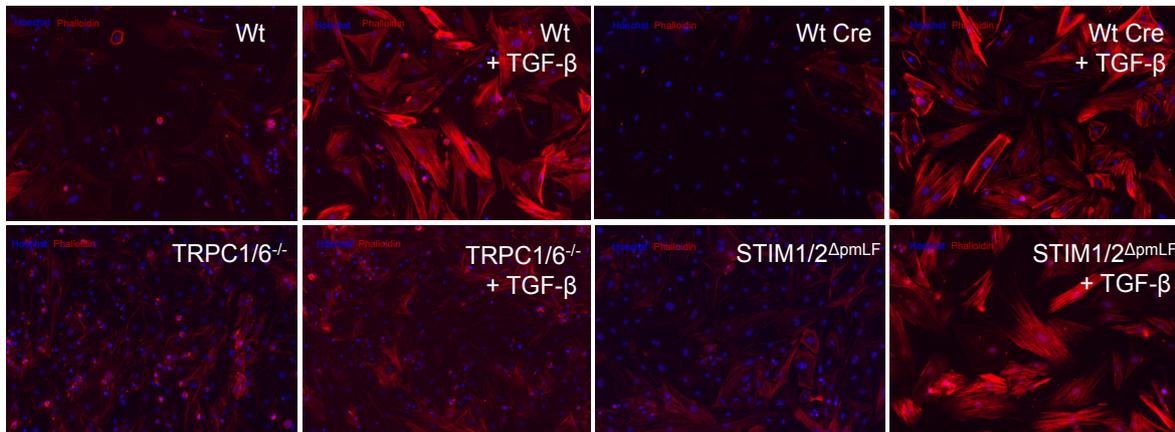


Abbildung 45: Quantifizierung von alpha-glatten Muskelaktin (α -SMA) in pmLF nach Zugabe von TGF- β 1 oder Lösungsmittel. Wt-, TRPC1/6^{-/-}-pmLF (b) sowie STIM1/2 Δ pmLF- und Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren) (c) wurden für 48 Stunden mit 2 ng/ml TGF- β 1 oder 0,1 % BSA in PBS (Lösungsmittel) behandelt und in 4 %-iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Fluoreszenz-gekoppelte Zweit-Antikörper wurden nach Inkubation mit anti- α -SMA-Antikörper verwendet, um die α -SMA-Expression zu quantifizieren. Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Zur Quantifizierung wurden die Graustufenintensitäten ermittelt und als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean* = SEM) abgebildet. (n>3). Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von den jeweiligen Genotypen sind in (a) dargestellt.

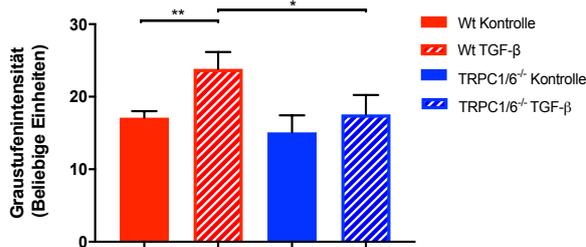
Wie in Abbildung 46 dargestellt kam es bei der Analyse der Aktinstressfasern durch an Fluoreszenz-gekoppeltes Phalloidin (Phalloidin-TRITC) in TGF- β 1-behandelten und unbehandelten pmLF zu ähnlichen Ergebnissen wie bei der Auswertung der α -SMA-Expression. Mit TGF- β 1-behandelte Wt-pmLF zeigten im Vergleich zu pmLF ohne TGF- β 1 eine signifikant erhöhte Expression von Aktinstressfasern. Im Gegensatz dazu wiesen TRPC1/6^{-/-}-TGF- β 1-pmLF keine signifikante Veränderung des polymerisierten Aktins gegenüber TRPC1/6^{-/-}-pmLF ohne TGF- β 1 auf (Abbildung 46a, b). Wie bereits bei der Analyse von α -SMA in STIM1/2-defizienten pmLF beschrieben, kam es auch bei der Auswertung von polymerisiertem Aktin in STIM1/2-defizienten pmLF zu keiner signifikanten Veränderung zwischen Kontrolle und TGF- β 1-Behandlung (Abbildung 46a, c). Allerdings zeigte sich hier keine Erhöhung der Aktin-Stressfaserbildung durch die Infektion mit Cre-Rekombinase exprimierenden Lentiviren so dass ein SOCE neben TRPC1/6-Kanälen

offensichtlich an der TGF- β -vermittelten Myofibroblasten-Differenzierung beteiligt ist. Die Analyse des polymerisierten Aktins in Wt Cre -pmLF nach TGF- β 1-Behandlung ergab, ähnlich wie in Wt-pmLF, eine erhöhte Expression von Aktinstressfasern im Vergleich zu Wt Cre -pmLF ohne TGF- β 1.

a



b



c

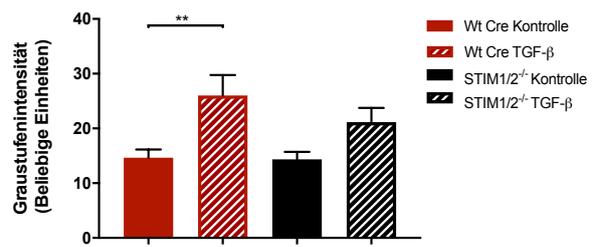


Abbildung 46: Quantifizierung der Aktinstressfaser-Expression in pmLF nach Zugabe von TGF- β 1 oder Lösungsmittel. Wt-, TRPC1/6^{-/-}-pmLF (b) sowie STIM1/2 Δ pmLF- und Wt Cre -pmLF (Wt-pmLF nach Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren) (c) wurden für 48 Stunden mit 2 ng/ml TGF- β 1 oder 0,1 % BSA in PBS (Lösungsmittel) behandelt und in 4 %-iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Zur Quantifizierung der Aktinstressfasern wurde Fluoreszenz-gekoppeltes Phalloidin verwendet. Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Ermittlung der Graustufenintensitäten und wurde als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean = SEM*) abgebildet. (n>3). Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von den jeweiligen Genotypen sind in (a) dargestellt.

4 Diskussion

Nach der Entdeckung der TRP-Kanäle in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde zu Beginn angenommen, dass diese als Speicher-operierte Kanäle für den kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms fungieren [220, 221]. Diese Hypothese wurde nach der Klonierung von homologen „classical transient receptor potential“ (TRPC)-Kanälen in Säugetieren zunächst bestätigt [222]. Als molekularer Mechanismus wurde eine direkte Aktivierung von TRPC-Kanälen durch Inositoltriphosphat (IP_3)-Rezeptoren, welche in der Membran interner Ca^{2+} -Speicher lokalisiert sind, nach der Bindung von IP_3 vorgeschlagen [219]. IP_3 und Diacylglycerin (DAG) werden nach Rezeptorstimulation durch die Aktivierung von Phospholipasen aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) generiert [223, zusammengefasst in 224]. Der vorgeschlagene Mechanismus konnte nur in Zelllinien mit heterolog überexprimierten Proteinen, jedoch nicht in nativen, frisch isolierten Zellen nachgewiesen werden [225, 226]. Außerdem zeigten TRPC-Kanäle im Gegensatz zu „Calcium release- activated Calcium“ (I_{CRAC})-Kanälen keine hohe Selektivität für Ca^{2+} -Ionen. Währenddessen wurde nachgewiesen, dass TRPC2/3/6/7-Kanäle direkt durch Diacylglycerin (DAG) ohne Beteiligung der internen Ca^{2+} -Speicher aktiviert werden konnten [59, 227, 228]. In den Jahren 2005 und 2006 wurde durch die Entdeckung der STIM-Proteine ein passenderes molekulares Korrelat für den Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) gefunden [229]. STIM-Proteine dienen als Ca^{2+} -Sensoren der internen Ca^{2+} -Speicher und aktivieren Ca^{2+} -selektive Orai-Kanäle in der Plasmamembran, die fast zeitgleich ebenfalls neu identifiziert wurden [32]. Nichtsdestotrotz postulieren einige Arbeitsgruppen weiterhin, dass TRPC3-Kanäle in Acinus-Zellen des Pankreas [230] und TRPC1-Kanäle in Zellen der Speicheldrüse [85] durch Interaktion mit STIM1/2-Proteinen [71-73] oder Orai-Kanälen [74-76] am SOCE mitwirken. Ebenso wurde eine indirekte Aktivierung von TRPC1/3/6-Kanälen durch den Ca^{2+} -Einstrom über geöffnete Orai-Kanäle in Blutplättchen vorgeschlagen [97]. Auf Grund dieser Daten sollte die molekulare Interaktion von TRPC-Kanälen mit STIM1/2-Proteinen und/oder Orai-Kanälen in unterschiedlichen Zelltypen unabhängig voneinander analysiert werden. Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Beteiligung von TRPC1/6- und TRPC1/3/6-Kanälen in pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) am Rezeptor- und Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom (ROCE/SOCE) zu untersuchen.

Bis heute wurde die physiologische Rolle des SOCE in der Lunge nur in wenigen Zelltypen (z.B. in humanen Lungenepithelzellen [163], Mastzellen [164] und pulmonalen glatten Muskelzellen [231, 232]) analysiert. Entsprechende Untersuchungen in pulmonalen murinen Lungenfibroblasten (pmLF), die an der Ausbildung einer Lungenfibrose beteiligt sind, liegen

bisweilen noch nicht vor. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit ebenfalls die Funktion des SOCE in primären murinen Lungenfibroblasten näher untersucht.

Im Rahmen von pathophysiologischen Veränderungen der Lunge sind diese Zellen an unkontrollierten Wundheilungsprozessen nach vermehrter Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen beteiligt. Als Hauptmediator bewirkt der „*Transforming-growth-factor β* “ (TGF- β) unter anderem eine Ausdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, wodurch es zu einer Umstrukturierung der Lungenarchitektur kommt [233]. In Abwesenheit von TRPC6-Kanälen war die Ausbildung einer Lungenfibrose nach Gabe von Bleomycin in TRPC6-gendefizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduziert [190]. Außerdem zeigte sich nach der Behandlung von pmLF mit TGF- β eine erhöhte Expression von TRPC6-Kanälen, weshalb diese Kanäle an der Entwicklung einer Lungenfibrose beteiligt sein könnten. Eine mögliche Funktion des SOCE während fibrotischer Veränderungen wurde bisher nur im Rahmen der renalen Fibrose und der Mukoviszidose untersucht [234, 235]. Daher wurde sowohl in TRPC1/6- als auch STIM1/2-defizienten primären murinen Lungenfibroblasten die Differenzierung zu Myofibroblasten nach Behandlung mit TGF- β analysiert.

4.1 Der Rezeptor- und Speicher-operierte Ca^{2+} -Einstrom (ROCE/ SOCE): Zwei voneinander unabhängige Signalwege in pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF)

Nachdem für den Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) eine direkte STIM-Orai-Interaktion in *Drosophila* S2-Zellen [236] nachgewiesen worden war, wurde eine Beteiligung von TRPC-Kanälen am SOCE kritischer hinterfragt. Nichtsdestotrotz konnten einige Arbeitsgruppen Daten über eine Beteiligung von TRPC-Kanälen am SOCE erheben und publizieren. Neben einer direkten Aktivierung von TRPC-Kanälen durch STIM1 (zusammengefasst in [77]) wurde auch die Bildung eines dreiteiligen Komplexes aus STIM1, TRPC1 und Orai1 [88] in HEK293-Zellen mit heterolog-exprimierten TRPC- und Orai-Kanälen beschrieben [74] (zusammengefasst in Abbildung 47).

