

Aus der Klinik für Innere Medizin V
Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Dr. Robert Bals

Einfluss des TRPC1-Kanals auf das Wachstum von Lungentumoren

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: Constantin Weichert
geb. am: 22.09.1995 in Saarlouis

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Summary	1
Impact of the TRPC1 channel on lung tumor growth	2
2. Einleitung	3
2.1 Lungenkrebs	3
2.2 Entzündung und Tumorprogression	4
2.3 TRP-Kanäle	8
2.3.1 Entdeckung der TRP-Kanäle	9
2.3.2 Aufbau der TRP-Kanäle	10
2.3.3 Funktion und Regulation von TRP-Kanälen	11
2.3.4 TRP-Kanäle und Krebs.....	14
2.3.5 TRP-Kanäle und Lungenkrebs	16
2.3.6 TRPC1	17
2.3.6.1. Einfluss von TRPC1 auf Zellmigration, -proliferation und -differenzierung.....	17
2.3.6.2. TRPC1 und Lungenkrebs	18
2.3.6.3. TRPC1 und Entzündung.....	19
2.4 Fragestellung	21
3. Material und Methoden	22
3.1 Material	22
3.1.1 Geräte und Verbrauchsartikel.....	22
3.1.2 Lösungen und Puffer	23
3.1.3 Software.....	23
3.2 Methoden.....	23
3.2.1 Zellkultur	23
3.2.2 Zellzahlbestimmung	24
3.2.3 RNS-Isolation.....	24
3.2.4 Quantitative real time PCR.....	25
3.2.5 WST-Assay	27
3.2.6 Tierversuche	27

3.2.6.1.	Lungenpräparation, Fixierung, histologische Schnitte	28
3.2.6.2.	Bewertung des Tumorwachstums.....	29
3.3	Statistik.....	29
4.	Ergebnisse	30
4.1	Analyse der Expression von TRP-Kanälen in Tumorzellen und primären Atemwegsepithelzellen	30
4.2	Analyse der Funktion von TRPC1 im murinen Lungenkrebsmodell	32
4.2.1	Alleinige Defizienz für TRPC1 hat keinen signifikanten Einfluss auf das Tumorwachstum.....	32
4.2.2	Defizienz für TRPC1 führt zu einem verminderten entzündungsinduzierten Tumorwachstum.....	33
4.3	TRPC 1 beeinflusst die Entzündung in der Tumormikroumgebung	35
4.4	Der Calciumkanal-Inhibitor SKF-96365 hemmt die Proliferation von A549 Zellen.....	36
5.	Diskussion	37
5.1	Expression von TRP Kanälen.....	37
5.2	TRPC1 nimmt Einfluss auf die Proliferation von Lungenkrebszellen	38
5.3	TRPC1 moduliert Entzündungsprozesse.....	39
5.4	Schlussbemerkung.....	41
6.	Literaturverzeichnis.....	42
7.	Abbildungsverzeichnis	57
8.	Tabellenverzeichnis.....	58
9.	Publikationen.....	59
10.	Danksagung.....	60

1. Zusammenfassung / Summary

Lungenkrebs ist eine der weltweit häufigsten malignen Erkrankungen. Die Prognose für die Patienten ist meist schlecht und die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) schwankt zwischen 10 und 20 %. Verantwortlich dafür sind zum einen die meist späte Diagnose und zum anderen die, vor allem in fortgeschrittenen Stadien, ineffektiven therapeutischen Möglichkeiten.

Haupttrisikofaktor für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms ist der aktive Tabakkonsum. Darüber hinaus stellen genetische Faktoren, Vorerkrankungen der Lunge (zum Beispiel COPD, Tuberkulose) sowie Umwelteinflüsse (Luftverschmutzung, Radonbelastung) Risikofaktoren für eine Neoplasie der Lunge dar. Außerdem begünstigt eine chronische Entzündung der Lunge die Entstehung und das Fortschreiten einer malignen Erkrankung.

Calcium ist als sekundärer Botenstoff (*second messenger*) an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Dabei unterliegt der Calciumhaushalt der Zelle unzähligen Steuerungsmechanismen und kann sehr fein reguliert werden. Beteiligt an der Calciumhomöostase sind unter anderem die nicht selektiven, calciumpermeablen Kationenkanäle der Transient-Receptor-Potential-Channel-Familie (TRP-Familie). Diese Kationenkanäle werden in mehrere Untergruppen unterteilt und im Menschen und anderen Säugetieren ubiquitär exprimiert. TRP-Kanäle haben Einfluss auf Zellproliferation, Zelltod und Zellmigration. Eine Auswirkung auf die Pathogenese und das Vorschreiten maligner Erkrankungen wurde bereits mehrfach postuliert. Insbesondere der TRP-Kanal canonical 1 (TRPC1) scheint bei der Betrachtung neoplastischer Erkrankungen der Lunge interessant zu sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit die Expression von TRPC1 mit dem Wachstum und Fortschreiten von Lungenkrebs zusammenhängt.

Die mRNA-Expression verschiedener TRP-Kanäle wurde mittels semi-quantitativer Real-Time PCR gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Tumorzelllinien A549 und Calu-3 sowie primäre Atemwegsepithelzellen von Patienten mit Lungentumoren die TRP-Kanäle TRPC1, TRPV1, TRPV4, TRPM4 und TRPM7 robust exprimieren. Im Kras-abhängigen murinen Lungenkrebsmodell wurde gezeigt, dass die Defizienz für TRPC1 bei Mäusen bis zu einem Alter von 6 Monaten keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von Lungentumoren hat. Im Modell der bakteriell induzierten Entzündung führte hingegen die Defizienz für TRPC1 zu einem signifikant verminderten Tumorstadium. Dies ging mit einer signifikant reduzierten Expression des tumorfördernden Zytokins IL-6 in der Tumormikroumgebung einher.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass TRPC1 entzündungsinduziertes Tumorstadium fördert. Zurückzuführen ist dieser Umstand möglicherweise darauf, dass TRPC1 die Expression tumorfördernder Zytokine begünstigt. Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass ein Entzündungsmilieu das Wachstum maligner Zellen verstärkt. Weitere Studien sind notwendig, um zu klären, inwiefern die tumorfördernde Funktion von TRPC1 von seiner Expression in Tumorzellen oder Entzündungszellen abhängig ist.

Impact of the TRPC1 channel on lung tumor growth

Lung cancer is one of the most common malignant diseases worldwide. The prognosis for patients is usually poor. The 5-year survival rate varies between 10 and 20 %. This is on the one hand due to the frequently late diagnosis and on the other hand to the limited therapeutic options, especially in advanced states. Main risk factor for the development of lung cancer is active tobacco consumption. Furthermore, genetic disposition, previous lung diseases (for example tuberculosis) and environmental factors such as air pollution and radon exposure are risk factors for malignancies of the lung. Moreover, chronic inflammation of the lung promotes the development and progression of lung cancer.

Calcium is involved as a second messenger in plenty of cellular processes. The calcium homeostasis of the cell is subject to a myriad of regulatory mechanisms and is finely adjusted. Among others, the non-selective, calcium-permeable cation channels of the transient receptor potential channel (TRP) family are involved in calcium homeostasis. These cation channels are subdivided into several subgroups and ubiquitously expressed in humans and other mammals. TRP channels influence cell proliferation, cell death and cell migration. An effect on the pathogenesis and progression of malignant diseases has been postulated several times yet. In particular, TRP channel canonical 1 (TRPC1) seemed to be of interest considering lung malignancies. The aim of the present study was to investigate the extent to which TRPC1 expression is related to lung cancer growth and progression.

The mRNA expression of different TRP channels was measured by semi-quantitative real time PCR. It is shown that A549 and Calu-3 tumor cells as well as primary airway epithelial cells robustly express TRPC1, TRPV1, TRPV4, TRPM4 and TRPM7 channels. In the Kras-dependent lung cancer model, deficiency in TRPC1 had no significant effect on lung tumor growth in mice up to 6 months of age. In contrast, in the bacterial-induced inflammation model deficiency in TRPC1 resulted in significantly decreased tumor growth. This was accompanied by significantly decreased expression of the tumor-promoting cytokine IL-6 in the tumor-microenvironment.

The present study demonstrates that TRPC1 promotes inflammation-induced tumor growth. This circumstance may be due to the fact that TRPC1 promotes the expression of tumor-promoting cytokines. This is consistent with the hypothesis that an inflammatory environment enhances the growth of malignant cells. Further studies are required to clarify to which extent the tumor-promoting function of TRPC1 is dependent on its expression in tumor cells or inflammatory cells.

2. Einleitung

2.1 Lungenkrebs

Lungenkrebs ist eine der häufigsten malignen Entitäten weltweit. Jährlich werden bezogen auf die Weltbevölkerung etwa 2,2 Millionen Fälle neu diagnostiziert und es gibt etwa 1,8 Millionen Todesfälle aufgrund der Erkrankung (SIEGEL et al., 2019; SUNG et al., 2021). Die meist späte Diagnose der Erkrankung und ihre Aggressivität sorgen für eine in den meisten Fällen schlechte Prognose. Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) schwankt zwischen 10 und 20 %. Damit handelt es sich bei Lungenkrebs um eine der malignen Erkrankungen mit der schlechtesten Prognose überhaupt. Sie stellt bei Männern die häufigste (21,5 %) und bei Frauen die zweithäufigste (13,7 %) Krebstodesursache dar (SUNG et al., 2021).

Lungentumore können in zwei große Gruppen unterteilt werden. Dabei entfallen etwa 85 % der Erkrankungen auf die nicht-kleinzelligen Tumore (*non small cell lung cancer*; NSCLC) und etwa 15 % auf die kleinzelligen Tumore (*small cell lung cancer*; SCLC) (ZAPPA, MOUSA, 2016). Die kleinzelligen Lungenkarzinome sind nicht nur histologisch, sondern auch durch ihre klinischen Eigenschaften von den nicht-kleinzelligen zu differenzieren. Sie zeichnen sich durch ein schnelleres, aggressiveres Wachstum und eine schlechtere Prognose aus. Dabei reagieren die SCLC aber – aufgrund ihrer hohen Teilungsrate – sensitiver auf chemotherapeutische Therapieansätze (JACKMAN, JOHNSON, 2005). Innerhalb der Gruppe der NSCLC können weitere histologische Formen unterschieden werden. Zum einen die Plattenepithelkarzinome (etwa 30 bis 40 % der Fälle), zum anderen die Adenokarzinome (20 bis 30 %) sowie die großzelligen Karzinome (etwa 10 %) (HAMMERSCHMIDT, WIRTZ, 2009; WAHBAH et al., 2007). Diese histologisch unterschiedlichen Typen werden aufgrund klinischer Gemeinsamkeiten in der Gruppe der NSCLC subsummiert. Anders als die SCLC wachsen diese Entitäten eher langsam, sind für klassische Chemotherapeutika aber aufgrund mannigfaltiger Resistenzmechanismen und einer niedrigeren Teilungsrate weniger sensibel (CHANG, 2011).

Die Ursachen für die Entstehung von Lungenkarzinomen sind vielfältig. Neben endogenen Risikofaktoren sind exogene Risikofaktoren von großer Bedeutung. Die endogenen Risikofaktoren umfassen die genetische Disposition und Vorerkrankungen der Lunge, wie beispielsweise die COPD und spielen insbesondere für Adenokarzinome eine Rolle (SCHWARTZ, RUCKDESCHEL, 2006). Von deutlich größerer Bedeutung sind jedoch die exogenen Einflüsse. Wichtigster Risikofaktor für die Entstehung von Lungentumoren insgesamt ist der aktive Tabakkonsum (SUNG et al., 2021). Insbesondere die Ausbildung eines NSCLC steht in Verbindung mit Zigarettenrauch (KENFIELD et al., 2008). Insgesamt werden Schätzungen zufolge etwa 90 % der Krebserkrankungen der Lunge von rauchinduzierten Veränderungen des Lungengewebes hervorgerufen oder mitverursacht (ALBERG et al., 2013). Weitere exogene Risikofaktoren für die Entstehung maligner Erkrankungen der Lunge sind Passivrauchen, das natürlich vorkommende Gas Radon, sowie Luftverschmutzung (COHEN, 2000; DUMA et al., 2019; MCERLEAN, GINSBERG, 2011; PAWEL, PUSKIN, 2004). Die schädlichen

Auswirkungen des Zigarettenrauchs basieren auf der Inhalation einer Vielzahl toxischer Stoffe, darunter einige mit nachweislich kanzerogenen Eigenschaften. Pro Zug an einer Zigarette werden etwa 10^{10} Partikel pro Milliliter und mehr als 4800 Stoffe verschiedenster Klassen eingeatmet. Bei etwa 60 von ihnen wurden bereits karzinogene Eigenschaften nachgewiesen. Dazu gehören unter anderem polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), N-Nitrosamine, aromatische Amine, Schwermetalle (Cadmium, Nickel) und Aldehyde (HECHT, 1999; PFEIFER et al., 2002). Von den im Rauch enthaltenen Stoffen werden eine Vielzahl pathologischer Veränderungen des Lungengewebes gefördert. Nachweisbar sind eine gesteigerte Entzündungsreaktion, oxidative Schädigungen und insbesondere genetische Veränderungen. Bei letzteren scheinen im Speziellen die Mechanismen der DNS-Methylierung, Histon-Acetylierung sowie die Beeinflussung nicht kodierender RNS eine Rolle zu spielen (GAO et al., 2015; IZZOTTI et al., 2011; SZULAKOWSKI et al., 2006; ZONG et al., 2019). Ein weiterer unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung eines Lungenkarzinoms ist die chronisch obstruktive Lungenkrankheit (COPD), die wiederum durch den Zigarettenkonsum verursacht wird (ADCOCK et al., 2011; HOUGHTON, 2013; YOUNG et al., 2009).

Therapeutisch stehen bis heute nur unbefriedigende Optionen zur Verfügung. Im frühen Stadium kann ein Tumor zwar chirurgisch entfernt werden, im fortgeschrittenen Krankheitsstadium sind die Optionen jedoch begrenzt. Dabei wird ein Großteil der Erkrankungen erst in einem späten Stadium diagnostiziert. Bei den nicht-kleinzelligen Tumoren werden 40 bis 50 % erst im Stadium IV, welches keine kurativen Therapieansätze mehr zulässt, erkannt (HAMMERSCHMIDT, WIRTZ, 2009). Kleinzellige Tumore werden sogar in 60 bis 70 % der Fälle erst im fortgeschrittenen Stadium (*extensive disease*), wenn bereits Fernmetastasen vorliegen, diagnostiziert. Therapien können zu diesem Zeitpunkt das Voranschreiten der Erkrankung meist nur noch verlangsamen, eine Heilung ist jedoch nicht möglich (JACKMAN, JOHNSON, 2005).

2.2 Entzündung und Tumorprogression

Von großer Wichtigkeit bei der Entstehung von Lungentumoren und Tumoren allgemein sind chronische Entzündungsprozesse. (BALKWILL, MANTOVANI, 2001; BREMNES et al., 2011; MANTOVANI et al., 2008). Dies wurde bereits vor 150 Jahren von Rudolf Virchow postuliert und konnte in mehreren Studien belegt werden (GRIVENNIKOV et al., 2010; MURATA, 2018; SHACTER, WEITZMAN, 2002; SHALAPOUR, KARIN, 2015). Schätzungen zufolge gehen 20 bis 25 % aller Tumoren auf Infektionen und chronische Entzündungsreaktionen zurück (AGGARWAL et al., 2009; COUSSENS, WERB, 2002; GRETEN, GRIVENNIKOV, 2019).

Mit Hinblick auf Lungentumoren und deren Risikofaktoren zeigt sich, dass sowohl der Konsum von Zigaretten als auch die chronisch obstruktive Lungenkrankheit (*chronic obstructive pulmonary disease*; COPD) mit einer chronischen Inflammation einhergehen, beziehungsweise diese begünstigen (CHUNG, ADCOCK, 2008). Im Vordergrund steht bei Patienten mit COPD eine chronische Entzündung des Lungengewebes, die häufig durch eine bakterielle oder virale Infektion weiter

angetrieben wird (BARNES, 2016; BRUSSELLE et al., 2011). Die genauen molekularen Mechanismen der Inflammation in der COPD sind Gegenstand aktueller Forschung. Beteiligt an der chronischen Entzündung sind sowohl die angeborene als auch adaptive Immunantwort. Es kommt zur Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, sowie lymphoiden Follikeln (BRUSSELLE et al., 2011; RITZMANN, 2020). Interessanterweise hat die Freisetzung zahlreicher Zytokine Einfluss auf das Tumorwachstum von Lungenkarzinomen. Darunter Interleukin-17 (IL-17), das hauptsächlich von aktivierten CD4⁺ T-Helferzellen gebildet wird (MOSELEY et al., 2003). In mehreren Studien konnte bereits der Einfluss von IL-17 auf das Wachstum von Lungentumoren nachgewiesen werden (CHANG et al., 2014; HE et al., 2010; HUANG et al., 2016; LI et al., 2012; NEURATH, FINOTTO, 2012; REPERT et al., 2011; REPERT et al., 2012). Reppert et. al. konnten beispielsweise zeigen, dass Patienten mit einem Lungenkarzinom eine deutlich höhere IL-17 Expression im Lungengewebe aufwiesen als gesunde Kontrollpersonen (REPERT et al., 2011). Außerdem führte die intranasale Applikation eines anti-IL-17A Antikörpers zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums in Wildtyp (WT) Mäusen (REPERT et al., 2011). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Chang et. al., die nachwies, dass eine Defizienz für IL-17 in einem Kras-abhängigen Mausmodell zu einer deutlichen Reduktion der Lungentumorfläche führt (CHANG et al., 2014).

Ebenfalls eine Rolle spielt Interleukin-6 (IL-6), welches über den Transkriptionsfaktor *nuclear factor κ B* (NF-κB) reguliert wird (CAETANO et al., 2016; ELINAV et al., 2013). Dieser Transkriptionsfaktor ist von zentraler Bedeutung bei der Entwicklung von Lungentumoren. Meylan et. al. konnten zeigen, dass der NF-κB Signalweg im Mausmodell für die Entwicklung von Adenokarzinomen essenziell ist. Die Inhibition von NF-κB führte zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums (MEYLAN et al., 2009). Insbesondere in Kras-abhängigen Mausmodellen wurde IL-6 als pleiotroper Faktor für die Entstehung von Lungenkrebs identifiziert (JI et al., 2006; MOGHADDAM et al., 2009). Auch bei humanen Lungenkarzinomen ist die Expression von IL-6 mit einer schlechteren Prognose assoziiert (BARRERA et al., 2015). Eine antikörpervermittelte Blockade von IL-6 zeigte eine reduzierte Tumorzellproliferation sowie eine verringerte Tumorangiogenese (CAETANO et al., 2016). Für den negativen Effekt von IL-6 scheint die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) verantwortlich zu sein (CAETANO et al., 2016; JI et al., 2006; MACE et al., 2018; ZHU et al., 2014). STAT3 spielt bei der Tumorentstehung und -ausbreitung eine zentrale Rolle. Es wurde bereits gezeigt werden, dass die Expression von STAT3 mit einem kürzeren Überleben von Patienten mit Adenokarzinom zusammenhängt. Der Effekt war für Patienten mit einer Kras-Mutation noch deutlicher als für alle Patienten mit Adenokarzinom ohne Kras-Mutation (CAETANO et al., 2016). Die Aktivierung von STAT3 durch IL-6 führt zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), die von großer Bedeutung für die Entstehung von Tumoren insgesamt, aber auch Lungentumoren im Besonderen, ist (REKA et al., 2014; SOLTERMANN et al., 2008; WENDT et al., 2014). Die EMT geht auf Elizabeth Hay zurück, die 1980 als erste die Änderung des Phänotyps einer epithelialen zu einer mesenchymalen Zelle beschrieb (HAY, 1995; LAMOUILLE et al., 2014). Genauer

beschreibt die EMT, dass Epithelzellen durch zahlreiche biochemische Veränderungen einen mesenchymalen Phänotyp annehmen können. Dies geht mit veränderten Eigenschaften wie einer erhöhten Zellmigration, invasiverem Wachstum und höherer Resistenz gegen Apoptose einher (DAS et al., 2019; KALLURI, NEILSON, 2003; KALLURI, WEINBERG, 2009)

Gleichzeitig führt die Aktivierung der IL-6/STAT3-Achse zu einer Differenzierung von T-Helferzellen und triggert die Produktion von IL-17, das, wie bereits dargestellt, das Tumorwachstum begünstigt (HUANG et al., 2016). Ein anderer Faktor, der möglicherweise die Tumorprogression fördert, beziehungsweise zu einem tumorwachstumsfördernden Milieu beiträgt, ist die *nitric oxide synthase 2* (NOS2) (THOMAS, WINK, 2017). Bei der NOS2 handelt es sich um die induzierbare *nitric oxide synthase*. Während die NOS1 (neuronale NOS) und die NOS3 (epitheliale NOS) eher kleine Mengen NO bilden, ist die NOS2 hauptverantwortlich für die NO-Bildung als Antwort auf inflammatorische Stimuli (KANWAR et al., 2009). Somit ist die NOS2 auch hauptsächlich für eine erhöhte NO-Konzentration in der Tumormikroumgebung verantwortlich (OKAYAMA et al., 2013). Eine erhöhte NO-Konzentration beziehungsweise eine erhöhte NOS2-Aktivität konnte in den Tumormikroumgebungen einiger Tumore nachgewiesen werden. Insgesamt wird eine gesteigerte NO-Synthese und eine gesteigerte Aktivität der NOS2 mit der Progression von Tumoren in Verbindung gebracht (AMBS, GLYNN, 2011; PERVIN et al., 2007). In Mausmodellen führte eine Deletion von NOS2 beziehungsweise die Hemmung von NOS2 zu einem verminderten Tumorwachstum (FUKUMURA et al., 2006; KISLEY et al., 2002). Auch im Hinblick auf Patienten mit Lungentumoren scheint die NOS2 eine Rolle zu spielen. So atmen Lungenkrebspatienten vermehrt NO aus und weisen außerdem eine erhöhte Expression der NOS2 in Krebszellen aber auch in alveolären Makrophagen auf (OKAYAMA et al., 2013; WANG et al., 2018).