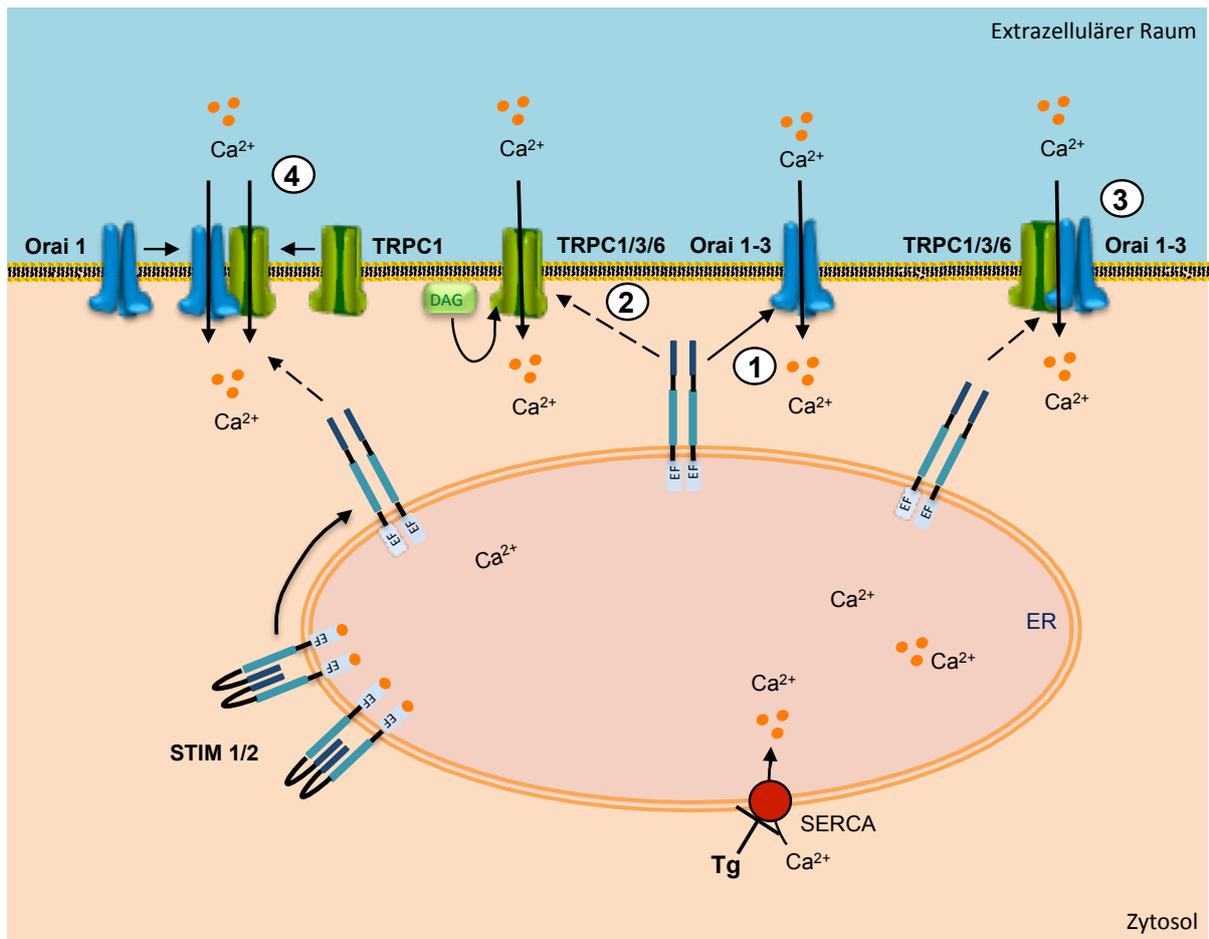


Abbildung 47: Schematische Darstellung der STIM-Orai-Interaktion und möglicher Hypothesen zum molekularen Mechanismus des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms. Signalweg 1: STIM-Orai-Interaktion. [20] Signalweg 2: Aktivierung von TRPC-Kanälen durch direkte Bindung von STIM-Proteinen an TRPC nach der Hypothese der Arbeitsgruppe um Shmuel Muallem [71]. Signalweg 3: Heteromere TRPC-Orai-Kanalkomplexe nach der Hypothese der Arbeitsgruppe um Lutz Birnbaumer [74]. Signalweg 4: Dreiteiliger Komplex aus TRPC1-STIM1-Orai1 nach der Hypothese der Arbeitsgruppe um Indu Ambudkar [88].

In diesen Veröffentlichungen wurden vor allem TRPC1-, TRPC3- und TRPC6-Kanäle untersucht, welche zur Familie der klassischen TRP (TRPC)-Kanäle gehören. Bis auf TRPC1 werden alle Ionenkanäle dieser Familie direkt durch Diacylglycerol (DAG) aktiviert [39, 60, 228, 237]. Nach einer Agonisten-initiierten Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kommt es durch Phospholipase-C zur Generierung von Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) [227, 236]. Während es durch DAG zu einer direkten Aktivierung von TRPC-Kanälen kommt [39, 60], fungiert TRPC1 in heteromeren TRPC-Kanälen eher wie eine regulatorische Einheit für den Ca^{2+} -Einstrom [58] als ein Ionenkanal *per se*. DAG-sensitive TRPC-Kanäle werden vor allem im Gehirn, in Endothel- sowie glatten Muskelzellen des vaskulären Systems exprimiert und führen in diesen Geweben zu einem Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstrom (ROCE) (zusammengefasst in [39]). Die Expression von TRPC1 und TRPC6 in pmLF konnte durch eigene „reverse transcription

*quantitative“ PCR (RT-qPCR)-Daten (Abbildung 25) nachgewiesen werden [190]. Da in glatten Muskelzellen der Trachea und der größeren Arterien (Durchmesser < 150 μm) aus TRPC6-defizienten Mäusen TRPC3-Kanäle kompensatorisch vermehrt exprimiert werden [184, 188], wurden in dieser Arbeit neben murinen TRPC1/6-defizienten Zellen auch Zellen aus TRPC1/3/6-defizienten Mäusen untersucht. TRPC1/6- und TRPC1/3/6-defiziente Mäuse wiesen, bis auf neuronale Koordinationsschwierigkeiten durch Abwesenheit von TRPC3 [199], keine phänotypischen Veränderungen unter normalen Umweltbedingungen auf. STIM-Proteine dienen zum einen als Ca^{2+} -Sensoren, die nach Absinken der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aktiv werden [229], und zum anderen initiieren diese die Aktivierung von Orai-Kanälen. Im Gegensatz zu TRPC-defizienten Mäusen sind globale STIM1/2-KO-Mäuse nicht lebensfähig und sterben bereits kurz nach der Geburt [70]. Daher wurde eine andere Methode gewählt, um STIM1/2-defiziente Zellen zu generieren. Durch die Zellisolation aus einer STIM1/2^{flox/flox}-Mauslinie [70] und der anschließenden Infektion mit rekombinanten Lentiviren, die Cre-Rekombinasen exprimieren [238], gelang es in dieser Arbeit STIM1/2-defiziente Lungenfibroblasten (pmLF) herzustellen. Die Deletion der mit der Erkennungsstelle für die Cre-Rekombinase (lox p) flankierten Exons im Stim1- und Stim2-Gen verhinderte die Produktion funktioneller STIM1/2-Proteine (Abbildung 22). Eine signifikante Reduktion der Genexpression von STIM1/2 in STIM1/2-defizienten pmLF (STIM1/2^{ΔpmLF}) konnte sowohl auf mRNA-Ebene (Abbildung 24) als auch auf Protein-Ebene (Abbildung 26) nachgewiesen werden. Neben dem Einsatz von Lentiviren, die rekombinant Cre-Rekombinasen exprimieren, gibt es in der Literatur noch weitere Methoden, um STIM1/2-defiziente Zellen zu generieren, zum Beispiel durch Paarung von STIM1/2^{flox/flox}-Mäusen mit transgenen Mäusen, die zeit- und gewebespezifisch Cre-Rekombinase exprimieren [14]. In unserem Fall bewährte sich der Einsatz der Cre-Lentiviren in der Zellkultur, wodurch es auch zu keiner Belastung für die *flox*-Mauslinie kam. Um den Einfluss der eingesetzten Lentiviren auf die Zellen zu untersuchen, wurden zum einen pmLF aus Kontroll-Mäusen (Wild-Typ, Wt) ebenfalls mit Lentiviren infiziert (Wt Cre -pmLF) und zum anderen in allen durchgeführten Experimenten als äquivalente Kontrollen verwendet.*

Da es sich bei den verwendeten TRPC-defizienten Mäusen um globale TRPC-Defizienzen handelt, wurden pmLF aus diesen Mäusen auf kompensatorische Genregulationen durch andere Ionenkanäle untersucht. Während in TRPC1/6^{-/-}-pmLF signifikant weniger STIM2-mRNA (Abbildung 24) exprimiert wurde, zeigten sich auf Proteinebene keine Unterschiede (Abbildung 26). Weder TRPC6- [190] noch TRPC1/6- defiziente Lungenfibroblasten zeigten anhand einer *qRT-PCR*-Analyse (Abbildung 25) eine kompensatorische Regulation anderer

TRPC-Kanäle. Gleichmaßen wiesen STIM1/2-defiziente pmLF und Wt Cre -pmLF keine signifikanten Unterschiede in ihrer Genexpression auf, sodass ein Einfluss der Lentiviren auf die STIM- und TRPC-Expressionen ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 24 und Abbildung 25).

TRPC1/6^{-/-} und TRPC1/3/6^{-/-} pmLF und PSMC zeigten in Untersuchungen des durch Endothelin-1 (Et-1)-initiierten ROCE [239] (Abbildung 27 und Abbildung 4.12. in Diana Stickels Doktorarbeit [203]) in Ca²⁺-haltiger Messlösung gegenüber den Wt-Kontrollen signifikant reduzierte, intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen ([Ca²⁺]_i). Im Gegensatz dazu blieben die [Ca²⁺]_i in STIM1/2-defizienten pmLF unverändert und PSMC sowie Fibroblasten, die sowohl TRPC1/6- als auch STIM1/2-defizient waren, zeigten keine weitere Reduktion der gemessenen intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen. Auf Grund der fehlenden signifikanten Veränderungen in Abwesenheit von STIM1/2-Proteinen kann davon ausgegangen werden, dass diese Proteine nicht am durch TRPC-Kanäle induzierten -ROCE beteiligt waren. In weiteren Versuchen zur Untersuchung des ROCE zeigten sich nach Aktivierung von Lysophosphatidsäure (LPA)-Rezeptoren durch LPA ähnliche Ergebnisse (Abbildung 28) [240]. Die Analyse des ROCE ergab übereinstimmend, dass TRPC-Kanäle sowohl in pmLF als auch in PSMC Rezeptor-operiert agierten. Die unveränderten Ca²⁺-Einströme in Abwesenheit von STIM1/2-Proteine verdeutlichen, dass STIM-Proteine keinen Einfluss auf den ROCE in pmLF und PSMC haben. Diese Beobachtungen stimmen mit der allgemeinen Annahme in der Literatur überein, dass TRPC-Kanäle Rezeptor-operiert aktiviert werden [59, 241].

Im Gegensatz dazu konnte für TRPC3-Kanäle in Azinuszellen des Pankreas [230] sowie für TRPC1-Kanäle in Speicheldrüsenzellen [85] eine direkte Beteiligung am SOCE gezeigt werden. Diese Beteiligungen kamen entweder durch Interaktionen mit STIM-Proteinen [71-73] oder Orai-Kanälen [74-76] zustande (zusammengefasst in [39, 77]). Die Arbeitsgruppe von Shmuel Muallem schlägt eine direkte Interaktion zwischen STIM-Proteinen und TRPC-Kanälen vor, die in einem SOCE resultiert [71]. Darüber hinaus postuliert Indu Ambudkars Arbeitsgruppe einen dreiteiligen STIM1-TRPC1-Orai1-Komplex, welcher sich durch die Aktivierung von STIM1-Proteinen bildet und in Speicheldrüsenzellen zu einem SOCE führt [88]. Die Forschergruppe um Lutz Birnbaumer favorisiert die Hypothese, dass TRPC-Kanäle mit Orai-Kanälen heteromere Komplexe bilden und mit Hilfe der Aktivierung durch STIM-Proteine ein SOCE entsteht [74]. Um eine Beteiligung von TRPC-Kanälen am SOCE in pmLF und PSMC zu untersuchen, wurden die Messungen im „*Calcium-Imaging*“ nach einem Rekalzifizierungsprotokoll durchgeführt [242]. Nach der Speicherentleerung durch

Thapsigargin in Ca^{2+} -freiem, extrazellulärem Medium und anschließender Zugabe von Ca^{2+} zeigten die Untersuchungen des SOCE in dieser Arbeit weder in PASM (Abbildung 31) noch in pmLF (Abbildung 32) eine Beteiligung von TRPC-Kanälen. In den Messungen kam es zwischen TRPC-defizienten pmLF und Wt-Zellen zu keinen veränderten Ca^{2+} -Einströmen. Währenddessen zeigten STIM1/2-defiziente pmLF einen signifikant reduzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Vergleich zu den Wt-Zellen, welche mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren infiziert wurden (Wt Cre -pmLF). Das zusätzliche Fehlen von TRPC1- und TRPC6-Kanälen in STIM1/2^{ΔpmLF}TRPC1/6^{-/-} pmLF bewirkte keine weitere Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in diesen Zellen, weshalb eine Beteiligung von TRPC1/6-Kanälen am SOCE in pmLF unwahrscheinlich ist.

Da es sich bei Thapsigargin um einen SERCA-Pumpen-Blocker handelt, wurden zusätzliche Experimente (Abbildung 29) unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Nach der Rezeptor-Aktivierung durch den Agonisten Et-1 kommt es zu einer G-Protein-gekoppelten Signalkaskade, die nach der Stimulation von PLC zur Produktion von IP_3 führt [239]. Die Aktivierung von IP_3 -Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum (ER)-Speicher resultiert anschließend in einer Speicherentleerung, einem sogenannten „ Ca^{2+} -Overshoot“ [242], sowie in einem damit verbundenen transienten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Nach der Speicherentleerung durch Et-1 in einem nicht extrazellulär Ca^{2+} -haltigen Medium wurde zwischen TRPC1/6^{-/-}- und Wt-pmLF zunächst kein signifikanter Unterschied der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ festgestellt. Nach der Zugabe von extrazellulärem CaCl_2 wurde jedoch ein signifikant reduzierter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in TRPC1/6-defizienten pmLF gegenüber Wt-pmLF gemessen. Während ein fehlender ROCE über TRPC1/6-Kanäle die wahrscheinlichste Ursache für diese Reduktion darstellt, kann die noch verbliebene Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Zugabe von extrazellulärem CaCl_2 durch einen SOCE über Orai-Kanäle erklärt werden. In den vorgestellten Experimenten wurde der Speicher-operierte Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) sowohl über die Speicherentleerung durch Thapsigargin als auch über eine Agonisten-induzierte IP_3 -Signalkaskade durchgeführt. In beiden Experimenten war der SOCE in pmLF jeweils unabhängig von TRPC-Kanälen. Diese Ergebnisse stimmen mit veröffentlichten Daten wie zum Beispiel aus Experimenten mit heterolog exprimierten Kanälen und STIM-Proteinen in HEK293-Zellen [243] überein (zusammengefasst in [13]). Allerdings konnten die Hypothesen der Forschungsgruppen um Shmuel Muallem, Indu Ambudkar und Lutz Birnbaumer in pmLF und PASM nicht bestätigt werden (Abbildung 47).