Verschiedene präklinische Studien zeigen, dass akute und chronische Entzündungen der Lunge, wie sie bei Rauchern und COPD-Patienten häufig vorliegen, das Tumorwachstum stark fördern. In Kras-abhängigen und metastatischen Lungenkrebsmodellen führte rauchinduzierte Entzündung, aber auch akute und chronische Exposition mit *nontypeable Haemophilus influenzae* (NTHi) zu einem verstärkten Krebswachstum. Diese Effekte waren abhängig vom Transkriptionsfaktor NF- κ B, MAP (*mitogen activated protein*), Kinasen und Zytokinen wie IL-6 und IL-17 (CAETANO et al., 2016; CHANG et al., 2014; EL RAYES et al., 2015; JUNGnickel et al., 2017a; MOGHADDAM et al., 2009; RITZMANN et al., 2019; TAKAHASHI et al., 2010).

NTHi-Infektionen stehen bei COPD-Patienten mit akuten Exazerbationen und chronischer Entzündung der Lunge in Verbindung (SETHI, 2010). Neben genetischen Veränderungen scheinen daher die pulmonale Entzündung und Infektionen zum erhöhten Lungenkrebsrisiko und ungünstigen Krankheitsverlauf bei Rauchern und insbesondere bei COPD-Patienten beizutragen. Die Rolle von Tabakkonsum und bakterieller Infektion in der Pathogenese der COPD und von Lungenkrebs ist komplex. Die Signalwege über die Zigarettenrauch und eine chronische bakterielle Entzündung die Karzinogenese und die Entstehung der COPD beeinflussen scheinen aber Gemeinsamkeiten

aufzuweisen. Insbesondere der NF- κ B und der STAT3 Signalweg sind dabei von großer Bedeutung (MOGHADDAM et al., 2011). Einen Überblick über die verschiedenen Vorgänge gibt Abbildung 1.

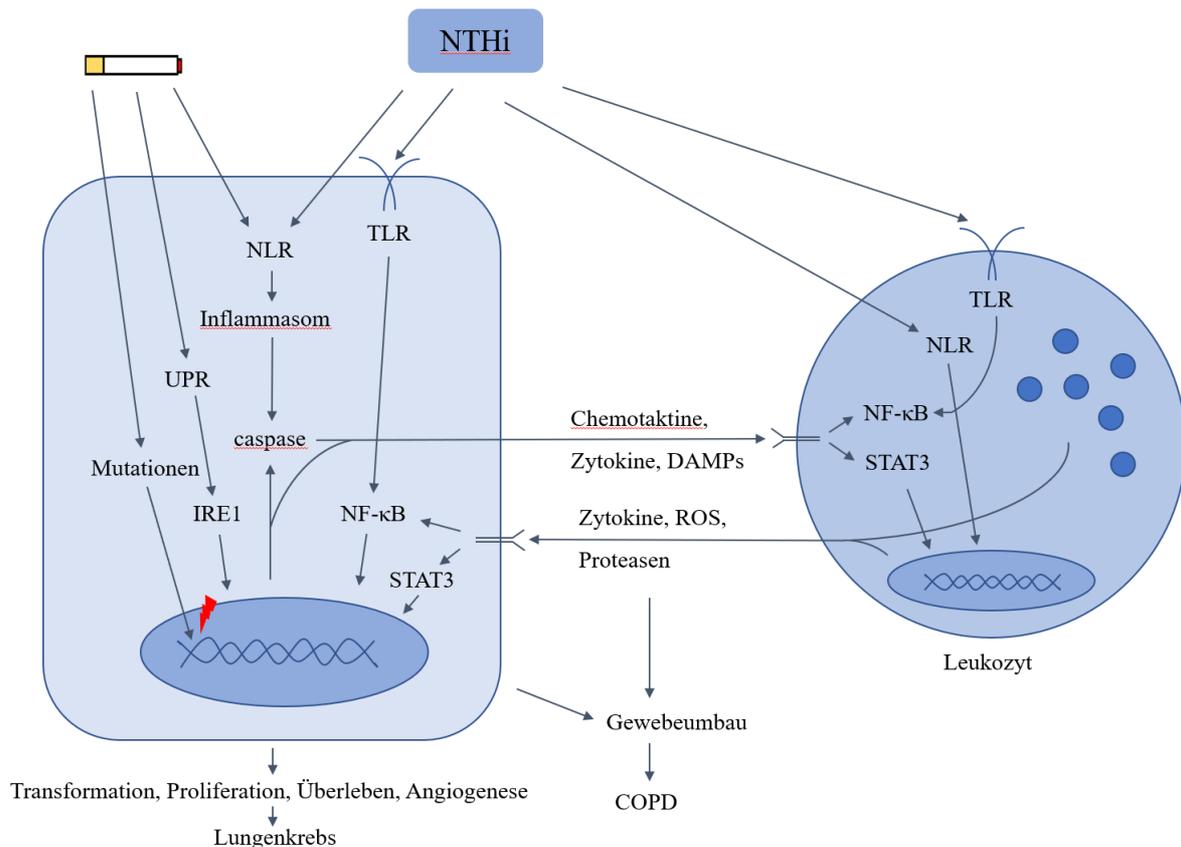


Abbildung 1: Einfluss von Zigarettenrauch und NTHi auf die Pathogenese von Lungenkrebs und COPD nach (MOGHADDAM et al., 2011). Die beiden Faktoren NTHi und Zigarettenkonsum haben insbesondere Einfluss auf zwei Zelltypen der Lunge, zum einen auf Leukozyten (rechts) und zum anderen auf Epithelzellen (links). Kohlenwasserstoffe und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im Zigarettenrauch führen zu Mutationen in Epithelzellen und induzieren so die Karzinogenese. Des Weiteren aktivieren die Bestandteile des Zigarettenrauchs die unfolded protein response (UPR) und nod-like receptors (NLRs) in Epithelzellen aber auch in Leukozyten, wie zum Beispiel Makrophagen. Damit induzieren sie über die Aktivierung zentraler Entzündungsmediatoren wie dem Inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), dem Inflammasom und NF- κ B eine Inflammation. Eine bakterielle Infektion von durch Zigarettenrauch vorgeschädigten Atemwegen, zum Beispiel mit NTHi, führt zur Verstärkung der Entzündungsreaktion über die Aktivierung pattern-recognition-receptors (PRR) wie die toll-like receptors (TLRs) und nod-like receptors (NLRs). So aktivierte Epithelzellen amplifizieren die Inflammation über die Ausschüttung von Chemotaktinen, Zytokinen und damage-associated molecular patterns (DAMPs), wodurch weitere Leukozyten ($CD8^+$ T-Zellen, $CD4^+$ T-H17-Zellen und B-Zellen) rekrutiert werden. Aktivierte Leukozyten fördern über den NF- κ B und den STAT3 Signalweg die Proliferation, Transformation und das Überleben von Epithelzellen, was zur Induktion der Karzinogenese beiträgt. Die COPD resultiert aus der Veränderung des Phänotyps der Epithelzellen. Dazu zählen die Mukusproduktion, Resistenz gegenüber Apoptose, gesteigerte Proliferation und Veränderung der extrazellulären Matrix. Diese Mechanismen, die zur Veränderung des Phänotyps beitragen werden unter dem Begriff des Gewebeumbaus (remodeling) subsummiert.

2.3 TRP-Kanäle

Die TRP-Kanäle werden im Englischen als *transient receptor potential channels* bezeichnet. Es handelt sich um nicht-selektive, tetramere Kationenkanäle, die in der Plasmamembran lokalisiert sind. TRP-Kanäle verfügen über sechs transmembranäre Domänen (RAMSEY et al., 2006). Mehrheitlich sind die TRP-Kanäle spannungsunabhängig und damit unempfindlich gegenüber Änderungen des Membranpotentials (NILIUS et al., 2005). Die Gruppe der TRP-Kanäle wird bei Säugetieren in sechs Untergruppen klassifiziert. Dazu gehören TRPC (klassisch/kanonisch), TRPV (vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPA (Ankyrin), TRPP (Polyzystin) und TRPML (Mukolipin), wobei TRPC, TRPV, TRPM und TRPA aufgrund ihrer größeren strukturellen Ähnlichkeit als Gruppe 1 und TRPP sowie TRPML als Gruppe 2 bezeichnet werden (MONTELL et al., 2002b; MORAN et al., 2004). Die Abstammung der TRPC, TRPV und TRPM Untergruppen ist in Abbildung 2 dargestellt. TRP-Kanäle werden dabei ubiquitär im Menschen und anderen Säugetieren exprimiert. Eine Zelle verfügt in der Regel über zahlreiche verschiedene TRP-Kanäle (CLAPHAM, 2003; PEDERSEN et al., 2005). Durch Öffnung kommt es zu einem Kationeneinstrom über die TRP-Kanäle und somit zu einer Depolarisation der Zelle auf etwa 0 mV (CLAPHAM et al., 2005). Diese Arbeit konzentriert sich auf die TRP-Kanalsubtypen TRPC, TRPV und TRPM, insbesondere aber TRPC1.

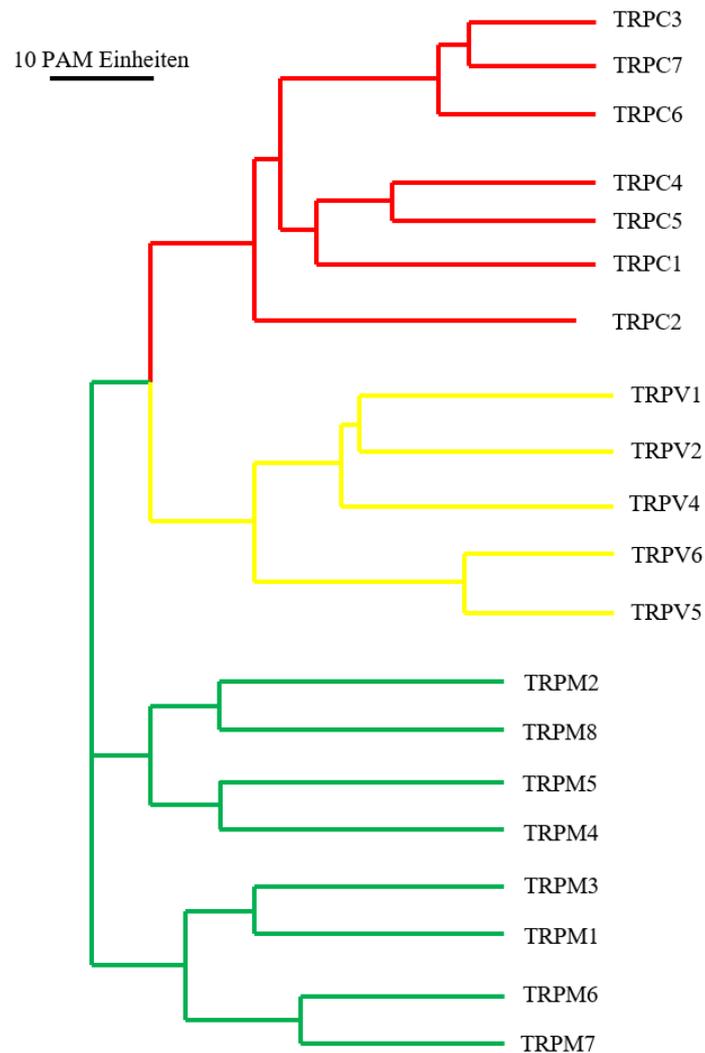


Abbildung 2: Abstammung und Verwandtschaft der TRP-Kanalfamilie nach (CLAPHAM et al., 2001). PAM (akzeptierte Punktmutation, point accepted mutations) bezeichnet eine Einheit zur Beschreibung der evolutionären Entfernung zweier Aminosäuresequenzen voneinander. Dabei entspricht eine PAM-Einheit einem Unterschied zwischen zwei Aminosäuresequenzen von durchschnittlich einer Punktmutation pro 100 Aminosäuren.

2.3.1 Entdeckung der TRP-Kanäle

Die Entdeckung der TRP-Kanäle gelang durch die Untersuchung der Photoreaktion im Auge von *Drosophila melanogaster* Mutanten. Diese Mutanten wiesen einen Defekt in der Signalkaskade der Lichtreaktion auf, der ihr Sehvermögen stark einschränkte. Sie reagierten auf einen langanhaltenden Lichtreiz nicht mit einem lichtinduzierten Strom (*light induced current*; LIC), sondern zeigten im Elektretinogramm lediglich ein schwaches, transientes lichtinduziertes Rezeptorpotential (COSENS, MANNING, 1969). Craig Montell konnte im Jahr 1985 augenspezifisch exprimierte DNS-Fragmente isolieren, die die langanhaltende Stromantwort wiederherstellten (MONTELL et al., 1985). Kurz darauf wurden weitere, sehr ähnliche Membrankanäle identifiziert. Eine Doppelmutation dieser beiden Kanaltypen sorgte für ein vollkommenes Ausbleiben eines LIC und vollständige Blindheit. Angelehnt an das transiente Rezeptorpotential, das sich im Elektretinogramm zeigte, wurden die Kanäle als

transient receptor potential channels und *transient receptor potential like channels* (TRP channels und TRP-like channels) bezeichnet (NIEMEYER et al., 1996). Im Normalfall kommt es während der Photoreaktion bei Insekten vermittelt durch die Phospholipase C (PLC) zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃). Dies hat die Aktivierung der Membrankanäle TRP und TRPL, die ein depolarisierendes Rezeptorpotential auslösen, zur Folge (HARDIE, RAGHU, 2001; SCHAEFER, URBAN, 2013). Die TRP-Kanäle begründeten damit eine neue Familie von integralen Ca²⁺-Kanälen (MONTELL, RUBIN, 1989). Später gelang es mittels PCR-Klonierung auch in anderen Spezies Homologe der TRP-Kanäle nachzuweisen (PETERSEN et al., 1995; VENNEKENS et al., 2002).

2.3.2 Aufbau der TRP-Kanäle

Sechs Transmembrandomänen (S1 – S6) bilden eine TRP-Untereinheit. Extrazellulär befindet sich eine Schleife (*pore loop*), die den Selektivitätsfilter und den oberen Eingang darstellt. Sie wird von den α -Helices S5 und S6 stabilisiert. Die Enden von S6 im Zytosol bilden die zentrale Pore (*gate*), die sich öffnet und schließt und so den Kationenstrom durch den Kanal reguliert. Im Zytosol befinden sich der C- und der N-Terminus, an denen jeweils verschiedene Protein-Protein-Interaktionsmotive angefügt sind, die die einzelnen Kanäle charakterisieren (VANNIER et al., 1998). Dazu gehören Ankyrin bindende Wiederholungen (Ankyrin-Repeats), die am N-Terminus einiger TRP-Kanäle lokalisiert sind (SCHINDL, ROMANIN, 2007). Außerdem weisen einige TRP-Kanäle am C-Terminus die sogenannte *TRP domain* auf, bei der es sich um eine hochkonservierte Sequenz aus 25 Aminosäuren handelt. Die *TRP domain* beginnt mit einer nahezu unveränderlichen Sequenz aus sechs Aminosäuren (EWKFAR bei TRPC-Kanälen), die als TRP Box bezeichnet wird (CLAPHAM, 2003). Darüber hinaus finden sich bei einigen TRP-Kanälen prolinreiche Sequenzen, die früher auch als TRP-Box 2 bezeichnet wurden (RAMSEY et al., 2006). Die Untereinheiten lagern sich zu Homo- oder Heterotetrameren zusammen. Erst hierdurch entstehen funktionsfähige Kationenkanäle (HELLWIG et al., 2005; LEPAGE et al., 2006). Eine Übersicht über den Aufbau, der in dieser Arbeit insbesondere betrachteten TRP-Subtypen ist in Abbildung 3 dargestellt.

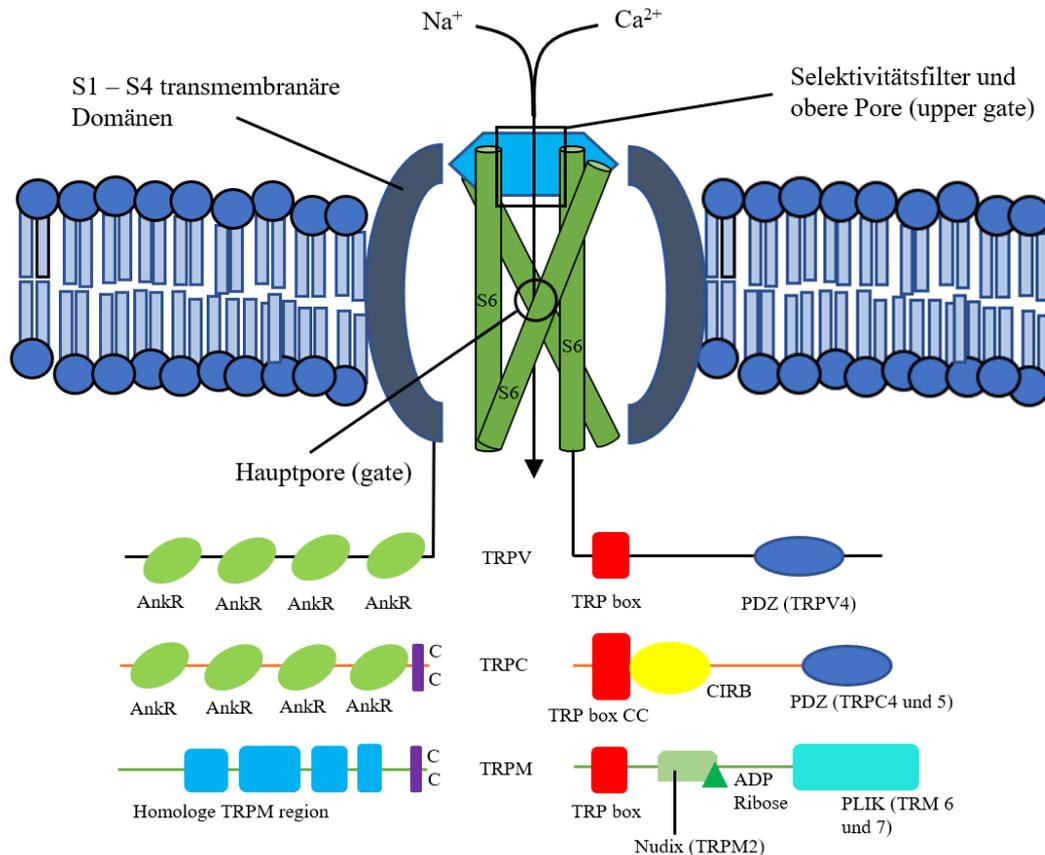


Abbildung 3: Aufbau verschiedener TRP Kanäle nach (CLAPHAM, 2003). Schematische Darstellung des Aufbaus der TRP-Kanalsubtypen TRPC, TRPV und TRPM. Der Selektivitätsfilter wird durch eine Schleife (*pore loop*) zwischen den Untereinheiten S5 und S6 gebildet. Auf die Darstellung der Untereinheit S5 wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. An den transmembranären Domänen hängen je nach Subtyp verschiedene Protein-Protein-Interaktionsmotive: AnkR = Ankyrin-Wiederholungen (*ankyrin repeats*), diese variieren in der Anzahl zwischen 0 und 14 (3 oder 4 in TRPV und TRPC); CC = *coiled-coil domain*; CIRB = calmodulin und IP₃-Bindungsstelle; PDZ = Protein-Interaktionsdomäne; PLIK = PLC-interagierende Kinase (bei TRPM 6 und 7); Nudix = Hydrolyseenzym, welches ADP-Ribose bindet (bei TRPM2); die Funktion der TRPM homologen Region ist bislang nicht bekannt.