Der signifikante Unterschied in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in STIM1/2-defizienten pmLF im Vergleich zu Wt-Kontrollzellen nach Entleerung der internen Ca^{2+} -Speicher und anschließender

Rekalzifizierung (Abbildung 32), deutete auf eine möglicherweise veränderte Ca^{2+} -Konzentration im ER hin. Um diesen Zusammenhang nachweisen zu können, wurden mit Hilfe des Fluoreszenzindikators Fura-2-FF die Ca^{2+} -Konzentrationen in den Speichern des ER genauer untersucht (Abbildung 30). Auf Grund der sehr geringen Bindungsaffinität von Ca^{2+} an Fura-2-FF im Vergleich zu Fura-2-AM war es möglich die in den ER-Speichern vorherrschenden höheren Ca^{2+} -Konzentrationen gezielt zu messen [211]. Wie erwartet wiesen die internen Ca^{2+} -Speicher in STIM1/2-defizienten pmLF signifikant geringere Ca^{2+} -Konzentrationen auf als die der Wt-Kontrollzellen. Dieser Effekt ist wiederum auf die Funktion von STIM-Proteinen als Ca^{2+} -Sensoren zurück zu führen. In Abwesenheit von STIM1/2-Proteinen kommt es in den ER-Speichern zu keiner Detektion von zu geringen Ca^{2+} -Konzentrationen. Darüber hinaus erfolgt ohne STIM-Proteine keine Aktivierung von Orai-Kanälen, wodurch ebenfalls der Speicher-operierte Ca^{2+} -Einstrom zur Auffüllung der Ca^{2+} -Speicher fehlt. Die Ergebnisse spiegeln zum einen die bedeutende Eigenschaft von STIM1/2-Proteinen als Ca^{2+} -Sensoren des ERs wider und unterstreichen zum anderen die wichtige Funktion von STIM zur Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Konzentrationen.

Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der internen ER-Speicher von TRPC1/6-defizienten pmLF im Vergleich zu Wt-pmLF unerwartet hohe Ca^{2+} -Werte (Abbildung 30). Diese Werte stehen im Widerspruch zu den nicht signifikant unterschiedlichen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Wt- und TRPC1/6- beziehungsweise TRPC1/3/6-defizienten pmLF nach Applikation von Thapsigargin (Abbildung 32). Ob es sich hier um Unterschiede in den Messmethoden mit zwei verschiedenen Ca^{2+} -Indikatoren handelt oder ob durch Pufferung von Ca^{2+} in Zellorganellen (z.B. Mitochondrien) die - durch Fura-2-AM gemessene - $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in TRPC1/6- beziehungsweise TRPC1/3/6-defizienten pmLF tatsächlich nicht erhöht ist, muss in Zukunft noch genauer untersucht werden.

4.2 Zellfunktionen des Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE) und von „classical transient receptor potential“ (TRPC1/6)-Kanälen in primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF)

Sowohl der Rezeptor- als auch der Speicher-operierte Ca^{2+} -Einstrom stellen in Fibroblasten essentielle, nicht spannungsabhängige Ca^{2+} -Signalwege dar [244]. Diese sind für einige grundlegende Zellfunktionen, wie beispielsweise die Proliferation, Migration und Genexpression, von großer Bedeutung. In verschiedenen Zelltypen, insbesondere in Tumorzellen [245] wurde bereits eine essentielle Rolle von STIM1/2-Proteinen während der Proliferation nachgewiesen (zusammengefasst in [246]). In dieser Arbeit wurde zum einen die

Zellviabilität anhand der metabolischen Aktivität und zum anderen die Proliferationsrate durch Quantifizierung der DNA-Syntheserate in pmLF untersucht. Während STIM1/2-defiziente pmLF keine Veränderungen der metabolischen Aktivität (Abbildung 34) gegenüber Wt-pmLF zeigten, welche ebenfalls mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren infiziert wurden (Wt Cre -pmLF), wiesen STIM1/2-defiziente pmLF eine signifikant reduzierte DNA-Syntheserate im Vergleich zu Wt-Kontrollzellen (Abbildung 36) auf. Dadurch konnte einerseits ein Einfluss der Lentiviren auf die Zellviabilität ausgeschlossen werden und andererseits konnten Daten zur Funktion von STIM1/2-Proteinen für die Zellproliferation bestätigt werden. Während in STIM1-defizienten vaskulären glatten Muskelzellen gegenüber den Kontrollzellen erst nach 24 Stunden eine verminderte Proliferationsrate gezeigt wurde [247], konnten in dieser Arbeit bereits deutlich eher signifikante Unterschiede identifiziert werden. In Abwesenheit von beiden STIM-Proteinen (Abbildung 36) zeigte sich bereits nach dreistündiger Inkubation eine verlangsamte Proliferationsrate in STIM1/2-defizienten pmLF. Dieser signifikante Unterschied könnte auf einen synergistischen Effekt auf Grund der Abwesenheit beider STIM-Proteine zurückzuführen sein. Interessanterweise übernehmen STIM2-Proteine Funktionen von STIM1-Proteinen, wenn diese nicht vorhanden sind. Das STIM2-Protein präsentiert dementsprechend eine Art „Rettungsfunktion“, um damit die Funktion von STIM1-Proteinen in vielen Zellprozessen aufrecht zu erhalten [23].

Durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt es unter anderem zur Translokation von „*nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic*“ (NFATc)-Transkriptionsfaktoren in den Zellkern (siehe Abbildung 8). Dies führt anschließend zu einer erhöhten Genexpression der durch NFATc regulierten Zielgene und infolgedessen kommt es zu einer Änderung von Zellfunktionen. Neben der ursprünglichen Entdeckung der NFATc-Proteine in T-Zellen, wurden diese ebenfalls in anderen Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, nachgewiesen. NFATc-Proteine spielen eine wichtige Rolle während der Zellaktivierung, -differenzierung und Zytokinproduktion [248]. In dieser Arbeit kam es in Abwesenheit von STIM1/2 im Vergleich zu Wt-Kontrollzellen (Wt Cre -pmLF) zu einer signifikant reduzierten Translokation von NFATc1- und NFATc3-Proteinen in den Zellkern (Abbildung 39 und Abbildung 40). Die Zellmigration stellt eine essentielle Zellfunktion während der Wundheilungsprozesse in geschädigten Bereichen der Lunge dar. Die Rolle von STIM1/2 während der Zellmigration wurde bereits intensiv in verschiedenen Tumorzellen untersucht, jedoch bisher noch nicht in pmLF [249]. In STIM1/2-defizienten pmLF konnte im Vergleich zu Wt Cre -pmLF, welche mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren

infiziert wurden, bereits nach acht Stunden eine signifikant verminderte Migration beobachtet werden (Abbildung 44). Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde in vaskulären glatten Muskelzellen in Abwesenheit von STIM1 ebenfalls eine verminderte Proliferation, Migration sowie reduzierte NFATc3-Level im Zellkern gezeigt [247]. Neben der verminderten Migration in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) nach der Zugabe des SOCE-Blockers SKF96365 wurde in STIM1- und Orai1-defizienten Brust-Tumorzellen ebenfalls eine reduzierte Migration gemessen [250]. Laut Autoren stellt der Ca^{2+} -Einstrom durch STIM-Orai-Interaktionen eine Voraussetzung für die fokale Adhäsion während des Migrationsprozesses dar, sodass dieser Prozess in Abwesenheit von STIM1 nicht mehr stattfinden konnte. Ein womöglich ähnlicher Mechanismus könnte auch für die verminderte Migration in STIM1/2-defiziente pmLF in dieser Arbeit verantwortlich sein und in Zukunft näher untersucht werden.

Während es in der Literatur kaum Hinweise auf mögliche Funktionen heteromerer TRPC1/6-Kanäle in nativen Zellen gibt, existieren für die einzelnen TRPC1- und TRPC6-Kanäle bereits viele publizierte Daten. Frau Susanne Fiedler zeigte in Ihrer Dissertation, dass es bei alleiniger Abwesenheit von TRPC6 in pmLF zu keinen signifikanten Unterschieden in der DNA-Syntheserate nach 24 Stunden kam [201]. Im Gegensatz dazu demonstrierten andere Arbeitsgruppen vergleichsweise signifikant reduzierte Proliferationsraten in verschiedenen TRPC6^{-/-} Tumorzellen (zusammengefasst in [42]). TRPC1-defiziente Tumorzellen wiesen je nach Tumor-Zelltyp und -grad entweder eine reduzierte Proliferationsrate oder gar eine erhöhte pro-apoptotische Aktivität auf. In dieser Arbeit zeigten die Ergebnisse des Zellviabilitätstests für TRPC1/6^{-/-}-pmLF im Vergleich zu Wt-pmLF eine leicht erhöhte, jedoch nicht signifikant veränderte, metabolische Aktivität auf (Abbildung 34). Neben einer bereits nach dreistündiger Inkubation auftretenden signifikant erhöhten Zellproliferation- und DNA-Syntheserate kam es nach 24 Stunden ebenso zu einer signifikant erhöhten Migration von TRPC1/6^{-/-} pmLF im Vergleich zu Wt-pmLF in den zellfreien Spalt (Abbildung 36 und Abbildung 37). Ein möglicher Grund hierfür könnte die inhibitorische Kanalregulator-Funktion von TRPC1 in heteromeren Komplexen sein, ohne die es zu einer erhöhten Ca^{2+} -Permeabilität kam [58]. Eine andere Arbeitsgruppe unseres Instituts demonstrierte in Abwesenheit von TRPC1 in heteromeren Kanälen ebenfalls eine verstärkte Migration von neuronalen „*gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons*“ (Gn11)-Zellen nach der Durchführung von Wundheilungsversuchen [58]. Die Abwesenheit von TRPC1/6-Kanälen in pmLF zeigte, dass die inhibitorische Funktion von TRPC1 in heteromeren Kanälen bisher unbekannter Zusammensetzung für bestimmte Zellfunktionen von essentieller Bedeutung ist.

Ohne diese Regulation kam es durch diese noch zu identifizierenden Kanalkomplexe zu erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen, welche in einer verstärkten Zellproliferation und -migration resultierten. Als möglicher molekularer Mechanismus wurde eine erhöhte Genexpression über den Ca^{2+} /Calcineurin/NFAT-Signalweg beschrieben [58]. Dieser Signalweg könnte auch in dieser Arbeit eine Erklärung für die einerseits verminderten Zellfunktionen von STIM1/2-defizienten pmLF und die andererseits erhöhte Proliferation und Migration von TRPC1/6^{-/-}-pmLF sein.

4.3 Analyse der TRPC1/6- Funktion in pmLF nach TGF- β -Behandlung

Während der Ausbildung einer Lungenfibrose kommt es zu einer vermehrten Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten und einer erhöhten Produktion von extrazellulären Matrix (ECM)-Proteinen [251]. Ein hauptsächlicher Auslöser für diese Prozesse ist das Zytokin TGF- β , das beispielsweise in Lungenfibroblasten zu einer Differenzierung mit kontraktilem Phänotypen führt. TGF- β erhöht einerseits die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration und führt andererseits zu einer vermehrten Zellproliferation, -migration sowie Produktion extrazellulärer Matrix (ECM), wie zum Beispiel Kollagen [252].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von STIM1/2-Proteinen und TRPC1/6-Kanälen auf zellulärer Ebene während der Differenzierung von Lungenfibroblasten untersucht. Dazu wurden Lungenfibroblasten mit TGF- β behandelt, um so eine Ausdifferenzierung zu Myofibroblasten zu initiieren. Nach der Behandlung mit TGF- β zeigten TRPC1/6^{-/-}-pmLF im Vergleich zu Wt-pmLF einen deutlich reduzierten sowie kontraktileren Phänotyp. Dies spiegelte sich sowohl in der reduzierten Expression von „ *α - smooth muscle actin*“ (α -SMA) als auch von Aktinstressfasern in TRPC1/6-defizienten pmLF nach entsprechender TGF- β -Behandlung (Abbildung 45 und Abbildung 46) wider. Frau Katharina Hofmann zeigte in Ihrer Dissertation und einer Veröffentlichung bereits einen ähnlich ausgeprägten Phänotyp in TRPC6^{-/-}-pmLF [190, 207]. In Abwesenheit von TRPC1 konnte von einer anderen Arbeitsgruppe sowohl ein erniedrigter Anteil an F-Aktin- als auch ein erhöhter Gehalt an G-Aktin intrazellulär nachgewiesen werden [58]. Dadurch kam es zu einer erhöhten Motilität von TRPC1-defizienten Neuronalzellen, was wiederum auch eine Erklärung für die schnellere Migration von TRPC1/6-defizienten pmLF im Vergleich zu Wt-pmLF in dieser Arbeit sein könnte (Abbildung 37). Auch wenn es zwischen TRPC1/6^{-/-}- und Wt-pmLF nach TGF- β -Behandlung zu keiner veränderten Migration kam, zeigten die behandelten Zellen zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle des einzelnen Genotypen eine verminderte Migration (Abbildung 43 und Abbildung 37). Dies könnte wiederum an der eingeschränkten Motilität von Myofibroblasten durch die erhöhte Expression von α -SMA liegen [253]. Im Einklang mit

den hier dargestellten Ergebnissen zeigte Frau Susanne Fiedler in ihrer Dissertation gegenüber Wt-pmLF ebenfalls eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit für TRPC6^{-/-}-pmLF [201]. Ähnlich wie in Katharina Hofmanns Dissertation [207] kam es in dieser Arbeit in Abwesenheit von TRPC1/6-Kanälen und nach der Behandlung mit TGF- β zu einer Reduktion der α -SMA- und Aktinstressfasern-Expression in pmLF (Abbildung 45 und Abbildung 46). Demzufolge zeigt nicht nur die Abwesenheit von TRPC6-Kanälen sondern auch die von TRPC1/6-Kanälen in pmLF eine hemmende Wirkung auf die Ausbildung von Myofibroblasten nach Behandlung mit TGF- β .