2.3.3 Funktion und Regulation von TRP-Kanälen

Die Hauptfunktion der TRP-Kanäle ist der Einstrom von Ca²⁺-Ionen aus dem Extrazellulärraum oder aus intrazellulären Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Die meisten TRP-Kanäle sind dabei nicht-selektive, Ca²⁺-permeable Kationenkanäle. TRPM4 und TRPM5 stellen Ausnahmen dar. Sie sind nur für einwertige Kationen durchlässig (NILIUS, 2007). Die meisten TRP-Kanäle verfügen aber über eine nur sehr gering ausgeprägte Selektivität. Ausnahmen stellen hier TRPV5 und TRPV6 dar, die Ca²⁺-selektiv sind ($P_{Ca}/P_{Na} > 100$) (RAMSEY et al., 2006).

TRP-Kanäle reagieren auf viele verschiedene chemische und physikalische Stimuli. Dazu gehört das Binden von Liganden, insbesondere DAG, Temperatur-, Osmolaritäts- und Spannungsveränderungen (PEDERSEN et al., 2005). Die genauen Aktivierungsmechanismen innerhalb der Gruppe der TRP-Kanäle sind sehr heterogen und subtypabhängig. Generell können jedoch 3 Wege unterschieden werden:

1. Über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und Rezeptor-Tyrosinkinasen wird die PLC aktiviert. Diese moduliert die Funktion von TRP-Kanälen durch die Spaltung von PIP₂ sowie die Produktion von DAG und InsP₃. InsP₃ vermittelt direkt oder über die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem ER eine Aktivierung der TRP-Kanäle (SCHAEFER et al., 2000). Ionenkanäle, die über diesen Mechanismus aktiviert werden, werden auch als speichergesteuerte Calciumkanäle (*store operated calcium channels*; SOCs) bezeichnet. Der bekannteste durch SOCs vermittelte Strom ist der *calcium release activated Ca²⁺ current* (I_{CRAC}) (SCHAEFER et al., 2000). Inwiefern TRP-Kanäle als SOCs fungieren ist umstritten (KISELYOV et al., 1998; PRAKRIYA, LEWIS, 2015). Dieser erste Weg spielt vor allem in der Subgruppe der TRPC-Kanäle eine Rolle (RAMSEY et al., 2006; SCHAEFER, URBAN, 2013).
2. Die direkte Bindung von exogenen (Capsaicin, Icilin, 2-APB) oder endogenen (DAG, Phosphoinositide, Eicosanoide, Anandamide) Liganden, Purinnukleotiden (Adenosin-Diphosphoribose (ADP-ribose), βNAD⁺) und anorganischen Ionen (Ca²⁺, Mg²⁺) (RAMSEY et al., 2006; VENKATACHALAM et al., 2003).
3. Eine direkte Aktivierung durch Änderung der Umgebungsbedingungen. Dazu gehören Veränderungen der Temperatur (vor allem TRPV1, TRPV3 und TRPM8), mechanische Stimuli, Phosphorylierungen und Zellschwellung. Die Aktivierung gelingt über *second messenger* oder noch nicht verstandene Signalkaskaden (VRIENS et al., 2004).

Einige TRP-Kanäle scheinen aber auch konstitutiv offen zu sein, darunter TRPV5 und TRPV6 (NILIUS, 2007). Moduliert wird die Aktivität von TRP-Kanälen außerdem von den Proteinkinasen A, C, und G (PKA, PKC und PKG) (VENKATACHALAM et al., 2003; YAO et al., 2005). Ca²⁺/Calmodulin (Ca²⁺/CaM) hat ebenfalls Einfluss auf die Aktivität von TRP-Kanälen (CLAPHAM, 2007; RAMSEY et al., 2006; TROST et al., 2001). Eine Übersicht der Eigenschaften der TRP-Kanäle wurde in Tabelle 1 zusammengestellt. Die genauen Funktions- und Regulationsmechanismen der einzelnen TRP-Kanäle sind dabei Gegenstand aktueller Forschung und weiterhin umstritten.

Tabelle 1: Eigenschaften der TRP-Kanäle nach (MONTELL et al., 2002a)

TRPC Untergruppe			
Name	Selektivität $P_{Ca^{2+}}:P_{Na^{+}}$	Aktivierung	Gewebe mit höchster Expression
TRPC1	nicht selektive Kationen	Speicher-gesteuert?	Herz, Gehirn, Hoden, Eierstock
TRPC2	?	Speicher-gesteuert?	Hoden
TRPC3	1,6	Speicher-gesteuert, DAG	Gehirn
TRPC4	7	Speicher-gesteuert?	Gehirn, Endothel, Nebennierenrinde, Retina, Hoden
TRPC5	9,5	Speicher-gesteuert?	Gehirn
TRPC6	5	DAG	Lunge, Gehirn
TRPC7	1,9	Speicher-gesteuert, DAG	Auge, Herz, Lunge
TRPV Untergruppe			
Name	Selektivität $P_{Ca^{2+}}:P_{Na^{+}}$	Aktivierung	Gewebe mit höchster Expression
TRPV1	9,6 (Vanilloide), 3,6 (Hitze)	Hitze (43° C), Vanilloide, Anandamide, PIP_2 , H^+	Trigeminusganglion, Spinalganglion
TRPV2	3	Hitze (52° C)	Spinalganglion, Spinalnerv, Gehirn, Milz, Dünndarm, Dickdarm
TRPC4	6	Osmolarität, Zellvolumen, Phorbolester	Nieren, Lunge, Milz, Hoden, Endothel, Leber, Herz
TRPV5	> 100	Niedriges intrazelluläres Ca^{2+} , Hyperpolarisation	Niere, Duodenum, Jejunum, Pankreas, Plazenta
TRPV6	> 100	Idem zu TRPV5	Dünndarm, Pankreas, Plazenta, Prostatakarzinom
TRPM Untergruppe			
Name	Selektivität $P_{Ca^{2+}}:P_{Na^{+}}$	Aktivierung	Gewebe mit höchster Expression
TRPM1	nicht selektive Kationen	Translokation?	Auge, Melanozyten
TRPM2	0,3	ADP, NAD	Gehirn
TRPM3	?	?	?

TRPM4	nicht selektive Kationen	?	Prostata, Kolon, Herz, Niere
TRPM5	?	?	Dünndarm, Leber, Lunge
TRPM6	?	?	?
TRPM7	Selektiv für Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Phosphorylierung, Mg ²⁺ -ATP	Niere, Herz
TRPM8	1 – 3,3	Menthol, Icilin, Kälte (26° C)	Prostata, Trigeminalganglion, Spinalganglion

2.3.4 TRP-Kanäle und Krebs

Die Funktionen der TRP-Kanäle sind sehr heterogen und bis heute nicht vollends verstanden. Es existieren allerdings eine Reihe von Hinweisen darauf, dass TRP-Kanäle mit einer Vielzahl verschiedener Symptome und Erkrankungen unterschiedlicher Organe in Verbindung stehen (KANEKO, SZALLASI, 2014; NILIUS, 2007; NILIUS et al., 2007).

Ca²⁺-Ionen spielen als *second messenger* bei nahezu allen zellulären Prozessen im menschlichen Organismus eine Rolle. Darunter auch programmierter Zelltod (Apoptose), Zellwachstum und Zellteilung (BERRIDGE et al., 1998; ORRENIUS et al., 2003; RAO et al., 2004; RIZZUTO et al., 2003; RODERICK, COOK, 2008; SHAPOVALOV et al., 2011; SHAPOVALOV et al., 2016). Somit sind TRP-Kanäle als Calciumkanäle maßgeblich am Zellwachstum und der Zellteilung beteiligt. Eine Dysregulation, Über- oder Unterexpression dieser Kanäle kann folglich zu Wachstumsstörungen, Störungen der Organogenese und auch malignen Entartungen führen (GKIKI, PREVARSKAYA, 2009; NILIUS et al., 2007).

Erste Hinweise darauf, dass TRP-Kanäle mit der Karzinogenese in Zusammenhang stehen könnten ergaben sich bei der Untersuchung von TRPM1. Die Expression von TRPM1 zeigt eine inverse Korrelation zur Aggressivität von Melanomzellen. TRPM1 könnte somit als Tumorsuppressor bezeichnet werden (DUNCAN et al., 2001; DUNCAN et al., 1998). Eine andere Tumorentität, bei der TRP-Kanäle eine Rolle zu spielen scheinen, ist das Prostatakarzinom. Die Calcium-Homöostase scheint in Prostata-Karzinomzellen gestört zu sein (PREVARSKAYA et al., 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von TRPC1 in Gewebe von Prostatakarzinomen unterdrückt wird (VANDEN ABEELE et al., 2003). Darüber hinaus ist die Expression von TRPV5 und TRPV6 bei Prostata-Adenokarzinomen deutlich höher als bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH). Des Weiteren korreliert die Expression von TRPV6 mit dem Tumorgrad, wie bereits mehrfach nachgewiesen werden konnte (LEHEN'KYI et al., 2007; WISSENBACH et al., 2004). Es existieren außerdem Hinweise darauf, dass TRPV6 generell die Ca²⁺-abhängige Zellproliferation steigert und somit direkt mit dem Tumorwachstum assoziiert sein könnte (SCHWARZ et al., 2006). Dass TRP-Kanäle auch bei anderen bösartigen Neubildungen eine Rolle spielen, wird bereits länger diskutiert. Darunter Darm-, Brust-, Schilddrüsen-, Pankreas-, Blasen- und Eierstockkrebs. Es lässt sich festhalten, dass es zahlreiche

Evidenzen dafür gibt, dass TRP-Kanäle mit verschiedenen Krebsarten sowie mit deren Prognose zusammenhängen (BOLANZ et al., 2008; DHENNIN-DUTHILLE et al., 2011; FIORIO PLA, GKIKI, 2013; IZZO, COUTTS, 2005; KALOGRIIS et al., 2010; LIGRESTI et al., 2006; PARK et al., 2016; PREVARSKAYA et al., 2007b; SO et al., 2019; YEE et al., 2012; ZENG et al., 2013; ZHUANG et al., 2002). Eine Zusammenfassung des Vorkommens von TRP-Kanälen in malignen Geweben ist in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Vorkommen von TRP-Kanälen in malignen Geweben nach (FELS et al., 2018)

Kanal	Krebsart	Zelllinie/Gewebe	Funktion/Phänotyp
TRPA1	Lewis Lungenkarzinom	LLC-2	Adhäsion
TRPC1	Brustkrebs	MDA-MB-231/MCF-10A	Migration, Proliferation
	Pankreaskarzinom	BxPc3, Capan-1	Migration
	NSCLC	A549/H1299	Proliferation
	Nasopharynxkarzinom	CNE2	Adhäsion
	Glioblastom	U251	Migration
	Schilddrüsenkarzinom	ML-1	Migration, Invasion
TRPC4	Medulloblastom	DAOY, ONS76, UW228-1	Migration
TRPC5	Kolonkarzinom	SW620/HT29/Gewebe	Proliferation, Migration, Invasion
TRPC6	Glioblastom	U373MG	Tumorwachstum, Invasion, Angiogenese
	NSCLC	A549	Proliferation, Invasion
	Prostatakarzinom	Gewebe	Expression in Metastasen
	Leberkarzinom	Huh-7/Gewebe	Proliferation, Invasion
TRPM7	Pankreaskarzinom	Panc-1/MiaPaCa2/Gewebe	Proliferation, Invasion
		NSCLC	A549
	Mammakarzinom	MD-MB-231/Gewebe	Migration, Adhäsion,
		MD-MB-231	Zellspannung,
		MD-MB-435	Lungenmetastasen,
		MD-MB-468	Migration, EMT-Übergang, Expression in Gewebe von invasiven duktalem Karzinomen
	Nasopharynxkarzinom	NPC SUNE1/5-8F	Migration
	Ovarialkarzinom	SKVO-3	Migration, Adhäsion, Koloniebildung

TRPM8	Orales Plattenepithelkarzinom	HSC3/4	Migration
	Mammakarzinom	MCF-7/MDA-MB-231	Migration
	Lewis Lungenkarzinom	LLC-2	Adhäsion
	Glioblastom	U-87MG/T9G	Migration, Chemotaxis
	Pankreaskarzinom	Panc-1	Migration, Invasion
	Prostatakarzinom	PC-3, LNCaP	Migration, Zellüberleben
TRPV2	Prostatakarzinom	PC-3	Migration
	Mammakarzinom	MCF-7/MDA-MB-231	Migration
TRPV4	Mammakarzinom	MDA-MB-435s	Migration, Invasion, Metastasierung, transendotheliale Migration
	Magenkarzinom	MKN45, SGC-7901	Proliferation, Migration
TRPV6	Mammakarzinom	MCF-7/MDA-MB-231/Gewebe	Migration, Chemotaxis
	Pankreaskarzinom	Pankreaskarzinomzellen/Gewebe	Proliferation, Migration, Invasion

2.3.5 TRP-Kanäle und Lungenkrebs

TRP-Kanäle werden in nahezu allen Bestandteilen des respiratorischen Trakts, von der nasalen Mukosa bis in die Alveolen exprimiert (BUCH et al., 2018; LORENZO et al., 2008). Dabei vermitteln sie vielfältige Funktionen wie physiologische Reflexe (Husten, Schleimsekretion, mukoziliäre Clearance) aber auch Entzündungsreaktionen wie bei der COPD und Asthma bronchiale (BESSAC, JORDT, 2008; BONVINI, BELVISI, 2017; BUCH et al., 2013; TAYLOR-CLARK, 2016).

Verschiedene Subtypen der TRP-Kanäle wurden in diversen Lungenkrebszelllinien nachgewiesen (MUKHOPADHYAY et al., 2011; SMITH, 1977). Die Inhibition von TRPA1 beispielsweise verminderte das Wachstum von SCLC-Zellen (SCHAEFER et al., 2013). TRPV1 konnte in Adenokarzinomzelllinien nachgewiesen werden (RAMER, HINZ, 2008; REILLY et al., 2003; THOMAS et al., 2007). TRPV3 wird in NSCLC- und TRPV6 in SCLC-Gewebe stärker exprimiert als in gesundem Lungengewebe (LAU et al., 2014; LI et al., 2016). TRPC1 kann die Aktivität des *epidermal growth factors* (EGF) modulieren. Über diesen Signalweg ist TRPC1 am Wachstum von Lungenkarzinomzellen beteiligt (TAJEDDINE, GAILLY, 2012). Auch TRPM7 steht in der Adenokarzinomzelllinie A549 mit dem EGF-Signalweg in Verbindung (GAO et al., 2011).

2.3.6 TRPC1

2.3.6.1. Einfluss von TRPC1 auf Zellmigration, -proliferation und -differenzierung

Insbesondere TRPC1 könnte im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen interessant sein, da er an Prozessen der Zellteilung, -migration und -differenzierung beteiligt zu sein scheint. Mehrere Studien wiesen in den letzten Jahren darauf hin, wenngleich seine genauen Funktions- und Regulationsmechanismen nach wie vor kontrovers diskutiert werden (FABIAN et al., 2012; FABIAN et al., 2008; GUEGUINOUE et al., 2016; HE et al., 2012; KUANG et al., 2012).

Dabei beziehen sich die Belege auf gänzlich verschiedene Gewebearten und maligne Entitäten. Es wurde sowohl malignes als auch nicht malignes Gewebe untersucht. So konnten Louis et. al. nachweisen, dass TRPC1 eine Rolle bei der Migration und Differenzierung von Skelettmuskelzellen spielt (LOUIS et al., 2008). Kuang et. al. zeigten, dass die Blockade von TRPC1 zu einer Suppression der Proliferation und Migration von endothelialen Vorläuferzellen führt (KUANG et al., 2012). Auch hinsichtlich maligner Gewebe gibt es ähnliche Belege. Beispielsweise für die Migration von Kolonkarzinomzellen oder Tumorzellen von nasopharyngealen Karzinomen (GUEGUINOUE et al., 2016; HE et al., 2012).

Die genauen Regulationsmechanismen, denen TRPC1 insbesondere in malignen Geweben unterliegt, sind noch weitestgehend unklar. Ahmmed et. al. konnten allerdings Hinweise dafür finden, dass TRPC1 über die Proteinkinase C (PKC) aktiviert wird. Eine solche Regulation, zusätzlich zu der über Calciumsensoren wie Stim1 (*stromal interaction molecule 1*), könnten einen großen Einfluss auf die Aktivität von TRPC1 haben (AHMMED et al., 2004). Hierbei eine Rolle spielt vermutlich auch der nukleäre Faktor aktivierter T-Zellen (*nuclear factor of activated T-cells*, NFAT) (PUTNEY, 2012). Es handelt sich um einen calciumabhängigen Transkriptionsfaktor, der durch die Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert und so aktiviert wird. NFAT fungiert als Transkriptionsfaktor für Gene, die für Zytokine und Rezeptoren, die unter anderem für das T-Zellüberleben notwendig sind, codieren. Es ist bekannt, dass maligne Zellen den NFAT-Signalweg manipulieren, um ihre Proliferation und das Zellüberleben zu erhöhen (ELZAMZAMY et al., 2020). Bucher et. al. konnten für das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom eine chronisch erhöhte NFAT Aktivität und erhöhte Calciumspiegel nachweisen. Gleichzeitig führte eine Inhibition von Calcineurin zu einer verminderten Expression der NFAT Zielgene EGR2, IL-10, NF- κ B und Jun. Bei Jun handelt es sich um ein Protoonkogen, das am Zellzyklus und der Apoptose beteiligt ist (CHIU et al., 1988). Weiterhin induzierte die Inhibition von Calcineurin den Zelltod in einer Zelllinie des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (BUCHER et al., 2020). Hinweise darauf, dass TRPC1 Einfluss auf Zellproliferation und Tumorwachstum hat, ergaben sich auch mit Hinblick auf andere Tumorentitäten. Die Blockade der TRPC1 Expression mittels *small interfering* RNA (siRNA) führte zu einer verringerten Proliferation in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-468 und MCF-7 sowie in der Gliomzelllinie D54MG (BOMBEN, SONTHEIMER, 2010; DAVIS et al., 2012; EL HIANI et al., 2009; FAOUZI et al., 2016).

2.3.6.2. TRPC1 und Lungenkrebs

Die komplexe Beteiligung von TRPC1 an der Regulation von Zellproliferation und -migration betrifft auch Lungenkarzinomzellen. Es gibt vielfache Evidenz dafür, dass TRPC1 einen Einfluss auf das Wachstum pulmonaler Neoplasien hat. Über welche Mechanismen TRPC1 Effekte auf die Proliferation vermittelt, ist zwar noch nicht vollends verstanden, es gibt jedoch einige Hypothesen und Erklärungsversuche. Eine Beeinflussung des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) Signalweges, wie in Abbildung 4 gezeigt, wird beispielsweise von Tajeddine und Gailly vorgeschlagen. Sie zeigten, dass eine TRPC1 Blockade in NSCLC Zellen zu einer verminderten Phosphorylierung des EGFR und damit zu einer verminderten Aktivität führte. Des Weiteren führte die TRPC1 Blockade zu einer herabgesetzten Aktivität der nachgeschalteten Signalwege über die *phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (PDK1) und die Proteinkinase B (PKB), die maßgeblich an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind (HARRIS, 2003; TAJEDDINE, GAILLY, 2012). Eine Interaktion zwischen TRPC1 und dem EGFR-Signalweg liegt auch deswegen nahe, weil in Tumorzellen von Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge Mutationen im EGFR mit 28 % die häufigsten Mutationen darstellen (JORDAN et al., 2017).

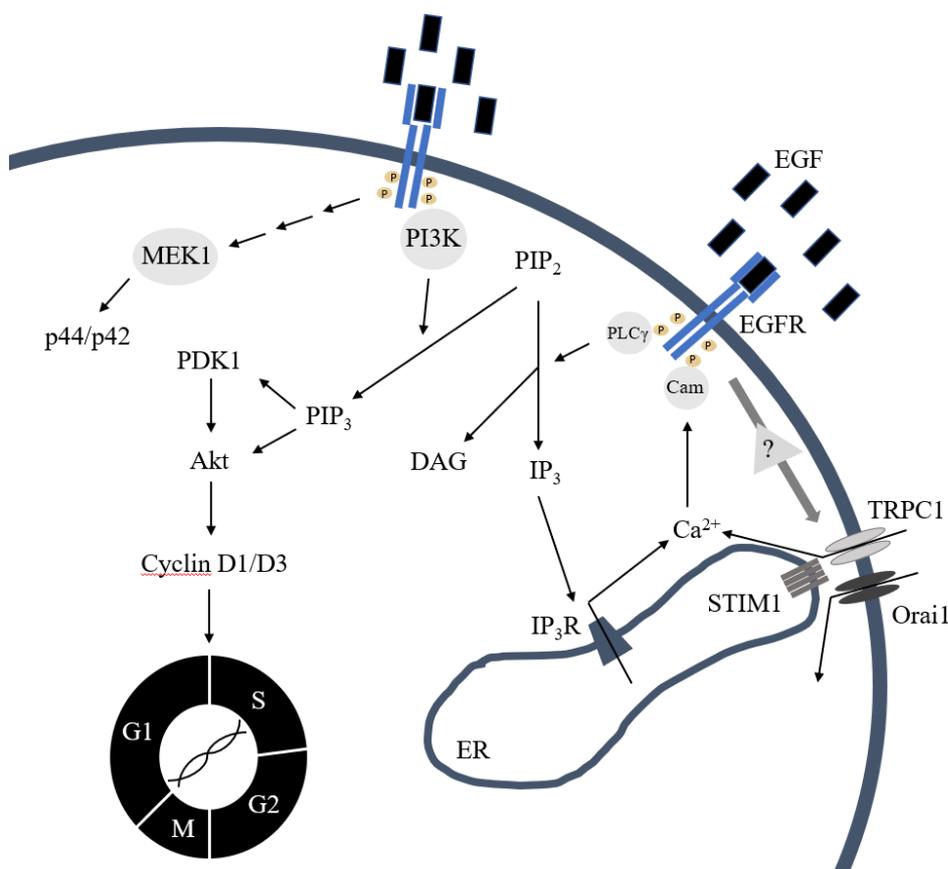


Abbildung 4: Die Rolle von TRPC1 im EGFR-Signalweg nach (TAJEDDINE, GAILLY, 2012). Die Aktivierung des EGFR durch EGF hat seine Autophosphorylierung zufolge. Hierdurch werden die Phospholipase C (PLC) sowie PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) aktiviert. Der PI3K/Akt Signalweg kontrolliert die Expression der Cycline D1 und D3, die für den Übertritt der Zelle von der G₁- in die S-Phase notwendig sind. Gleichzeitig führt die Aktivierung der PLC zu einer IP₃ (Inositol-1,4,5-trisphosphat) vermittelten Calciumfreisetzung aus dem ER (endoplasmatisches Retikulum). Der

verminderte Calciumspiegel im ER führt zu einer Aktivierung von TRPC1 und dem Calciumkanal Orai1 über den Calciumsensor Stim1 (*stromal interaction molecule 1*). Der Calciumeinstrom über TRPC1 wirkt als positives Feedback auf die EGFR Phosphorylierung und verstärkt damit die Aktivität der PI3K (TAJEDDINE, GAILLY, 2012).

Jiang et. al. konnten nachweisen, dass TRPC1 sowohl in Gewebe von Adenokarzinomen als auch Plattenepithelkarzinomen deutlich stärker exprimiert wird als in gesundem Lungengewebe. Während in Gewebe von Gesunden TRPC6 am stärksten von allen TRPC-Kanälen exprimiert wird, ist es in malignem Gewebe TRPC1. Außerdem korrelierte die Expression von TRPC1 signifikant mit dem Differenzierungsgrad des Tumorgewebes, wobei gering differenziertes – das heißt weiter vom Ursprungsgewebe entartetes Gewebe – eine niedrigere TRPC1 Expression aufwies. Des Weiteren führte eine Überexpression von TRPC1 in der Adenokarzinomzelllinie A549 zu einer erhöhten Proliferation. Auf der anderen Seite hatte eine unspezifische TRPC Blockade mittels 2-APB (2-Aminoethoxydiphenylborat), genauso wie eine antikörpervermittelte spezifische Blockade von TRPC1, eine geringere Proliferation zur Folge (JIANG et al., 2013).

Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Hypoxie-induzierte Faktor 1 (HIF-1). Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, der aus einer induzierbaren α - und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit besteht (GUO et al., 2012). Wird der Transkriptionsfaktor durch Hypoxie aktiviert, kann er an *hypoxia response elements* (HRE) an den Promotorregionen verschiedener Gene binden, die mit Zellproliferation und dementsprechend auch Tumorwachstum und -metastasierung in Verbindung stehen (DEWHIRST et al., 2008; SEMENZA, 2003). Es konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass die HIF-1 Spiegel durch Nikotin sowohl dosis- als auch zeitabhängig erhöht werden. Außerdem führt eine Nikotinstimulation zu einer erhöhten HIF-1-abhängigen Transkriptionsaktivität. Dies zeigte sich beispielsweise in der Adenokarzinomzelllinie A549 (GUO et al., 2012). Nikotin erhöht darüber hinaus die Proliferation von A549 und H1650 Zellen, einer weiteren NSCLC Zelllinie (NAIR et al., 2014). Hinweise dafür, dass HIF-1 mit Calcium und TRPC1 in Verbindung steht, lieferten Wang et. al. Sie wiesen nach, dass die Behandlung von A549 Zellen mit Nikotin zu einer Erhöhung der basalen Calciumspiegel sowie zu einem verstärkten speichervermittelten Calciumeinstrom (*store operated calcium entry*; SOCE) führt, an dem unter anderem TRPC1 beteiligt ist. Eine unspezifische Blockade von TRPC Kanälen führte zu einer Verringerung der basalen und nikotininduzierten Zellproliferation und -migration. Zusätzlich konnte in A549 Zellen nachgewiesen werden, dass eine siRNA-vermittelte Blockade von HIF-1 zu einer reduzierten Expression von TRPC1 und anderen SOCs führt (WANG et al., 2018).

2.3.6.3. TRPC1 und Entzündung

TRPC1 hat nicht nur direkten Einfluss auf die Zellproliferation und damit auf das Tumorwachstum, sondern auch auf inflammatorische Prozesse, die bei der Entstehung von malignen Tumoren aller Art und auch Lungenkrebs eine Rolle spielen. Es konnte bereits dokumentiert werden, dass TRPC1 die Expression inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen beeinflusst (CHAUHAN et al., 2018). Es

konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung von Makrophagen mit Interferon γ (IFN γ) zu einem Calciumeinstrom führt. Dieser Ca²⁺-Strom konnte durch eine siRNA-vermittelte Blockade von TRPC1 reduziert werden. Eine Defizienz für TRPC1 bei aus dem Knochenmark abgeleiteten und mit IFN γ aktivierten Makrophagen führte ebenfalls zu einem verminderten Ca²⁺-Einstrom. Außerdem war die Produktion von Zytokinen, wie dem Tumornekrosefaktor α (TNF α), IL-6, IL-23 und NOS2, bei mit siRNA gegen TRPC1 behandelten Makrophagen genauso wie bei Makrophagen von TRPC1 defizienten Mäusen (*Trpc1*^{-/-}) im Vergleich zu Kontroll-siRNA und WT Mäusen, signifikant verringert. Dies ließ sich auch bei peritonealen Makrophagen mit Hilfe eines *Klebsiella pneumoniae*-induzierten Peritonitis-Modells nachweisen. Hier zeigte sich, dass eine Infektion mit *K. pneumoniae* bei WT Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung zahlreicher Entzündungsmediatoren in Makrophagen führte. Bei Mäusen mit einer Defizienz für TRPC1 blieb diese Erhöhung jedoch aus (CHAUHAN et al., 2018).

Die TRPC1-Expression scheint auch bei Patienten mit einer schweren systemischen Entzündungsreaktion (*systemic inflammatory response syndrome*; SIRS) eine Rolle zu spielen. In Blutproben von auf Intensivstationen behandelter Patienten mit SIRS konnte in Makrophagen und Monozyten eine 20 bis 40-fach höhere TRPC1-Expression nachgewiesen werden (CHAUHAN et al., 2018). Pu et. al. zeigten, dass *Trpc1*^{-/-} Mäuse nach Behandlung mit Hausstaubmilben signifikant weniger Entzündungszellen im Lungengewebe aufwiesen. Darüber führt die Defizienz für TRPC1 zu einem verringerten Umbau (*remodeling*) des Lungengewebes. Außerdem zeigte sich, dass eine Defizienz für TRPC1 zu einer herabgesetzten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie einer reduzierten Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-6, TNF α , IL-4, IL-10, IL-17 und IL-1 β führt (PU et al., 2019). Interessanterweise scheint TRPC1 an der Modulation der Immunantwort über den JNK (c-Jun-N-terminale Kinasen)/NF- κ B Signalweg beteiligt zu sein (ZHOU et al., 2015). Die siRNA-vermittelte Blockade von TRPC1 mündete in einer reduzierten Aktivierung von NF- κ B sowie STAT3, während STAT3 zusammen mit IL-17 an der Tumorprogression und Tumormetastasierung beteiligt ist (GU et al., 2015; HUANG et al., 2016; PU et al., 2019).

2.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Erkenntnisse über die Funktion von TRP-Kanälen, im Besonderen von TRPC1, beim Wachstum von Lungentumoren zu gewinnen. Im ersten Schritt sollte dazu mit Hilfe der semi-quantitativen real-time PCR die Expression von TRP-Kanälen in Lungenkrebszelllinien und Atemwegsepithelzellen ermittelt werden. Im präklinischen *Kras*-abhängigen Lungentumormodell sollte die Auswirkung der Defizienz von TRPC1 auf das Tumorwachstum geprüft werden. Insbesondere sollte untersucht werden, inwiefern TRPC1 entzündungsinduziertes Tumorwachstum vermittelt. Darüber hinaus sollte die Auswirkung eines unspezifischen TRP-Inhibitors auf Krebszelllinien untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsartikel

Die für die Arbeit verwendeten Geräte sind mit Herstellerangaben Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Geräte mit Hersteller

Gerätebezeichnung	Hersteller
Brutschrank Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
CFx96 Touch Real-Time System	Bio-Rad, Hercules, USA
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop DM750	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroplattenleser FLUOstar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Mikroskop BX51	Olympus, Shinjuku, Japan
MyCycler	Bio-Rad, Hercules, USA
NanoDrop 8000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Schlittenmikrotom SM 2000R	Leica, Wetzlar, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Spektrophotometer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Waage ABS 120-4	Kern, Balingen, Deutschland
Inkubationsbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Cellspin II	Tharmac, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zählkammer Neubauer improved	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland

Weitere Verbrauchsartikel, Kunststoffwaren, Kits und Computerprogramme, die für die Arbeit verwendet wurden, sind dem jeweiligen Methodenteil zu entnehmen.

3.1.2 Lösungen und Puffer

Die für die Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer sind der nachfolgenden Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller / Zusammensetzung
10 x PBS	NaCl (8g/l), KCL (0,2g/l), Na ₂ HPO ₄ (1,44 g/l) x 2 H ₂ O, KH ₂ PO ₄ (0,24 g/l), pH 7,4
Agaroselösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
H2O; RNase-frei	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Ursotamin, Serumwerk, Bernburg, Deutschland
NaCl – Lösung 0,9 %	Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
Fötales Kälberserum	Gibco Qualified FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Formalinlösung 4 %	108 ml 37 % Formaldehydlösung mit 1 x PBS auf 1 L auffüllen
Xylazinhydrochlorid	Xylazin, WDT, Garbsen, Deutschland

3.1.3 Software

Als Textverarbeitungsprogramm wurde Microsoft Word (Microsoft, Redmond, USA) genutzt. Für Kalkulationen wurde Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) verwendet. Das Erstellen von Diagrammen und die statistischen Auswertungen erfolgten mit der Software GraphPad Prism 5 der Firma GraphPad Software Inc. (San Diego, USA).

Für die Mikroskopie der histologischen Präparate wurden die Programme Visiomorph (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark) und CellSens Dimension (Olympus, Shinjuku, Japan) eingesetzt. Die Berechnung der Tumorflächen wurde mit der Software ImageJ (Wayne Rasband (NIH), USA) durchgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Kulturmedien sind Tabelle 5 zu entnehmen. Das Medium DMEM-F12, Trypsin und die Antibiotika (Penicillin-Streptomycin, 10.000 U/ml) wurden von der Firma Gibco Qualified FBS, Thermo Fisher Scientific (Waltheim, USA) bezogen. Das Airway Epithelial Cell Medium wurde von der Firma Promocell (Heidelberg, Deutschland) und Primocin (50 mg/ml) von der Firma InvivoGen (San Diego, USA) bezogen.

Tabelle 5: Zelllinien und Medien

Zelllinie	Medium
Calu-3	DMEM-F12 + 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
A-549	DMEM-F12 + 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Primärzellen (human, Patientenisolat)	Airway Epithelial Cell Medium + Primocin

Die verwendeten Zelllinien wurden in der Erhaltungskultur im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner, Kremsmünster, Österreich) kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 % erfolgte die Subkultivierung der Zellen. Dazu wurde unter sterilen Arbeitsbedingungen das Medium aus den Kulturgefäßen abgesaugt und die Zellen mit 20 ml Mg/Ca-freien PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 ml Trypsin und eine Inkubation von 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C. Die Zellsuspension wurde in 10 ml frisches Medium aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension des Pellets in 5 ml frischem Medium. Hiervon wurden 500 µl in eine neue Zellkulturflasche mit 20 ml frischem vorgewärmtem Medium gegeben.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dazu wurden nach Pelletierung und Resuspension 100 µl der Zellsuspension mit 900 µl frischem Medium verdünnt. Die Zählkammer wurde mit einem Deckglas abgedeckt. Anschließend erfolgte die Beschickung der Kammern mit der verdünnten Zellsuspension. Es erfolgte die Auszählung von zweimal vier Eckquadraten unter Sicht durch ein Lichtmikroskop.

3.2.3 RNS-Isolation

Zur Isolation der RNS aus A549-Zellen, primären Zellen und Calu3-Zellen wurde das NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstelleranleitung durchgeführt. Die Konzentration der RNS (ng/µl) wurde mittels der Computersoftware NanoDrop – 8000 V1.2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Die Synthese der cDNS erfolgte mit dem RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltheim, USA) nach Herstellerangaben. Dazu wurde die RNS mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg RNS pro 10 µl Lösung verdünnt. Das Programm der cDNS-Synthese ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Programm der cDNS-Synthese

Schritt	Zeit	Temperatur
1	5 Minuten	65°C
2	5 Minuten	4°C
3	60 Minuten	42°C
4	5 Minuten	70°C

Die synthetisierte cDNS wurde anschließend 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt und bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Quantitative real time PCR

Die Genexpressionsanalysen wurden mittels semi-quantitativer Real Time qPCR (RT-qPCR) durchgeführt. Verwendet wurde hierzu das SensiMix SYBR Kit (Bioline, London, Großbritannien) nach Herstellerangaben auf dem System CFX96. Der jeweils für eine Reaktion verwendete Reaktionsansatz ist in Tabelle 7 aufgelistet. Das genutzte Temperaturprogramm wird in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 7: Reaktionsansatz semi-quantitative Real Time qPCR

12, 5 µl	SensiMix SYBR Fluorescin
0,1 µl	fw Primer (100 µM)
0,1 µl	rev Primer (100 µM)
7,3 µl	PCR-H ₂ O
5 µl	cDNS

Tabelle 8: Temperaturprogramm semi-quantitative Real Time qPCR

Zyklus	Zeit (m:s)	Temperatur
1	10:00	95 °C
2	00:15	95 °C
3	00:30	60 °C
4	Messung der Fluoreszenz	
Wiederholen der Zyklen 2-4, 40x		
5	00:30	65 °C
6	00:05	65 °C + 0,5 °C / Zyklus
7	Messung der Fluoreszenz	
Wiederholen der Zyklen 6-7, 60x		
8	∞	4 °C

Die Primer für die Genexpressionsanalysen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes (Dr. Eva Schwarz, nach (WENNING et al., 2011)). Als Referenzgen diente die *RNA-Polymerase II* (RNA-Pol II; #NM_000937). Die verwendeten Primer sind Tabelle 9 zu entnehmen. Zur Kontrolle der Spezifität der Amplifikationen erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse. Als Negativkontrolle wurde RNS-freies ddH₂O verwendet. Aus den RT-PCR Ergebnissen wurde mittels Δ Ct-Methode die relative Expression errechnet.

Tabelle 9: TRP-Kanal-Primer semi-quantitative Real Time qPCR

Gen		Primersequenz
RNA-Pol	forward	5'-GGAGATTGAGTCCAAGTTCA-3'
	reverse	5'-GCAGACACACCAGCATAGT-3'
TRPC1	forward	5'-CTATGGAGAAGAAGTGCAGTC-3'
	reverse	5'-GGAAGTCAAGTAACGATGCAC-3'
TRPC3	forward	5'-TGTTCAATGCCTCAGACAGG-3'
	reverse	5'-AGTGTCACCTTCACTGAGGTC-3'
TRPC6	forward	5'-CTTTTGCTGAAGGCAAGAGG-3'
	reverse	5'-CTGCACAGATCAAGGAGTCC-3'
TRPC7	forward	5'-CTGCACAATGTCTCGCTTC-3'
	reverse	5'-TGAGGCACATCTTGATTCTC-3'
TRPV1	forward	5'-ACACACCTGATGGCAAGGAC-3'
	reverse	5'-AGACTGCCTATCTCGAGCAC-3'
TRPV2	forward	5'-AAGCGGAGGTTGGAAACTAC-3'
	reverse	5'-CACTGACTCTGTGGCATTGG-3'
TRPV3	forward	5'-TGCCTGACTTCCTCATGCAC-3'
	reverse	5'-GACTGAGGATGTACTTCAGG-3'
TRPV4	forward	5'-ACATTGTCAACTACCTGACGG-3'
	reverse	5'-ACAGGTAGGAGACCACGTTG-3'
TRPV5	forward	5'-CAGAGAACAAGACTGGGACC-3'
	reverse	5'-TCCATGCTCAATGAGCAGC-3'
TRPV6	forward	5'-CAAGTTGCTCAAGTATGAGG-3'
	reverse	5'-TCCATGCTCAATGAGCAGC-3'
TRPM2	forward	5'-GTCAAGCTCAACGTGCAGG-3'
	reverse	5'-ATTGTCCACGGAGAGCTGG-3'
TRPM3	forward	5'-GAGCTCACAGCAATGTTGG-3'
	reverse	5'-GTCTCATTCTGTCCACAGG-3'
TRPM4	forward	5'-AGGTGGAGAGGATTATGACC-3'
	reverse	5'-AGAGCAGATACATGCTCTCC-3'

TRPM5	forward	5`-TGTCACCTGCAGGATGCTG-3`
	reverse	5`-TCATCAATCTCGTCCAGTGG-3`
TRPM6	forward	5`-GTTCACTTACACCGTGTTGG-3`
	reverse	5`-TCTTCTTGGTCGTGAGGAG-3`
TRPM7	forward	5`-GATGATGGTCCTGTAAGACC-3`
	reverse	5`-TGAGTGTCTTCGGTAGATGG-3`

3.2.5 WST-Assay

Der unspezifische TRP-Kanal-Inhibitor SKF 96365 hydrochloride wurde von Tocris (Bristol, Großbritannien) bezogen. Es wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 50 μM in DMSO eingestellt. Der WST-Assay wurde nach den Herstellerangaben (Biotium, Fremont, USA) durchgeführt. Dazu wurden die A549 Zellen wie unter 3.2.1 beschrieben subkultiviert und die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit frischem Medium bis zu einer Konzentration von 5×10^3 verdünnt und anschließend 300 μl der Zellsuspension pro Well auf eine 96-Well-Platte gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 24 h. Danach wurde das Medium aus jedem Well abgesaugt und verworfen.

Es wurden jeweils 4 Wells mit der gleichen Konzentration des unspezifischen TRP-Kanalinhibitors SKF 96365 behandelt. Die Konzentrationen der Testsubstanz wurden hierfür jeweils durch eine Verdünnung der Stammlösung mittels frischen Mediums erreicht. In jedes Well wurde ein Volumen von insgesamt 200 μl pipettiert. Zusätzlich wurde eine 0,1 %ige DMSO- sowie eine Medium-Kontrolle mitgeführt.

Nach der Behandlung erfolgte die Inkubation der Zellen für 24 h. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 μl WST-Lösung und die Inkubation bei 37 °C für 2 h. Nachfolgend wurde die Absorption bei 440 und 650 nm in einem Plate Reader gemessen.

3.2.6 Tierversuche

Die tierexperimentellen Versuche wurden durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt und unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Im *Kras*-Modell entwickeln Mäuse aufgrund einer Mutation, die zu einer dauerhaften Aktivierung des *Kras*-Gens führt, Lungentumore (JOHNSON et al., 2001). Dieses Modell ist geeignet, um die Initiation von Tumoren und die Tumorgenese zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden folgende Mausstämme genutzt: B6.129S-Krastm2Tyj Mäuse (*Kras*) und B6.129S-Krastm2Tyj-TRPC1 Mäuse (*Trpc1^{-/-}/Kras*). *Trpc1^{-/-}/Kras* Mäuse sind zusätzlich zur vorhandenen *Kras*-Mutation defizient für TRPC1. Da das Geschlecht der Mäuse einen entscheidenden Einfluss auf das Lungenvolumen, die Lungenfunktion und das Körpergewicht ausübt, wurde sich auf Mäuse weiblichen Geschlechtes beschränkt.