Auf Grund der zum jetzigen Zeitpunkt fehlenden schlüssigen Erklärung auf molekularer Ebene, müssen diese interessanten Daten in Zukunft noch detaillierter untersucht werden..

4.4 Analyse der STIM1/2- Funktion in pmLF nach TGF- β -Behandlung

Um eine mögliche Funktion von STIM1/2-Proteinen in Myofibroblasten zu untersuchen, wurde zum einen die mRNA- und Protein-Expressionen sowie zum anderen das Migrationsverhalten nach Behandlung mit TGF- β untersucht.

Nach der Behandlung mit TGF- β zeigten STIM1/2-defiziente pmLF eine reduzierte Migration im Vergleich zu Wt-pmLF, die nach der Infektion mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Lentiviren auch mit TGF- β behandelt wurden (Wt Cre-TGF- β -pmLF) (Abbildung 44). Auf Grund der verminderten Motilität von Myofibroblasten durch einen erhöhten Anteil an α -SMA [253] zeigten jedoch beide Zelltypen ein signifikant reduziertes Migrationsverhalten nach Behandlung mit TGF- β . (siehe Abbildung 38).

Auch wenn STIM1/2-defizienten pmLF nach TGF- β -Behandlung auf mRNA-Ebene stärkere α -SMA-Expressionen als Wt Cre -pmLF zeigten, war der Unterschied auf Proteinebene zwar noch erkennbar, jedoch nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 41 und Abbildung 45). Im Gegensatz dazu zeigte die Quantifizierung der Aktinstressfasern in STIM1/2-defizienten pmLF nach der Behandlung mit TGF- β keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu Wt Cre -pmLF (Abbildung 46). Wt Cre -pmLF verhielten sich hinsichtlich der Aktin-Expressionen zwar ähnlich wie Wt-pmLF, jedoch können Veränderungen des Aktinskeletts durch Lentiviren in diesem Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden [254]. Da es sich bei α -SMA um glattes Muskelzell-Aktin und bei Aktinstressfasern um polymerisiertes F-Aktin handelt, könnten STIM1/2-Proteine auch einen unterschiedlichen Effekt auf die jeweiligen Aktinarten haben. F-Aktin spielt beispielsweise eine wichtige Rolle für die Interaktion von STIM und Orai, da es unter anderem den Kontakt zwischen der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und der Plasmamembran herstellt [255]. Unter ER-Stress, zum Beispiel nach lentiviraler Infektion, kann es jedoch zu Veränderungen der

Aktinformation kommen. Auch wenn in Abwesenheit von STIM1 in glatten Muskelzellen kein veränderter Gehalt an Aktin- und Tubulin gemessen wurde, wurden erhöhte Expressionen von Kollagentyp1A und -3A nachgewiesen [23]. Im Gegensatz dazu ergaben sich unter Verwendung des allerdings sehr unspezifischen SOCE-Blockers SKF96365 reduzierte α -SMA-Expressionen, sowohl mit als auch ohne TGF- β -Behandlung [256]. Darüber hinaus resultierte der Einsatz von SKF96365 im Nierengewebe in reduzierten Expressionen fibrotischer Marker wie beispielsweise α -SMA, Kollagen1, Kollagen3 und Fibronectin. Die Analyse des mRNA-Gehalts des Fibrosemarkers Kollagen 1 (COL1) zeigte in STIM1/2-defizienten pmLF signifikant reduzierte Werte im Vergleich zu Wt- und Wt Cre - pmLF (Abbildung 42). Ohne die Behandlung mit TGF- β kam es sowohl in Wt Cre - pmLF als auch in STIM1/2-defizienten pmLF zu signifikant erhöhten Expressionen von α -SMA. Nach der Behandlung mit TGF- β zeigten Wt Cre-TGF- β -pmLF und STIM1/2^{ΔpmLF}-TGF- β gegenüber Wt-TGF- β -pmLF ebenfalls erhöhte α -SMA-Expressionen.

Um die Funktion von STIM1/2-Proteinen während der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten weiter untersuchen zu können, sollte zukünftig neben α -SMA weitere Fibrosemarker auf Proteinebene untersucht werden.

5 Fazit und Ausblick

Die genauen Pathomechanismen der pulmonalen arteriellen Hypertonie und der Lungenfibrose sind bis heute nicht vollständig aufgeschlüsselt. Dies spiegelt sich in limitierten Behandlungsmöglichkeiten und in einer schlechten Prognose/ Überlebensrate wider. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Rezeptor-operierte TRP-Kanäle und/ oder Speicher-aktivierte STIM/ Orai-Proteine könnte für beide Krankheitsbilder wichtig sein (siehe z.B. TRPC6 [181], TRPV4 [257] und STIM/ Orai [23]). Um weitere mögliche Zielstrukturen zur Behandlung der Lungenfibrose und pulmonalen arteriellen Hypertonie zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit der Rezeptor- und Speicher-operierte Ca^{2+} -Einstrom (ROCE/ SOCE) untersucht. Die Analyse der beiden Ca^{2+} -Einstrommechanismen konnte in pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) [1] keine möglichen Interaktionen nachweisen, weshalb der ROCE und SOCE in den untersuchten Zellen zwei voneinander getrennte Signalwege darstellen. Darüber hinaus wurden essentielle physiologische Funktionen für STIM1/2-Proteine und TRPC1/6-Kanäle für die Zellproliferation und -migration sowie die nukleäre Translokation von NFATc1 und NFATc3 in pmLF identifiziert. Während eine STIM1/2-Defizienz in pmLF mit einer reduzierten Zellproliferation und -migration verbunden war, zeigten mit TGF- β 1-behandelte Myofibroblasten in Abwesenheit von TRPC1/6 eine deutlich reduzierte Expression von Aktinfilamenten, die an der TGF- β 1-induzierten Myofibroblasten-Differenzierung beteiligt sind. Aus diesem Grund stellen beide Ca^{2+} -Einstrom unabhängig voneinander wichtige Signalwege für die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration dar und bilden wichtige Zielstrukturen zur Entwicklung neuer therapeutischer Optionen gegen pulmonale Hypertonie und Lungenfibrose.

Literaturverzeichnis

1. Bendiks, L., F. Geiger, T. Gudermann, S. Feske, and A. Dietrich, *Store-operated Ca(2+) entry in primary murine lung fibroblasts is independent of classical transient receptor potential (TRPC) channels and contributes to cell migration*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 6812.
2. Parekh, A.B., *Advances in intracellular Ca(2+) signalling*. *J Physiol*, 2016. **594**(11): p. 2811-2.
3. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(7): p. 517-29.
4. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(1): p. 11-21.
5. Bagur, R. and G. Hajnóczky, *Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling*. *Mol Cell*, 2017. **66**(6): p. 780-788.
6. Rosado, J.A., *Calcium Entry Pathways in Non-excitabile Cells. Preface*. *Adv Exp Med Biol*, 2016. **898**: p. vii-viii.
7. Berridge, M.J., *The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease*. *Physiol Rev*, 2016. **96**(4): p. 1261-96.
8. Putney, J.W., Jr., *Recent breakthroughs in the molecular mechanism of capacitative calcium entry (with thoughts on how we got here)*. *Cell Calcium*, 2007. **42**(2): p. 103-10.
9. Putney, J.W., Jr., *A model for receptor-regulated calcium entry*. *Cell Calcium*, 1986. **7**(1): p. 1-12.
10. Takemura, H., A.R. Hughes, O. Thastrup, and J.W. Putney, Jr., *Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(21): p. 12266-71.
11. Hoth, M. and R. Penner, *Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells*. *Nature*, 1992. **355**(6358): p. 353-6.
12. Parekh, A.B. and R. Penner, *Store depletion and calcium influx*. *Physiol Rev*, 1997. **77**(4): p. 901-30.
13. Parekh, A.B. and J.W. Putney, Jr., *Store-operated calcium channels*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(2): p. 757-810.
14. M., O.-H. and L. X., *Chapter 6 Function of Orai/Stim Proteins Studied in Transgenic Animal Models*, in *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*, K.J. A. and J.J. Putney, Editors. 2017. p. 328.
15. Liou, J., M.L. Kim, W.D. Heo, J.T. Jones, J.W. Myers, J.E. Ferrell, Jr., and T. Meyer, *STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx*. *Curr Biol*, 2005. **15**(13): p. 1235-41.
16. Roos, J., P.J. DiGregorio, A.V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safrina, J.A. Kozak, S.L. Wagner, M.D. Cahalan, G. Velichelebi, and K.A. Stauderman, *STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function*. *J Cell Biol*, 2005. **169**(3): p. 435-45.
17. Parker, N.J., C.G. Begley, P.J. Smith, and R.M. Fox, *Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5*. *Genomics*, 1996. **37**(2): p. 253-6.
18. Overall, M.L., N.J. Parker, D.L. Scarcella, P.J. Smith, and M. Dziadek, *Murine Stim1 maps to distal chromosome 7 and is not imprinted*. *Mamm Genome*, 1998. **9**(8): p. 657-9.
19. Williams, R.T., S.S. Manji, N.J. Parker, M.S. Hancock, L. Van Stekelenburg, J.P. Eid, P.V. Senior, J.S. Kazenwadel, T. Shandala, R. Saint, P.J. Smith, and M.A. Dziadek,

- Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins.* Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 673-85.
20. Derler, I., I. Jardin, and C. Romanin, *Molecular mechanisms of STIM/Orai communication.* Am J Physiol Cell Physiol, 2016. **310**(8): p. C643-62.
 21. Soboloff, J., B.S. Rothberg, M. Madesh, and D.L. Gill, *STIM proteins: dynamic calcium signal transducers.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(9): p. 549-65.
 22. Hogan, P.G. and A. Rao, *Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation.* Biochem Biophys Res Commun, 2015. **460**(1): p. 40-9.
 23. Mancarella, S., S. Potireddy, Y. Wang, H. Gao, R.K. Gandhirajan, M. Autieri, R. Scalia, Z. Cheng, H. Wang, M. Madesh, S.R. Houser, and D.L. Gill, *Targeted STIM deletion impairs calcium homeostasis, NFAT activation, and growth of smooth muscle.* FASEB J, 2013. **27**(3): p. 893-906.
 24. Subedi, K.P., H.L. Ong, G.Y. Son, X. Liu, and I.S. Ambudkar, *STIM2 Induces Activated Conformation of STIM1 to Control Orai1 Function in ER-PM Junctions.* Cell Rep, 2018. **23**(2): p. 522-534.
 25. Liou, J., M. Fivaz, T. Inoue, and T. Meyer, *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, 2007. **104**(22): p. 9301-6.
 26. Luik, R.M., M.M. Wu, J. Buchanan, and R.S. Lewis, *The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions.* J Cell Biol, 2006. **174**(6): p. 815-25.
 27. Zhang, S.L., Y. Yu, J. Roos, J.A. Kozak, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, K.A. Stauderman, and M.D. Cahalan, *STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane.* Nature, 2005. **437**(7060): p. 902-5.
 28. Muik, M., I. Frischauf, I. Derler, M. Fahrner, J. Bergsmann, P. Eder, R. Schindl, C. Hesch, B. Polzinger, R. Fritsch, H. Kahr, J. Madl, H. Gruber, K. Groschner, and C. Romanin, *Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation.* J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 8014-22.
 29. Yang, X., H. Jin, X. Cai, S. Li, and Y. Shen, *Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1).* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(15): p. 5657-62.
 30. Prakriya, M. and R.S. Lewis, *Store-Operated Calcium Channels.* Physiol Rev, 2015. **95**(4): p. 1383-436.
 31. Stathopulos, P.B., R. Schindl, M. Fahrner, L. Zheng, G.M. Gasmi-Seabrook, M. Muik, C. Romanin, and M. Ikura, *STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry.* Nat Commun, 2013. **4**: p. 2963.
 32. Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.H. Puppel, B. Tanasa, P.G. Hogan, R.S. Lewis, M. Daly, and A. Rao, *A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function.* Nature, 2006. **441**(7090): p. 179-85.
 33. Yeromin, A.V., S.L. Zhang, W. Jiang, Y. Yu, O. Safrina, and M.D. Cahalan, *Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai.* Nature, 2006. **443**(7108): p. 226-9.
 34. Vig, M., C. Peinelt, A. Beck, D.L. Koomoa, D. Rabah, M. Koblan-Huberson, S. Kraft, H. Turner, A. Fleig, R. Penner, and J.P. Kinet, *CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry.* Science, 2006. **312**(5777): p. 1220-3.
 35. Hou, X., L. Pedi, M.M. Diver, and S.B. Long, *Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai.* Science, 2012. **338**(6112): p. 1308-13.