Im NTHi-Modell wurde die Auswirkung pulmonaler Entzündung auf das Tumorwachstum geprüft. Hierfür wurden 8 bis 12 Wochen alte *Kras* und *Trpc1^{-/-}/Kras* Mäuse einmal wöchentlich im wachen

Zustand für 40 Minuten in einer Plexiglasbox und mittels PariMaster Nebulizer vernebelten, inaktivierten *H. influenzae* (nontypeable *haemophilus influenzae* Patientenisolat (NTHi)) mit einer Konzentration von 2,5 mg Protein/ml in PBS beziehungsweise Raumluft als Kontrolle exponiert. Die Tiere wurden insgesamt 4-mal NTHi exponiert und 4 Wochen nach der ersten Exposition mit NTHi für die Bestimmung der Tumorlast analysiert. Für die Analyse der Tumorlast wurden die Lungen wie unter 3.2.6.1 entnommen und in Paraffin eingebettet. Für die Analyse der Expression inflammatorischer Marker sowie Zellzyklus und Apoptose regulierenden Gene wurden Mäuse 2 Stunden nach der vierten NTHi-Exposition euthanasiert. Die Lungen wurden entnommen und Tumorknoten isoliert. Es wurde die gesamte RNS mittels NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) isoliert und eine semi-quantitative RT-PCR wie unter 3.2.4 durchgeführt. Folgende Primer wurden verwendet (LIN et al., 2013; LIU et al., 2013; SEO et al., 2012):

Tabelle 10: Verwendete Primer semi-quantitative Real Time qPCR

Gen		Primersequenz
IL-1 β	forward	5`-AAG CCT CGT GCT GTC GGA CC-3`
	reverse	5`-TGA GGC CCA AGG CCA CAG GT-3`
IL-6	forward	5`-AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA-3`
	reverse	5`-TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC-3`
Bcl-xl	forward	5`- GCT GGG ACA CTT TTG TGG AT-3`
	reverse	5`- TGT CTG GTC ACT TCC GAC TG-3`
Bcl-2	forward	5`-TGA GTA CCT GAA CCG GCA TCT-3`
	reverse	5`-TGA GTA CCT GAA CCG GCA TCT-3`

3.2.6.1. Lungenpräparation, Fixierung, histologische Schnitte

Die Tiere wurden mit einer doppelten Dosis von Ketamin und Xylazin intraperitoneal (Dosierung Xylazin 20-24 mg/kg, Ketamin 180 – 240 mg/kg) betäubt. Nachdem mittels Zwischenzehenreflex die Schmerzfreiheit überprüft worden war, wurde der Brustkorb eröffnet und das Tier durch finale Blutentnahme aus dem Herzen getötet. Zur histologischen Untersuchung der Lunge und Isolierung von Tumorknoten erfolgte die weitere Präparation. Hierzu wurde eine Venenverweilkanüle (Vasofix, BBraun, Melsungen, Deutschland) in die obere Trachea eingeführt und durch Abbinden mit einem Faden fixiert. Mit Hilfe einer weiteren Venenverweilkanüle wurden die Lungen sorgfältig aus dem Situs herauspräpariert. Daraufhin wurden die Lungen für 15 Minuten mittels eines Scheidetrichters mit einem konstanten Druck von 30 cm H₂O mit einer PBS gepufferten 4 %igen Formaldehydlösung befüllt. Die weitere Fixierung erfolgte durch das Abbinden der Lungen mit einem Faden unter dem Druck der Säule. Nun wurden die Lungen in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 40 ml Formalin überschichtet. Das Formalin wurde nach 24 Stunden gewechselt und die Fixierung für 24 Stunden fortgeführt (VOSS et al., 2015). Daraufhin wurde das Formalin wiederholt mit PBS ausgewaschen. Gleichzeitig erfolgte die

Präparation und Trennung der Lunge von anhängendem Gewebe und Organen wie Herz, Thymus und Ösophagus. Die Voreinbettung der Lungen wurde im Ganzen in PBS gepufferter 1 %iger Agaroselösung über Nacht bei 60 °C vorgenommen. Nach dem Abkühlen wurden sie am nächsten Tag in der Transversalebene von cranial nach caudal in 5 Millimeter dicke Blöcke geschnitten. Nun erfolgte die planare Überführung in Einbettenschälchen. Es wurde darauf geachtet, dass die Schnittflächen so orientiert waren, dass unterschiedliche Schnittebenen im Schälchen nach oben zeigten. Die Schnitte wurden mit 1 %iger Agaroselösung überschichtet. Die Lagerung der ausgehärteten Agaroseblöcke erfolgte bis zur Paraffineinbettung in Einbettkassetten. Vorgenommen wurde die Paraffineinbettung freundlicherweise durch das Institut für experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Mit Hilfe des Schlittenmikrotoms wurden von den erhaltenen Paraffinblöcken 2 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt. Diese wurden bis zur weiteren Färbung bei Raumtemperatur dunkel und staubgeschützt gelagert. Die Färbung mit Hämalaun (Dako, Jena, Deutschland) und Eosin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte nach Standardprotokoll (RITZMANN, 2020).

3.2.6.2. Bewertung des Tumorwachstums

Nach Ablauf des jeweiligen Beobachtungszeitraums wurde die Tumorlast in den Lungen bestimmt. Aus den, wie in 3.2.6.1 beschrieben hergestellten Gewebsschnitten wurde zufällig ein Schnitt ausgewählt. Es erfolgte die Anfärbung mit der H&E Färbung. Anschließend wurde der gesamte Gewebsschnitt mit dem Programm Visiomorph mikroskopisch aufgenommen. Am Olympus BX51 Mikroskop wurde das Verhältnis von Tumorfläche zu Lungenfläche mit Hilfe des Programms CellSens ausgemessen. Als erstes wurde die gesamte Lungenfläche pro Gewebsschnitt ausgemessen, anschließend die Tumorkläsionen einzeln und ihr Anteil an der Gesamtfläche errechnet (RITZMANN, 2020).

3.3 Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten dieser Arbeit wurden die Programme GraphPad Prism 5 und Microsoft Excel verwendet.

Die Prüfung auf Normalverteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Normalverteilung vorausgesetzt erfolgten Vergleiche zwischen zwei Gruppen mit dem zweiseitigen Students t-Test. Mehr als zwei Gruppen wurden mit dem parametrischen two-Way ANOVA mit Bonferroni post-test verglichen. Als statistisch signifikant betrachtet wurden die Ergebnisse, wenn $p < 0,05$. Die jeweils verwendeten statistischen Tests, Signifikanzen sowie n-Zahlen sind zusammengefasst den Abbildungsbeschriftungen im jeweiligen Ergebnisteil zu entnehmen.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche veranschaulichen die robuste Expression einiger TRP-Kanäle in verschiedenen Zelltypen. Weiterhin konnte *in vitro* ein Einfluss der unspezifischen TRP-Kanalblockade auf die Proliferation von Adenokarzinomzellen demonstriert werden. Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche legen nahe, dass TRPC1 allein keinen Einfluss auf das pulmonale Tumorwachstum hat, sehr wohl aber auf das entzündungsinduzierte pulmonale Tumorwachstum.

4.1 Analyse der Expression von TRP-Kanälen in Tumorzellen und primären Atemwegsepithelzellen

Mittels semi-quantitativer RT-PCR wurde die Expression verschiedener TRP-Kanäle in Lungenkrebs-Zelllinien gemessen. Als Referenzgen diente die *RNA-Polymerase II*. Es zeigte sich, dass die humane Adenokarzinomzelllinie A549 insbesondere TRPC1, TRPC6, TRPV1, TRPV5, TRPV6, TRPM4 sowie TRPM7 stark exprimiert. Für diese TRP-Kanäle lag der *Cycle threshold* (Ct)-Wert deutlich unter dem Cut off von 33 Zyklen (Abb. 5A). Die relative Expression bezogen auf das Referenzgen *RNA-Polymerase II* veranschaulicht die robuste Expression dieser TRP-Kanäle (Abb. 5B).

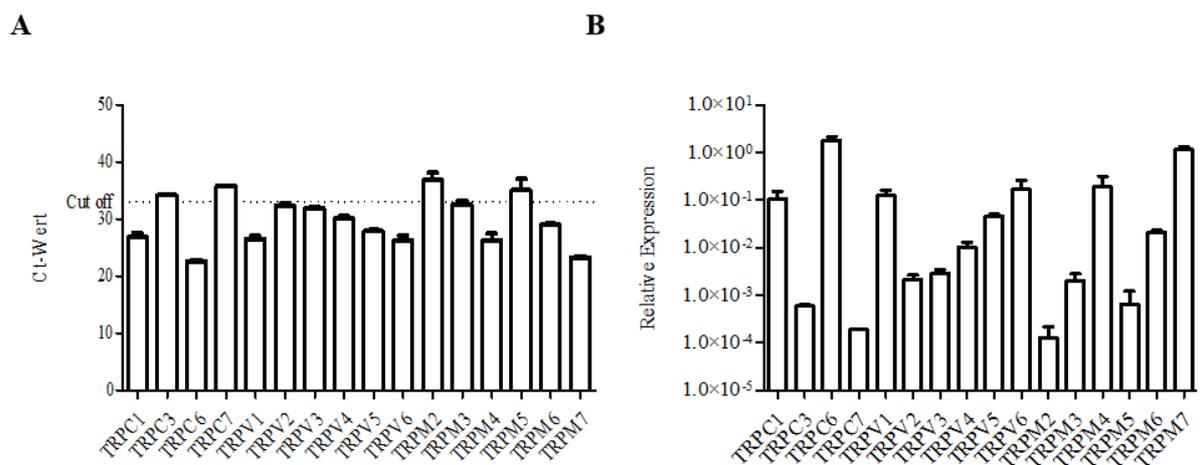


Abbildung 5: mRNA-Expression verschiedener TRP-Kanäle in A549 Zellen. (A) Ct-Werte, Cut off bei Ct = 33. (B) Relative Genexpression bezogen auf die *RNA-Polymerase II*. Zwei unabhängige Versuche.

Zudem wurde die mRNA-Expression der verschiedenen TRP-Kanäle in der humanen Adenokarzinomzelllinie Calu-3 gemessen. Insbesondere für TRPC 1, TRPV 1, TRPV 2, TRPV 4, TRPV 6, TRPM 4 und TRPM 7 lag der Ct-Wert deutlich unter dem Cut off von 33 Zyklen (Abb. 6A). Die relative Expression bezogen auf das Referenzgen *RNA-Polymerase II* veranschaulicht die robuste Expression dieser TRP-Kanäle (Abb. 6B).

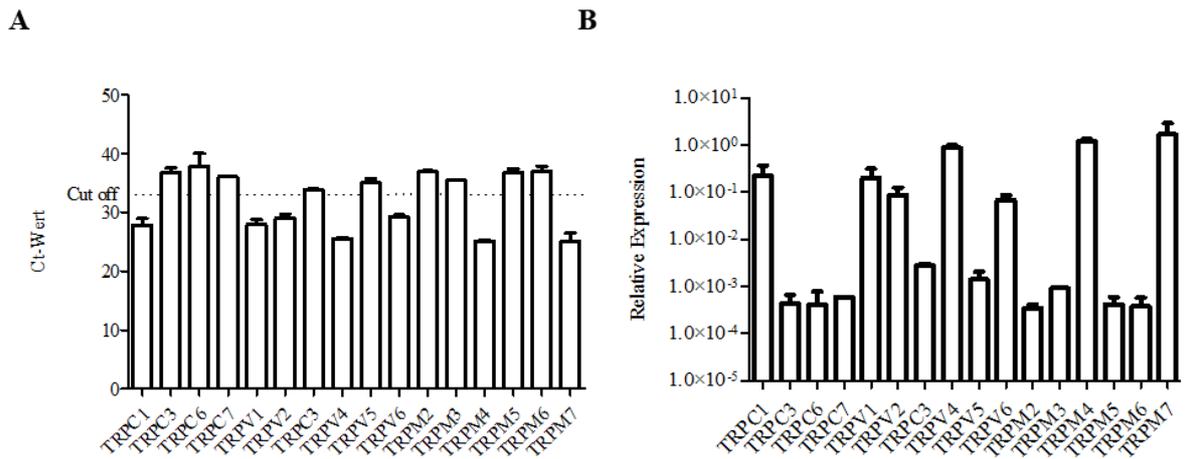


Abbildung 6: mRNA-Expression verschiedener TRP-Kanäle in Calu-3 Zellen. (A) Ct-Werte, Cut off bei Ct = 33. (B) Relative Genexpression bezogen auf die *RNA-Polymerase II*. Zwei unabhängige Versuche.

Neuere Studien legen nahe, dass Adenokarzinome auf mutierte Atemwegsepithelzellen zurückgehen (SPELLA et al., 2019). Es wurde daher die mRNA-Expression der TRP-Kanäle in primären Atemwegsepithelzellen gemessen. Atemwegsepithelzellen wiesen eine robuste Expression von TRPC1, TRPV1, TRPV4, TRPM 4 und TRPM7 auf (Abb. 7 A und B).

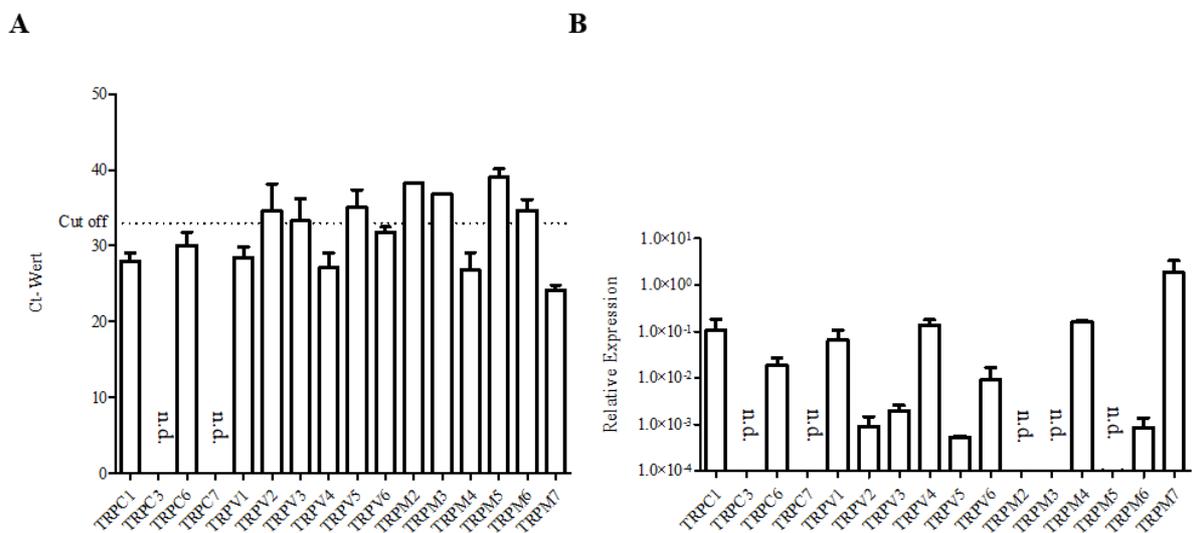


Abbildung 7: mRNA-Expression verschiedener TRP-Kanäle in primären Atemwegsepithelzellen. (A) Ct-Werte, Cut off bei Ct = 33. (B) Relative Genexpression bezogen auf die *RNA-Polymerase II*. Zwei unabhängige Versuche.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Tumor- und Atemwegsepithelzellen TRP-Kanäle differenziell exprimieren. TRPC1, TRPV1, TRPV4, TRPM4 und TRPM7 wurden in beiden Krebszelllinien und in Atemwegsepithelzellen robust exprimiert. Die relative Expression von TRPC1 bezogen auf die *RNA-Polymerase II* von 10^{-1} fiel für die Tumorzelllinien und primären Atemwegsepithelzellen vergleichbar aus.

4.2 Analyse der Funktion von TRPC1 im murinen Lungenkrebsmodell

4.2.1 Alleinige Defizienz für TRPC1 hat keinen signifikanten Einfluss auf das Tumorwachstum

Es wurde in einem Mausmodell geprüft, ob TRPC1 das Tumorwachstum ohne zusätzliche Stimulation oder Behandlung beeinflusst. Hierzu wurden TRPC1 defiziente (*TRPC1*^{-/-}) Mäuse mit *Kras*-Mäusen gekreuzt, sodass sich *TRPC1*^{-/-}/*Kras* Mäuse ergaben. Die Mäuse wurden keiner weiteren Behandlung unterzogen und nach 6 Monaten bezüglich des Tumorwachstums analysiert (Abb. 8 und 9). Es zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen *Kras* und *Trpc1*^{-/-}/*Kras* Mäusen hinsichtlich des Tumorwachstums gab. Sowohl die prozentuale Tumorfläche an der Gesamtlungenfläche als auch die Anzahl der Tumorknoten pro Quadratmillimeter unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 9).

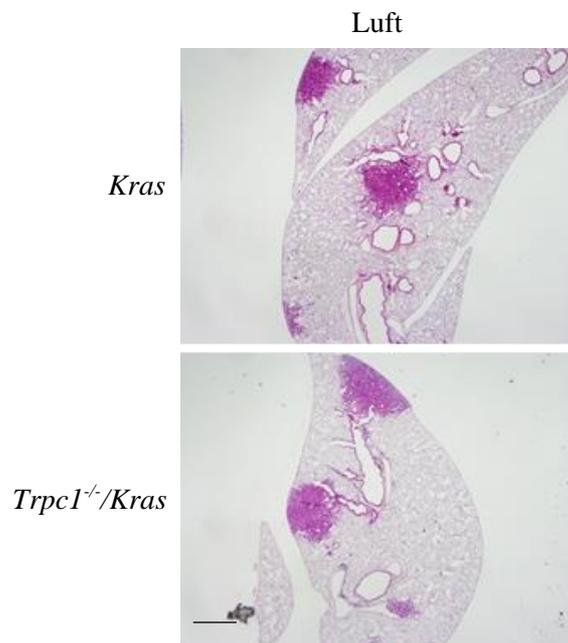


Abbildung 8: Defizienz für TRPC1 ohne induzierte Entzündungsreaktion führt nicht zu einem signifikant verringerten Tumorwachstum. *Kras* und *Trpc1*^{-/-}/*Kras* Mäuse wurden unbehandelt nach 6 Monaten analysiert. Gezeigt werden zwei repräsentative histologische Schnitte (H&E Färbung). Maßstab 500 µm.

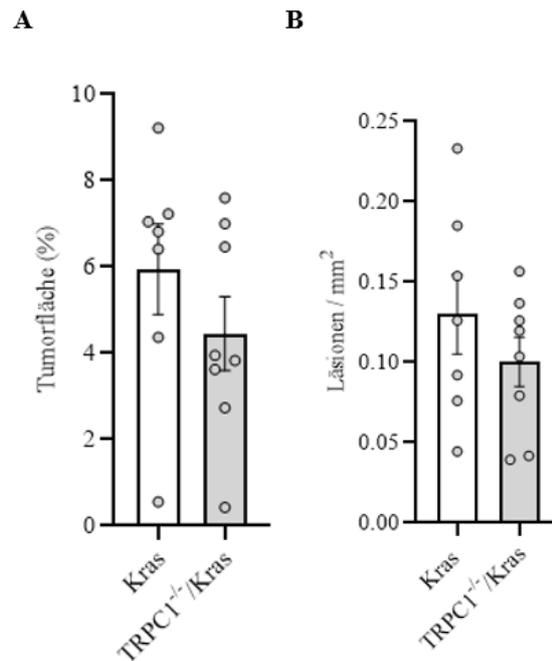


Abbildung 9: Defizienz für TRPC1 führt ohne NTHi-Exposition nicht zu einer geringeren Tumorlast. *Kras* und *Trpc1^{-/-}/Kras* Mäuse wurden ohne weitere Behandlung nach 6 Monaten hinsichtlich des Tumorwachstums analysiert. (A) Die Fläche der Tumorkläsionen wurden in histologischen Schnitten ausgemessen und ins Verhältnis zur Gesamtlungenfläche gesetzt. Gezeigt wird die Tumorfäche in %. (B) Die Anzahl der Tumorkläsionen pro mm² wurden in histologischen Schnitten gezählt. Gezeigt wird die Anzahl der Tumorkläsionen pro mm². Student's t-Test. Daten sind als MW ± SEM gezeigt.

4.2.2 Defizienz für TRPC1 führt zu einem verminderten entzündungsinduzierten Tumorwachstum

Zahlreiche Studien zeigen, dass pulmonale Entzündung das Wachstum von Lungentumoren stark fördert (GRIVENNIKOV et al., 2010; JUNGNICHEL et al., 2017a; RITZMANN et al., 2019; TAKAHASHI et al., 2010). Die Lungen von COPD-Patienten sind häufig akut und chronisch mit NTHi infiziert, was zur Entzündung der Lunge maßgeblich beiträgt (MOGHADDAM et al., 2011; SETHI, 2000). Um die Auswirkung einer Defizienz für TRPC1 auf das entzündungsinduzierte Tumorwachstum zu untersuchen, wurden 8 bis 12 Wochen alte *Kras* Tiere und *Trpc1^{-/-}/Kras* Tiere für 4 Wochen einmal wöchentlich inaktiviertem NTHi exponiert oder blieben unbehandelt. Die Tiere wurden 4 Wochen nach der ersten NTHi-Exposition analysiert. In diesem Modell führt die Exposition mit NTHi zu einer COPD-typischen Entzündung der Lunge und einem gesteigertem Tumorwachstum (JUNGNICHEL et al., 2017b; MOGHADDAM et al., 2009; RITZMANN et al., 2019).