36. Lis, A., C. Peinelt, A. Beck, S. Parvez, M. Monteilh-Zoller, A. Fleig, and R. Penner, *CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties*. *Curr Biol*, 2007. **17**(9): p. 794-800.
37. Mercer, J.C., W.I. Dehaven, J.T. Smyth, B. Wedel, R.R. Boyles, G.S. Bird, and J.W. Putney, Jr., *Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(34): p. 24979-90.
38. Rothberg, B.S., Y. Wang, and D.L. Gill, *Orai channel pore properties and gating by STIM: implications from the Orai crystal structure*. *Sci Signal*, 2013. **6**(267): p. pe9.
39. Dietrich, A., H. Kalwa, B.R. Rost, and T. Gudermann, *The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance*. *Pflugers Arch*, 2005. **451**(1): p. 72-80.
40. Gees, M., B. Colsoul, and B. Nilius, *The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(10): p. a003962.
41. McFadzean, I. and A. Gibson, *The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle*. *Br J Pharmacol*, 2002. **135**(1): p. 1-13.
42. Smani, T., G. Shapovalov, R. Skryma, N. Prevarskaya, and J.A. Rosado, *Functional and physiopathological implications of TRP channels*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1853**(8): p. 1772-82.
43. Cosens, D.J. and A. Manning, *Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant*. *Nature*, 1969. **224**(5216): p. 285-7.
44. Montell, C. and G.M. Rubin, *Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction*. *Neuron*, 1989. **2**(4): p. 1313-23.
45. Zhu, X., P.B. Chu, M. Peyton, and L. Birnbaumer, *Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the Drosophila trp gene*. *FEBS Lett*, 1995. **373**(3): p. 193-8.
46. Wes, P.D., J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten, and C. Montell, *TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(21): p. 9652-6.
47. Zitt, C., A. Zobel, A.G. Obukhov, C. Harteneck, F. Kalkbrenner, A. Lückhoff, and G. Schultz, *Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion*. *Neuron*, 1996. **16**(6): p. 1189-96.
48. Montell, C., *The TRP superfamily of cation channels*. *Sci STKE*, 2005. **2005**(272): p. re3.
49. Nilius, B. and G. Owsianik, *The transient receptor potential family of ion channels*. *Genome Biol*, 2011. **12**(3): p. 218.
50. Clapham, D.E., *TRP channels as cellular sensors*. *Nature*, 2003. **426**(6966): p. 517-24.
51. Samanta, A., T.E.T. Hughes, and V.Y. Moiseenkova-Bell, *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*. *Subcell Biochem*, 2018. **87**: p. 141-165.
52. Vazquez, G., B.J. Wedel, O. Aziz, M. Trebak, and J.W. Putney, Jr., *The mammalian TRPC cation channels*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1742**(1-3): p. 21-36.
53. Dietrich, A., M. Fahlbusch, and T. Gudermann, *Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator?* *Cells*, 2014. **3**(4): p. 939-62.
54. Abramowitz, J. and L. Birnbaumer, *Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels*. *Faseb j*, 2009. **23**(2): p. 297-328.
55. Putney, J.W., Jr., *The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels*. *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(6): p. 282-6.
56. Clapham, D.E., L.W. Runnels, and C. Strübing, *The TRP ion channel family*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. **2**(6): p. 387-96.

57. Hofmann, T., M. Schaefer, G. Schultz, and T. Gudermann, *Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7461-6.
58. Storch, U., A.L. Forst, M. Philipp, T. Gudermann, and M. Mederos y Schnitzler, *Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes*. J Biol Chem, 2012. **287**(5): p. 3530-40.
59. Hofmann, T., A.G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann, and G. Schultz, *Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol*. Nature, 1999. **397**(6716): p. 259-63.
60. Storch, U., A.L. Forst, F. Pardatscher, S. Erdogmus, M. Philipp, M. Gregoritza, Y.S.M. Mederos, and T. Gudermann, *Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(1): p. E37-e46.
61. Shaw, J.P., P.J. Utz, D.B. Durand, J.J. Toole, E.A. Emmel, and G.R. Crabtree, *Identification of a putative regulator of early T cell activation genes*. Science, 1988. **241**(4862): p. 202-5.
62. Serfling, E., R. Barthelmäs, I. Pfeuffer, B. Schenk, S. Zarius, R. Swoboda, F. Mercurio, and M. Karin, *Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes*. Embo j, 1989. **8**(2): p. 465-73.
63. Macian, F., *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 472-84.
64. Wu, H., A. Peisley, I.A. Graef, and G.R. Crabtree, *NFAT signaling and the invention of vertebrates*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(6): p. 251-60.
65. Putney, J.W., *Calcium signaling: deciphering the calcium-NFAT pathway*. Curr Biol, 2012. **22**(3): p. R87-9.
66. Vaeth, M. and S. Feske, *NFAT control of immune function: New Frontiers for an Abiding Trooper*. F1000Res, 2018. **7**: p. 260.
67. Park, Y.J., S.A. Yoo, M. Kim, and W.U. Kim, *The Role of Calcium-Calcineurin-NFAT Signaling Pathway in Health and Autoimmune Diseases*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 195.
68. Pan, M.G., Y. Xiong, and F. Chen, *NFAT gene family in inflammation and cancer*. Curr Mol Med, 2013. **13**(4): p. 543-54.
69. Nilius, B., G. Owsianik, T. Voets, and J.A. Peters, *Transient receptor potential cation channels in disease*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 165-217.
70. Oh-Hora, M., M. Yamashita, P.G. Hogan, S. Sharma, E. Lamperti, W. Chung, M. Prakriya, S. Feske, and A. Rao, *Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 432-43.
71. Yuan, J.P., W. Zeng, G.N. Huang, P.F. Worley, and S. Muallem, *STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 636-45.
72. Lee, K.P., J.P. Yuan, J.H. Hong, I. So, P.F. Worley, and S. Muallem, *An endoplasmic reticulum/plasma membrane junction: STIM1/Orai1/TRPCs*. FEBS Lett, 2010. **584**(10): p. 2022-7.
73. Lee, K.P., J.P. Yuan, I. So, P.F. Worley, and S. Muallem, *STIM1-dependent and STIM1-independent function of transient receptor potential canonical (TRPC) channels tunes their store-operated mode*. J Biol Chem, 2010. **285**(49): p. 38666-73.
74. Liao, Y., C. Erxleben, E. Yildirim, J. Abramowitz, D.L. Armstrong, and L. Birnbaumer, *Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4682-7.

75. Liao, Y., C. Erxleben, J. Abramowitz, V. Flockerzi, M.X. Zhu, D.L. Armstrong, and L. Birnbaumer, *Functional interactions among Orail, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orail/TRPC model for SOCE/Icrac channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 2895-900.
76. Cheng, K.T., X. Liu, H.L. Ong, and I.S. Ambudkar, *Functional requirement for Orail in store-operated TRPC1-STIM1 channels*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 12935-40.
77. Choi, S., J. Maleth, A. Jha, K.P. Lee, M.S. Kim, I. So, M. Ahuja, and S. Muallem, *The TRPCs-STIM1-Orail interaction*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **223**: p. 1035-54.
78. Liao, Y., J. Abramowitz, and L. Birnbaumer, *The TRPC family of TRP channels: roles inferred (mostly) from knockout mice and relationship to ORAI proteins*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **223**: p. 1055-75.
79. Cheng, K.T., H.L. Ong, X. Liu, and I.S. Ambudkar, *Contribution and regulation of TRPC channels in store-operated Ca²⁺ entry*. Curr Top Membr, 2013. **71**: p. 149-79.
80. Malczyk, M., C. Veith, R.T. Schermuly, T. Gudermann, A. Dietrich, N. Sommer, N. Weissmann, and O. Pak, *NADPH oxidases-do they play a role in TRPC regulation under hypoxia?* Pflugers Arch, 2016. **468**(1): p. 23-41.
81. Lee, K.P., S. Choi, J.H. Hong, M. Ahuja, S. Graham, R. Ma, I. So, D.M. Shin, S. Muallem, and J.P. Yuan, *Molecular determinants mediating gating of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1)*. J Biol Chem, 2014. **289**(10): p. 6372-82.
82. Huang, G.N., W. Zeng, J.Y. Kim, J.P. Yuan, L. Han, S. Muallem, and P.F. Worley, *STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(9): p. 1003-10.
83. Zeng, W., J.P. Yuan, M.S. Kim, Y.J. Choi, G.N. Huang, P.F. Worley, and S. Muallem, *STIM1 gates TRPC channels, but not Orail, by electrostatic interaction*. Mol Cell, 2008. **32**(3): p. 439-48.
84. Kim, M.S., W. Zeng, J.P. Yuan, D.M. Shin, P.F. Worley, and S. Muallem, *Native Store-operated Ca²⁺ Influx Requires the Channel Function of Orail and TRPC1*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 9733-41.
85. Liu, X., K.T. Cheng, B.C. Bandyopadhyay, B. Pani, A. Dietrich, B.C. Paria, W.D. Swaim, D. Beech, E. Yildirim, B.B. Singh, L. Birnbaumer, and I.S. Ambudkar, *Attenuation of store-operated Ca²⁺ current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(44): p. 17542-7.
86. Dietrich, A., H. Kalwa, U. Storch, M. Mederos y Schnitzler, B. Salanova, O. Pinkenburg, G. Dubrovska, K. Essin, M. Gollasch, L. Birnbaumer, and T. Gudermann, *Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1*. Pflugers Arch, 2007. **455**(3): p. 465-77.
87. Varga-Szabo, D., K.S. Authi, A. Braun, M. Bender, A. Ambily, S.R. Hassock, T. Gudermann, A. Dietrich, and B. Nieswandt, *Store-operated Ca(2+) entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1*. Pflugers Arch, 2008. **457**(2): p. 377-87.
88. Ong, H.L., K.T. Cheng, X. Liu, B.C. Bandyopadhyay, B.C. Paria, J. Soboloff, B. Pani, Y. Gwack, S. Srikanth, B.B. Singh, D.L. Gill, and I.S. Ambudkar, *Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orail ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components*. J Biol Chem, 2007. **282**(12): p. 9105-16.
89. Ambudkar, I.S., *Ca²⁺ signaling microdomains:platforms for the assembly and regulation of TRPC channels*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(1): p. 25-32.
90. Kiselyov, K., J.Y. Kim, W. Zeng, and S. Muallem, *Protein-protein interaction and function TRPC channels*. Pflugers Arch, 2005. **451**(1): p. 116-24.