Die Analyse histologischer Schnitte ergab, dass die Induktion einer Entzündung mittels NTHi zu einem deutlich erhöhten Tumorwachstum bei *Kras* Mäusen führte. Sowohl der prozentuale Anteil der mit Tumor belegten Lungenfläche als auch die Anzahl der Tumorkläsionen pro Quadratmillimeter war bei NTHi exponierten *Kras* Mäusen im Vergleich zu NTHi exponierten *Trpc1^{-/-}/Kras* Mäusen signifikant erhöht (Abb. 10 und 11). Bei TRPC1 defizienten Mäusen blieb das entzündungsinduzierte

Tumorwachstum aus. Wie zuvor zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Tumorlast zwischen unbehandelten *Kras* und *Trpc1^{-/-}/Kras* Mäusen.

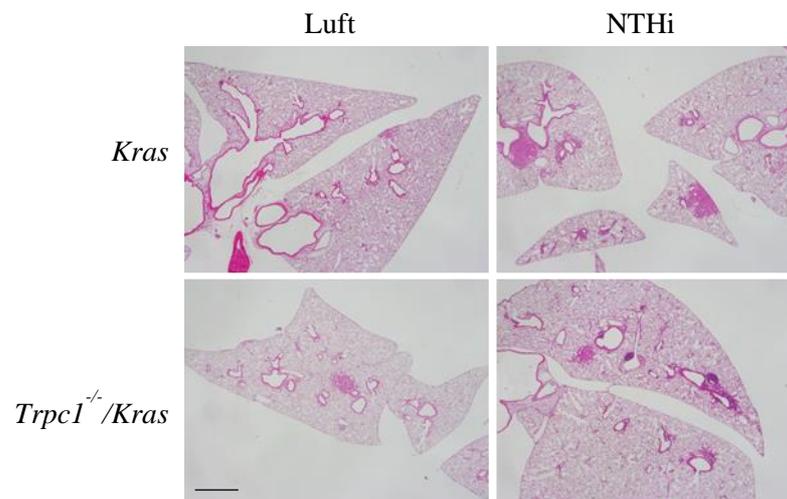


Abbildung 10: Defizienz von TRPC1 verringert das NTHi-induzierte Tumorwachstum. *Kras* und *Trpc1^{-/-}/Kras* Mäuse wurden für 4 Wochen einmal wöchentlich NTHi exponiert oder blieben unbehandelt. Gezeigt werden repräsentative mikroskopische Pathologien (H&E Färbung). Maßstab 500 μ m.

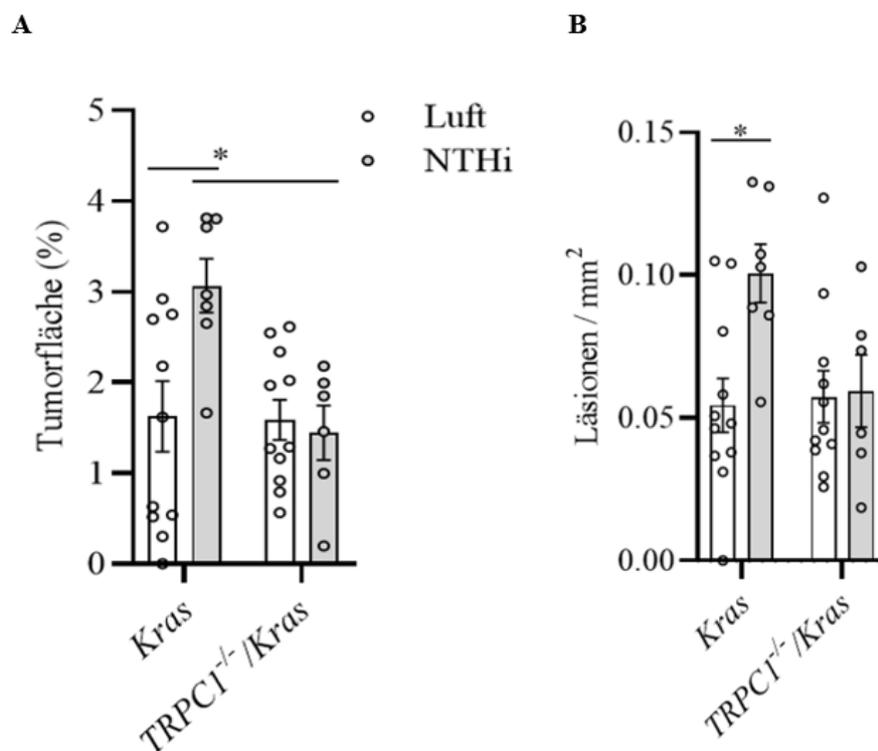


Abbildung 11: Defizienz für TRPC1 führt zu einem geringeren entzündungsinduzierten Tumorwachstum. *Kras* und *Trpc1^{-/-}/Kras* Mäuse wurden für 4 Wochen einmal wöchentlich NTHi exponiert. (A) Die Fläche der Tumorkläsionen wurden in histologischen Schnitten ausgemessen und ins Verhältnis zur Gesamtlungenfläche gesetzt. Gezeigt wird die Tumorkläsionen in %. (B) Die Anzahl der Tumorkläsionen pro mm^2 wurden in histologischen Schnitten gezählt. Gezeigt wird die Anzahl der Tumorkläsionen pro mm^2 . Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. * $p < 0,05$.

4.3 TRPC 1 beeinflusst die Entzündung in der Tumormikroumgebung

Zwei Stunden nach der vierten NTHi Exposition wurden Tumore aus Luft und NTHi exponierten Mäusen präpariert und die RNS isoliert. Untersuchungen mittels semi-quantitativer RT-PCR zeigten, dass die NTHi Exposition zu einer signifikant gesteigerten mRNA Expression der tumorfördernden Entzündungsmediatoren IL-6 und IL-1 β führte. Die Expression von IL-6 und IL-1 β war bei NTHi exponierten *Trpc1*^{-/-}/*Kras* Mäusen verglichen mit NTHi exponierten *Kras* Mäusen signifikant vermindert (Abb. 12 A und B). TRPC1 und NTHi hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA Expression der Zellzyklus und Apoptose regulierenden Gene Bcl-2 und Bcl-x1 (Abb. 12 C und D) sowie Cyclin D1 (Daten nicht gezeigt).

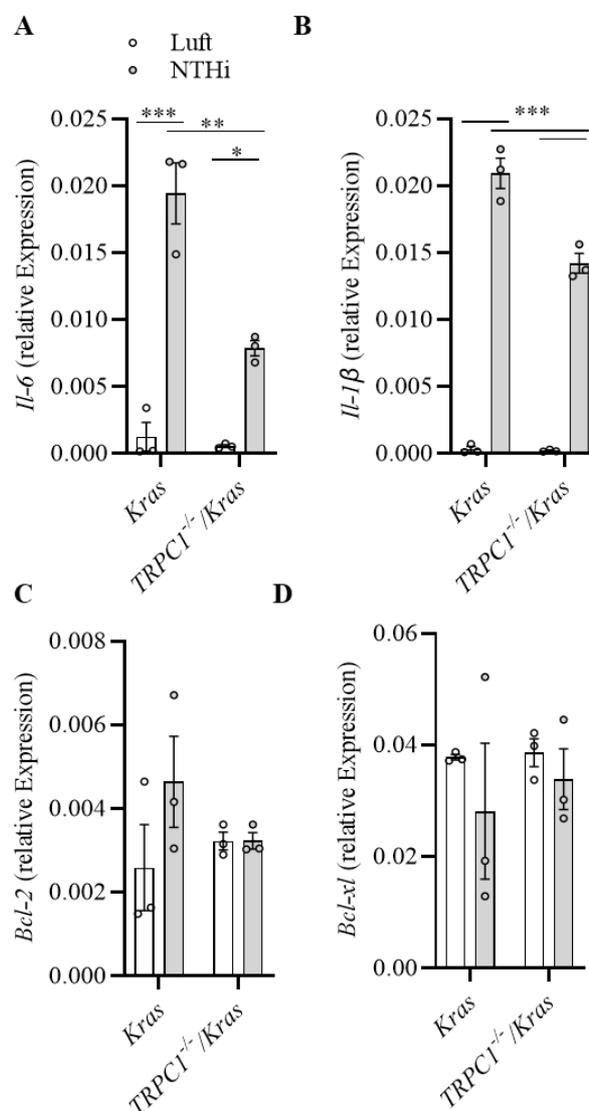


Abbildung 12: Defizienz für TRPC1 führt zu einer geringeren Expression von tumorfördernden Zytokinen. *Kras* und *Trpc1*^{-/-}/*Kras* Mäuse wurden für 4 Wochen einmal wöchentlich NTHi exponiert. Tumorknoten wurden 2 Stunden nach der finalen NTHi Exposition isoliert. Die Expression von IL-6, IL-1 β , Bcl-2 und Bcl-x1 wurde mittels semiquantitativer RT-PCR bezogen auf Aktin ermittelt. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

4.4 Der Calciumkanal-Inhibitor SKF-96365 hemmt die Proliferation von A549 Zellen

Um zu klären, ob die TRP-Kanäle und deren Aktivität einen Einfluss auf das Wachstum beziehungsweise von Lungentumorzellen haben, wurde ein WST-Assay mit A549 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des unspezifischen Calciumkanal-Inhibitors SKF-96365, der unter anderem auch TRP-Kanäle blockiert, behandelt. Es zeigte sich, dass das Zellwachstum durch die Behandlung mit SKF-96365 im Vergleich zu unbehandelten Zellen dosisabhängig signifikant reduziert wurde (Abb. 13).

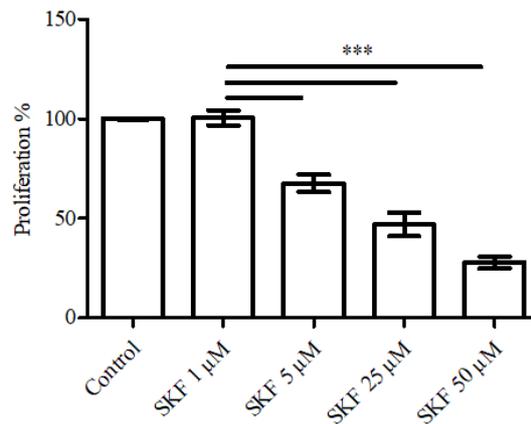


Abbildung 13: Behandlung von A-549 Zellen mit SKF-96365 senkt deren Proliferation. Proliferation von mit unterschiedlichen Konzentrationen SKF-96365 behandelten A549-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Control). Kontrolle mit 0,1 %iger DMSO-Lösung. Student's t-Test. Zwei unabhängige Versuche. Daten sind gezeigt als MW \pm SEM. ***p < 0,001.

5. Diskussion

TRP Kanäle sind ubiquitär vorkommende Kationenkanäle mit vielfältigen Funktionen. Hauptsächlich beteiligt sind sie am Calciumhaushalt der Zelle. Dabei scheinen sie am SOCE mitbeteiligt zu sein. Calcium ist einer der wichtigsten *second messenger* und erfüllt innerhalb des Stoffwechsels und der Zellproliferation eine Vielzahl an Aufgaben. TRP Kanäle unterliegen mannigfaltigen Regulationsmechanismen. Da sie an der Regulation des Calciumstoffwechsels beteiligt sind, greifen TRP Kanäle in zahlreiche zelluläre Prozesse ein. Es existieren Hinweise darauf, dass TRP Kanäle Einfluss auf Zellproliferation und Entzündungsprozesse haben. Die Vermutung liegt daher nahe, dass TRP Kanäle bei der Entstehung und der Progression von Tumorerkrankungen der Lunge von Bedeutung sind. Insbesondere für TRPC1 konnte bereits nachgewiesen werden, dass er in Tumorproben von Lungenkrebspatienten exprimiert wird (JIANG et al., 2013). Die Hintergründe und Funktionen von TRP Kanälen und insbesondere TRPC1 bei der Initiation und Progression von Lungenkrebs sind jedoch noch weitgehend ungeklärt. Die vorliegende Arbeit untersuchte daher, wie und in welcher Form TRP Kanäle und TRPC1 im Besonderen Einfluss auf die Entstehung und das Fortschreiten maligner Erkrankungen der Lunge haben. Im ersten Schritt analysierten wir daher mittels RT-qPCR die Expression von TRP Kanälen verschiedener Lungenkrebszelllinien. In einem Tiermodell wurde geprüft, wie sich die Defizienz für TRPC1 *in vivo* auf das Tumorwachstum auswirkt. Die Auswirkung einer unspezifischen Inhibition von TRP Kanälen auf das Zellwachstum wurde in der Zellkultur untersucht.

5.1 Expression von TRP Kanälen

TRP Kanäle wurden bereits in zahlreichen malignen Geweben nachgewiesen, darunter Brustkrebs (DHENNIN-DUTHILLE et al., 2011), Eierstockkrebs (ZENG et al., 2013), Prostatakarzinomen (PREVARSKAYA et al., 2007a), Nierenzellkarzinomen (VELICEASA et al., 2007), Glioblastomen (CHIGURUPATI et al., 2010) und Magentumoren (CAI et al., 2009). Dabei konnte gezeigt werden, dass das Expressionsmuster der TRP Kanäle zwischen den verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich ist. In Nierenzellkarzinomen werden insbesondere TRPC1, TRPC4, TRPC6 und TRPC7 exprimiert, im Unterschied dazu werden in Mammakarzinom-Zelllinien insbesondere TRPC1, TRPM7, TRPM8, TRPV2, TRPV4 und TRPV6 exprimiert (FELS et al., 2018; VELICEASA et al., 2007). Wobei die hier betrachteten Adenokarzinomzelllinien wiederum ein anderes Expressionsmuster für TRP-Kanäle aufwiesen.

Jiang et. al. fanden außerdem Hinweise dafür, dass die Expression zusätzlich mit dem Differenzierungsgrad von Lungenkarzinomgewebe zusammenhängt (JIANG et al., 2013). Der Differenzierungsgrad beschreibt, ob und in welchem Ausmaß das maligne Gewebe sich bereits histologisch vom Ursprungsgewebe entfernt hat. Der Grad der Differenzierung wird in Abstufungen von Grad 1 bis Grad 4 vorgenommen. Grad 1 beschreibt gut differenziertes Gewebe, das noch hohe histologische Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe aufweist, während Grad 4 schlecht differenziertes malignes Gewebe beschreibt, das sich nicht mehr, oder nur noch aufgrund

immunhistochemischer Eigenschaften dem Ursprungsgewebe zuordnen lässt (COINDRE et al., 1986; EDGE, COMPTON, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRP Kanäle, insbesondere TRPC1, in den humanen Tumorzelllinien A549 und Calu-3 exprimiert werden. Darüber hinaus konnte eine robuste Expression von TRPC1 in Basalzellen des respiratorischen Epithels nachgewiesen werden. Basalzellen sind die Stammzellen von Zilien-, Becher- und Club-Zellen. Neueste Arbeiten weisen darauf hin, dass Adenokarzinome aus Club-Zellen hervorgehen (FERONE et al., 2020; SPELLA et al., 2019). TRPC1 war der einzige TRP-Kanal, der sowohl in den beiden Krebszelllinien als auch in Basalzellen robust exprimiert wurde.

5.2 TRPC1 nimmt Einfluss auf die Proliferation von Lungenkrebszellen

Die Steuerung der Zellproliferation ist äußerst komplex. In Tumorgewebe von Lungenkrebspatienten lassen sich häufig Mutationen in bestimmten Genen nachweisen. Eines dieser Gene ist das Gen, welches den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) kodiert. Der damit verbundene Signalweg (EGFR-Signalweg) ist für die Zellproliferation von großer Bedeutung. Tajeddine et. al. konnten zeigen, dass TRPC1 eine Rolle im EGFR-Signalweg spielt. So ist der Calciumeinstrom über TRPC1 ein wichtiger Schritt zur vollständigen Aktivierung des EGFR zu sein. Gleichzeitig führte eine Blockade von TRPC1 zu einem Zellzyklusarrest, sowie zu einer Hemmung des EGFR-Signalwegs (TAJEDDINE, GAILLY, 2012). Vermutlich handelt es sich dabei nur um einen von vielen Mechanismen, über die TRPC1 an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist.

Eine unspezifische Blockade von TRPC Kanälen hat Einfluss auf die Proliferation von Lungenkrebszelllinien (JIANG et al., 2013; WANG et al., 2018; YANG et al., 2017). Dies konnte auch in dieser Arbeit in der Zellkultur mittels des unspezifischen TRPC Kanal Inhibitors SKF 96365 in A549 Zellen gezeigt werden. Um die Funktion von TRPC1 bei der Tumorentstehung und Progression weiter zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Kras-abhängiges murines Tumormodell verwendet. In diesem Modell kommt es bei Mäusen, die aufgrund eines Austauschs von Glycin zu Asparaginsäure in Kodon 12 (G12D) des Kras Genes ein onkogenes Allel tragen, das nach einem spontanen Rekombinationsereignis exprimiert wird, zum Wachstum von Lungentumoren (JOHNSON et al., 2001). Der Vergleich von 6 Monaten alten Kras-Mäusen mit Kras-Mäusen, die zusätzlich für TRPC1 defizient waren, ergab keinen Unterschied im Tumorwachstum. Das hier verwendete Kras-abhängige Lungenkrebsmodell hat allerdings Einschränkungen. So ist es nicht geeignet, die Funktion des EGFR-Signalwegs bei der Tumorprogression zu prüfen. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Liganden für den EGF-Rezeptor in EGFR-abhängigen, nicht aber in Kras-abhängigen Mausmodellen Lungenkrebs fördern (TOMOSHIGE et al., 2018). Die Funktion von TRPC1 beim EGFR-abhängigem Tumorwachstum sollte daher in EGFR-abhängigen oder chemisch-induzierten Tumormodellen, wie dem Urethan-Modell, analysiert werden.

5.3 TRPC1 moduliert Entzündungsprozesse

Der Einfluss von Entzündungsprozessen scheint für die Krebsentstehung und -progression von großer Bedeutung zu sein. Es ist bekannt und wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass Entzündung und die damit verbundene Freisetzung inflammatorischer Zytokine das Wachstum verschiedenster Tumoren begünstigt. Die ersten Hinweise lieferte Rudolf Virchow bereits vor 150 Jahren und diese Hypothese wurde seitdem mehrfach bestätigt (COUSSENS, WERB, 2002; GRIVENNIKOV et al., 2010; MURATA, 2018; SHACTER, WEITZMAN, 2002; SHALAPOUR, KARIN, 2015). Wie für viele Krebserkrankungen konnte auch für Lungenkrebs gezeigt werden, dass die tumorassoziierte Entzündung das Tumorstadium verstärkt. Mehrere Studien wiesen zum Beispiel nach, dass T-Helferzellen, die IL-17 produzieren, (T_H17-Zellen) das Tumorstadium begünstigen (HE et al., 2010; REPERT et al., 2011; REPERT et al., 2012). Nach Chang et al. führte die Defizienz von IL-17 im Kras-abhängigen Tumormodell zu einem verringerten Tumorstadium (CHANG et al., 2014). Reppert et al. konnten eine erhöhte Expression von IL-17 in Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Lungengewebe nachweisen (REPERT et al., 2011). Dabei führt IL-17 zu einer erhöhten Produktion von IL-6 und damit zu einem erhöhten Tumorstadium (AKBAY et al., 2017). Auch weitere inflammatorische Zytokine scheinen das Tumorstadium zu begünstigen und sich gleichzeitig gegenseitig zu beeinflussen und die jeweiligen Effekte sogar noch zu verstärken. In verschiedenen Lungenkrebsmodellen konnte eine tumorfördernde Funktion des Zytokins IL-6 nachgewiesen werden. So führte in Kras-abhängigen Lungenkrebsmodellen die antikörpervermittelte Blockade sowie die Defizienz von IL-6 zu einer verminderten Tumorstadium, wobei STAT3 hier eine zentrale Rolle einzunehmen scheint (CAETANO et al., 2016; QU et al., 2015). Zudem zeigten zahlreiche Studien, dass pulmonale Entzündung, die sowohl durch Rauch als auch durch Bakterien hervorgerufen wird, das Tumorstadium stark fördert. In Kras-abhängigen und metastatischen Lungenkrebsmodellen konnte nachgewiesen werden, dass dies durch inflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-17 und IL-6 und Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B vermittelt wird (CAETANO et al., 2016; CHANG et al., 2014; LI et al., 2014; RITZMANN et al., 2019; TAKAHASHI et al., 2010).

Neue Studien legen nahe, dass TRPC1 eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen und der Freisetzung von Zytokinen zu haben scheint. Chauhan et al. konnten beispielsweise zeigen, dass TRPC1 maßgeblich an der Funktion von Makrophagen beteiligt ist, und eine Defizienz für TRPC1 zu einer reduzierten Freisetzung von TNF α und IL-6 sowie NOS2 führt. Eine Funktion von TRPC1 bei der Polarisierung von Makrophagen konnte hier sowohl nach IFN γ -Behandlung als auch im *Klebsiella pneumoniae* Infektionsmodell beobachtet werden (CHAUHAN et al., 2018). In einer Studie von Pu et al. führte die Defizienz für TRPC1 in einem Modell der allergischen Entzündung der Lunge zu einer verringerten Freisetzung von zahlreichen inflammatorischen Mediatoren wie IL-6, TNF α , IL-4, IL-10, IL-17 und IL-1 β (PU et al., 2019).