91. Liu, X., B.C. Bandyopadhyay, B.B. Singh, K. Groschner, and I.S. Ambudkar, *Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21600-6.
92. Wu, X., T.K. Zagranichnaya, G.T. Gurda, E.M. Eves, and M.L. Villereal, *A TRPC1/TRPC3-mediated increase in store-operated calcium entry is required for differentiation of H19-7 hippocampal neuronal cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(42): p. 43392-402.
93. Beech, D.J., *Emerging functions of 10 types of TRP cationic channel in vascular smooth muscle*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005. **32**(8): p. 597-603.
94. Sundivakkam, P.C., M. Freichel, V. Singh, J.P. Yuan, S.M. Vogel, V. Flockerzi, A.B. Malik, and C. Tiruppathi, *The Ca(2+) sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1) is necessary and sufficient for the store-operated Ca(2+) entry function of transient receptor potential canonical (TRPC) 1 and 4 channels in endothelial cells*. Mol Pharmacol, 2012. **81**(4): p. 510-26.
95. Zagranichnaya, T.K., X. Wu, and M.L. Villereal, *Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29559-69.
96. Liao, Y., N.W. Plummer, M.D. George, J. Abramowitz, M.X. Zhu, and L. Birnbaumer, *A role for Orai in TRPC-mediated Ca2+ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca2+ entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3202-6.
97. Chen, W., I. Thielmann, S. Gupta, H. Subramanian, D. Stegner, R. van Kruchten, A. Dietrich, S. Gambaryan, J.W. Heemskerk, H.M. Hermanns, B. Nieswandt, and A. Braun, *Orai1-induced store-operated Ca(2+) entry enhances phospholipase activity and modulates canonical transient receptor potential channel 6 function in murine platelets*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(4): p. 528-39.
98. Silverthorn, D.U., *Physiologie. Die komplette Physiologie des Menschen in integrativer Darstellung*. 2009: Pearson Studium. 1408.
99. Matthys, H.S., W., *Klinische Pneumologie*. 4. Auflage ed. 2008: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
100. ICRP, P., *Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection*. Ann ICRP, 1994. **24**(1-3): p. 1-482.
101. Silbernagl, S. and A. Despopoulos, *Taschenatlas der Physiologie*. 6. Auflage ed. 2003: Thieme.
102. Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*. 1998: de Gruyter.
103. Aumüller, G., G. Aust, A. Doll, J. Engele, J. Kirsch, S. Mense, and L.J. Wurzinger, *Duale Reihe Anatomie*. 2006: Thieme.
104. Kleinstreuer, C., Z. Zhang, and J.F. Donohue, *Targeted drug-aerosol delivery in the human respiratory system*. Annu Rev Biomed Eng, 2008. **10**: p. 195-220.
105. Meyerholz, D.K., C.J. Suarez, S.M. Dintzis, and C.W. Frevert, *9 - Respiratory System*, in *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*, P.M. Treuting, S.M. Dintzis, and K.S. Montine, Editors. 2018, Academic Press: San Diego. p. 147-162.
106. Volckaert, T. and S. De Langhe, *Lung epithelial stem cells and their niches: Fgf10 takes center stage*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2014. **7**: p. 8.
107. Kannler, M., *TRPA1-Kationenkanäle: Expression und Funktion als Sauerstoffsensoren in Epithelzellen des respiratorischen Systems*, in *Faculty of Medicine*. 2019, LMU München: München.
108. White, E.S., *Lung extracellular matrix and fibroblast function*. Ann Am Thorac Soc, 2015. **12 Suppl 1**(Suppl 1): p. S30-3.

109. Gelfand, E.W., *Pro: mice are a good model of human airway disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(1): p. 5-6; discussion 7-8.
110. Hoepfer, M.M., M. Humbert, R. Souza, M. Idrees, S.M. Kawut, K. Sliwa-Hahnle, Z.C. Jing, and J.S. Gibbs, *A global view of pulmonary hypertension*. Lancet Respir Med, 2016. **4**(4): p. 306-22.
111. Prins, K.W. and T. Thenappan, *World Health Organization Group I Pulmonary Hypertension: Epidemiology and Pathophysiology*. Cardiol Clin, 2016. **34**(3): p. 363-74.
112. Kovacs, G., D. Dumitrescu, A. Barner, S. Greiner, E. Grünig, A. Hager, T. Köhler, R. Kozlik-Feldmann, I. Kruck, A.E. Lammers, D. Mereles, A. Meyer, J. Meyer, S. Pabst, H.J. Seyfarth, C. Sinning, S. Soricter, G. Stähler, H. Wilkens, and M. Held, *Definition, clinical classification and initial diagnosis of pulmonary hypertension: Updated recommendations from the Cologne Consensus Conference 2018*. Int J Cardiol, 2018. **272s**: p. 11-19.
113. Simonneau, G., D. Montani, D.S. Celermajer, C.P. Denton, M.A. Gatzoulis, M. Krowka, P.G. Williams, and R. Souza, *Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2019. **53**(1).
114. Weitzenblum, E., C. Hirth, A. Ducolone, R. Mirhom, J. Rasaholinjanahary, and M. Ehrhart, *Prognostic value of pulmonary artery pressure in chronic obstructive pulmonary disease*. Thorax, 1981. **36**(10): p. 752-8.
115. Seeger, W., Y. Adir, J.A. Barberà, H. Champion, J.G. Coghlan, V. Cottin, T. De Marco, N. Galiè, S. Ghio, S. Gibbs, F.J. Martinez, M.J. Semigran, G. Simonneau, A.U. Wells, and J.L. Vachiéry, *Pulmonary hypertension in chronic lung diseases*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(25 Suppl): p. D109-16.
116. Seferian, A., M.C. Chaumais, L. Savale, S. Günther, P. Tubert-Bitter, M. Humbert, and D. Montani, *Drugs induced pulmonary arterial hypertension*. Presse Med, 2013. **42**(9 Pt 2): p. e303-10.
117. Humbert, M., E.M. Lau, D. Montani, X. Jaïs, O. Sitbon, and G. Simonneau, *Advances in therapeutic interventions for patients with pulmonary arterial hypertension*. Circulation, 2014. **130**(24): p. 2189-208.
118. Eddahibi, S., N. Morrell, M.P. d'Ortho, R. Naeije, and S. Adnot, *Pathobiology of pulmonary arterial hypertension*. Eur Respir J, 2002. **20**(6): p. 1559-72.
119. Rabinovitch, M., *Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2372-9.
120. Weir, E.K., J. López-Barneo, K.J. Buckler, and S.L. Archer, *Acute oxygen-sensing mechanisms*. N Engl J Med, 2005. **353**(19): p. 2042-55.
121. Seeger, W. and S.S. Pullamsetti, *Mechanics and mechanisms of pulmonary hypertension-Conference summary and translational perspectives*. Pulm Circ, 2013. **3**(1): p. 128-36.
122. Davie, N., S.J. Haleen, P.D. Upton, J.M. Polak, M.H. Yacoub, N.W. Morrell, and J. Wharton, *ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(3): p. 398-405.
123. Fagan, K.A., I.F. McMurtry, and D.M. Rodman, *Role of endothelin-1 in lung disease*. Respir Res, 2001. **2**(2): p. 90-101.
124. Chester, A.H. and M.H. Yacoub, *The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension*. Glob Cardiol Sci Pract, 2014. **2014**(2): p. 62-78.
125. Farber, H.W. and J. Loscalzo, *Pulmonary arterial hypertension*. N Engl J Med, 2004. **351**(16): p. 1655-65.
126. Hoepfer, M.M., H.A. Ghofrani, M. Gorenflo, E. Grünig, S. Rosenkranz, and D. Schranz, *Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie*. Der Kardiologe, 2010. **4**(3): p. 189-207.

127. Giaid, A., M. Yanagisawa, D. Langleben, R.P. Michel, R. Levy, H. Shennib, S. Kimura, T. Masaki, W.P. Duguid, and D.J. Stewart, *Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension*. New England Journal of Medicine, 1993. **328**(24): p. 1732-1739.
128. Giaid, A. and D. Saleh, *Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension*. New England Journal of Medicine, 1995. **333**(4): p. 214-221.
129. Christman, B.W., C.D. McPherson, J.H. Newman, G.A. King, G.R. Bernard, B.M. Groves, and J.E. Loyd, *An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension*. New England Journal of Medicine, 1992. **327**(2): p. 70-75.
130. Richeldi, L., H.R. Collard, and M.G. Jones, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. Lancet, 2017. **389**(10082): p. 1941-1952.
131. Raghu, G., H.R. Collard, J.J. Egan, F.J. Martinez, J. Behr, K.K. Brown, T.V. Colby, J.F. Cordier, K.R. Flaherty, J.A. Lasky, D.A. Lynch, J.H. Ryu, J.J. Swigris, A.U. Wells, J. Ancochea, D. Bouros, C. Carvalho, U. Costabel, M. Ebina, D.M. Hansell, T. Johkoh, D.S. Kim, T.E. King, Jr., Y. Kondoh, J. Myers, N.L. Müller, A.G. Nicholson, L. Richeldi, M. Selman, R.F. Dudden, B.S. Griss, S.L. Protzko, and H.J. Schünemann, *An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(6): p. 788-824.
132. King, T.E., Jr., A. Pardo, and M. Selman, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. Lancet, 2011. **378**(9807): p. 1949-61.
133. Kelly, B.G., S.S. Lok, P.S. Hasleton, J.J. Egan, and J.P. Stewart, *A Rearranged Form of Epstein–Barr Virus DNA Is Associated with Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2002. **166**(4): p. 510-513.
134. Ueda, T., K. Ohta, N. Suzuki, M. Yamaguchi, K. Hirai, T. Horiuchi, J. Watanabe, T. Miyamoto, and K. Ito, *Idiopathic Pulmonary Fibrosis and High Prevalence of Serum Antibodies to Hepatitis C Virus*. American Review of Respiratory Disease, 1992. **146**(1): p. 266-268.
135. Rock, J.R., C.E. Barkauskas, M.J. Crouse, Y. Xue, J.R. Harris, J. Liang, P.W. Noble, and B.L. Hogan, *Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(52): p. E1475-83.
136. Hung, C., G. Linn, Y.H. Chow, A. Kobayashi, K. Mittelstadt, W.A. Altemeier, S.A. Gharib, L.M. Schnapp, and J.S. Duffield, *Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(7): p. 820-30.
137. Andersson-Sjöland, A., C.G. de Alba, K. Nihlberg, C. Becerril, R. Ramírez, A. Pardo, G. Westergren-Thorsson, and M. Selman, *Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 2129-40.
138. Kim, K.K., M.C. Kugler, P.J. Wolters, L. Robillard, M.G. Galvez, A.N. Brumwell, D. Sheppard, and H.A. Chapman, *Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops *in vivo* during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(35): p. 13180-13185.
139. Tanjore, H., D.S. Cheng, A.L. Degryse, D.F. Zoz, R. Abdolrasulnia, W.E. Lawson, and T.S. Blackwell, *Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal*

- transition in response to endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2011. **286**(35): p. 30972-80.
140. Tomasek, J.J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R.A. Brown, *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
 141. Klingberg, F., B. Hinz, and E.S. White, *The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis*. The Journal of Pathology, 2013. **229**(2): p. 298-309.
 142. Kristensen, J.H., M.A. Karsdal, F. Genovese, S. Johnson, B. Svensson, S. Jacobsen, P. Hägglund, and D.J. Leeming, *The role of extracellular matrix quality in pulmonary fibrosis*. Respiration, 2014. **88**(6): p. 487-99.
 143. Ghosh, A.K. and D.E. Vaughan, *PAI-1 in tissue fibrosis*. Journal of Cellular Physiology, 2012. **227**(2): p. 493-507.
 144. Ventetuolo, C.E., S.M. Kawut, and D.J. Lederer, *Plasma endothelin-1 and vascular endothelial growth factor levels and their relationship to hemodynamics in idiopathic pulmonary fibrosis*. Respiration, 2012. **84**(4): p. 299-305.
 145. Ugucioni, M., L. Pulsatelli, B. Grigolo, A. Facchini, L. Fasano, C. Cinti, M. Fabbri, G. Gasbarrini, and R. Meliconi, *Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis*. J Clin Pathol, 1995. **48**(4): p. 330-4.
 146. Swigris, J.J. and K.K. Brown, *The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. BioDrugs, 2010. **24**(1): p. 49-54.
 147. Raghu, G., K.J. Anstrom, T.E. King, Jr., J.A. Lasky, and F.J. Martinez, *Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2012. **366**(21): p. 1968-77.
 148. Zhao, X., J.Y.Y. Kwan, K. Yip, P.P. Liu, and F.F. Liu, *Targeting metabolic dysregulation for fibrosis therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2020. **19**(1): p. 57-75.
 149. Glassberg, M.K., *Overview of idiopathic pulmonary fibrosis, evidence-based guidelines, and recent developments in the treatment landscape*. Am J Manag Care, 2019. **25**(11 Suppl): p. S195-s203.
 150. Parekh, A.B., *Calcium signalling in health and disease*. Semin Cell Dev Biol, 2019. **94**: p. 1-2.
 151. Hammoudi, N. and D. Lebeche, *Calcium Signaling in Cardiovascular Physiology and Pathology*, in *Pathophysiology and Pharmacotherapy of Cardiovascular Disease*, G. Jagadeesh, P. Balakumar, and K. Maung-U, Editors. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 57-81.
 152. Belardetti, F. and G.W. Zamponi, *Calcium channels as therapeutic targets*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling, 2012. **1**(4): p. 433-451.
 153. Feske, S., *CRAC channelopathies*. Pflugers Arch, 2010. **460**(2): p. 417-35.
 154. Dietrich, A., *Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Health and Disease*. Cells, 2019. **8**(5).
 155. Parekh, A.B., *Store-operated CRAC channels: function in health and disease*. Nature Reviews Drug Discovery, 2010. **9**(5): p. 399-410.
 156. Picard, C., C.A. McCarl, A. Papolos, S. Khalil, K. Lüthy, C. Hivroz, F. LeDeist, F. Rieux-Laucat, G. Rechavi, A. Rao, A. Fischer, and S. Feske, *STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity*. N Engl J Med, 2009. **360**(19): p. 1971-80.
 157. Johnstone, L.S., S.J. Graham, and M.A. Dziadek, *STIM proteins: integrators of signalling pathways in development, differentiation and disease*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(7): p. 1890-903.
 158. Stiber, J., A. Hawkins, Z.S. Zhang, S. Wang, J. Burch, V. Graham, C.C. Ward, M. Seth, E. Finch, N. Malouf, R.S. Williams, J.P. Eu, and P. Rosenberg, *STIM1*

- signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle.* Nat Cell Biol, 2008. **10**(6): p. 688-97.
159. Jardin, I. and J.A. Rosado, *STIM and calcium channel complexes in cancer.* Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(6 Pt B): p. 1418-26.
160. Baba, Y., K. Nishida, Y. Fujii, T. Hirano, M. Hikida, and T. Kurosaki, *Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses.* Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 81-8.
161. Varga-Szabo, D., A. Braun, C. Kleinschnitz, M. Bender, I. Pleines, M. Pham, T. Renné, G. Stoll, and B. Nieswandt, *The calcium sensor STIM1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction.* J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1583-91.
162. Jairaman, A., C.H. Maguire, R.P. Schleimer, and M. Prakriya, *Allergens stimulate store-operated calcium entry and cytokine production in airway epithelial cells.* Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 32311.
163. Samanta, K. and A.B. Parekh, *Store-operated Ca²⁺ channels in airway epithelial cell function and implications for asthma.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2016. **371**(1700).
164. Di Capite, J.L., G.J. Bates, and A.B. Parekh, *Mast cell CRAC channel as a novel therapeutic target in allergy.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2011. **11**(1): p. 33-8.
165. Johnson, M. and M. Trebak, *ORAI channels in cellular remodeling of cardiorespiratory disease.* Cell Calcium, 2019. **79**: p. 1-10.
166. Bleakley, C., P.K. Hamilton, R. Pumb, M. Harbinson, and G.E. McVeigh, *Endothelial Function in Hypertension: Victim or Culprit?* J Clin Hypertens (Greenwich), 2015. **17**(8): p. 651-4.
167. Abdullaev, I.F., J.M. Bisailon, M. Potier, J.C. Gonzalez, R.K. Motiani, and M. Trebak, *Stim1 and Orail1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation.* Circ Res, 2008. **103**(11): p. 1289-99.
168. Trebak, M., *STIM1/Orail1, ICRAC, and endothelial SOC.* Circ Res, 2009. **104**(9): p. e56-7.
169. Shifren, A., C. Witt, C. Christie, and M. Castro, *Mechanisms of remodeling in asthmatic airways.* J Allergy (Cairo), 2012. **2012**: p. 316049.
170. Spinelli, A.M., J.C. González-Cobos, X. Zhang, R.K. Motiani, S. Rowan, W. Zhang, J. Garrett, P.A. Vincent, K. Matrougui, H.A. Singer, and M. Trebak, *Airway smooth muscle STIM1 and Orail1 are upregulated in asthmatic mice and mediate PDGF-activated SOCE, CRAC currents, proliferation, and migration.* Pflugers Arch, 2012. **464**(5): p. 481-92.
171. Dietrich, A., V. Chubanov, H. Kalwa, B.R. Rost, and T. Gudermann, *Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells.* Pharmacol Ther, 2006. **112**(3): p. 744-60.
172. Curcic, S., O. Tiapko, and K. Groschner, *Photopharmacology and opto-chemogenetics of TRPC channels-some therapeutic visions.* Pharmacol Ther, 2019. **200**: p. 13-26.
173. Nilius, B. and A. Szallasi, *Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine.* Pharmacol Rev, 2014. **66**(3): p. 676-814.
174. Mori, M.X., K. Itsuki, H. Hase, S. Sawamura, T. Kurokawa, Y. Mori, and R. Inoue, *Dynamics of receptor-operated Ca(2+) currents through TRPC channels controlled via the PI(4,5)P2-PLC signaling pathway.* Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 22.
175. Mukerji, N., T.V. Damodaran, and M.P. Winn, *TRPC6 and FSGS: the latest TRP channelopathy.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(8): p. 859-68.

176. Firth, A.L., C.V. Remillard, and J.X. Yuan, *TRP channels in hypertension*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1772**(8): p. 895-906.
177. Yu, Y., I. Fantozzi, C.V. Remillard, J.W. Landsberg, N. Kunichika, O. Platoshyn, D.D. Tigno, P.A. Thistlethwaite, L.J. Rubin, and J.X. Yuan, *Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(38): p. 13861-6.
178. Yu, Y., S.H. Keller, C.V. Remillard, O. Safrina, A. Nicholson, S.L. Zhang, W. Jiang, N. Vangala, J.W. Landsberg, J.Y. Wang, P.A. Thistlethwaite, R.N. Channick, I.M. Robbins, J.E. Loyd, H.A. Ghofrani, F. Grimminger, R.T. Schermuly, M.D. Cahalan, L.J. Rubin, and J.X. Yuan, *A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension*. *Circulation*, 2009. **119**(17): p. 2313-22.
179. Wang, J., L. Weigand, W. Lu, J.T. Sylvester, G.L. Semenza, and L.A. Shimoda, *Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells*. *Circ Res*, 2006. **98**(12): p. 1528-37.
180. Lin, M.J., G.P. Leung, W.M. Zhang, X.R. Yang, K.P. Yip, C.M. Tse, and J.S. Sham, *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*, 2004. **95**(5): p. 496-505.
181. Weissmann, N., A. Dietrich, B. Fuchs, H. Kalwa, M. Ay, R. Dumitrascu, A. Olschewski, U. Storch, M. Mederos y Schnitzler, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, O. Pinkenburg, W. Seeger, F. Grimminger, and T. Gudermann, *Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(50): p. 19093-8.
182. Xia, Y., X.R. Yang, Z. Fu, O. Paudel, J. Abramowitz, L. Birnbaumer, and J.S. Sham, *Classical transient receptor potential 1 and 6 contribute to hypoxic pulmonary hypertension through differential regulation of pulmonary vascular functions*. *Hypertension*, 2014. **63**(1): p. 173-80.
183. Dietrich, A., *Modulators of Transient Receptor Potential (TRP) Channels as Therapeutic Options in Lung Disease*. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2019. **12**(1).
184. Dietrich, A., Y.S.M. Mederos, M. Gollasch, V. Gross, U. Storch, G. Dubrovskaja, M. Obst, E. Yildirim, B. Salanova, H. Kalwa, K. Essin, O. Pinkenburg, F.C. Luft, T. Gudermann, and L. Birnbaumer, *Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(16): p. 6980-9.
185. Tai, Y., S. Yang, Y. Liu, and W. Shao, *TRPC Channels in Health and Disease*. *Adv Exp Med Biol*, 2017. **976**: p. 35-45.
186. Freichel, M., R. Vennekens, J. Olausson, S. Stolz, S.E. Philipp, P. Weissgerber, and V. Flockerzi, *Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies*. *J Physiol*, 2005. **567**(Pt 1): p. 59-66.
187. Seth, M., Z.S. Zhang, L. Mao, V. Graham, J. Burch, J. Stiber, L. Tsiokas, M. Winn, J. Abramowitz, H.A. Rockman, L. Birnbaumer, and P. Rosenberg, *TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart*. *Circ Res*, 2009. **105**(10): p. 1023-30.
188. Sel, S., B.R. Rost, A.O. Yildirim, B. Sel, H. Kalwa, H. Fehrenbach, H. Renz, T. Gudermann, and A. Dietrich, *Loss of classical transient receptor potential 6 channel reduces allergic airway response*. *Clin Exp Allergy*, 2008. **38**(9): p. 1548-58.
189. Yildirim, E., M.A. Carey, J.W. Card, A. Dietrich, G.P. Flake, Y. Zhang, J.A. Bradbury, Y. Reboloso, D.R. Germolec, D.L. Morgan, D.C. Zeldin, and L. Birnbaumer, *Severely blunted allergen-induced pulmonary Th2 cell response and lung*

- hyperresponsiveness in type 1 transient receptor potential channel-deficient mice.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **303**(6): p. L539-49.
190. Hofmann, K., S. Fiedler, S. Vierkotten, J. Weber, S. Klee, J. Jia, W. Zwicklenpflug, V. Flockerzi, U. Storch, A. Yildirim, T. Gudermann, M. Königshoff, and A. Dietrich, *Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis.* Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(2): p. 560-568.
191. Aydar, E., S. Yeo, M. Djamgoz, and C. Palmer, *Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: a potential target for breast cancer diagnosis and therapy.* Cancer Cell Int, 2009. **9**: p. 23.
192. Zeng, B., C. Yuan, X. Yang, S.L. Atkin, and S.Z. Xu, *TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis.* Curr Cancer Drug Targets, 2013. **13**(1): p. 103-16.
193. Thebault, S., M. Flourakis, K. Vanoverberghe, F. Vandermoere, M. Roudbaraki, V. Lehen'kyi, C. Slomianny, B. Beck, P. Mariot, J.L. Bonnal, B. Mauroy, Y. Shuba, T. Capiod, R. Skryma, and N. Prevarskaya, *Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells.* Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 2038-47.
194. Jiang, H.N., B. Zeng, Y. Zhang, N. Daskoulidou, H. Fan, J.M. Qu, and S.Z. Xu, *Involvement of TRPC channels in lung cancer cell differentiation and the correlation analysis in human non-small cell lung cancer.* PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67637.
195. Häfner, S., F. Burg, M. Kannler, N. Urban, P. Mayer, A. Dietrich, D. Trauner, J. Broichhagen, and M. Schaefer, *A (+)-Larixol Congener with High Affinity and Subtype Selectivity toward TRPC6.* ChemMedChem, 2018. **13**(10): p. 1028-1035.
196. Urban, N., K. Hill, L. Wang, W.M. Kuebler, and M. Schaefer, *Novel pharmacological TRPC inhibitors block hypoxia-induced vasoconstriction.* Cell Calcium, 2012. **51**(2): p. 194-206.
197. Schaefer, M., *TRPs: modulation by drug-like compounds.* Handb Exp Pharmacol, 2014. **223**: p. 1077-106.
198. Malin, R. *Boehringer Ingelheim beginnt klinische Phase-2-Studie einer zielgerichteten Therapie für Patienten mit schweren Atemwegskomplikationen aufgrund von COVID-19.* 2020; Available from: <https://www.boehringer-ingelheim.de/pressemitteilung/entwicklung-potentieller-therapie-fuer-schwere-covid19-komplikationen>.
199. Hartmann, J., E. Dragicevic, H. Adelsberger, H.A. Henning, M. Sumser, J. Abramowitz, R. Blum, A. Dietrich, M. Freichel, V. Flockerzi, L. Birnbaumer, and A. Konnerth, *TRPC3 Channels Are Required for Synaptic Transmission and Motor Coordination.* Neuron, 2008. **59**(3): p. 392-398.
200. Demleitner, J., *Molekulare Analyse der Funktion des TRPC6-Kanals in primären Podozyten der Maus.* 2016: München. p. 213 Seiten.
201. Fiedler, S., *Analyse des molekularen Aktivierungsmechanismus des TRPC6-Kanals und Entschlüsselung der Funktion von TRPC6 in Lungenzellen während der Entwicklung einer Lungenfibrose,* in Faculty of Medicine. 2020, LMU München: München.
202. Lewandoski, M., *Conditional control of gene expression in the mouse.* Nat Rev Genet, 2001. **2**(10): p. 743-55.
203. Stickel, D., *Cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ handling in pulmonary arterial smooth muscle and endothelial cells.* 2016, München. 154 Seiten.

204. Waypa, G.B., J.D. Marks, M.M. Mack, C. Boriboun, P.T. Mungai, and P.T. Schumacker, *Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes*. *Circ Res*, 2002. **91**(8): p. 719-26.
205. Staab-Weijnitz, C.A., I.E. Fernandez, L. Knüppel, J. Maul, K. Heinzelmann, B.M. Juan-Guardela, E. Hennen, G. Preissler, H. Winter, C. Neurohr, R. Hatz, M. Lindner, J. Behr, N. Kaminski, and O. Eickelberg, *FK506-Binding Protein 10, a Potential Novel Drug Target for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015. **192**(4): p. 455-67.
206. Kalwa, H., U. Storch, J. Demleitner, S. Fiedler, T. Mayer, M. Kannler, M. Fahlbusch, H. Barth, A. Smrcka, F. Hildebrandt, T. Gudermann, and A. Dietrich, *Phospholipase C epsilon (PLCε) induced TRPC6 activation: a common but redundant mechanism in primary podocytes*. *J Cell Physiol*, 2015. **230**(6): p. 1389-99.
207. Hofmann, K.M., *Molekulare Analyse des TRPC6-Kanals während der Ausbildung einer pulmonalen Fibrose*. 2017, München. IX, 136 Blätter.
208. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(6): p. 3440-50.
209. Etter, E.F., A. Minta, M. Poenie, and F.S. Fay, *Near-membrane [Ca²⁺] transients resolved using the Ca²⁺ indicator FFP18*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(11): p. 5368-73.
210. Eberhard, M. and P. Erne, *Calcium binding to fluorescent calcium indicators: calcium green, calcium orange and calcium crimson*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **180**(1): p. 209-15.
211. Golovina, V.A. and M.P. Blaustein, *Spatially and functionally distinct Ca²⁺ stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum*. *Science*, 1997. **275**(5306): p. 1643-8.
212. Devinney, M.J., 2nd, I.J. Reynolds, and K.E. Dineley, *Simultaneous detection of intracellular free calcium and zinc using fura-2FF and FluoZin-3*. *Cell Calcium*, 2005. **37**(3): p. 225-32.
213. Bioquest, A.; Available from: <https://www.aatbio.com/products/fura-ff-am-fura-2ff-am-cas-348079-12-9>.
214. Eyden, B., *The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine*. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(1): p. 22-37.
215. Baum, J. and H.S. Duffy, *Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about?* *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011. **57**(4): p. 376-9.
216. Peng, G., J. Xu, R. Liu, Z. Fu, S. Li, W. Hong, J. Chen, B. Li, and P. Ran, *Isolation, culture and identification of pulmonary arterial smooth muscle cells from rat distal pulmonary arteries*. *Cytotechnology*, 2017. **69**(5): p. 831-840.
217. Wettschureck, N. and S. Offermanns, *Mammalian G proteins and their cell type specific functions*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(4): p. 1159-204.
218. Darby, I.A. and T.D. Hewitson, *Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis*. *Int Rev Cytol*, 2007. **257**: p. 143-79.
219. Martinez, F.J., H.R. Collard, A. Pardo, G. Raghu, L. Richeldi, M. Selman, J.J. Swigris, H. Taniguchi, and A.U. Wells, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. **3**: p. 17074.
220. Hardie, R.C. and B. Minke, *The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors*. *Neuron*, 1992. **8**(4): p. 643-51.
221. Hardie, R.C. and B. Minke, *Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization*. *Trends Neurosci*, 1993. **16**(9): p. 371-6.