Diese Studien zeigen, dass TRPC1 die Polarisierung von Makrophagen reguliert, und dass dies mit der Bildung tumorfördernder Zytokine wie IL-6 einhergeht. Die Funktion von TRPC1 beim

entzündungsinduzierten Tumorwachstum und auf die tumorassoziierte Entzündung wurde unseres Wissens nach jedoch bisher noch nicht untersucht. Um den Einfluss einer pulmonalen Entzündung auf das Wachstum von Lungentumoren bei *Kras* und *Trpc1^{-/-}/Kras* Mäusen zu überprüfen, wurde daher im Mausmodell mittels nontypeable *H. influenzae* eine Entzündungsreaktion in der Lunge induziert. Vorherige Studien zeigten, dass die NTHi-induzierte pulmonale Entzündung zu einem verstärktem Tumorwachstum führt und dass dies partiell über Zytokine wie IL-17A, IL-17C und IL-6 sowie neutrophile Granulozyten vermittelt wird (CAETANO et al., 2016; CHANG et al., 2014; GONG et al., 2013; RITZMANN et al., 2019). Wie bereits beschrieben, führte 4-wöchige NTHi-Exposition zu einem signifikant verstärktem Tumorwachstum. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede zu Mäusen, die für TRPC1 defizient waren. Bei TRPC1 defizienten Mäusen ging die NTHi-induzierte pulmonale Entzündung mit keinem signifikant gesteigerten Tumorwachstum einher. Wie in vorherigen Arbeiten gezeigt, induzierte die NTHi-Exposition eine gesteigerte Expression tumorfördernder Zytokine wie IL-6 im Tumorgewebe, während die Expression von Zellzyklus-regulierender Gene und Apoptose-regulierender Gene durch TRPC1 nicht beeinflusst wurden. Diese Ergebnisse legen daher nahe, dass im *Kras*-Modell TRPC1 tumorassoziierte Entzündung reguliert und dies möglicherweise Tumorwachstum fördert. Weitere Studien müssen zeigen, in welchen Zelltypen der Tumormikroumgebung TRPC1 die Bildung von Zytokinen reguliert. Es ist denkbar, dass TRPC1 die Polarisierung tumorassoziiierter Makrophagen reguliert. Es ist aber auch denkbar, dass TRPC1 die Expression von Entzündungsmediatoren in Epithelzellen oder Tumorzellen induziert, wie es für Lungenepithelzellen schon gezeigt werden konnte (ZHOU et al., 2015). Zusammengefasst deutet die in dieser Arbeit durchgeführte Mausstudie darauf hin, dass im *Kras*-Modell die Defizienz für TRPC1 bei Abwesenheit pulmonaler Entzündung sich nicht signifikant auf das Tumorwachstum auswirkt und keinen Einfluss auf die Transkription Zellzyklus- und Apoptose-regulierender Gene zu haben scheint. Vielmehr scheint TRPC1 im *Kras*-Modell über die tumorassoziierte Entzündung das Tumorwachstum zu fördern.

5.4 Schlussbemerkung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von TRP-Kanälen robust in Lungenkrebszellen, aber auch in Basalzellen des respiratorischen Epithels exprimiert werden. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die unspezifische Blockade von TRP-Kanälen die Proliferation der Lungenkrebszellen A549 hemmt. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass das NTHi-induzierte Tumorwachstum und die hiermit verbundene tumorassoziierte Entzündung bei TRPC1 defizienten *Kras* Mäusen, im Vergleich zu *Kras* Mäusen ohne Defizienz für TRPC1, signifikant geringer ausfällt. Die Defizienz für TRPC1 führte zu einer verminderten Expression tumorfördernder Zytokine (IL-6 und IL-1 β) in der Tumormikroumgebung führt. Dementsprechend kann vermutet werden, dass TRPC1 über die Reduktion inflammatorischer Prozesse Einfluss auf die Tumorentstehung und das Tumorwachstum hat. Dass Entzündungsprozesse eine Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten maligner Erkrankungen spielen, konnte bisher bereits mehrfach nachgewiesen werden. Bezüglich der genauen Regulationsmechanismen, Signalwege und möglicher klinischer Therapieansätze bleiben jedoch noch viele Fragen offen. Diese Arbeit konnte zwar zeigen, dass TRPC1 an der Expression inflammatorischer Botenstoffe beteiligt ist und hierüber möglicherweise das Krebswachstum beeinflusst. Über welche Wege dies erfolgt, bleibt jedoch in weiteren Studien zu klären. Insbesondere welche Zytokine hierbei eine Rolle spielen, ist dabei von großem Interesse. Weiterführend ist es sinnvoll, auch die übrigen im Tumorgewebe exprimierten TRP-Kanäle hinsichtlich ihres Einflusses auf das Tumorwachstum zu untersuchen. Außerdem ist noch unklar, in welchen Zelltypen in der Tumormikroumgebung TRPC1 einen Einfluss auf die Bildung inflammatorischer Zytokine hat. Weitere Studien müssen zeigen, ob der Effekt beispielsweise auf eine Polarisierung tumorassoziiierter Makrophagen zurückzuführen ist. Dies wäre genauso denkbar, wie eine Regulation über die Expression von Entzündungsmediatoren in Epithelzellen oder Tumorzellen. Sollte sich hier ein zentraler Regulationsmechanismus eruieren lassen, kann dieser eventuell als Ansatzpunkt für zukünftige klinische Therapie genutzt werden. Es sind weitere Studien nötig, um zu prüfen inwiefern TRPC1 Proliferation oder auch Apoptose reguliert und so die Tumorprogression beeinflusst. Die vorliegende Arbeit unterstreicht in jedem Fall die Rolle einer (chronischen) Entzündung bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren. Der Verhinderung oder Hemmung einer solchen Entzündungsreaktion könnte zukünftig in der Therapie ein deutlich höherer Stellenwert zukommen als bisher.

6. Literaturverzeichnis

1. Adcock IM, Caramori G, Barnes PJ (2011) Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: new molecular insights. *Respiration* 81:265-284
2. Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B (2009) Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* 15:425-430
3. Ahmmed GU, Mehta D, Vogel S, Holinstat M, Paria BC, Tirupathi C, Malik AB (2004) Protein kinase Calpha phosphorylates the TRPC1 channel and regulates store-operated Ca²⁺ entry in endothelial cells. *J Biol Chem* 279:20941-20949
4. Akbay EA, Koyama S, Liu Y, Dries R, Bufe LE, Silkes M, Alam MM, Magee DM, Jones R, Jinushi M, Kulkarni M, Carretero J, Wang X, Warner-Hatten T, Cavanaugh JD, Osa A, Kumanogoh A, Freeman GJ, Awad MM, Christiani DC, Bueno R, Hammerman PS, Dranoff G, Wong KK (2017) Interleukin-17A Promotes Lung Tumor Progression through Neutrophil Attraction to Tumor Sites and Mediating Resistance to PD-1 Blockade. *J Thorac Oncol* 12:1268-1279
5. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD (2013) Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 143:e1S-e29S
6. Ambs S, Glynn SA (2011) Candidate pathways linking inducible nitric oxide synthase to a basal-like transcription pattern and tumor progression in human breast cancer. *Cell Cycle* 10:619-624
7. Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-545
8. Barnes PJ (2016) Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 138:16-27
9. Barrera L, Montes-Servin E, Barrera A, Ramirez-Tirado LA, Salinas-Parra F, Banales-Mendez JL, Sandoval-Rios M, Arrieta O (2015) Cytokine profile determined by data-mining analysis set into clusters of non-small-cell lung cancer patients according to prognosis. *Ann Oncol* 26:428-435
10. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* 395:645-648
11. Bessac BF, Jordt SE (2008) Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiology (Bethesda)* 23:360-370
12. Bolanz KA, Hediger MA, Landowski CP (2008) The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol Cancer Ther* 7:271-279

13. Bomben VC, Sontheimer H (2010) Disruption of transient receptor potential canonical channel 1 causes incomplete cytokinesis and slows the growth of human malignant gliomas. *Glia* 58:1145-1156
14. Bonvini SJ, Belvisi MG (2017) Cough and airway disease: The role of ion channels. *Pulm Pharmacol Ther* 47:21-28
15. Bremnes RM, Al-Shibli K, Donnem T, Sirera R, Al-Saad S, Andersen S, Stenvold H, Camps C, Busund LT (2011) The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6:824-833
16. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR (2011) New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 378:1015-1026
17. Buch T, Schafer E, Steinritz D, Dietrich A, Gudermann T (2013) Chemosensory TRP channels in the respiratory tract: role in toxic lung injury and potential as "sweet spots" for targeted therapies. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 165:31-65
18. Buch TRH, Buch EAM, Boekhoff I, Steinritz D, Aigner A (2018) Role of Chemosensory TRP Channels in Lung Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)* 11
19. Bucher P, Erdmann T, Grondona P, Xu W, Schmitt A, Schurch C, Zapukhlyak M, Schonfeld C, Serfling E, Kramer D, Grau M, Klener P, Lengerke C, Schulze-Osthoff K, Lenz G, Hailfinger S (2020) Targeting chronic NFAT activation with calcineurin inhibitors in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 135:121-132
20. Caetano MS, Zhang H, Cumpian AM, Gong L, Unver N, Ostrin EJ, Daliri S, Chang SH, Ochoa CE, Hanash S, Behrens C, Wistuba II, Sternberg C, Kadara H, Ferreira CG, Watowich SS, Moghaddam SJ (2016) IL6 Blockade Reprograms the Lung Tumor Microenvironment to Limit the Development and Progression of K-ras-Mutant Lung Cancer. *Cancer Res* 76:3189-3199
21. Cai R, Ding X, Zhou K, Shi Y, Ge R, Ren G, Jin Y, Wang Y (2009) Blockade of TRPC6 channels induced G2/M phase arrest and suppressed growth in human gastric cancer cells. *Int J Cancer* 125:2281-2287
22. Chang A (2011) Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer* 71:3-10
23. Chang SH, Mirabolfathinejad SG, Katta H, Cumpian AM, Gong L, Caetano MS, Moghaddam SJ, Dong C (2014) T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:5664-5669
24. Chauhan A, Sun Y, Sukumaran P, Quenum Zangbede FO, Jondle CN, Sharma A, Evans DL, Chauhan P, Szlabick RE, Aaland MO, Birnbaumer L, Sharma J, Singh BB, Mishra BB (2018) M1 Macrophage Polarization Is Dependent on TRPC1-Mediated Calcium Entry. *iScience* 8:85-102

25. Chigurupati S, Venkataraman R, Barrera D, Naganathan A, Madan M, Paul L, Pattisapu JV, Kyriazis GA, Sugaya K, Bushnev S, Lathia JD, Rich JN, Chan SL (2010) Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res* 70:418-427
26. Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M (1988) The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54:541-552
27. Chung KF, Adcock IM (2008) Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J* 31:1334-1356
28. Clapham DE, Runnels LW, Strubing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387-396
29. Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517-524
30. Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005) International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 57:427-450
31. Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047-1058
32. Cohen AJ (2000) Outdoor air pollution and lung cancer. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 4:743-750
33. Coindre JM, Trojani M, Contesso G, David M, Rouesse J, Bui NB, Bodaert A, De Mascarel I, De Mascarel A, Goussot JF (1986) Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer* 58:306-309
34. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285-287
35. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867
36. Das V, Bhattacharya S, Chikkaputtaiah C, Hazra S, Pal M (2019) The basics of epithelial-mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *J Cell Physiol*
37. Davis FM, Peters AA, Grice DM, Cabot PJ, Parat MO, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR (2012) Non-stimulated, agonist-stimulated and store-operated Ca²⁺ influx in MDA-MB-468 breast cancer cells and the effect of EGF-induced EMT on calcium entry. *PLoS One* 7:e36923
38. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B (2008) Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 8:425-437
39. Dhennin-Duthille I, Gautier M, Faouzi M, Guilbert A, Brevet M, Vaudry D, Ahidouch A, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H (2011) High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cell Physiol Biochem* 28:813-822
40. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR (2019) Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc* 94:1623-1640

41. Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW (1998) Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* 58:1515-1520
42. Duncan LM, Deeds J, Cronin FE, Donovan M, Sober AJ, Kauffman M, McCarthy JJ (2001) Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol* 19:568-576
43. Edge SB, Compton CC (2010) The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 17:1471-1474
44. El Hiani Y, Ahidouch A, Lehen'kyi V, Hague F, Gouilleux F, Mentaverri R, Kamel S, Lassoued K, Brule G, Ouadid-Ahidouch H (2009) Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and TRPC1 channels are required for calcium-sensing receptor-stimulated MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Cell Physiol Biochem* 23:335-346
45. El Rayes T, Catena R, Lee S, Stawowczyk M, Joshi N, Fischbach C, Powell CA, Dannenberg AJ, Altorki NK, Gao D, Mittal V (2015) Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated degradation of Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:16000-16005
46. Elinav E, Nowarski R, Thaïss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA (2013) Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer* 13:759-771
47. Elzamzamy OM, Penner R, Hazlehurst LA (2020) The Role of TRPC1 in Modulating Cancer Progression. *Cells* 9
48. Fabian A, Fortmann T, Dieterich P, Riethmuller C, Schon P, Mally S, Nilius B, Schwab A (2008) TRPC1 channels regulate directionality of migrating cells. *Pflugers Arch* 457:475-484
49. Fabian A, Bertrand J, Lindemann O, Pap T, Schwab A (2012) Transient receptor potential canonical channel 1 impacts on mechanosignaling during cell migration. *Pflugers Arch* 464:623-630
50. Faouzi M, Hague F, Geerts D, Ay AS, Potier-Cartereau M, Ahidouch A, Ouadid-Ahidouch H (2016) Functional cooperation between KCa3.1 and TRPC1 channels in human breast cancer: Role in cell proliferation and patient prognosis. *Oncotarget* 7:36419-36435
51. Fels B, Bulk E, Petho Z, Schwab A (2018) The Role of TRP Channels in the Metastatic Cascade. *Pharmaceuticals (Basel)* 11
52. Ferone G, Lee MC, Sage J, Berns A (2020) Cells of origin of lung cancers: lessons from mouse studies. *Genes Dev* 34:1017-1032
53. Fiorio Pla A, Gkika D (2013) Emerging role of TRP channels in cell migration: from tumor vascularization to metastasis. *Front Physiol* 4:311
54. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK (2006) The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 6:521-534

55. Gao H, Chen X, Du X, Guan B, Liu Y, Zhang H (2011) EGF enhances the migration of cancer cells by up-regulation of TRPM7. *Cell Calcium* 50:559-568
56. Gao X, Jia M, Zhang Y, Breitling LP, Brenner H (2015) DNA methylation changes of whole blood cells in response to active smoking exposure in adults: a systematic review of DNA methylation studies. *Clin Epigenetics* 7:113
57. Gkika D, Prevarskaya N (2009) Molecular mechanisms of TRP regulation in tumor growth and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1793:953-958
58. Gong L, Cumpian AM, Caetano MS, Ochoa CE, De la Garza MM, Lapid DJ, Mirabolfathinejad SG, Dickey BF, Zhou Q, Moghaddam SJ (2013) Promoting effect of neutrophils on lung tumorigenesis is mediated by CXCR2 and neutrophil elastase. *Mol Cancer* 12:154
59. Greten FR, Grivennikov SI (2019) Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* 51:27-41
60. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140:883-899
61. Gu K, Li MM, Shen J, Liu F, Cao JY, Jin S, Yu Y (2015) Interleukin-17-induced EMT promotes lung cancer cell migration and invasion via NF-kappaB/ZEB1 signal pathway. *Am J Cancer Res* 5:1169-1179
62. Gueguinou M, Harnois T, Crottes D, Uguen A, Deliot N, Gambade A, Chantome A, Haelters JP, Jaffres PA, Jourdan ML, Weber G, Soriani O, Bougnoux P, Mignen O, Bourmeyster N, Constantin B, Lecomte T, Vandier C, Potier-Cartereau M (2016) SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmlin. *Oncotarget* 7:36168-36184
63. Guo L, Li L, Wang W, Pan Z, Zhou Q, Wu Z (2012) Mitochondrial reactive oxygen species mediates nicotine-induced hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human non-small cell lung cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1822:852-861
64. Hammerschmidt S, Wirtz H (2009) Lung cancer: current diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 106:809-818; quiz 819-820
65. Hardie RC, Raghu P (2001) Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 413:186-193
66. Harris TK (2003) PDK1 and PKB/Akt: ideal targets for development of new strategies to structure-based drug design. *IUBMB Life* 55:117-126
67. Hay ED (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154:8-20
68. He B, Liu F, Ruan J, Li A, Chen J, Li R, Shen J, Zheng D, Luo R (2012) Silencing TRPC1 expression inhibits invasion of CNE2 nasopharyngeal tumor cells. *Oncol Rep* 27:1548-1554
69. He D, Li H, Yusuf N, Elmets CA, Li J, Mountz JD, Xu H (2010) IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 184:2281-2288

70. Hecht SS (1999) Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:1194-1210
71. Hellwig N, Albrecht N, Harteneck C, Schultz G, Schaefer M (2005) Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* 118:917-928
72. Houghton AM (2013) Mechanistic links between COPD and lung cancer. *Nat Rev Cancer* 13:233-245
73. Huang Q, Han J, Fan J, Duan L, Guo M, Lv Z, Hu G, Chen L, Wu F, Tao X, Xu J, Jin Y (2016) IL-17 induces EMT via Stat3 in lung adenocarcinoma. *Am J Cancer Res* 6:440-451
74. Izzo AA, Coutts AA (2005) Cannabinoids and the digestive tract. *Handb Exp Pharmacol*:573-598
75. Izzotti A, Larghero P, Longobardi M, Cartiglia C, Camoirano A, Steele VE, De Flora S (2011) Dose-responsiveness and persistence of microRNA expression alterations induced by cigarette smoke in mouse lung. *Mutat Res* 717:9-16
76. Jackman DM, Johnson BE (2005) Small-cell lung cancer. *Lancet* 366:1385-1396
77. Ji H, Houghton AM, Mariani TJ, Perera S, Kim CB, Padera R, Tonon G, McNamara K, Marconcini LA, Hezel A, El-Bardeesy N, Bronson RT, Sugarbaker D, Maser RS, Shapiro SD, Wong KK (2006) K-ras activation generates an inflammatory response in lung tumors. *Oncogene* 25:2105-2112
78. Jiang HN, Zeng B, Zhang Y, Daskoulidou N, Fan H, Qu JM, Xu SZ (2013) Involvement of TRPC channels in lung cancer cell differentiation and the correlation analysis in human non-small cell lung cancer. *PLoS One* 8:e67637
79. Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, Jacks T (2001) Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410:1111-1116
80. Jordan EJ, Kim HR, Arcila ME, Barron D, Chakravarty D, Gao J, Chang MT, Ni A, Kundra R, Jonsson P, Jayakumaran G, Gao SP, Johnsen HC, Hanrahan AJ, Zehir A, Rekhtman N, Ginsberg MS, Li BT, Yu HA, Paik PK, Drilon A, Hellmann MD, Reales DN, Benayed R, Rusch VW, Kris MG, Chaft JE, Baselga J, Taylor BS, Schultz N, Rudin CM, Hyman DM, Berger MF, Solit DB, Ladanyi M, Riely GJ (2017) Prospective Comprehensive Molecular Characterization of Lung Adenocarcinomas for Efficient Patient Matching to Approved and Emerging Therapies. *Cancer Discov* 7:596-609
81. Jungnickel C, Schmidt LH, Bittigkoffer L, Wolf L, Wolf A, Ritzmann F, Kamyschnikow A, Herr C, Menger MD, Spieker T, Wiewrodt R, Bals R, Beisswenger C (2017a) IL-17C mediates the recruitment of tumor-associated neutrophils and lung tumor growth. *Oncogene* 36:4182-4190
82. Jungnickel C, Schnabel PA, Bohle R, Wiewrodt R, Herr C, Bals R, Beisswenger C (2017b) Nontypeable *Haemophilus influenzae*-Promoted Proliferation of Kras-Induced Early

- Adenomatous Lesions Is Completely Dependent on Toll-Like Receptor Signaling. *Am J Pathol* 187:973-979
83. Kalluri R, Neilson EG (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112:1776-1784
84. Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119:1420-1428
85. Kalogris C, Caprodossi S, Amantini C, Lambertucci F, Nabissi M, Morelli MB, Farfariello V, Filosa A, Emiliozzi MC, Mammana G, Santoni G (2010) Expression of transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) in urothelial cancers of human bladder: relation to clinicopathological and molecular parameters. *Histopathology* 57:744-752
86. Kaneko Y, Szallasi A (2014) Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br J Pharmacol* 171:2474-2507
87. Kanwar JR, Kanwar RK, Burrow H, Baratchi S (2009) Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr Med Chem* 16:2373-2394
88. Kenfield SA, Wei EK, Stampfer MJ, Rosner BA, Colditz GA (2008) Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. *Tob Control* 17:198-204
89. Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, Muallem S (1998) Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396:478-482
90. Kisley LR, Barrett BS, Bauer AK, Dwyer-Nield LD, Barthel B, Meyer AM, Thompson DC, Malkinson AM (2002) Genetic ablation of inducible nitric oxide synthase decreases mouse lung tumorigenesis. *Cancer Res* 62:6850-6856
91. Kuang CY, Yu Y, Wang K, Qian DH, Den MY, Huang L (2012) Knockdown of transient receptor potential canonical-1 reduces the proliferation and migration of endothelial progenitor cells. *Stem Cells Dev* 21:487-496
92. Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:178-196
93. Lau JK, Brown KC, Dom AM, Witte TR, Thornhill BA, Crabtree CM, Perry HE, Brown JM, Ball JG, Creel RG, Damron CL, Rollyson WD, Stevenson CD, Hardman WE, Valentovic MA, Carpenter AB, Dasgupta P (2014) Capsaicin induces apoptosis in human small cell lung cancer via the TRPV6 receptor and the calpain pathway. *Apoptosis* 19:1190-1201
94. Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N (2007) TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 26:7380-7385
95. Lepage PK, Lussier MP, Barajas-Martinez H, Bousquet SM, Blanchard AP, Francoeur N, Dumaine R, Boulay G (2006) Identification of two domains involved in the assembly of transient receptor potential canonical channels. *J Biol Chem* 281:30356-30364

96. Li D, Beisswenger C, Herr C, Hellberg J, Han G, Zakharkina T, Voss M, Wiewrodt R, Bohle RM, Menger MD, Schmid RM, Stockel D, Lenhof HP, Bals R (2014) Myeloid cell RelA/p65 promotes lung cancer proliferation through Wnt/beta-catenin signaling in murine and human tumor cells. *Oncogene* 33:1239-1248
97. Li Q, Han Y, Fei G, Guo Z, Ren T, Liu Z (2012) IL-17 promoted metastasis of non-small-cell lung cancer cells. *Immunol Lett* 148:144-150
98. Li X, Zhang Q, Fan K, Li B, Li H, Qi H, Guo J, Cao Y, Sun H (2016) Overexpression of TRPV3 Correlates with Tumor Progression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci* 17:437
99. Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V (2006) Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 318:1375-1387
100. Lin KR, Li CL, Yen JJ, Yang-Yen HF (2013) Constitutive phosphorylation of GATA-1 at serine(2)(6) attenuates the colony-forming activity of erythrocyte-committed progenitors. *PLoS One* 8:e64269
101. Liu Z, Liu JQ, Talebian F, Wu LC, Li S, Bai XF (2013) IL-27 enhances the survival of tumor antigen-specific CD8+ T cells and programs them into IL-10-producing, memory precursor-like effector cells. *Eur J Immunol* 43:468-479
102. Lorenzo IM, Liedtke W, Sanderson MJ, Valverde MA (2008) TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12611-12616
103. Louis M, Zanou N, Van Schoor M, Gailly P (2008) TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *J Cell Sci* 121:3951-3959
104. Mace TA, Shakya R, Pitarresi JR, Swanson B, McQuinn CW, Loftus S, Nordquist E, Cruz-Monserrate Z, Yu L, Young G, Zhong X, Zimmers TA, Ostrowski MC, Ludwig T, Bloomston M, Bekaii-Saab T, Lesinski GB (2018) IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut* 67:320-332
105. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-444
106. McErlean A, Ginsberg MS (2011) Epidemiology of lung cancer. *Semin Roentgenol* 46:173-177
107. Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, Shen L, Turk E, Ouyang C, Jacks T (2009) Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* 462:104-107
108. Moghaddam SJ, Li H, Cho SN, Dishop MK, Wistuba, II, Ji L, Kurie JM, Dickey BF, Demayo FJ (2009) Promotion of lung carcinogenesis by chronic obstructive pulmonary disease-like airway inflammation in a K-ras-induced mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:443-453
109. Moghaddam SJ, Ochoa CE, Sethi S, Dickey BF (2011) Nontypeable Haemophilus influenzae in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 6:113-123

110. Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G (1985) Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* 230:1040-1043
111. Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313-1323
112. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V (2002a) The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108:595-598
113. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002b) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 9:229-231
114. Moran MM, Xu H, Clapham DE (2004) TRP ion channels in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 14:362-369
115. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH (2003) Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:155-174
116. Mukhopadhyay I, Gomes P, Aranake S, Shetty M, Karnik P, Damle M, Kuruganti S, Thorat S, Khairatkar-Joshi N (2011) Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J Recept Signal Transduct Res* 31:350-358
117. Murata M (2018) Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med* 23:50
118. Nair S, Bora-Singhal N, Perumal D, Chellappan S (2014) Nicotine-mediated invasion and migration of non-small cell lung carcinoma cells by modulating *STMN3* and *GSPT1* genes in an *ID1*-dependent manner. *Mol Cancer* 13:173
119. Neurath MF, Finotto S (2012) The emerging role of T cell cytokines in non-small cell lung cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 23:315-322
120. Niemeyer BA, Suzuki E, Scott K, Jalink K, Zuker CS (1996) The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell* 85:651-659
121. Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2005) Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* 567:35-44
122. Nilius B (2007) TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772:805-812
123. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87:165-217
124. Okayama H, Saito M, Oue N, Weiss JM, Stauffer J, Takenoshita S, Wiltrout RH, Hussain SP, Harris CC (2013) NOS2 enhances KRAS-induced lung carcinogenesis, inflammation and microRNA-21 expression. *Int J Cancer* 132:9-18
125. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:552-565

126. Park YR, Chun JN, So I, Kim HJ, Baek S, Jeon JH, Shin SY (2016) Data-driven Analysis of TRP Channels in Cancer: Linking Variation in Gene Expression to Clinical Significance. *Cancer Genomics Proteomics* 13:83-90
127. Pawel DJ, Puskin JS (2004) The U.S. Environmental Protection Agency's assessment of risks from indoor radon. *Health Phys* 87:68-74
128. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 38:233-252
129. Pervin S, Singh R, Hernandez E, Wu G, Chaudhuri G (2007) Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway. *Cancer Res* 67:289-299
130. Petersen CC, Berridge MJ, Borgese MF, Bennett DL (1995) Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila* *trp* and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem J* 311 (Pt 1):41-44
131. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P (2002) Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21:7435-7451
132. Prakriya M, Lewis RS (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 95:1383-1436
133. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2004) Ca²⁺ homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1326-1335
134. Prevarskaya N, Flourakis M, Bidaux G, Thebault S, Skryma R (2007a) Differential role of TRP channels in prostate cancer. *Biochem Soc Trans* 35:133-135
135. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G (2007b) TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1772:937-946
136. Pu Q, Zhao Y, Sun Y, Huang T, Lin P, Zhou C, Qin S, Singh BB, Wu M (2019) TRPC1 intensifies house dust mite-induced airway remodeling by facilitating epithelial-to-mesenchymal transition and STAT3/NF-kappaB signaling. *FASEB J* 33:1074-1085
137. Putney JW (2012) Calcium signaling: deciphering the calcium-NFAT pathway. *Curr Biol* 22:R87-89
138. Qu Z, Sun F, Zhou J, Li L, Shapiro SD, Xiao G (2015) Interleukin-6 Prevents the Initiation but Enhances the Progression of Lung Cancer. *Cancer Res* 75:3209-3215
139. Ramer R, Hinz B (2008) Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *J Natl Cancer Inst* 100:59-69
140. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619-647
141. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11:372-380

142. Reilly CA, Taylor JL, Lanza DL, Carr BA, Crouch DJ, Yost GS (2003) Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicol Sci* 73:170-181
143. Reka AK, Chen G, Jones RC, Amunugama R, Kim S, Karnovsky A, Standiford TJ, Beer DG, Omenn GS, Keshamouni VG (2014) Epithelial-mesenchymal transition-associated secretory phenotype predicts survival in lung cancer patients. *Carcinogenesis* 35:1292-1300
144. Reppert S, Boross I, Koslowski M, Tureci O, Koch S, Lehr HA, Finotto S (2011) A role for T-bet-mediated tumour immune surveillance in anti-IL-17A treatment of lung cancer. *Nat Commun* 2:600
145. Reppert S, Koch S, Finotto S (2012) IL-17A is a central regulator of lung tumor growth. *Oncoimmunology* 1:783-785
146. Ritzmann F, Jungnickel C, Vella G, Kamyschnikow A, Herr C, Li D, Menger MM, Angenendt A, Hoth M, Lis A, Bals R, Beisswenger C (2019) IL-17C-mediated innate inflammation decreases the response to PD-1 blockade in a model of Kras-driven lung cancer. *Sci Rep* 9:10353
147. Ritzmann F (2020) Einfluss der PD-1/PD-L1-Achse auf den entzündungsinduzierten Lungenschaden in der COPD, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar.
148. Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes PJ, Di Virgilio F, Pozzan T (2003) Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 22:8619-8627
149. Roderick HL, Cook SJ (2008) Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* 8:361-375
150. Schaefer EA, Stohr S, Meister M, Aigner A, Gudermann T, Buech TR (2013) Stimulation of the chemosensory TRPA1 cation channel by volatile toxic substances promotes cell survival of small cell lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 85:426-438
151. Schaefer M, Plant TD, Obukhov AG, Hofmann T, Gudermann T, Schultz G (2000) Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* 275:17517-17526
152. Schaefer M, Urban N (2013) TRP-Kanäle: vielseitige zelluläre Sensoren und Effektoren. *BIOspektrum* 19:143-145
153. Schindl R, Romanin C (2007) Assembly domains in TRP channels. *Biochem Soc Trans* 35:84-85
154. Schwartz AG, Ruckdeschel JC (2006) Familial lung cancer: genetic susceptibility and relationship to chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 173:16-22
155. Schwarz EC, Wissenbach U, Niemeyer BA, Strauss B, Philipp SE, Flockerzi V, Hoth M (2006) TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium* 39:163-173
156. Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:721-732

157. Seo JW, Kim JH, Kim JH, Seo M, Han HS, Park J, Suk K (2012) Time-dependent effects of hypothermia on microglial activation and migration. *J Neuroinflammation* 9:164
158. Sethi S (2000) Infectious etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* 117:380S-385S
159. Sethi S (2010) Infection as a comorbidity of COPD. *Eur Respir J* 35:1209-1215
160. Shacter E, Weitzman SA (2002) Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)* 16:217-226, 229; discussion 230-212
161. Shalapour S, Karin M (2015) Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest* 125:3347-3355
162. Shapovalov G, Lehen'kyi V, Skryma R, Prevarskaya N (2011) TRP channels in cell survival and cell death in normal and transformed cells. *Cell Calcium* 50:295-302
163. Shapovalov G, Ritaine A, Skryma R, Prevarskaya N (2016) Role of TRP ion channels in cancer and tumorigenesis. *Semin Immunopathol* 38:357-369
164. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2019) Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69:7-34
165. Smith BT (1977) Cell line A549: a model system for the study of alveolar type II cell function. *Am Rev Respir Dis* 115:285-293
166. So CL, Saunus JM, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR (2019) Calcium signalling and breast cancer. *Semin Cell Dev Biol* 94:74-83
167. Soltermann A, Tischler V, Arbogast S, Braun J, Probst-Hensch N, Weder W, Moch H, Kristiansen G (2008) Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 14:7430-7437
168. Spella M, Lilis I, Pepe MA, Chen Y, Armaka M, Lamort AS, Zazara DE, Roumelioti F, Vreka M, Kanellakis NI, Wagner DE, Giannou AD, Armenis V, Arendt KA, Klotz LV, Toumpanakis D, Karavana V, Zakynthinos SG, Giopanou I, Marazioti A, Aidinis V, Sotillo R, Stathopoulos GT (2019) Club cells form lung adenocarcinomas and maintain the alveoli of adult mice. *Elife* 8
169. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*
170. Szulakowski P, Crowther AJ, Jimenez LA, Donaldson K, Mayer R, Leonard TB, MacNee W, Drost EM (2006) The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 174:41-50
171. Tajeddine N, Gailly P (2012) TRPC1 protein channel is major regulator of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 287:16146-16157

172. Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, Broide DH, Karin M (2010) Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell* 17:89-97
173. Taylor-Clark TE (2016) Role of reactive oxygen species and TRP channels in the cough reflex. *Cell Calcium* 60:155-162
174. Thomas DD, Wink DA (2017) NOS2 as an Emergent Player in Progression of Cancer. *Antioxid Redox Signal* 26:963-965
175. Thomas KC, Sabnis AS, Johansen ME, Lanza DL, Moos PJ, Yost GS, Reilly CA (2007) Transient receptor potential vanilloid 1 agonists cause endoplasmic reticulum stress and cell death in human lung cells. *J Pharmacol Exp Ther* 321:830-838
176. Tomoshige K, Guo M, Tsuchiya T, Fukazawa T, Fink-Baldauf IM, Stuart WD, Naomoto Y, Nagayasu T, Maeda Y (2018) An EGFR ligand promotes EGFR-mutant but not KRAS-mutant lung cancer in vivo. *Oncogene* 37:3894-3908
177. Trost C, Bergs C, Himmerkus N, Flockerzi V (2001) The transient receptor potential, TRP4, cation channel is a novel member of the family of calmodulin binding proteins. *Biochem J* 355:663-670
178. Vanden Abeele F, Shuba Y, Roudbaraki M, Lemonnier L, Vanoverberghe K, Mariot P, Skryma R, Prevarskaya N (2003) Store-operated Ca²⁺ channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium* 33:357-373
179. Vannier B, Zhu X, Brown D, Birnbaumer L (1998) The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J Biol Chem* 273:8675-8679
180. Veliceasa D, Ivanovic M, Hoepfner FT, Thumbikat P, Volpert OV, Smith ND (2007) Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma. *FEBS J* 274:6365-6377
181. Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL (2003) Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* 278:29031-29040
182. Vennekens R, Voets T, Bindels RJ, Droogmans G, Nilius B (2002) Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium* 31:253-264
183. Voss M, Wolf L, Kamyschnikow A, Wonenberg B, Honecker A, Herr C, Lepper PM, Wegmann M, Menger MD, Bals R, Beisswenger C (2015) IL-17A contributes to maintenance of pulmonary homeostasis in a murine model of cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309:L188-195
184. Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T, Nilius B (2004) Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:396-401

185. Wahbah M, Boroumand N, Castro C, El-Zeky F, Eltorkey M (2007) Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer: a review of 4,439 cases. *Ann Diagn Pathol* 11:89-96
186. Wang Y, He J, Jiang H, Zhang Q, Yang H, Xu X, Zhang C, Xu C, Wang J, Lu W (2018) Nicotine enhances storeoperated calcium entry by upregulating HIF1alpha and SOCC components in nonsmall cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 40:2097-2104
187. Wendt MK, Balanis N, Carlin CR, Schiemann WP (2014) STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. *JAKSTAT* 3:e28975
188. Wenning AS, Neblung K, Strauss B, Wolfs MJ, Sappok A, Hoth M, Schwarz EC (2011) TRP expression pattern and the functional importance of TRPC3 in primary human T-cells. *Biochim Biophys Acta* 1813:412-423
189. Wissenbach U, Niemeyer B, Himmerkus N, Fixemer T, Bonkhoff H, Flockerzi V (2004) TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca²⁺ channel expression. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1359-1363
190. Yang LL, Liu BC, Lu XY, Yan Y, Zhai YJ, Bao Q, Doetsch PW, Deng X, Thai TL, Alli AA, Eaton DC, Shen BZ, Ma HP (2017) Inhibition of TRPC6 reduces non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion. *Oncotarget* 8:5123-5134
191. Yao X, Kwan HY, Huang Y (2005) Regulation of TRP channels by phosphorylation. *Neurosignals* 14:273-280
192. Yee NS, Chan AS, Yee JD, Yee RK (2012) TRPM7 and TRPM8 Ion Channels in Pancreatic Adenocarcinoma: Potential Roles as Cancer Biomarkers and Targets. *Scientifica (Cairo)* 2012:415158
193. Young RP, Hopkins RJ, Christmas T, Black PN, Metcalf P, Gamble GD (2009) COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. *Eur Respir J* 34:380-386
194. Zappa C, Mousa SA (2016) Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res* 5:288-300
195. Zeng B, Yuan C, Yang X, Atkin SL, Xu SZ (2013) TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 13:103-116
196. Zhou X, Ye Y, Sun Y, Li X, Wang W, Privratsky B, Tan S, Zhou Z, Huang C, Wei YQ, Birnbaumer L, Singh BB, Wu M (2015) Transient Receptor Potential Channel 1 Deficiency Impairs Host Defense and Proinflammatory Responses to Bacterial Infection by Regulating Protein Kinase Calpha Signaling. *Mol Cell Biol* 35:2729-2739
197. Zhu Z, Aref AR, Cohoon TJ, Barbie TU, Imamura Y, Yang S, Moody SE, Shen RR, Schinzel AC, Thai TC, Reibel JB, Tamayo P, Godfrey JT, Qian ZR, Page AN, Maciag K, Chan EM, Silkworth W, Labowsky MT, Rozhansky L, Mesirov JP, Gillanders WE, Ogino S, Hacohen N,

-
- Gaudet S, Eck MJ, Engelman JA, Corcoran RB, Wong KK, Hahn WC, Barbie DA (2014) Inhibition of KRAS-driven tumorigenicity by interruption of an autocrine cytokine circuit. *Cancer Discov* 4:452-465
198. Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR (2002) Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* 82:1755-1764
199. Zong D, Liu X, Li J, Ouyang R, Chen P (2019) The role of cigarette smoke-induced epigenetic alterations in inflammation. *Epigenetics Chromatin* 12:65

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einfluss von Zigarettenrauch und NTHi auf die Pathogenese von Lungenkrebs und COPD	7
Abbildung 2: Abstammung und Verwandtschaft der TRP-Kanalfamilie	9
Abbildung 3: Aufbau verschiedener TRP Kanäle.....	11
Abbildung 4: Die Rolle von TRPC1 im EGFR-Signalweg	18
Abbildung 5: mRNS-Expression verschiedener TRP-Kanäle in A549 Zellen	30
Abbildung 6: mRNS-Expression verschiedener TRP-Kanäle in Calu-3 Zellen	31
Abbildung 7: mRNS-Expression verschiedener TRP-Kanäle in primären Atemwegsepithelzellen....	31
Abbildung 8: Defizienz für TRPC1 ohne induzierte Entzündungsreaktion führt nicht zu einem signifikant verringerten Tumorwachstum	32
Abbildung 9: Defizienz für TRPC1 führt ohne NTHi-Exposition nicht zu einer geringeren Tumorlast	33
Abbildung 10: Defizienz von TRPC1 verringert das NTHi-induzierte Tumorwachstum	34
Abbildung 11: Defizienz für TRPC1 führt zu einem geringeren entzündungsinduzierten Tumorwachstum.....	34
Abbildung 12: Defizienz für TRPC1 führt zu einer geringeren Expression von tumorfördernden Zytokinen	35
Abbildung 13: Behandlung von A-549 Zellen mit SKF-96365 senkt deren Proliferation	36

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der TRP-Kanäle	13
Tabelle 2: Vorkommen von TRP-Kanälen in malignen Geweben	15
Tabelle 3: Geräte mit Hersteller	22
Tabelle 4: Puffer und Lösungen	23
Tabelle 5: Zelllinien und Medien	24
Tabelle 6: Programm der cDNS-Synthese.....	25
Tabelle 7: Reaktionsansatz semi-quantitative Real Time qPCR	25
Tabelle 8: Temperaturprogramm semi-quantitative Real Time qPCR.....	25
Tabelle 9: TRP-Kanal-Primer semi-quantitative Real Time qPCR.....	26
Tabelle 10: Verwendete Primer semi-quantitative Real Time qPCR	28

9. Publikationen

10. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen, um einigen Menschen zu danken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Als erstes gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe Bals, die mich freundlich aufgenommen, integriert und jederzeit bestmöglich unterstützt hat. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Christoph Beißwenger und Herrn Professor Dr. Dr. Robert Bals für die freundliche Überlassung des Themas, die herausragende Betreuung und ermutigenden Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Dr. Felix Ritzmann für die exzellente Einarbeitung, technische Unterstützung, aufgebrauchte Geduld und investierte Zeit. Ohne seine freundschaftliche und humorvolle Hilfe und Beratung wäre diese Arbeit wohl kaum möglich gewesen.

Außerdem gilt mein Dank Anja Hoecker, Andreas Kamyschnikow, Dr. Christian Herr und Giovanna Vella für ihre technische und beratende Unterstützung.

Dem Institut für Experimentelle Chirurgie danke ich für die Paraffineinbettung der Lungen. Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. Eva Schwarz und dem gesamten Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes für die Zurverfügungstellung der Primer.

Insbesondere danken möchte ich an dieser Stelle meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Sibylle Gusek und Jürgen Weichert, auf die ich mich immer verlassen kann und die mich unterstützen, ermahnen oder bestärken, wann immer es notwendig ist.

Großer Dank geht selbstverständlich auch an meine Freunde, die mich während dieser Zeit begleitet haben, ohne euch wäre diese Arbeit mit Sicherheit nicht fertiggestellt worden.

Kim, ich danke dir.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 23. Mai 2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Beisswenger
Prof. Dr. Hans-Joachim Schäfers