222. Zhu, X., M. Jiang, M. Peyton, G. Boulay, R. Hurst, E. Stefani, and L. Birnbaumer, *trp*, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell*, 1996. **85**(5): p. 661-71.
223. Boulay, G., D.M. Brown, N. Qin, M. Jiang, A. Dietrich, M.X. Zhu, Z. Chen, M. Birnbaumer, K. Mikoshiba, and L. Birnbaumer, *Modulation of Ca^{2+} entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca^{2+} entry*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(26): p. 14955-60.
224. Birnbaumer, L., G. Boulay, D. Brown, M. Jiang, A. Dietrich, K. Mikoshiba, X. Zhu, and N. Qin, *Mechanism of capacitative Ca^{2+} entry (CCE): interaction between IP3 receptor and TRP links the internal calcium storage compartment to plasma membrane CCE channels*. *Recent Prog Horm Res*, 2000. **55**: p. 127-61; discussion 161-2.
225. Trebak, M., J.B.G. St, R.R. McKay, L. Birnbaumer, and J.W. Putney, Jr., *Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(18): p. 16244-52.
226. Zhu, X., M. Jiang, and L. Birnbaumer, *Receptor-activated Ca^{2+} influx via human *Trp3* stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca^{2+} entry*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(1): p. 133-42.
227. Okada, T., R. Inoue, K. Yamazaki, A. Maeda, T. Kurosaki, T. Yamakuni, I. Tanaka, S. Shimizu, K. Ikenaka, K. Imoto, and Y. Mori, *Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca^{2+} -permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(39): p. 27359-70.
228. Lucas, P., K. Ukhanov, T. Leinders-Zufall, and F. Zufall, *A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction*. *Neuron*, 2003. **40**(3): p. 551-61.
229. Cahalan, M.D., *STIMulating store-operated Ca^{2+} entry*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(6): p. 669-77.
230. Kim, M.S., J.H. Hong, Q. Li, D.M. Shin, J. Abramowitz, L. Birnbaumer, and S. Muallem, *Deletion of TRPC3 in mice reduces store-operated Ca^{2+} influx and the severity of acute pancreatitis*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(4): p. 1509-17.
231. Peel, S.E., B. Liu, and I.P. Hall, *A key role for STIM1 in store operated calcium channel activation in airway smooth muscle*. *Respir Res*, 2006. **7**: p. 119.
232. Peel, S.E., B. Liu, and I.P. Hall, *ORAI and store-operated calcium influx in human airway smooth muscle cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008. **38**(6): p. 744-9.
233. Yue, X., B. Shan, and J.A. Lasky, *TGF- β : Titan of Lung Fibrogenesis*. *Curr Enzym Inhib*, 2010. **6**(2).
234. Mai, X., J. Shang, S. Liang, B. Yu, J. Yuan, Y. Lin, R. Luo, F. Zhang, Y. Liu, X. Lv, C. Li, X. Liang, W. Wang, and J. Zhou, *Blockade of Orail Store-Operated Calcium Entry Protects against Renal Fibrosis*. *J Am Soc Nephrol*, 2016. **27**(10): p. 3063-3078.
235. Balghi, H., R. Robert, B. Rappaz, X. Zhang, A. Wohlhuter-Haddad, A. Evagelidis, Y. Luo, J. Goepf, P. Ferraro, P. Roméo, M. Trebak, P.W. Wiseman, D.Y. Thomas, and J.W. Hanrahan, *Enhanced Ca^{2+} entry due to Orail plasma membrane insertion increases IL-8 secretion by cystic fibrosis airways*. *Faseb j*, 2011. **25**(12): p. 4274-91.
236. Zhang, S.L., A.V. Yeromin, X.H. Zhang, Y. Yu, O. Safrina, A. Penna, J. Roos, K.A. Stauderman, and M.D. Cahalan, *Genome-wide RNAi screen of Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(24): p. 9357-62.

237. Venkatachalam, K., F. Zheng, and D.L. Gill, *Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C*. J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 29031-40.
238. Heldt, S.A. and K.J. Ressler, *The Use of Lentiviral Vectors and Cre/loxP to Investigate the Function of Genes in Complex Behaviors*. Front Mol Neurosci, 2009. **2**: p. 22.
239. Pollock, D.M., T.L. Keith, and R.F. Highsmith, *Endothelin receptors and calcium signaling*. Faseb j, 1995. **9**(12): p. 1196-204.
240. Riaz, A., Y. Huang, and S. Johansson, *G-Protein-Coupled Lysophosphatidic Acid Receptors and Their Regulation of AKT Signaling*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(2): p. 215.
241. Trebak, M., G. Vazquez, G.S. Bird, and J.W. Putney, Jr., *The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels*. Cell Calcium, 2003. **33**(5-6): p. 451-61.
242. Bird, G.S., W.I. DeHaven, J.T. Smyth, and J.W. Putney, Jr., *Methods for studying store-operated calcium entry*. Methods, 2008. **46**(3): p. 204-12.
243. DeHaven, W.I., B.F. Jones, J.G. Petranka, J.T. Smyth, T. Tomita, G.S. Bird, and J.W. Putney, Jr., *TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 10): p. 2275-98.
244. Janssen, L.J., S. Mukherjee, and K. Ask, *Calcium Homeostasis and Ionic Mechanisms in Pulmonary Fibroblasts*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015. **53**(2): p. 135-48.
245. Shuba, Y.M., *Ca(2+) channel-forming ORAI proteins: cancer foes or cancer allies?* Exp Oncol, 2019. **41**(3): p. 200-206.
246. Pinto, M.C., A.H. Kihara, V.A. Goulart, F.M. Tonelli, K.N. Gomes, H. Ulrich, and R.R. Resende, *Calcium signaling and cell proliferation*. Cell Signal, 2015. **27**(11): p. 2139-49.
247. Potier, M., J.C. Gonzalez, R.K. Motiani, I.F. Abdullaev, J.M. Bisailon, H.A. Singer, and M. Trebak, *Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration*. Faseb j, 2009. **23**(8): p. 2425-37.
248. Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan, *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 707-47.
249. Chen, Y.F., P.C. Lin, Y.M. Yeh, L.H. Chen, and M.R. Shen, *Store-Operated Ca(2+) Entry in Tumor Progression: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications*. Cancers (Basel), 2019. **11**(7).
250. Yang, S., J.J. Zhang, and X.Y. Huang, *Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 124-34.
251. McAnulty, R.J., *Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(4): p. 666-71.
252. Fernandez, I.E. and O. Eickelberg, *The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers*. Proc Am Thorac Soc, 2012. **9**(3): p. 111-6.
253. Rønnov-Jessen, L. and O.W. Petersen, *A function for filamentous alpha-smooth muscle actin: retardation of motility in fibroblasts*. J Cell Biol, 1996. **134**(1): p. 67-80.
254. Taylor, M.P., O.O. Koyuncu, and L.W. Enquist, *Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(6): p. 427-39.
255. van Vliet, A.R., F. Giordano, S. Gerlo, I. Segura, S. Van Eygen, G. Molenberghs, S. Rocha, A. Houcine, R. Derua, T. Verfaillie, J. Vangindertael, H. De Keersmaecker, E. Waelkens, J. Tavernier, J. Hofkens, W. Annaert, P. Carmeliet, A. Samali, H. Mizuno, and P. Agostinis, *The ER Stress Sensor PERK Coordinates ER-Plasma Membrane Contact Site Formation through Interaction with Filamin-A and F-Actin Remodeling*. Mol Cell, 2017. **65**(5): p. 885-899.e6.

256. Hong, J., Z. Hu, Q. Wu, C. Tang, J. Hu, R. Chen, B. Li, and Z. Wang, *The deregulation of STIM1 and store operative calcium entry impaired aortic smooth muscle cells contractility in aortic medial degeneration*. Biosci Rep, 2019. **39**(1).
257. Rahaman, S.O., L.M. Grove, S. Paruchuri, B.D. Southern, S. Abraham, K.A. Niese, R.G. Scheraga, S. Ghosh, C.K. Thodeti, D.X. Zhang, M.M. Moran, W.P. Schilling, D.J. Tschumperlin, and M.A. Olman, *TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice*. J Clin Invest, 2014. **124**(12): p. 5225-38.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei allen Personen bedanken, die mich während der Durchführung und Anfertigung meiner Doktorarbeit in vielerlei Hinsicht unterstützt haben.

Zuallererst gilt mein herzlichster Dank meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Alexander Dietrich. Ich danke ihm vielmals für die Vergabe der anspruchsvollen und interessanten Fragestellung sowie der Möglichkeit die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe absolvieren zu können. Mein besonderer Dank gilt hierbei der stets hervorragenden Betreuung und tatkräftigen Unterstützung sowie der spannenden, wissenschaftlichen Diskussionen in den vergangenen Jahren. In diesem Zusammenhang möchte ich neben Alexander Dietrich auch dem Institutsleiter des Walther-Straub-Instituts, Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann, für die Aufnahme am Institut und die Teilnahme an vielen interessanten Konferenzen danken.

Mein ganz besonderer Dank gebührt all den Kollegen des Walther-Straub-Instituts, die ich während meiner Doktorarbeit kennenlernen durfte. Hierbei danke ich vor allem meiner Arbeitsgruppe für die tatkräftige Unterstützung und die Hilfestellung in den letzten Jahren. Ich möchte mich bei der gesamten AG Dietrich für die Einführung in die Methoden und den Umgang mit Mäusen vielmals bedanken. Ein ganz besonderer Dank gilt Susanne Fiedler, die mir über lange Zeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand und viel zum positiven Arbeitsklima beitrug. Außerdem möchte ich mich bei Astrid Bauer und Bettina Braun für die Unterstützung im Labor und bei Bestellungen herzlichst bedanken. Ebenso möchte ich Jonas Weber, Martina Kannler, Suhasini Rajan und Christian Schremmer meinen Dank für die gute Zusammenarbeit aussprechen. Ganz besonders möchte ich mich bei Suhi bedanken, die mit ihrer indischen Kultur eine angenehme Atmosphäre in die Arbeitsgruppe gebracht hat. Ein weiterer Dank gilt Fabienne Geiger, die mich bei der Revision des Papers tatkräftig unterstützte. Ebenso danke ich Isabel Müller sowohl für ihre Mithilfe als studentische Hilfskraft als auch für ihre angenehme Gesellschaft im Labor und in den Mittagspausen. Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei den Personen der anderen Arbeitsgruppen bedanken, die mich bei der Organisation des Doktorandenstammtisches unterstützt haben und für eine schöne Abwechslung zum Arbeitsalltag gesorgt haben.

Es hat mich ebenfalls sehr gefreut Dennis Faro, Melanie Meier und Katrin Schmidt auf den Konferenzen persönlich kennen gelernt zu haben.

Mein größter Dank gilt meinen zwei Brüdern, Martin und Thomas, meinen Freunden und vor allem meinem Partner, Beatus. Ich danke euch von ganzem Herzen für euren Beistand und die verständnisvolle Unterstützung nach dem Tod meiner Mutter. Ohne euch hätte ich das Ziel

meiner Promotion mit all den Höhen und Tiefen niemals erreichen können. Vielen Dank an Randi und Beatus für die schnellen Korrekturen und Anmerkungen.

Ganz besonders möchte ich mich nochmals bei meinem Freund Beatus bedanken. Du warst und bist für mich neben meinem Bruder Martin die größte Unterstützung und gibst mir jeden Tag aufs Neue sehr viel Kraft und Antrieb.

In Erinnerung an meine Mutter, Heidemarie Bendiks, widme ich ihr diese Doktorarbeit und bedanke mich bei ihr von tiefsten Herzen für all die schönen und unvergesslichen Momente in meinem Leben.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Ich, Larissa Bendiks, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Der Speicher- und Rezeptor-operierte Ca^{2+} -Einstrom in pulmonale arterielle glatte Muskelzellen und murine Lungenfibroblasten“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 20.10.2021

Ort, Datum

Larissa Bendiks

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand