

**Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

**Non-neuronale Expression und Funktion des
sensorischen Kationenkanals TRPA1
in Tumorzellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Eva Anna Maria Schäfer

aus Lehrte

2013

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: Prof. Dr. Alexander Dietrich

Zweitgutachter: Prof. Dr. Axel Imhof

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03. 2014

*Nachdenklich betrachteten wir mit Neugier den zweifelnden
Blauen Mann auf der Leinwand, sahen uns an und
Begannen von vorne.*

(Bertolt Brecht)

Inhalt

1. Zusammenfassung	11
2. Summary	13
3. Einleitung.....	15
3.1 Fortschritte und Probleme bei der Therapie solider Tumore	16
3.2 Das Pankreaskarzinom	17
3.3 Das Bronchialkarzinom.....	19
3.4 Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC).....	20
3.4.1 Bronchialkarzinome – Einteilung, klinischer Phänotyp und Therapie.....	20
3.4.2 Ursprung, Modellsysteme und molekulare Charakteristika	21
3.4.2.1 Molekulare Marker	22
3.4.2.2 Genetische Veränderungen in SCLC-Zellen.....	22
3.4.2.3 Die SCLC-Zelllinien H69, H82, H146, H187, H209 und H510	23
3.5 Ca ²⁺ als onkogenes Signalmolekül in SCLC.....	23
3.6 TRP-Kanäle.....	25
3.6.1 Einteilung der TRP-Kanäle	26
3.6.2 Struktur und Funktion	27
3.6.3 Die wichtigsten Vertreter der TRPC-, TRPV- und TRPM-Familien.....	28
3.6.4 TRPA1	30
3.6.4.1 TRPA1-Aktivatoren und Aktivierungsmechanismus	31
3.6.4.2 Isothiocyanate – eine heterogene Gruppe von TRPA1-Aktivatoren.....	33
3.6.4.3 TRPA1 als O ₂ -Sensor.....	34
3.6.4.4 Weitere, kovalent modifizierende TRPA1-Aktivatoren	37
3.6.4.5 Nicht-kovalente Aktivatoren von TRPA1	38
3.6.4.6 Sonstige, nicht chemisch definierte Aktivatoren	39
3.6.4.7 Inhibitoren von TRPA1	40
3.6.5 TRP-Kanäle und Krebs	40
3.6.5.1 TRPM-Kanäle	42
3.6.5.2 TRPV-Kanäle	43

3.6.5.3 Andere TRP-Kanäle	43
3.7 Fragestellung.....	44
4. Material und Methoden.....	45
4.1 Geräte.....	45
4.2 Chemikalien und andere Materialien	46
4.2.1 Chemikalien	46
4.2.2 Aktivatoren, Inhibitoren.....	46
4.2.3 Enzyme, Kits und Größenstandards	47
4.2.4 Verbrauchsmaterialien	47
4.2.5 Oligonukleotide ("Primer").....	48
4.2.6 Vektoren/Plasmide.....	49
4.2.7 Antikörper	50
4.2.8 Puffer und Lösungen.....	50
4.3 Zellen.....	51
4.3.1 Zelllinien.....	51
4.3.2 Zellkulturmedium	53
4.3.3 Zellkulturreagenzien und Zellkulturmaterialien	53
4.3.4 Zellkultur: Kultivierung von Suspensionszelllinien	53
4.3.5 Zellkultur: Kultivierung von adhärenen Zelllinien	53
4.3.6 Kryokonservierung.....	54
4.3.7 Bestimmung der Zellzahl	54
4.3.8 Transfektion von Zellen.....	55
4.3.9 Etablierung einer TRPA1-positiven Zelllinie	55
4.3.10 Behandlung von Zellen mit Zigarettenrauch-Extrakt ("cigarette smoke extract", CSE).55	
4.3.11 RNA-Interferenz (RNAi)-vermittelte Herunterregulierung von hTRPA1.....	55
4.4 Patientenproben	56
4.4.1 Isolierung der totalen RNA.....	56
4.4.2 RNA-Transkription/cDNA-Synthese und quantitative RT-PCR.....	56
4.5 Proteintransfer-Immunnachweis ("Western-Blot")	57

4.5.1	Stimulierungen und anschließende Gewinnung von Zelllysaten.....	57
4.5.2	Gewinnung von Lysaten für Caspase-"Western-Blots"	57
4.5.3	SDS-Page (Sodiumdodecylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	57
4.5.3.1	SDS-Page	58
4.5.3.2	Proteintransfer-Immunnachweis ("Western-Blot").....	59
4.6	Quantifizierung der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$).....	61
4.6.1	Aequorin-Messungen.....	61
4.6.2	Fura-2-AM-Messungen	63
4.7	RNA-Isolierung und quantitative, reverse Transkription (RT) PCR	64
4.7.1	RNA-Isolierung.....	64
4.7.2	RNA-Transkription/cDNA-Synthese (reverse Transkription, RT).....	65
4.7.3	Quantitative PCR	66
4.8	Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA	67
4.9	Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA.....	69
4.10	Methoden zur Bestimmung von Zelloptose, Zellproliferation und Zellviabilität.....	70
4.10.1	Tetrazolium-(XTT) Verfahren.....	70
4.10.2	β -Galaktosidase-Seneszenz-Färbung.....	71
4.10.3	Bestimmung der Calpain-Aktivität	72
4.10.4	Analyse des Tumorwachstums im semi-soliden Medium ("Soft-Agar").....	73
4.10.5	Durchflusszytometrische-Messung (FACS).....	74
4.11	Enzym-gekoppelter Immunadsorptions-Nachweis (ELISA).....	75
4.11.1	Konzentrationsbestimmung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) mittels ELISA.....	75
4.11.2	Konzentrationsbestimmung von Serotonin mittels ELISA	76
4.12	Statistik.....	77
5.	Ergebnisse	78
5.1	TRP-Expressionsprofil in SCLC-Zellen.....	78
5.2	TRPA1-Expressionsprofil in SCLC-Zellen.....	82
5.3	TRPA1-Expression in anderen Zellsystemen.....	83
5.4	Funktionelle Expression von TRPA1 in Pankreaskarzinomzellen.....	84

5.5	Funktionelle Expression von TRPA1 in A549-Lungenzellen.....	89
5.6	TRPA1-Expression in SCLC-Zelllinien auf Proteinebene.....	92
5.7	TRPA1-Expression in SCLC-Patientenmaterial.....	93
5.8	AITC-vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in SCLC-Zellen	94
5.9	Strukturell nicht verwandte TRPA1-Aktivatoren	99
5.10	AITC-Desensibilisierung.....	100
5.11	Beteiligung interner Ca^{2+} -Speicher und des extrazellulären Ca^{2+} an der AITC-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in SCLC-Zellen	101
5.12	Analyse der SCLC-Zellen mittels Inhibitoren von TRPA1	103
5.13	TRPA1-Aktivierung im heterologen Expressionssystem in HEK293-Zellen	107
5.14	TRPA1-Aktivierung durch Stickstoffmonoxid (NO)-Donatoren in stabil transfizierten HEK293-Zellen.....	108
5.15	TRPA1-Aktivierung durch "cigarette smoke extract" (CSE) in stabil transfizierten HEK293-Zellen.....	109
5.16	TRPA1-Aktivierung durch "cigarette smoke extract" (CSE) in H146-Zellen	110
5.17	Aktivierung der MAPK-Kaskade über TRPA1 in SCLC-Zellen	111
5.18	Aktivierung der MAPK-Kaskade durch Inhalantien.....	116
5.19	TRPA1 vermittelte Sekretion: VEGF und Serotonin.....	118
5.20	AITC-vermittelte Toxizität in SCLC-Zellen	122
5.21	TRPA1-vermittelter Überlebens-Effekt in SCLC-Zellen.....	128
5.22	Inhibition der TRPA1-Expression mittels "small interference RNA" (siRNA)	133
5.23	Analyse des Zellwachstums von H146-Zellen in semi-solidem Medium ("Soft-Agar"-Versuche) nach Transfektion mit TRPA1-spezifischen und -unspezifischen siRNAs.....	135
6.	Diskussion.....	137
6.1	Non-neuronale Expression von TRPA1	138
6.2	TRPA1 als O_2 -Sensor	140
6.3	Isothiocyanate als Aktivatoren von TRPA1	141
6.4	TRPA1 als polymodaler Sensor für elektrophile Substanzen.....	145
6.5	TRPA1 und Krebs.....	147
6.6	Beteiligung von TRPA1 an der Pathogenese des SCLC.....	149

6.7	Isothiocyanate und Krebs	152
6.8	Mögliche Mechanismen der TRPA1-unabhängigen Toxizität von Isothiocyanaten	156
6.9	Beteiligung von TRPA1 an der Pathogenese des akuten toxischen Lungenschadens	159
6.10	Karzinogene Wirkungen von Tabakrauch: Tumorinitiierende vs. Tumorpromovierende Effekte	161
7.	Anhang	163
7.1	Abkürzungsverzeichnis	163
7.2	Literaturverzeichnis	168
7.3	Eidesstattliche Versicherung	189
7.4	Eigene Publikationen	190
7.4.1	Diplomarbeit	190
7.4.2	Original-Arbeiten	190
7.4.3	Übersichtsartikel	190
7.4.4	Buchbeitrag	190
7.4.5	Publizierte Kongressbeiträge	191
7.5	Danksagung	192

1. Zusammenfassung

TRPA1 ist ein Kationenkanal aus der Familie der "transient receptor potential" (TRP)-Kanäle. Die Expression und Funktion dieses Ionenkanals wurde bisher hauptsächlich in neuronalen Zellen, insbesondere in Schmerzneuronen, untersucht. Dort übt TRPA1 eine Warnfunktion aus und fungiert als Sensormolekül für Reizstoffe. Dementsprechend wird TRPA1 durch eine Reihe von irritativen oder toxischen Substanzen direkt aktiviert, z. B. durch Allylthiocyanat (AITC), Formalin, Zigarettenrauch, Tränengas oder Ozon. Im Einklang mit dieser Funktion wurde eine neuronale Expression von TRPA1 in vielen Grenzflächen des Körpers, z. B. in der Haut, im Gastrointestinaltrakt oder in der Lunge gefunden. Im Respirationstrakt konnte TRPA1 in sensorischen Nervenendigungen in den luftleitenden Atemwegen nachgewiesen werden, wo seine Aktivierung durch inhalative Schadstoffe mit entzündlichen und asthmatoïden Reaktionen in Verbindung gebracht wird. Im Gegensatz zur gut charakterisierten Rolle von TRPA1 in Neuronen ist bisher noch relativ wenig über die Expression von TRPA1 in non-neuronalen Zellen bekannt. Auch eine Funktion von TRPA1 in Tumoren ist bisher weitgehend unerforscht.

In dieser Arbeit wurde eine Reihe von Zelllinien des Kleinzelligen Bronchialkarzinoms (engl.: "small cell lung cancer", SCLC) im Hinblick auf die Expression von TRP-Kanälen und im Speziellen von TRPA1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass TRPA1 in SCLC-Zelllinien exprimiert wird und seine Aktivierung zur Stimulierung von Tumor-relevanten Signalkaskaden führt. Die Aktivierung von TRPA1 durch AITC oder durch ein wässriges Extrakt aus Zigarettenrauch führte in diesen Zellen zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$). Diese Ca^{2+} -Erhöhung erwies sich als transmembranärer Ca^{2+} -Einstrom und konnte von TRPA1-Inhibitoren blockiert werden.

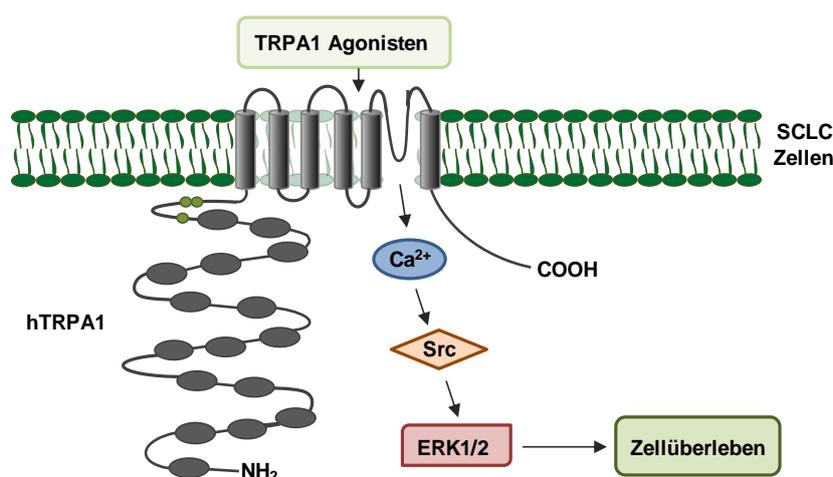


Abb. 1: Struktur des humanen TRPA1-Kanals (hTRPA1) und Übersicht über TRPA1-vermittelte Signalwege in SCLC-Zellen.

Darüber hinaus führte die TRPA1-abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zu einer Aktivierung der extrazellulär signalregulierten Kinase ERK1/2 über einen Src-abhängigen Mechanismus. Des Weiteren wirkte eine TRPA1-Aktivierung in SCLC-Zellen anti-apoptotisch und förderte das Überleben der Zellen in serumfreiem Medium (vgl. Abb. 1).

Umgekehrt hatte die siRNA-vermittelte Herunterregulierung von TRPA1 eine schwere Wachstumsreduzierung von SCLC-Zellen in semisolidem Medium zur Folge. Die potentielle tumorbiologische Relevanz dieser Befunde wird durch die Tatsache unterstrichen, dass in humanen Tumorproben von Patienten mit SCLC eine gegenüber non-SCLC-Proben und normalem Lungengewebe deutlich erhöhte TRPA1-Expression zu verzeichnen war. Interessanterweise fand sich eine funktionelle Expression von TRPA1 außerdem auch in zwei Pankreaskarzinom-Zelllinien sowie einer Lungenzelllinie mit Alveolarzell-Typ-II-Charakteristika.

Die Tatsache, dass eine Aktivierung von TRPA1 das Überleben von SCLC-Zellen förderte, weist auf potentielle Tumor-promovierende Wirkungen von TRPA1-Aktivatoren hin. Bekanntermaßen stimulieren zahlreiche Inhaltsstoffe des Tabakrauchs den TRPA1-Kanal und Nikotinabusus ist einer der Hauptfaktoren bei der Entstehung des SCLC. Insofern weist die vorliegende Untersuchung auf einen möglichen neuen Signalweg hin, der neben den etablierten genotoxischen Effekten von Tabakrauch für die Entstehung von Lungentumoren wichtig ist. Weiterhin sind die hier vorgestellten Befunde ein Anknüpfungspunkt für weitere Studien zur Rolle von TRPA1 im Pankreaskarzinom und in epithelialen Zellen in der Lunge.

2. Summary

The cation channel TRPA1 belongs to the family of transient receptor potential (TRP) channels. To date, the expression and function of this ion channel has mainly been studied in neuronal cells, especially in nociceptive neurons. In this context TRPA1 exhibits an alert function and acts as a sensory molecule detecting potential harmful irritants. Accordingly, TRPA1 is directly activated by a number of pungent or toxic substances, e. g., allyl isothiocyanate (AITC), formalin, cigarette smoke, tear gases, or ozone. In line with this function a neuronal expression of TRPA1 has been found in many interface regions of the human body as in the skin, in the gastro-intestinal tract, and in the lung. In the respiratory tract TRPA1 has been identified in sensory nerve endings of the airways. These pulmonary sensory neurons mediate inflammatory responses and accelerate asthma symptoms upon exposure towards TRPA1 activators. In contrast to the well-defined role of TRPA1 in neuronal cells, the function of this channel in a non-neuronal context is still widely unsettled. Moreover, little is known regarding a role of TRPA1 in tumor cells.

In the present investigation the expression of TRP channels, with special emphasis on TRPA1, has been studied in a panel of human small cell lung cancer (SCLC) cell lines. This analysis revealed that TRPA1 is functionally expressed in SCLC cells and activates tumor-relevant signaling cascades. Stimulation of TRPA1 by AITC or an aqueous cigarette smoke extract led to an increase of the intracellular calcium ion concentration ($[Ca^{2+}]_i$) via a transmembrane influx of Ca^{2+} . This elevation of Ca^{2+} was sensitive to TRPA1 inhibitors. In addition, a TRPA1-dependent increase in the $[Ca^{2+}]_i$ stimulated the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) cascade through a Src-dependent mechanism. Moreover, TRPA1 activation had anti-apoptotic effects and increased the survival of SCLC cells under serum-free conditions (Fig. 2). Vice versa, a siRNA-mediated knock-down of

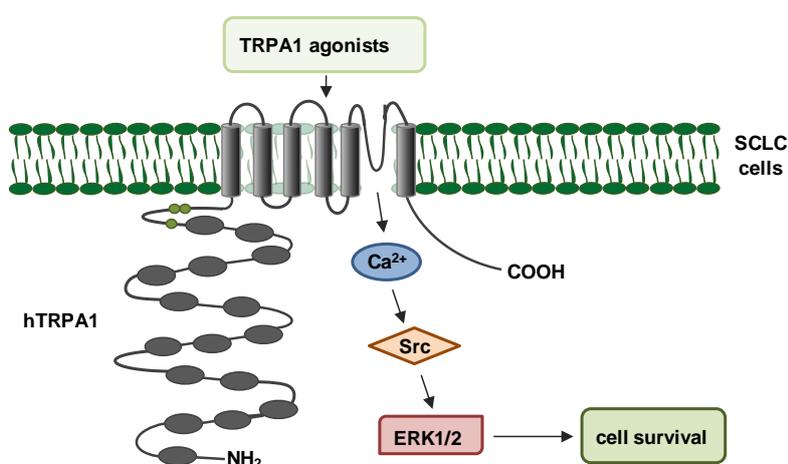


Fig. 2: Structure of the human TRPA1 channel (hTRPA1) and its signaling cascades in SCLC cells.

TRPA1 severely impaired the growth of SCLC cells in a semisolid medium. The potential relevance of these findings for the tumor biology of SCLC is underpinned by the fact that this channel was overexpressed in samples of patients harboring SCLC tumors as compared to non-SCLC specimens or normal lung tissue samples. Interestingly, a functional expression of TRPA1 was also found in two pancreas

carcinoma cell lines and an alveolar type II cell line.

The fact that a stimulation of TRPA1 increased the survival of SCLC cells suggests a potential tumor promoting effect of TRPA1 activators. It is well known that cigarette smoke contains numerous compounds acting as TRPA1 activators. Furthermore, nicotine abuse is a main causal factor in SCLC tumorigenesis. Thus, the present investigation defines a novel signaling pathway in SCLC cells which could be involved in the etiopathogenesis of this tumor entity. In addition, the results of this study should stimulate further investigations regarding the function of TRPA1 in pancreatic cancer cells and lung epithelial cells.

3. Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Expression und Aktivierbarkeit von Calciumionen (Ca^{2+})-leitenden Kanälen der "transient receptor potential" (TRP)-Familie, insbesondere von TRPA1, in Tumorzellen (Lungen- und Pankreaskarzinom) zu bestimmen sowie deren Bedeutung für den Tumorphänotyp näher zu charakterisieren. Des Weiteren sollte die Rolle von chemosensorischen TRP-Kanälen im Lungenepithel im Hinblick auf eine Funktion bei akuten toxischen Lungenschäden durch inhalierbare Schadstoffe untersucht werden.

Calciumionen sind zentrale Signalmoleküle für die Regulation der Integrität epithelialer Grenzschichten und üben eine kritische Rolle bei der Steuerung von Zellviabilität und -proliferation aus. Daher könnten sie in die Entstehung und das Voranschreiten von Tumorerkrankungen involviert sein und Zellschäden oder adaptive Antworten nach Einwirkung von Noxen vermitteln. Interessanterweise wird eine Reihe von TRP-Kanälen durch inhalative Schadstoffe wie Zigarettenrauch, Dieselpartikel, Ozon, Formalin oder Acrolein direkt oder indirekt aktiviert. Die Tatsache, dass zahlreiche dieser Schadstoffe potentielle oder nachgewiesene Karzinogene für das Bronchial- und Pankreaskarzinom sind und darüber hinaus relevante Induktoren für eine akute toxische Lungenschädigung repräsentieren, unterstützt die Ausgangshypothese dieser Arbeit, dass TRP-Kanäle funktionell in Lungen- und Pankreaskarzinomzellen exprimiert werden und dort eine relevante biologische Funktion ausüben. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, (1) das mechanistische Verständnis über die Entstehung von Tumoren bzw. toxischen Lungenschäden zu erweitern und (2) therapeutisch nutzbare Zielstrukturen zu identifizieren.

Im Folgenden sollen nun zunächst kurz die Fortschritte und Probleme bei der Therapie solider Tumore am Beispiel von Lungen- und Pankreaskarzinomen sowie die Rolle von zielgerichteten Therapien vorgestellt werden. Anschließend folgt eine Darstellung zur Biologie des Kleinzelligen Bronchialkarzinoms und zum Stellenwert von Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen in diesem Tumor. Abschließend wird ein Überblick über die TRP-Kanalfamilie mit besonderer Berücksichtigung von TRPA1 gegeben.

3.1 Fortschritte und Probleme bei der Therapie solider Tumore

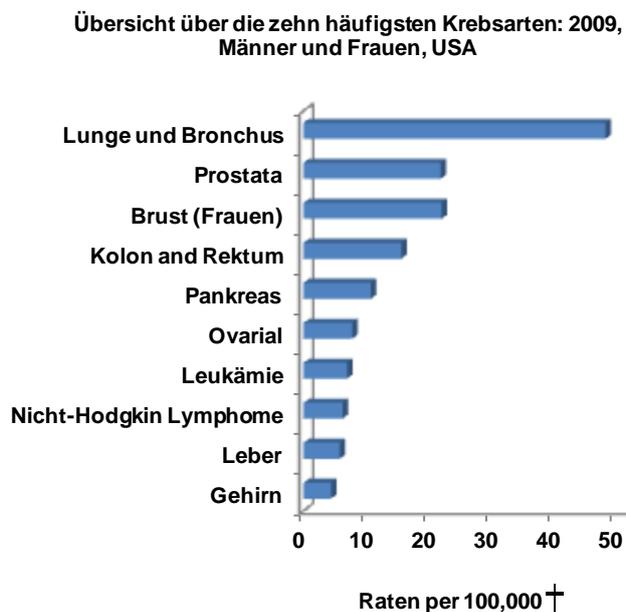


Abb. 3: Alters-adjustierte Todesfälle pro Tumorentität. Im Fall von Lungenkrebs zeigt dieses Diagramm, dass 50 von 100.000 Menschen an dieser Krankheit verstorben sind. Adaptiert aus U.S. Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics: 1999-2009 Incidence and Mortality, Web-based Report. www.cdc.gov/uscs.

Die Notwendigkeit besserer Tumorthérapien und -therapeutika wird nicht zuletzt durch die statistische Erhebung krebsbedingter Todesfälle veranschaulicht. Im Jahr 2008 wurden weltweit 12,7 Millionen neue Krebsfälle diagnostiziert und 7,6 Millionen krebsbedingte Todesfälle aufgeführt (Ferlay et al, 2010). Die am häufigsten diagnostizierten Krebsarten weltweit sind Lungenkrebs (1,61 Millionen, 12,7 %), gefolgt von Brustkrebs (1,38 Millionen, 10,9 %) und dem kolorektalen Karzinom (1,23 Millionen, 9,7 %). Eine Übersicht über die Alters-adjustierte Mortalitätsrate verschiedener

Tumorarten in den Vereinigten Staaten für das Jahr 2009 wird in Abb. 3 gezeigt. In dieser Erhebung waren Tumore der Lunge und des Bronchialsystems mit deutlichem Abstand für die meisten Tumor-bedingten Todesfälle verantwortlich (U.S. Cancer Statistics Working Group 2009).

Auch weltweit werden die meisten Krebstoten durch Lungenkrebs verursacht (1,38 Millionen, 18,2 %), danach folgen das Magenkarzinom (738.000, 9,7 %) und Malignome der Leber (696.000, 9,2 %) (Parkin et al, 2001; Parkin et al, 2005; Parkin et al, 2010).

Die ideale Krebstherapie bei soliden Tumoren versucht eine Maximierung aus Antitumorwirkung und Tumorspezifität, um so unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren. Theoretisch kann dies, abhängig von dem jeweiligen Tumor, auf zwei verschiedenen Wegen erreicht werden. Zum einen können unspezifisch wirkende Zytostatika über geeignete Trägermoleküle möglichst direkt zu den Tumorzellen gebracht werden ("specific delivery"), zum anderen können Tumor-spezifische Signalwege beeinflusst werden, z. B. durch Inhibition bestimmter Proteine, die in den entsprechenden Tumoren wichtige Funktionen ausüben (Minchinton & Tannock, 2006). Der letztgenannte Ansatz entspricht im engeren Sinne einer sogenannten zielgerichteten Therapie ("targeted therapy").

Zwei Probleme stellen sich bei der Entwicklung solcher zielgerichteten Therapien: (1) die große Heterogenität von Tumoren und (2) die sich hieraus ergebende Notwendigkeit eines vertieften

mechanistischen Verständnisses in die Biologie des entsprechenden Tumors. Die große Heterogenität solider Tumore ergibt sich daraus, dass diese – im Gegensatz zu den klassischen Tumorerkrankungen des blutbildenden Systems, wie der chronischen myeloischen Leukämie – in einem sehr komplexen, mehrstufigen Prozess entstehen und daher multiple genetische Veränderungen aufweisen. Hieraus ergibt sich, dass häufig ein Teil der Tumorzellen nicht auf die gewählte spezifische Therapie anspricht und es so unter der Therapie zur Selektion resistenter Tumorklone kommt. Dies erklärt die Fähigkeit solider Tumore, die medikamentöse Inhibition einzelner Signalkaskaden zu kompensieren (Ludwig, 2012). Die komplexen genetischen Veränderungen in Tumorzellen und deren funktionelle Bedeutungen machen es daher für eine sinnvolle Therapie notwendig, auf der Basis eines mechanistischen Verständnisses der Tumorbiologie informative Biomarker zu ermitteln, um eine zielgerichtete medikamentöse Behandlung zu ermöglichen. Hierbei ist letztlich das Ziel, eine individualisierte Therapie von Krebserkrankungen durchzuführen.

Dies konnte schon mit bemerkenswerten Erfolgen für eine Reihe von Tumoren gezeigt werden. Ein Beispiel ist die Anwendung von Imatinib in der Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren, welche bestimmte c-Kit Mutationen aufweisen (Califano et al, 2012). Ein anderes Beispiel ist die zielgerichtete Therapie mit Trastuzumab bei Brustkrebs, der für den humanen Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (HER)-2-positiv ist. Als weitere, in diverse therapeutische Protokolle eingeführte Inhibitoren von Signalwegen, die vom Epidermalen Wachstumsfaktor-abhängig sind, können Gefitinib und Erlotinib genannt werden, die etwa in der Behandlung des Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinoms (engl.: "non small cell lung cancer", N-SCLC) Verwendung finden.

Da das Pankreaskarzinom und Lungentumore, insbesondere das Kleinzellige Bronchialkarzinom, im besonderen Fokus dieser Arbeit lagen, sollen diese beiden Tumorentitäten im Folgenden näher beschrieben werden.

3.2 Das Pankreaskarzinom

Pankreaskarzinome sind die viert- bis fünfhäufigste Krebsart, die in der westlichen Welt zum Tod führt, mit zunehmender Inzidenz, für die allerdings noch keine Gründe identifiziert werden konnten (Schima et al, 2007). Dabei sind Inzidenz- und Mortalitätsraten nahezu deckungsgleich, was die äußerst schlechte Prognose bei diesem Tumor verdeutlicht (Heinemann, 2009). Hauptsächlich tritt das Pankreaskarzinom im höheren Alter auf; so liegt das mittlere Erkrankungsalter bei Männern bei 67 Jahren und bei Frauen bei 74 Jahren. Risikofaktoren für das Auftreten eines Pankreaskarzinoms sind unter anderem Rauchen, übermäßiger Alkoholgenuss, Übergewicht, genetische Dispositionen für chronische Pankreatitis und Umwelt- oder Arbeitsplatzexpositionen (z. B. chlorierte Kohlenwasserstoffe, Nickel, Chrom, Pestizide, Fungizide,

Herbizide sowie Kraftstoffdämpfe). Dabei scheinen genetische Risikofaktoren und Rauchen die Faktoren zu sein, die bei der Entstehung von Pankreaskarzinomen die größte Rolle spielen. Rauchen verdoppelt das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, und ungefähr 20 % der Pankreaskarzinome sind auf das Rauchen zurückzuführen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Raucher gegenüber Nichtrauchern überdurchschnittlich viele Mutationen in diesem Tumor aufweisen (Blackford et al, 2009; Schuller, 2002; Vincent et al, 2011).

Das Pankreaskarzinom kann in exokrine Pankreaskarzinome, die 90 % der Fälle ausmachen, und endokrine Pankreaskarzinome, die 10 % aller Pankreaskarzinome umfassen, unterschieden werden. Histologisch kann das Pankreaskarzinom noch weiter in verschiedene Untergruppen subklassifiziert werden. Für das exokrine Pankreaskarzinom sind hier hauptsächlich zu nennen: das Adenokarzinom, das muzinöse non-zystische Karzinom, das Siegelring-Zell-Karzinom, das adenosquamöse Karzinom, das Azinus-Zell Karzinom, die undifferenzierten Karzinome und das Pankreatikoblastom (Schima et al, 2007). Über 95 % der exokrinen Pankreaskarzinome sind Adenokarzinome. Sie entstehen durch maligne Entartung von Zellen in den sekretfördernden Ausführungsgängen des Pankreas und werden auch als duktales Pankreaskarzinom bezeichnet (Seufferlein & Adler, 2009).

Häufige Mutationen, die bei diesen Tumoren regelmäßig auftreten, sind unter anderem in den Onkogenen *kras* und *braf* sowie in den Tumorsuppressorgenen *cdkn2a*, *tp53*, *smad4* und *brca2* zu finden (Vincent et al, 2011). Ein wichtiger Signalweg in der Tumorentwicklung und -progression scheint der Ras-Signalweg zu sein, inklusive der an dieser Signalkaskade beteiligten Proteine z. B. Raf, Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase (MEK) und Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) (Vincent et al, 2011).

Da das Pankreaskarzinom aufgrund fehlender Warnsignale oder spezifischer und sensitiver Marker meist erst in einem Stadium diagnostiziert wird, in dem es nicht mehr operabel ist und eine frühzeitige lokale Metastasierung stattgefunden hat, ist die Prognose äußerst schlecht. Eine Heilung ist generell nur durch einen chirurgischen Eingriff möglich, und die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei unter 5 % (Seufferlein & Adler, 2009). Nach erfolgreicher und vollständiger Tumorresektion folgt meist eine adjuvante Chemotherapie des Pankreaskarzinoms mit Gemcitabin. Sollte das primäre chirurgische Vorgehen aufgrund eines metastasierten und inoperablen Pankreaskarzinoms nicht möglich sein, wird ohne einen vorgeschalteten operativen Eingriff bereits initial eine palliative Chemotherapie des Pankreaskarzinoms mit Gemcitabin angestrebt. Kombinationen mit zielgerichteten Therapien werden durchgeführt, zeigen allerdings nur eine geringe mittlere Lebensdauerverlängerung von 2 Wochen und dies nur bei bestimmten Patientengruppen. Dabei wird zusätzlich zu der Gabe von Gemcitabin noch der Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib als Inhibitor des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (engl.:

"epidermal growth factor receptor", EGFR) verabreicht (Seufferlein & Adler, 2009). Neue zielgerichtete Therapien, wie z. B. die Gabe des monoklonalen Antikörpers Cetuximab, ebenfalls gegen EGFR gerichtet, sind zur Zeit in klinischen und präklinischen Versuchen und recht erfolgversprechend (Shi et al, 2012). Das Pankreaskarzinom ist ein besonders geeignetes Forschungsgebiet, da es ein typisches Beispiel für einen Tumor mit ausgeprägter Chemoresistenz darstellt. Darüber hinaus liefert die derzeitige (klassische) Chemotherapie nur unbefriedigende Resultate, und bisher konnte noch keine zielgerichtete Therapie etabliert werden.

3.3 Das Bronchialkarzinom

Lungenkrebs kann in vier verschiedene Subtypen unterteilt werden: Adenokarzinome, die ungefähr 40 % aller Fälle ausmachen, Plattenepithel-Karzinome mit 30 % sowie Großzellige Karzinome und

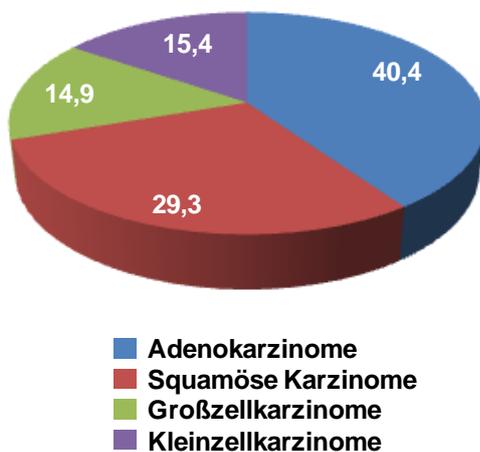


Abb. 4: *Lungenkrebs kann in vier verschiedene Subtypen unterteilt werden. Adenokarzinome machen ungefähr 40 % aller Lungenkrebsfälle aus. Bei 30 % aller Lungenkrebsfälle handelt es sich um Plattenepithelkarzinome und bei jeweils 15 % um Großzellkarzinome oder um SCLC Fälle. Adaptiert aus Wahbah et al. 2007.*

Kleinzellige Karzinome (SCLC) mit jeweils 15 % (siehe auch Abb. 4) (Wahbah et al, 2007). Aufgrund gewisser klinischer Gemeinsamkeiten werden Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und das Großzellige Karzinom unter dem Überbegriff Nicht-Kleinzellige Karzinome (N-SCLC) zusammengefasst und dem SCLC gegenübergestellt (Travis, 2002). Beim N-SCLC wurden in den letzten 10 Jahren deutliche Fortschritte in der Therapie gemacht, die beispielhaft für die Prinzipien einer sogenannten zielgerichteten Therapie stehen. Hierbei kamen z. B. EGFR-Inhibitoren sowie duale Kinaseinhibitoren zum Einsatz (Goldstraw et al, 2011), die in der Regel mit klassischen Chemotherapeutika und Bestrahlung kombiniert werden.

Beim SCLC wird nach wie vor die konventionelle Standardtherapie mit Etoposid und Cisplatin durchgeführt, die bereits seit den 80er Jahren in Gebrauch ist. Das SCLC ist zwar nur für einen relativ kleinen Anteil der Lungenkrebsfälle verantwortlich, doch die Prognose bei diesem Tumor ist besonders schlecht. Dieser Umstand ergibt sich vor allem aus der hohen Proliferationsrate des Tumors und seiner ausgeprägten Metastasierungsneigung. Letzteres führt dazu, dass bei Diagnosestellung in der Regel bereits Tumorabsiedelungen in entfernten Organen vorliegen. Dementsprechend liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei unter 5 % (Parkin et al, 2005; Parkin et al, 2010). Gerade für diese Tumorentität sind daher neue Therapieansätze dringend erforderlich, um in Zukunft einen besseren Behandlungserfolg zu ermöglichen. Im Folgenden wird die Behandlung des SCLC ausführlicher dargestellt.

3.4 Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC)

3.4.1 Bronchialkarzinome – Einteilung, klinischer Phänotyp und Therapie

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, ist das SCLC meist inoperabel, da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in der Regel bereits Fernmetastasen vorliegen. Bevorzugte Metastasierungsorte sind das Skelett, die Leber, das Knochenmark, das Gehirn und die Nebennieren. Da das SCLC also in der Regel eine systemische Erkrankung ist, spielen lokale Therapie-Optionen, wie chirurgische oder interventionelle Techniken (z. B. die chirurgische Entfernung einzelner Tumorknoten oder Tumorembolisationen) eine untergeordnete Rolle. Das SCLC wird daher überwiegend durch eine Kombinations-Chemotherapie behandelt (Laskin et al, 2003).

Initial zeigt das SCLC hierbei häufig ein bemerkenswert gutes Ansprechen, wie es für viele schnell wachsende Malignome typisch ist. Leider kommt es im Verlauf jedoch meist zur Ausbildung einer Chemoresistenz, so dass trotz fortgesetzter zytostatischer Therapie ein erneutes Voranschreiten der Erkrankung zu verzeichnen ist. Aus diesem Grund hat das SCLC im Allgemeinen eine schlechtere Prognose als andere bronchiale Malignome. Allerdings führen konservative Behandlungsmethoden mit einer Standard-Chemotherapie plus Thoraxbestrahlung und evtl. prophylaktischer Schädelbestrahlung (Jett et al, 2013) zu einer mittleren Überlebensrate von 2 Jahren, wenn bei Diagnose noch keine Metastasen vorliegen, was als sogenannte "limited disease" (LD) bezeichnet wird. Bei Vorliegen von Metastasen (engl.: "extensive disease", ED) liegt die mittlere Überlebenszeit bei nur 9-10 Monaten (Laskin et al, 2003). Dabei machen aber LD-Patienten bei Diagnose nur 30 % aller Patienten aus. Der Rest wird in das Stadium ED eingeordnet. Eine Kombinations-Chemotherapie wird sowohl bei LD als auch ED angewendet. Die Standard-Chemotherapie für Patienten mit guter körperlicher Leistungsfähigkeit ist eine Platin-basierte Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid zusammen mit mehrfacher Radiotherapie des Brustkorbs. In den letzten Jahren wurden neue chemotherapeutische Substanzen gesucht und getestet, wie zum Beispiel Irinotecan, Gemcitabin und Picoplatin, um die Überlebenschancen von SCLC-Patienten zu verbessern. Diese erwiesen sich zum Teil als ähnlich effektiv wie die Cisplatin- und Etoposid-Behandlung, allerdings mit anderen Toxizitätsprofilen. Aus diesem Grund können diese Therapeutika für bestimmte Patientengruppen geeignet sein, die entweder schlechte Prognosefaktoren aufweisen oder auf die primäre Chemotherapie nicht ansprechen. Neben diesen konventionellen und zytoreduktiven Chemotherapie-Ansätzen wurden in den letzten Jahren auch vermehrt Versuche unternommen, sogenannte "targeted agents" zu entwickeln, wobei eine verstärkte Kenntnis der aberranten molekularen Signalwege, die für die Karzinogenese beim SCLC verantwortlich sind, genutzt werden soll. Bisher wurde eine ganze Reihe von Agenzien, jedoch ohne größeren Erfolg, getestet. Dazu gehören Inhibitoren von Proliferations-kontrollierenden Signalwegen, wie z. B. c-Kit, Src, EGFR und m-TOR, sowie Inhibitoren der Angiogenese, wie z. B. dem

vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (engl.: "vascular endothelial growth factor", VEGF). Weiterhin befinden sich Apoptose-Promotoren, Immunkonjugate und sogenannte Tumor-Impfstoffe, die eine Immunantwort gegen den Tumor induzieren sollen, in der Testung. Diese Tests sind aber noch immer in einer frühen Phase, und der Stellenwert dieser Therapien bleibt abzuwarten. Daher besteht beim SCLC nach wie vor ein dringender Bedarf für die Suche nach geeigneten Zielmolekülen (Califano et al, 2012).

3.4.2 Ursprung, Modellsysteme und molekulare Charakteristika

Lungenkarzinome nehmen ihren Ausgangspunkt von malignen Veränderungen einzelner Zellen des bronchialen Epithels. Je nach betroffenem Zelltyp resultiert eine der oben erwähnten Varianten von Bronchialkarzinomen. Die Ursprungszellart, aus der sich SCLCs entwickeln, ist noch nicht eindeutig identifiziert, es scheint sich hierbei jedoch um Zellen des neuroendokrinen Systems zu handeln (Williams, 1997). Unter neuroendokrinen Zellen versteht man Zellen ektodermaler Herkunft, die in der Lage sind, Neurotransmitter sowie Hormone bzw. endokrin wirksame Stoffe zu synthetisieren und zu sezernieren.

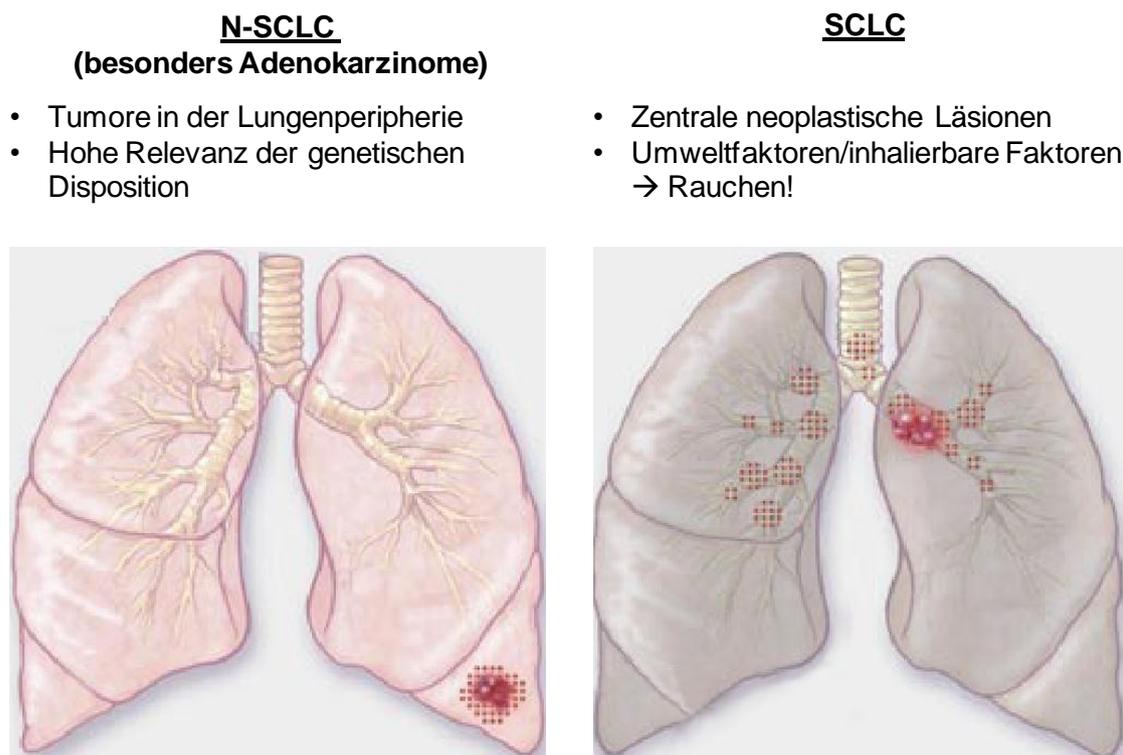


Abb. 5: *Der Ursprungsort des N-SCLC liegt in der Peripherie der Lunge, wobei in der Regel zunächst ein lokales Wachstum vorliegt (links). N-SCLC tritt sowohl bei Rauchern, als auch bei Nichtrauchern auf. Beim SCLC sind vor allem zentrale Teile des Bronchialsystems betroffen (rechts), und es kommt frühzeitig zum Auftreten von Metastasen in der Lunge aber auch in entfernten Organen. Die vom SCLC betroffenen Bereiche der Lunge liegen initial in der Nähe großer Bronchien, in denen eine intensive Exposition von toxischen, inhalativen Substanzen stattfindet. SCLC tritt hauptsächlich bei Rauchern auf. Aus diesen Befunden lässt sich ableiten, dass inhalative Schadstoffe, insbesondere Tabakrauch, eine ursächliche Rolle beim SCLC spielen. Adaptiert aus Herbst et al. 2008.*

Die Hauptursache für das SCLC ist das Rauchen. Hierbei spielen offenbar mutagene Substanzen im Tabakrauch, z. B. Nitrosamine, eine Rolle, welche für die initialen Mutationen verantwortlich sind, die zur Umwandlung der normalen Vorläuferzellen in Tumorzellen führen. Weiterhin sind offenbar auch – noch nicht endgültig charakterisierte – nicht-genotoxische Inhaltsstoffe des Tabakrauchs mit Promotor-Wirkung an der Progression der Erkrankung beteiligt. Diese Inhaltsstoffe sind nicht DNA-schädigend, bewirken aber auf der epigenetischen bis post-translationalen Ebene einen Wachstumsvorteil für Tumorzellen und sind so für das Anwachsen des Tumors in der Lunge notwendig (Hecht, 2003; Weisburger, 1990; Wogan et al, 2004).

Aufgrund der inhalativen Komponente beim Rauchen manifestiert sich das SCLC vor allem in Form von zentralen neoplastischen Läsionen (vgl. Abb. 5) (Herbst et al, 2008). Diese Bronchus-nahen Regionen der Lunge sind die Orte der höchsten Belastung durch inhalative Schadstoffe. Das N-SCLC dagegen tritt eher in der Lungenperipherie auf, und es liegen Befunde vor, die auf eine starke genetische Disposition für diesen Lungentumor sprechen.

3.4.2.1 Molekulare Marker

SCLC-Tumore exprimieren regelhaft bestimmte neuroendokrine Marker, wie z. B. das neuronale Zell-Adhäsions-Molekül (NCAM1) und neuronspezifische Enzyme, wie z. B. die L-DOPA Decarboxylase (DDC) und die Neuron-spezifische Enolase (NSE). Außerdem findet man weitere Marker neurosekretorischer Zellen, nämlich Proteine, die an der Vesikelfusion beteiligt sind, wie z. B. Synaptophysin und Neuropeptidhormone, wie z. B. Bombesin, Gastrin-freisetzendes Peptid (GRP), Galanin, Arginin-Vasopressin und Bradykinin sowie deren zugehörige Rezeptoren. Außerdem exprimieren sie auch verschiedene, spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (VGCCs) (Williams, 1997).

3.4.2.2 Genetische Veränderungen in SCLC-Zellen

In vielen Tumorzellen lassen sich genetische Veränderungen, d. h. DNA-Mutationen, nachweisen. Diese Mutationen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Voranschreiten einer Krebserkrankung. Beim SCLC sind die bekannten Tumor-Suppressor-Gene p53 und Rb (Retinoblastom-Gen) jeweils in ca. 90 % der Fälle inaktiviert (Wistuba et al, 2001). Die von den Tumor-Suppressor-Genen kodierten Proteine haben eine wichtige Funktion in der Zellzykluskontrolle und der Regulierung pro-apoptotischer Signalwege. Sie stehen einer Tumorentstehung bzw. -ausbreitung entgegen. Defekte in diesen Genen fördern aus diesem Grund die Tumorentstehung.

Bei dem vom p53-Gen kodierten Protein handelt es sich um ein nukleäres Phosphoprotein, das eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Regulationsprozessen spielt, die die Kontrolle des Zellzyklusprogramms, die Erkennung und Behebung von DNA-Schäden und die rechtzeitige

Einleitung zellulärer Apoptosemechanismen einschließen. Auch bei dem von Rb kodierten Protein handelt es sich um ein nukleäres Phosphoprotein, das einen wesentlichen Einfluss auf die Kontrolle des Zellzyklus hat und mehrere positive Induktoren in der Frühphase des Zellzyklus neutralisiert.

Meuwissen et al. entwickelten 2003 ein Mausmodell für neuroendokrine Lungentumore durch Gewebs-spezifische Inaktivierung von Rb1 und p53 in Lungenepithelzellen von Mäusen. Die hierbei entstehenden, hoch aggressiven Lungentumore waren in ihrer Morphologie und ihrem Immunphänotyp dem SCLC äußerst ähnlich (Meuwissen et al, 2003). Dieser Befund ist ein wichtiges Argument für die Bedeutung von p53 und Rb bei der Entstehung des SCLC.

3.4.2.3 Die SCLC-Zelllinien H69, H82, H146, H187, H209 und H510

Da SCLC-Tumore, wie bereits erwähnt, nur selten operativ behandelt werden und daher kaum frisches Tumorgewebe für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung steht, werden sich kontinuierlich teilende *In-vitro*-Kulturen als Modellsystem verwendet. Dafür wurden SCLC-Patienten Biopsate, die Tumorzellen enthielten, entnommen und diese in einem Wachstumsmedium kultiviert. Aus einigen Zellkulturen konnten so sich kontinuierlich teilende Zelllinien gewonnen werden, die zytologisch SCLC-Zellen ähneln, bei subcutaner oder intraperitonealer Implantation in immunsupprimierten Mäusen (Xenotransplantation) Tumore bilden und darüber hinaus auch als xenotransplantierte Tumor die histologische Morphologie des SCLC behalten (Carney et al, 1980; Carney et al, 1985). SCLC-Zelllinien zeigen außerdem die gleichen Tumor-relevanten Mutationen (sog. "Driver"-Mutationen) und epigenetischen Veränderungen wie SCLC-Tumorproben aus Patienten (Gazdar et al, 2010). Die Zelllinien H69, H146, H187, H209 sowie H510 gehören zu den klassischen SCLC-Zelllinien, die sich dadurch auszeichnen, dass sie erhöhte Level typischer Biomarker wie DDC, NSE, Cholezystokinin-BB (CK-BB), Bombesin oder Gastrin-freisetzendes Peptid (GRP) exprimieren. Die Zelllinie H82 gehört zum sogenannten varianten Typ, bei dem die neuroendokrinen Biomarker in geringerem Maße exprimiert sind.

3.5 Ca^{2+} als onkogenes Signalmolekül in SCLC

Im Hinblick auf die Wachstumskaskaden, die in die Progression von Lungentumoren involviert sind, gibt es sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zwischen SCLC und N-SCLC. Bei beiden Tumortypen spielt offenbar die Ras-Raf-MEK-ERK1/2-Kaskade eine wichtige Rolle für die Proliferation und eine erhöhte Resistenz der Tumorzellen gegenüber Apoptose. Beim N-SCLC wird eine konstitutive Aktivierung dieses Signalweges offenbar hauptsächlich durch diverse aktivierende Mutationen in Elementen der Kaskade (z. B. Wachstumsfaktor-Rezeptor- oder Ras-Mutationen) hervorgerufen (vgl. Abb. 6). Im Unterschied dazu sind beim SCLC solche Mutationen sehr selten (Gudermann & Roelle, 2006).

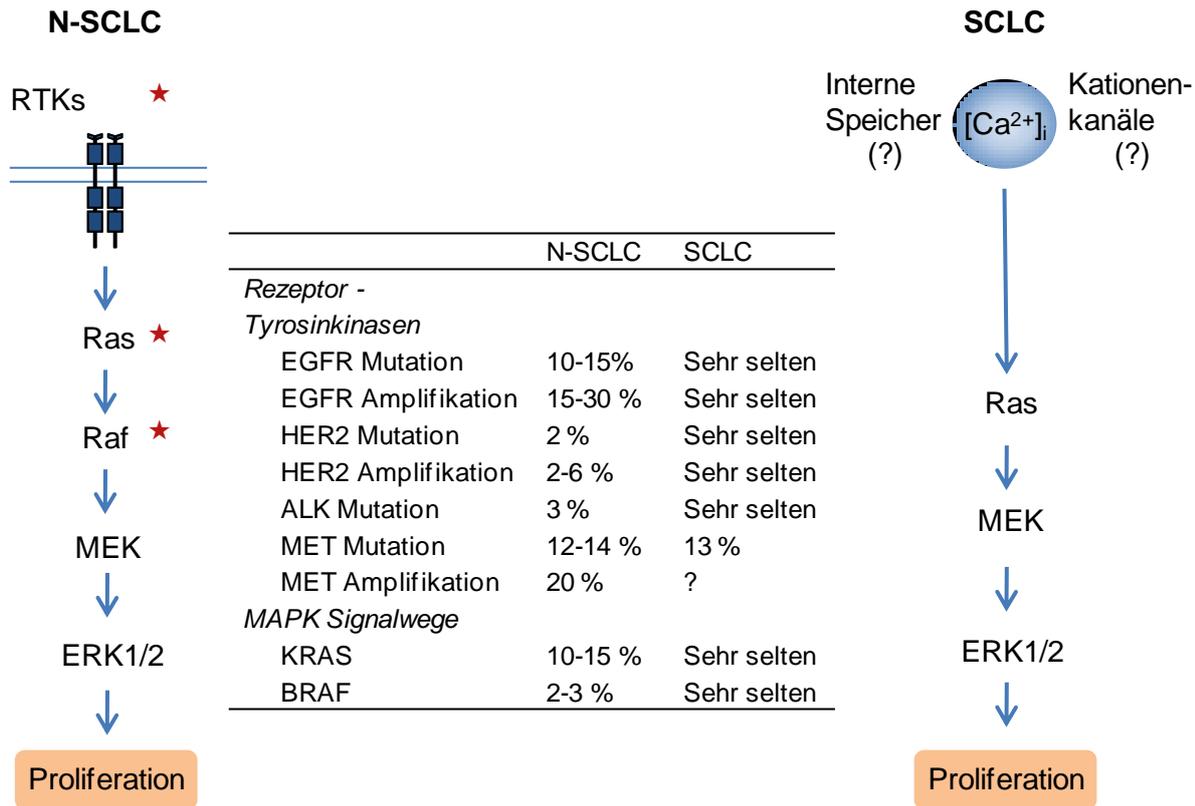


Abb. 6: Eine Besonderheit des SCLC stellt das Fehlen von genetischen Alterationen in Elementen des Ras-Raf-MEK-ERK1/2-Signalwegs dar. Viele andere Tumorentitäten verfügen über konstitutiv aktive Mutationen von Ras oder anderen Signalmolekülen dieser Kaskade (vgl. die Markierung mit Sternen). Die Daueraktivierung von Ras führt zu vermehrtem Zellwachstum und -überleben. Weder Ras noch Tyrosinkinase sind jedoch beim SCLC mutiert. Im Gegensatz dazu verfügt das SCLC über funktionell aktivierte, autokrine Wachstumsschleifen unter Involvement der ERK1/2-Kaskade, welche zu gesteigerter Zellproliferation führen. Dabei stellen Calciumionen ein wichtiges Signal dar. Sowohl durch das Leeren interner Speicher, als auch über einen Calciumionen-Einstrom über die Plasmamembran kann in diesem Kontext die intrazelluläre Calciumionenkonzentration erhöht werden. Adaptiert aus Gudermann & Roelle 2006.

Offenbar sind bei diesem Tumortyp autokrine und parakrine Stimuli (z. B. Neuropeptide oder Acetylcholin) dafür verantwortlich, dass der Ras-Raf-MEK-ERK1/2-Signalweg funktionell daueraktiviert wird. Hierbei ist eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) ein integrierendes Signal diverser auto- und parakriner Faktoren (vgl. Abb. 6). So wurde beim SCLC gezeigt, dass eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ notwendig und ausreichend ist, um die Ras-ERK1/2-Kaskade zu aktivieren und eine gesteigerte Proliferationsrate zu induzieren (Wittau et al, 2000). Calciumionen binden direkt an die Tyrosinkinase Pyk2 und führen zu deren Stimulierung. Pyk2 aktiviert daraufhin zusammen mit Src das monomere G-Protein Ras (Roelle et al, 2008). Dieses stellt einen Adapter für das nächste Protein Raf, das auch als MAPK-Kinase-Kinase bezeichnet wird, dar. Anschließend findet eine Translokation von Raf zur Zellmembran statt, wo dieses Protein aktiviert wird und selbst wiederum die MAPK-Kinase MEK1/2 phosphoryliert. MEK1/2 aktiviert nach Phosphorylierung die p44/p42 MAPK (auch ERK1/2 genannt) (Katz et al, 2007). Bei ERK1/2 handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase mit mehr als 50 identifizierten Substraten, darunter auch Proteine, die den Stoffwechsel, Proliferation, Zytoskelettproteine und

Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Hilger et al, 2002). Als eine gemeinsame Endstrecke diverser proliferativer Stimuli bietet der Ca^{2+} -Signalübertragungsweg eine gute Möglichkeit zu einer therapeutischen Intervention.

Die Ca^{2+} -Erhöhung in SCLC-Zellen könnte sowohl durch Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), als auch durch einen transmembranären Einstrom zustande kommen. Ein transmembranärer Einstrom kann wiederum durch in SCLC-Zellen exprimierte Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (VGCCs) vermittelt werden. Ein Argument für eine wichtige Rolle von VGCCs bei der Proliferation von SCLC-Zellen ist die Tatsache, dass diese Tumoren eine langsamere Wachstumskinetik bei solchen Patienten zeigen, die neben der eigentlichen SCLC-Erkrankung zusätzlich ein sogenanntes Lambert-Eaton-Syndrom entwickeln. Bei diesem Syndrom, das sich in einer Schwäche der Skelettmuskulatur äußert, werden Autoantikörper gebildet, die an präsynaptische VGCCs binden können und diese inhibieren. Es gilt als ein paraneoplastisches (=Begleit-)Syndrom für SCLC, weil es gehäuft bei SCLC-Patienten auftritt (Wang et al, 2006).

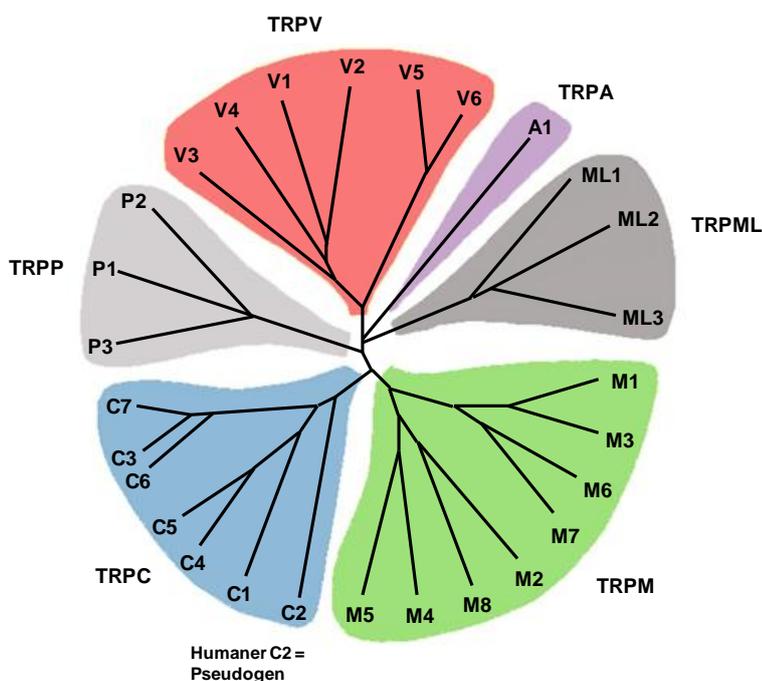
Zur Zeit ist noch unklar, wie VGCCs in SCLC-Zellen aktiviert werden können, da ein SCLC-Tumor kein klassisches, erregbares Gewebe darstellt und aus diesem Grund der übliche Aktivierungsweg eines VGCCs über ein nervales Aktionspotential nicht realisiert werden kann. Allerdings wäre eine Aktivierung durch Rezeptor-operierte Kanäle (ROCs) denkbar. Im Gegensatz zu der Situation in Neuronen würden die VGCCs in SCLC-Zellen demzufolge durch eine Depolarisierung von Kationengestragenen Strömen über ROCs aktiviert (Gudermann et al, 2004). Die molekulare Identität dieser ROCs ist derzeit jedoch noch nicht geklärt. Aufgrund der Bedeutung Neuropeptid-vermittelter, $G_{q/11}$ -abhängiger Signale sind ROCs, die durch eine $\text{PLC}\beta$ -Aktivierung reguliert werden, mögliche Kandidaten. Hierzu zählen eine Reihe von Kationenkanälen aus der Familie der TRP-Kanäle (Clapham, 2003; Montell, 2005).

3.6 TRP-Kanäle

Bereits in den 1960er Jahren wurde eine blinde Drosophila-Mutante beschrieben, bei der sich in der Netzhaut nur eine sehr kurzzeitige (transiente) Reizantwort nach Lichtexposition zeigte, weshalb diese Mutation die Bezeichnung *trp* (engl.: "transient receptor potential") erhielt (Cosens & Manning, 1969). Das *trp*-Gen wurde 1989 kloniert und codiert für einen Rhodopsin-aktivierten Ca^{2+} -Kanal in Drosophila (Montell & Rubin, 1989). Homologe Gensequenzen wurden in fast allen Spezies inklusive den Säugetieren gefunden, die insgesamt 28 TRP-Kanäle exprimieren (Venkatachalam & Montell, 2007).

3.6.1 Einteilung der TRP-Kanäle

Bei den TRP-Kanälen der Säugetiere handelt es sich um eine Superfamilie von Kationenkanälen, die über sechs transmembranale Segmente und eine große Sequenzhomologie verfügen. In einigen wichtigen Punkten unterscheiden sich diese Ionenkanäle jedoch von einander: Zum einen zeigen die TRP-Kanäle eine große Vielfalt in ihrer Kationenselektivität und zum anderen auch ganz unterschiedliche, spezifische Aktivierungsmechanismen. Dabei ist auffällig, dass viele Vertreter der TRP-Kanalfamilie durch eine ganze Reihe verschiedener Mechanismen aktiviert werden können. Dies führt dazu, dass diese TRP-Kanäle als multiple Signal-Integratoren bezeichnet werden, da verschiedene eingehende Signale in einer Kanalantwort zusammengefasst werden, wobei sich die diversen "Inputs" gegenseitig modifizieren können. Eine weitere Gemeinsamkeit vieler Vertreter der TRP-Kanäle scheint ihre wichtige Rolle für die Detektion aller klassischen sensorischen Stimuli, wie z. B. Licht, Geräuschen, Chemikalien, Temperatur, Änderungen der Osmolarität und Berührung zu sein (Bandell et al, 2007; Clapham, 2003; Ramsey et al, 2006).



Die TRP-Superfamilie kann in sechs Familien aufgeteilt werden, die wiederum zwei Gruppen zugeordnet werden (Montell, 2005). Gruppe 1 besteht aus fünf TRP-Familien: TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin) und TRPA (Ankyrin). Gruppe 2 dagegen besteht aus nur zwei Familien, TRPP (Polycystin) und TRPML (Mucolipin). Die einzelnen Mitglieder der TRP-Superfamilie beim Menschen sind in Abb. 7 dargestellt.

Abb. 7: *TRP-Stammbaum* adaptiert aus Clapham et al. 2003 und Bandell et al. 2007. Dargestellt ist die phylogenetische Verwandtschaft der TRP-Proteine.

Die Unterscheidung dieser beiden Gruppen basiert auf Sequenz- und Topologieunterschieden. Die fünf TRP-Familien der Gruppe 1 TRPs zeichnen sich durch die höchste Sequenzhomologie zu dem namensgebenden Mitglied, dem *Drosophila*-TRP, aus (Montell & Rubin, 1989). Dabei zeigen die TRPC-Kanäle die stärkste Verwandtschaft zu *Drosophila*-TRP und werden aus diesem Grund auch oft als die "klassischen" (C für Classical oder Canonical) TRP-Kanäle bezeichnet. Die vier weiteren Gruppe 1 TRPs wurden jeweils nach dem Originalnamen des zuerst klonierten Mitgliedes der

jeweiligen TRP-Familie benannt (Pedersen et al, 2005). Insgesamt besteht die Gruppe 1 der TRP-Superfamilie abhängig vom Organismus aus elf bis 22 Mitgliedern.

3.6.2 Struktur und Funktion

In der Gruppe 1 der TRPs befinden sich mehrere auffällige Sequenzelemente und Domänen. Dabei umfasst die größte Sequenzhomologieregion die sechs transmembranären Segmente, die die zwischen dem fünften und sechsten Transmembran-Segment befindliche Porenschleife beinhalten (Clapham, 2003). Alle TRPs der Gruppe 1 verfügen über multiple N-terminale Ankyrin-Domänen. Eine Ausnahme stellen dabei die TRPM-Kanäle dar. Die Mitglieder der Gruppe 2 der TRPs sind entfernt verwandt mit der Gruppe 1 der TRPs. Sie zeigen eine starke Sequenzhomologie in den transmembranären Segmenten und beinhalten eine große Schleife, die die ersten beiden transmembranären Domänen trennt (Ramsey et al, 2006; Venkatachalam & Montell, 2007).

Es ist nicht möglich, aufgrund der Zugehörigkeit eines TRPs zu einer bestimmten Familie auch auf die Mechanismen zu schließen, durch die dieser Kanal aktiviert wird. Regulierte Exozytose stimuliert zum Beispiel den Kationenfluss über mehrere TRPC-, TRPV- und TRPM-Kanäle (Cerny & Huber, 2011; Morenilla-Palao et al, 2004). Dennoch wurden auch Ähnlichkeiten zwischen Familienmitgliedern festgestellt. So werden die meisten, wenn nicht alle, TRPC-Kanäle über Signalwege beeinflusst, die eine Stimulierung der Phospholipase C (PLC) beinhalten. Allgemein kann aber festgehalten werden, dass die meisten Kanäle über mehr als einen Mechanismus aktiviert werden können (Venkatachalam & Montell, 2007). Insbesondere Diacylglycerol (DAG) scheint verschiedene Ionenkanäle der TRPC-Familie aktivieren zu können, darunter z. B. TRPC3, TRPC6 und TRP7 (Dietrich et al, 2005). Das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), als Substrat der PLC, kann an einige TRP-Kanäle binden und so deren Aktivität regulieren (Qin, 2007; Rohacs, 2007; Voets & Nilius, 2007). Auch über eine Aktivierung der PKC (Proteinkinase C) kann eine Regulierung einiger TRP-Kanäle stattfinden (Agam et al, 2004; Venkatachalam et al, 2003).

Zu den thermisch aktivierten TRPs zählen Mitglieder der TRPV-, TRPM- und in einigen Spezies auch der TRPA-Unterfamilien. Für TRPA1 in Säugetieren wird die Rolle der Thermosensation allerdings kontrovers diskutiert (Latorre et al, 2007; Reid, 2005). Die Naturstoffe Capsaicin und Menthol aktivieren die Hitze-sensitiven TRPV1-, beziehungsweise die Kälte-sensitiven TRPM8-Kanäle (Caterina et al, 1997; Helliwell et al, 1998; McKemy et al, 2002). Jeder Thermo-TRP wird durch einen spezifischen Temperaturbereich aktiviert, und eine Temperaturbandbreite von schädlicher Hitze ($\geq 52^{\circ}\text{C}$) bis zu schädlicher Kälte ($\leq 10^{\circ}\text{C}$) wird so abgedeckt. Daher scheint die Aktivierung der Thermo-TRPs der Hauptmechanismus für die periphere Wärmeempfindung zu sein (Jordt et al, 2003; Tominaga, 2007). Darüber hinaus reagieren die Kanäle auch auf eine Reihe von chemischen

und physikalischen Stimuli, wodurch es ihnen ermöglicht wird, als polymodale Sensoren zu arbeiten (Nilius, 2007; Ramsey et al, 2006).

3.6.3 Die wichtigsten Vertreter der TRPC-, TRPV- und TRPM-Familien

Menschen exprimieren lediglich sechs der sieben beschriebenen **TRPC**-Gene, da das humane TRPC2 ein Pseudogen darstellt. Rund 30 % Aminosäureidentität finden sich in den sieben Säugetierhomologen in den N-terminalen 750-900 Aminosäuren wieder. Aufgrund der Aminosäureähnlichkeit kann die TRPC-Familie nochmals in vier Untergruppen aufgeteilt werden: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5. Das Expressionsverhalten der TRPC-Kanäle variiert im Menschen stark: Während TRPC1 ubiquitär exprimiert wird, werden andere TRPCs vor allem im Zentralnervensystem (ZNS) gefunden. Bei den Aktivierungsmechanismen haben alle TRPCs gemein, dass sie PLC für die Aktivierung benötigen. Davon abgesehen existiert eine hohe Variabilität in ihrer Kationenselektivität und den spezifischen Aktivierungsmechanismen. TRPC3 und TRPC6 sind darüber hinaus wichtige Regulatoren des Tonus der glatten Muskulatur (Dietrich et al, 2007).

Die **TRPV**-Kanäle zeigen ungefähr 25 % Homologie mit den TRPC-Kanälen in einer Region, die die Transmembrandomänen 5 und 6 überspannt. Der erste Säugetier-TRPV wurde bei der Suche nach Kanälen identifiziert, die durch Capsaicin aktiviert werden, einem inflammatorischen Vanilloid, das für die Chili-vermittelte, "heiße" Schärfe von Speisen verantwortlich ist (Caterina et al, 1997). TRPV1 wird dementsprechend auch durch Hitze ($\geq 43^{\circ}\text{C}$) und pro-inflammatorische Substanzen, wie z. B. Endocannabinoide, Anandamid, Campher etc., aktiviert. Verstärkt wird der TRPV1-vermittelte Kationeninflux durch einen niedrigen pH-Wert, wie er ebenfalls in entzündeten Geweben vorkommt. Als weitere Modulatoren der TRPV1-Antwort werden Ethanol (verantwortlich für das wärmende Gefühl, das durch hochprozentige Schnäpse vermittelt wird), Nikotin sowie eine Reihe von pro-inflammatorischen Cytokinen diskutiert (Cortright & Szallasi, 2004; Geppetti & Trevisani, 2004; Ma & Quirion, 2007). Daher wird TRPV1 auch häufig als ein multipler Signal-Integrator bezeichnet. Die TRPV-Kanäle TRPV2, TRPV3 und TRPV4 sind ebenfalls als hitzeaktivierbar beschrieben worden (Benham et al, 2003; Tominaga & Caterina, 2004; Wetsel, 2011). Eine Expression von TRPV1 und TRPV2 ist vor allem in DGR-Neuronen zu finden (Eid & Cortright, 2009; Immke & Gavva, 2006; Nagy et al, 2004; Vennekens et al, 2008). TRPV3 und TRPV4 finden sich in einer Reihe von epithelialen Zellen, so auch in den luftleitenden Atemwegen (Liedtke & Simon, 2004; Plant & Strotmann, 2007; Yang et al, 2006). Die anderen Vertreter dieser Kanalfamilie, TRPV5 und TRPV6, sind dagegen nicht hitzeaktivierbar und selektiv für Calciumionen. Für TRPV6 wird vor allem eine Rolle bei der Regulation des Ca^{2+} - und Knochenstoffwechsels vermutet. Vor allem ist dieser Kanal wohl für die intestinale Aufnahme von Ca^{2+} essentiell (Lieben & Carmeliet, 2012) und wird außerdem auch in Osteoblasten exprimiert (Little et al, 2011; van der Eerden et al, 2012). Die Rolle von TRPV6 in Osteoblasten ist jedoch noch nicht endgültig definiert

(van der Eerden et al, 2012). Schließlich wurde eine hohe Expression dieses Kanals auch im Prostatakarzinom beschrieben, wohingegen normale Prostatazellen TRPV6 nicht oder nur gering exprimieren (Van Haute et al, 2010; Wissenbach & Niemeyer, 2007). Inwieweit TRPV6 eine tumorbiologisch relevante Rolle im Prostatakarzinom spielt ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch wird darüber spekuliert, dass dieser Kanal Ca^{2+} -abhängige Proliferations-fördernde Signalwege in Prostatakarzinomzellen reguliert und so für das Wachstum der Tumorzellen wichtig ist (Lehen'kyi et al, 2007; Vanden Abeele et al, 2003; Wissenbach et al, 2004).

Die **TRPM**-Kanäle teilen ungefähr 20 % Aminosäureidentität mit den TRPC-Kanälen in den transmembranären Domänen und haben eine konservierte C-terminale Domäne. Die Größen und Sequenzen dieser Proteine variieren jedoch recht stark. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit können TRPM-Kanäle nochmals in Subgruppen aufgeteilt werden, nämlich TRPM1/3, TRPM4/5 und TRPM6/7. Auch TRPM2 und TRPM8 zeigen untereinander eine gewisse Homologie. TRPM1 war der erste Säugetier-TRPM, der identifiziert wurde (Duncan et al, 1998; Fleig & Penner, 2004). Sein Expressionslevel korreliert invers mit dem metastatischen Potential in einigen Melanomzelllinien, woraus sich seine ursprüngliche Bezeichnung als Melastatin herleitet (Duncan et al, 1998), die auch namensgebend für die TRPM-Familie war. TRPM2 sowie TRPM6 und TRPM7 werden auch als Kanalenzyme (engl.: "chanzymes") bezeichnet, da sie in ihrem C-Terminus Enzymdomänen besitzen und z. B. als Kinasen (TRPM6 und TRPM7) oder ADP-Hydrolasen (TRPM2) fungieren können (Montell, 2003; Perraud et al, 2003). TRPM7 ist ein divalentspezifischer Kationenkanal, der auch für Magnesiumionen (Mg^{2+}) permeabel ist und eine entscheidende Rolle bei der Mg^{2+} -Homöostase spielt (Paravicini et al, 2012; Schlingmann et al, 2007). Aufgrund seiner Permeabilität für Schwermetallionen wie z. B. Cadmiumionen (Cd^{2+}) ist TRPM7 auch an der intrazellulären Aufnahme und nachfolgenden Toxizität dieser Ionen mitbeteiligt (Levesque et al, 2008; Martineau et al, 2010). TRPM4 und TRPM5 sind spannungsgesteuerte Ca^{2+} -aktivierte, monovalente Kationenselektive Kanäle (VCAMs) aufgrund eines kurzen sauren Motivs von sechs Aminosäuren in ihren Porenschleifen (Guinamard et al, 2011). Für TRPM4 ist eine Expression in einer Vielzahl von Zellen beschrieben worden und es werden dementsprechend viele unterschiedliche Funktionen mit diesem Kanal assoziiert, z. B. eine Rolle bei der kardialen Reizleitung, bei der Kontrolle des Tonus von glatten Muskelzellen und bei der Sekretion von Insulin (Abriel et al, 2012; Guinamard et al, 2010; Islam, 2011). TRPM5 ist hauptsächlich in die Signaltransduktion von Geschmacksrezeptoren involviert (Amrein & Bray, 2003; Liman, 2007; Talavera et al, 2005).

3.6.4 TRPA1

TRPA1 ist beim Menschen der einzige bisher klonierte Kationenkanal der TRPA-Familie.

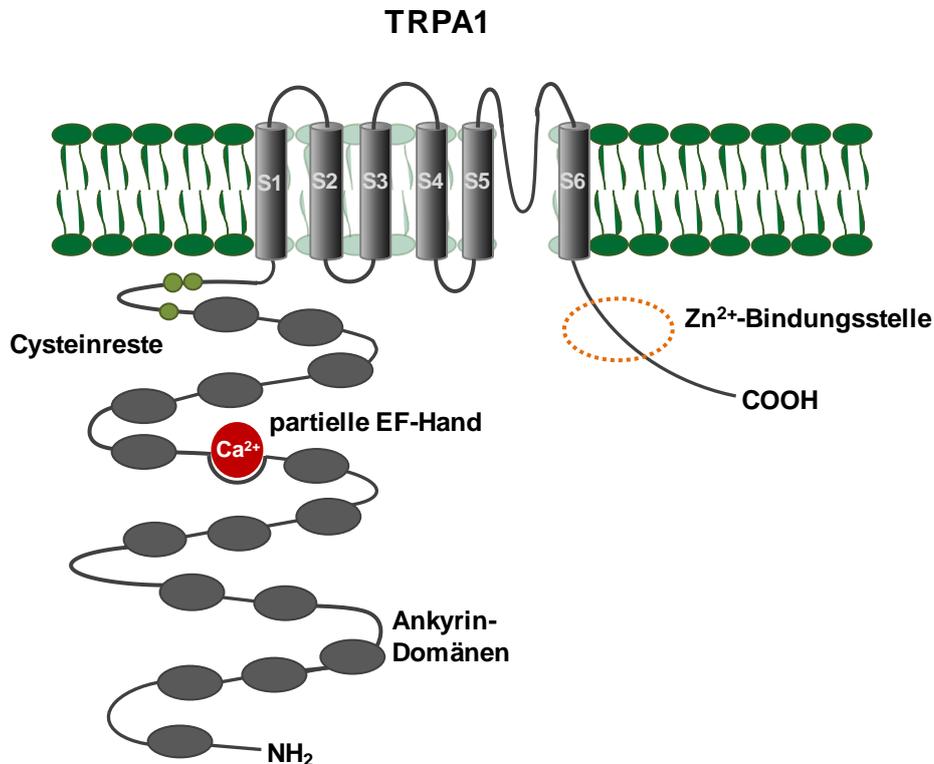


Abb. 8: **Struktur des TRPA1-Kanals** mit schematischer Darstellung der Transmembrandomänen und der intra- und extrazellulären Schleifen sowie der Lokalisation der für die Kanalaktivierung kritischen Cysteinreste (grün) und der wichtigsten Bindungsstellen. Die namensgebenden Ankyrin-Domänen (dunkelgrau) befinden sich im Bereich des N-Terminus. Dort ist auch eine Calciumionen-bindende EF-Hand-Domäne zu finden, die für die Aktivierung des Kanals durch Calciumionen verantwortlich sein soll. Im C-Terminus befindet sich eine Bindungsstelle für Zinkionen (Zn²⁺), die die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöhen sollen.

Der menschliche TRPA1-Kanal unterscheidet sich von den anderen TRP-Proteinen durch die große Anzahl von ca. 16 Ankyrin-Domänen in seinem N-Terminus, was namensgebend für diesen Kanal war. Darüber hinaus verfügt er über eine Bindungsstelle für Zinkionen (Zn²⁺) am C-Terminus (siehe 3.6.4.5) und über eine Calciumionenbindungsstelle am N-Terminus. Bisher wurden drei Cysteinreste innerhalb des N-Terminus identifiziert, die für die Aktivierung des TRPA1 mittels einer kovalenten Modifikation verantwortlich sein sollen (siehe folgendes Kapitel). Eine schematische Darstellung der strukturellen Elemente dieses Kanals wird in Abb. 8 gezeigt. Auf die speziellen Aktivierungsmechanismen durch kovalente Modifikation und nicht-kovalent bindende Stimuli soll in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden.

3.6.4.1 TRPA1-Aktivatoren und Aktivierungsmechanismus

Der TRPA1-Kanal zeichnet sich dadurch aus, dass er durch eine Vielzahl strukturell nicht verwandter Substanzklassen aktiviert werden kann. Unter anderem kann dieser Kanal durch eine Reihe von elektrophilen Substanzen durch kovalente Bindung geöffnet werden. Darüber hinaus kann eine Aktivierung aber auch durch Agenzien erfolgen, die reversibel an eine spezifische Bindungstasche binden (sog. "Schlüssel-Schloss-Prinzip"), wie das für andere Liganden-gesteuerte TRP-Kanäle beschrieben wurde (siehe 3.6.4.5). Im Folgenden werden diese beiden Mechanismen näher beschrieben und die wichtigsten Substanzklassen vorgestellt, die als TRPA1-Aktivatoren identifiziert wurden.

Ein für Ionenkanäle ungewöhnlicher Aktivierungsmechanismus von TRPA1 erfolgt über eine kovalente Modifikation von spezifischen Cystein-Seitenketten, die sich in der zytoplasmatischen, N-terminalen Domäne des Kanals befinden. Exogene Verbindungen, die über diesen Mechanismus den Kanal aktivieren, müssen zunächst die Zellmembran permeieren und anschließend die entsprechenden Cysteinreste modifizieren. Prinzipiell können hierbei chemisch sehr unterschiedliche Modifikationen zu einer Stimulierung von TRPA1 führen, so dass Agonisten des Kanals einer relativ großen Anzahl unterschiedlicher Verbindungsklassen zuzuordnen sind. Typische Reaktionsprodukte der Reaktion zwischen Aktivatoren und TRPA1-Cysteinresten sind sogenannte Michael-Addukte, z. B. bei Aktivierung durch α,β -ungesättigte Aldehyde wie Zimtaldehyd. Daneben führt die Reaktion von Cysteinen mit Isothiocyanaten (z. B. AITC) zur Ausbildung von Dithiocarbamaten. Eine Übersicht über einige typische Aktivatoren und über mögliche Reaktionen ist in Abb. 9 und Abb. 10 enthalten; der genaue Mechanismus der klassischen Michael-Addition ist in Abb. 10 dargestellt (Bandell et al, 2007; Cebi & Koert, 2007; Hinman et al, 2006; Macpherson et al, 2007a). Hinman et al. kamen zu dem Schluss, dass die unterschiedliche Reaktivität strukturell unterschiedlicher Stimuli ein kritischer Faktor für die Potenz von TRPA1-Agonisten ist (Hinman et al, 2006). Daneben ist die Größe und Struktur der Seitenkette reaktiver Verbindungen entscheidend für den Effekt auf die Konformation des Kanals, so dass dieser Faktor, neben der grundsätzlichen Frage der Membranpermeabilität, auch die Wirkung (engl.: "efficacy") diktiert. Einige Oxim-Verbindungen, die vermutlich zur Gruppe der kovalent-modifizierenden Substanzen gehören, sind entsprechend der Struktur ihrer Seitenkette sogar als Inhibitoren wirksam (Defalco et al, 2010). Zurzeit wird versucht, die Frage zu klären, ob elektrophile Verbindungen, die über eine unterschiedliche Reaktivität verfügen, auch als reversible Ionenkanalagonisten fungieren können, indem entsprechende kovalente Modifikationen auch wieder abgespalten werden können.

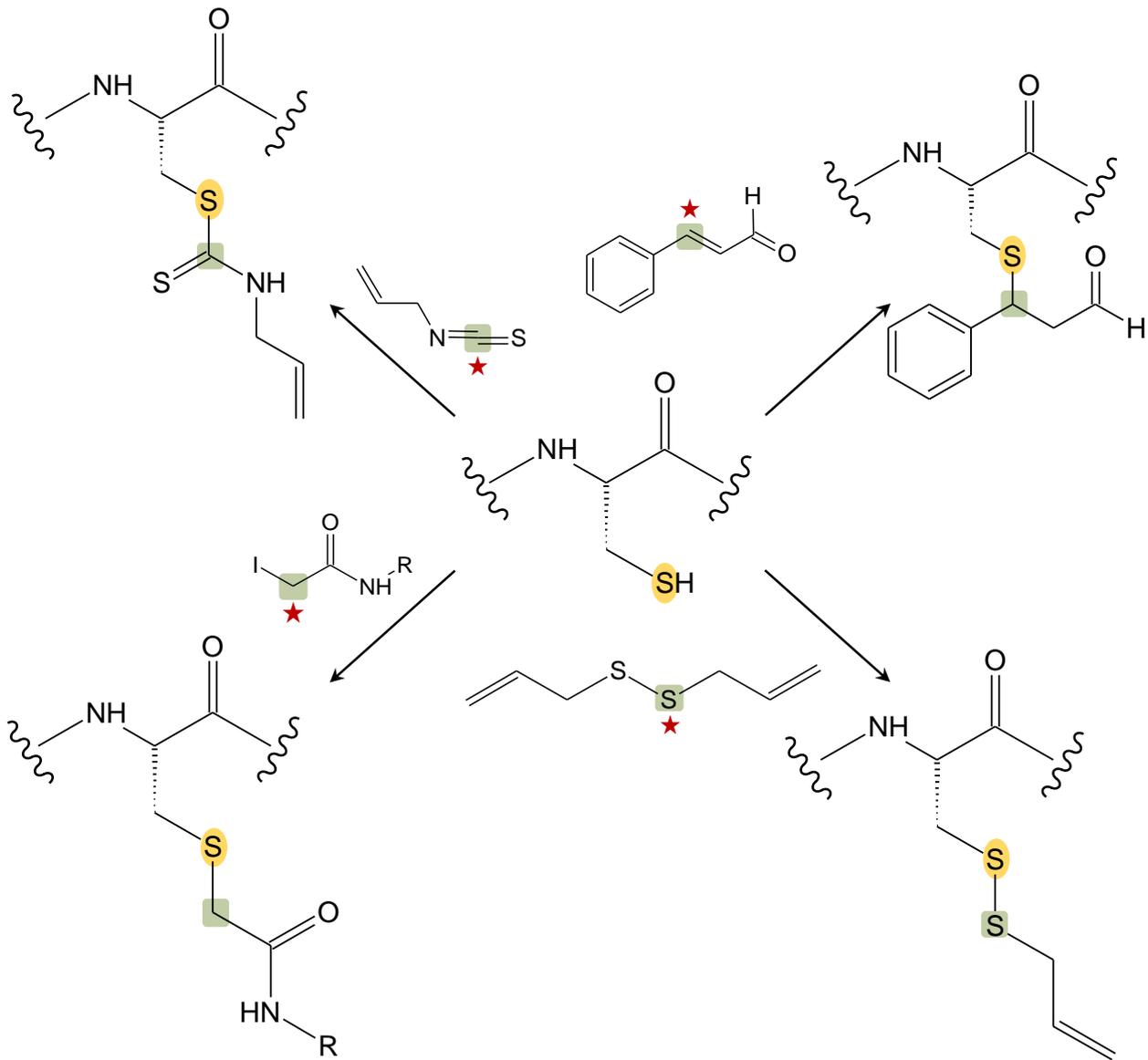


Abb. 9: Vier wichtige Mechanismen zur kovalenten Modifikation regulatorischer SH-Gruppen des TRPA1 durch reaktive elektrophile Substanzen. Adaptiert aus Cebi & Koert 2007 Das reaktive Zentrum der elektrophilen Substanz ist mit einem roten Stern gekennzeichnet. Zur Verdeutlichung der Reaktion sind reaktives Zentrum und korrespondierendes Atom im Reaktionsprodukt grün markiert; das nucleophile Schwefelatom des Cysteins ist gelb markiert.

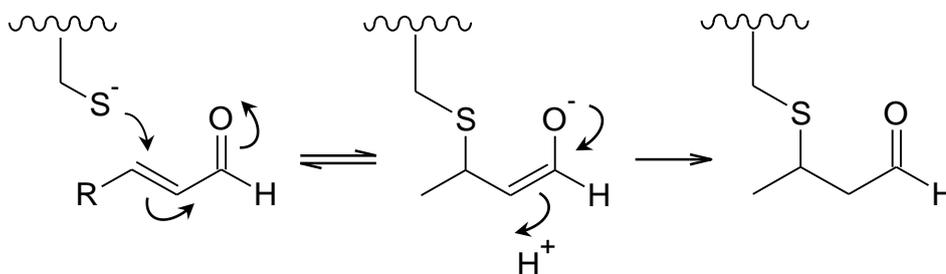


Abb. 10: Aktivierung des TRPA1-Kanals durch kovalente Modifikationen. Adaptiert aus Bandell et al. 2007. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

3.6.4.2 Isothiocyanate – eine heterogene Gruppe von TRPA1-Aktivatoren

Viele Pflanzeninhaltsstoffe, die bei Verzehr scharf schmecken, sind TRPA1-Aktivatoren. Im Unterschied zur Schärfe, die durch TRPV1-Aktivatoren wie Chili vermittelt wird, ist die Stimulierung von TRPA1 nicht von einem Hitzegefühl begleitet. Beispiele für solche "thermisch neutralen", scharfen Gewürze sind Meerrettich, Senf oder Kresse. Die TRPA1-Aktivatoren, die in diesen Pflanzen enthalten sind, sind von ihrer chemischen Struktur her größtenteils Isothiocyanate. Eine Übersicht über verschiedene Vertreter dieser Pflanzeninhaltsstoffe wird in Abb. 11 gegeben.

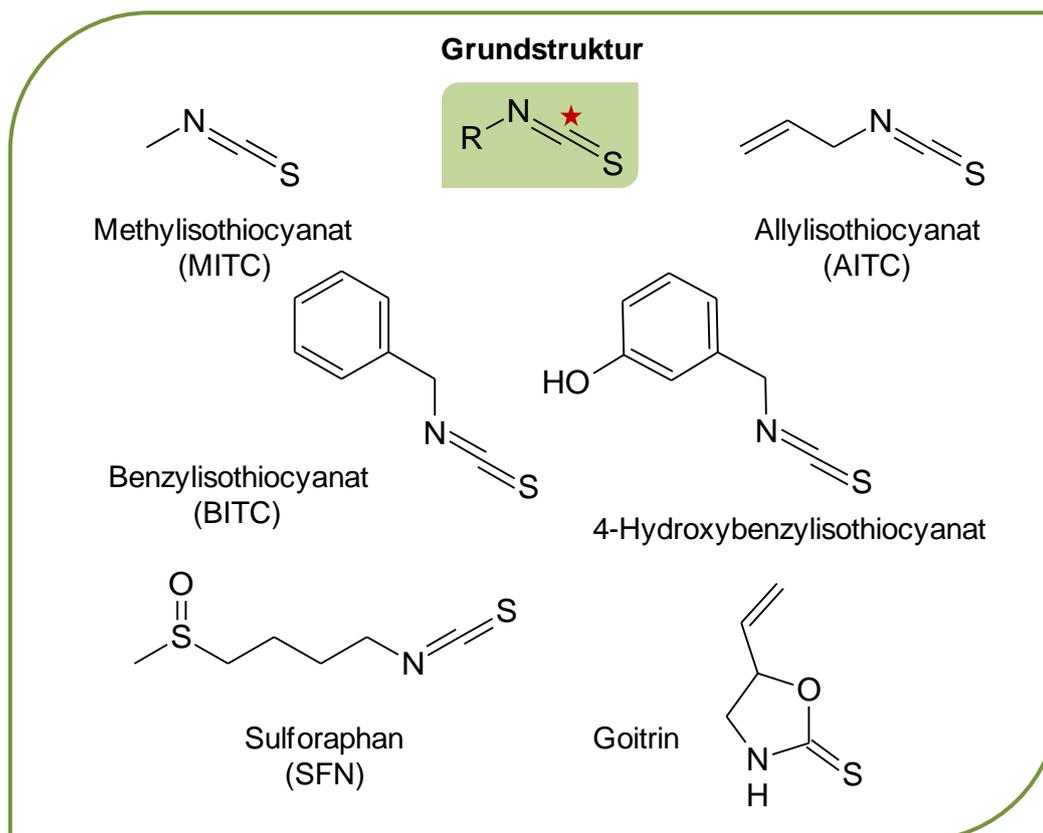


Abb. 11: Die wichtigsten Vertreter der Gruppe der organischen Isothiocyanate. Es handelt sich dabei um Verbindungen, die sich von der unbeständigen Isothiocyansäure ($H-N=C=S$) ableiten lassen. Organische Isothiocyanate werden aufgrund ihres natürlichen Vorkommens auch als Senföle bezeichnet. Das reaktive Zentrum der elektrophilen Substanzen ist in der Formel der Grundstruktur mit einem roten Stern gekennzeichnet (Hinman et al, 2006; Peterlin et al, 2007).

Ein typisches, TRPA1-aktivierendes Isothiocyanat ist Allylisothiocyanat (AITC), das auch in der vorliegenden Arbeit in den überwiegenden Fällen als Stimulus des Kanals verwendet wurde. Als starke Elektrophile sind Isothiocyanate in der Lage, den Kanal kovalent zu modifizieren und so zu aktivieren (Bautista et al, 2005; Jordt et al, 2004).

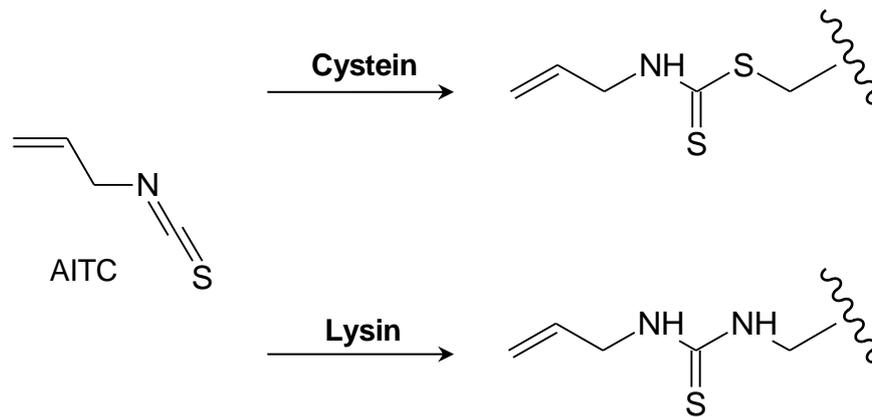


Abb. 12: Aktivierungsmechanismus des TRPA1-Kanals durch Isothiocyanate. Adaptiert aus Hinman et al. 2006.

Isothiocyanate können auch zu einer kovalenten Modifikation von Lysin-Resten des TRPA1-Kanals führen (Abb. 12), deren biologische Bedeutung im Hinblick auf die Kanalaktivierung jedoch noch nicht geklärt ist (Hinman et al, 2006).

3.6.4.3 TRPA1 als O₂-Sensor

Aufgrund der Tatsache, dass eine Oxidation von Cysteinresten im TRPA1-Kanal zu dessen Aktivierung führt, wurde kürzlich untersucht, inwieweit molekularer Sauerstoff als Oxidationsmittel und damit als Aktivator des Kanals in Frage kommt (Takahashi et al, 2011).

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass bereits zahlreiche Moleküle identifiziert wurden, die prinzipiell in der Lage sind, die Sauerstoffkonzentration zu messen und somit Zustände von Hypoxie oder Hyperoxie zu registrieren. Die zellulären Antworten, die durch O₂-detektierende Moleküle reguliert werden, sind grundsätzlich in relativ schnell erfolgende Reaktionen (innerhalb von Sekunden bis Minuten) und eher langsam einsetzende Effekte (innerhalb von Stunden) einzuteilen. Schnelle zelluläre Antworten werden typischerweise durch eine ganze Reihe O₂-sensitiver Membrankanäle mediiert, während langsame Wirkungen durch O₂-regulierte Transkriptionsfaktoren erfolgen.

Grundsätzlich ist einer Vielzahl von O₂-Sensormolekülen ein ähnlicher allgemeiner Mechanismus zu eigen, nämlich eine O₂-abhängige Oxidation von Prolin- oder Cysteinresten des betreffenden Proteins, welche als post-translationelle Modifikation entweder die biologische Aktivität oder die Halbwertszeit des Proteins regulieren. Auf diese Weise können O₂-Schwankungen der zellulären Umgebung direkt registriert und adaptive Antworten initiiert werden.

Ein Paradebeispiel für ein O₂-Sensorprotein und eines der ersten, dessen molekularer Mechanismus in eukaryontischen Zellen genauer charakterisiert wurde, ist der redox-regulierte Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierter Faktor (HIF) (Ratcliffe et al, 1998). Bei diesem Faktor

wird die Halbwertszeit durch eine unter anderem vom Von-Hippel-Lindau-Protein (VHL) gesteuerte Ubiquitin-vermittelte proteosomale Degradation stark limitiert, wobei eine Oxidation von Prolinresten durch sogenannte Prolin-Hydroxylasen das Signal für den Abbau von HIF ist (Kim & Kaelin, 2003; Safran & Kaelin, 2003; Schofield & Ratcliffe, 2004). Da O_2 bei dieser Reaktion als Oxidationsmittel dient, erfolgt die Prolinhydroxylierung konstitutiv unter normoxischen Bedingungen. Eine Hypoxie führt zum Sistieren dieser Reaktion und damit zu einer längeren Halbwertszeit und Akkumulation von HIF, welches dann als Transkriptionsfaktor viele, ganz unterschiedliche Proteine hochreguliert, welche für eine Anpassung an Sauerstoffmangel sorgen (z. B. Angiogenesefaktoren, hämatopoetische Wachstumsfaktoren und Elemente des Energiestoffwechsels).

Im Gegensatz zu diesen verzögerten adaptiven Reaktionen benötigt eine Anpassung an akute hypoxische Zustände schnelle Gegenregulationen, z. B. eine rasche Vasodilatation, um die Sauerstoffversorgung schnell wieder zu verbessern. In diesem Zusammenhang wurden zunächst AMP-Kinase (AMPK)- und Kohlenstoffmonoxid (CO)- bzw. Schwefelwasserstoff (H_2S)-gesteuerte K^+ -Kanäle als Effektoren identifiziert (Peers et al, 2010). Diese Kanäle haben bei normalen O_2 -Spiegeln in der Zelle eine hohe Offenwahrscheinlichkeit, und ein Abfall der intrazellulären O_2 -Konzentration führt über indirekte Mechanismen zu einer Inhibition der Kanäle. Der resultierende verringerte K^+ -Efflux resultiert dann in einer Zelldepolarisation und stellt das innerhalb von Millisekunden einsetzende primäre Signal auf den Sauerstoffmangel dar. Bei AMPK-gesteuerten, Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanälen der BK-Familie (BKCa) sowie Zwei-Porendomänen-Kanälen der TASK-Familie (TASK-3) bewirkt eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration eine verringerte ATP-Synthese, was über eine Aktivierung der AMPK eine Hemmung der entsprechenden K^+ -Kanäle (wahrscheinlich über direkte Phosphorylierung) zur Folge hat (Peers et al, 2010) (vgl. Abb. 13). Demgegenüber erfolgt ein alternativer Mechanismus bei BK-Kanälen über gasförmige Transmitter, nämlich H_2S und CO, wobei eine verringerte Sauerstoffspannung zunächst das Isoenzym 2 der Häm-Oxygenase hemmt, wodurch die Synthese von CO sistiert. Da CO unter normoxischen Bedingungen für die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der BKCa-Kanäle mitverantwortlich ist, kommt es durch den Abfall der CO-Konzentration bei Hypoxie zu einem verringerten K^+ -Efflux. Zusätzlich hemmt CO die Synthese von H_2S , welches wiederum inhibitorisch auf BKCa-Kanäle wirkt. Auf diese Weise sorgt Hypoxie zusätzlich für eine vermehrte H_2S -abhängige Hemmung dieser Kanäle (vgl. auch Abb. 13). Sowohl BKCa- als auch TASK-3-Kanäle spielen z. B. im sogenannten *Glomus caroticum* (engl.: "Carotid body") eine Rolle als Sauerstoffsensoren. Dieses Organ sitzt in der Aufzweigung der Halsschlagader in die innere (das Gehirn versorgende) und die äußere (die Halsorgane versorgende) *Arteria carotis*. Eine Aktivierung des *Glomus caroticum* durch Sauerstoffmangel führt zu erhöhter Atemfrequenz und -tiefe und steuert so dem verringerten Sauerstoffgehalt im Blut

entgegen. Es kann davon ausgegangen werden, dass BKCa- und TASK-3-Kanäle aber auch in weiteren Organen eine Rolle als O₂-detektierende Moleküle spielen.

Ein anderer Kanal, der ebenfalls eine wichtige Funktion bei schnellen Reaktionen auf Sauerstoffmangel ausübt, ist der Na⁺- und Ca²⁺-permeable Kationenkanal TRPC6, ein entfernterer Verwandter des TRPA1-Kanals. TRPC6 wird über den sekundären Botenstoff Diacylglycerol (DAG) aktiviert (Hofmann et al, 1999), dessen Konzentration in der Zelle auf zweierlei Weise durch Hypoxie erhöht wird: Zum einen kommt es durch Hypoxie zu einer H₂O₂-vermittelten Hemmung von DAG-Kinase (DAGK)-Isoformen (Weissmann et al, 2012), also von Enzymen, welche die DAG-Spiegel einer Zelle durch Umwandlung von DAG in Phosphatidsäure senken; zum anderen kann der Hypoxie-vermittelte Anstieg der H₂O₂-Konzentration zu einer direkten Aktivierung bestimmter Phospholipase C (PLC)-Isoformen führen (Peng & Arendshorst, 2008), womit die Bildung von DAG aus Phosphatidylinositolbisphosphat gesteigert wird. Das Schlüsselenzym für die vermehrte H₂O₂-Synthese unter Hypoxie könnte hierbei die NADPH-Oxidase (NOX) sein (vgl. Abb. 13), deren kritische Rolle bereits beim Reperfusionsschaden der Lunge charakterisiert werden konnte (Weissmann et al, 2012). Der TRPC6-Kanal wird z.B. in der glatten Muskulatur von Pulmonalarterien exprimiert und spielt dort dementsprechend auch eine Rolle in der Chemotransduktion bei Hypoxie. So konnte durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe A. Dietrich (Fuchs et al, 2011; Weissmann et al, 2006) gezeigt werden, dass durch die indirekte Aktivierung von TRPC6 bei Hypoxie via Akkumulation von DAG der sogenannte Euler-Liljestrand-Reflex ausgelöst wird. Dieser Reflex wird auch als akute hypoxische Vasokonstriktion bezeichnet, ist also dafür verantwortlich, dass sich Pulmonalarterien (im Gegensatz zu anderen Arterien im Körper) bei Sauerstoffmangel kontrahieren, was dafür sorgt, dass schlecht belüftete (also hypoxische) Abschnitte der Lunge weniger stark durchblutet werden und folglich Blut in die besser ventilerten Lungenabschnitte umdirigiert wird (Sylvester et al, 2012). Der Euler-Liljenstrand-Reflex ist von essentieller Bedeutung für die Lungenfunktion, da es immer wieder zu passageren Minderbelüftungen von einzelnen Lungenabschnitten kommt, wenn z. B. ein Schleimpfropf einen Bronchus-Ast verstopft.

Ein direkterer Mechanismus der Hypoxie-vermittelten Aktivierung von Ionenkanälen ist schließlich für TRPA1 beschrieben (zur Übersicht: (Takahashi et al, 2012)). Bei diesem Kanal führt eine normale O₂-Konzentration zu einer, vermutlich enzymatisch regulierten, basalen Oxidation von bestimmten Prolinresten, welche unter diesen Bedingungen als Hydroxyprolin vorliegen, was die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals reduziert. Eine Reduktion dieser Prolinreste unter hypoxischen Bedingungen führt hingegen zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Interessanterweise kann aber auch ein hyperoxischer Zustand zu einer Kanalöffnung führen, weil unter diesen Bedingungen eine Oxidation von Cysteinresten, entweder zu Sulfensäuren oder zu Disulfiden, erfolgt, was ein aktivierendes Signal darstellt (Takahashi et al, 2011). Diese

bifunktionelle Rolle von TRPA1 könnte ein weiterer Hinweis für die physiologische Funktion von TRPA1 in non-neuronalen Zellen in der Lunge sein. Allerdings ist, wie dargestellt (vgl. auch Abb. 13), TRPA1 nur eines von mehreren Kanalmolekülen, welche als O₂-Sensoren wirken. Ein besonderes Interesse verdient dieser Kanal dabei vor allem aufgrund der Tatsache, dass seine Aktivierung bei Hypoxie vermutlich direkt erfolgt und bereits eine Reihe von *in vivo* erprobten Modulatoren von TRPA1 existieren, so dass sich TRPA1 als pharmakologische Zielstruktur zur Beeinflussung hypoxischer Zellantworten anbietet.

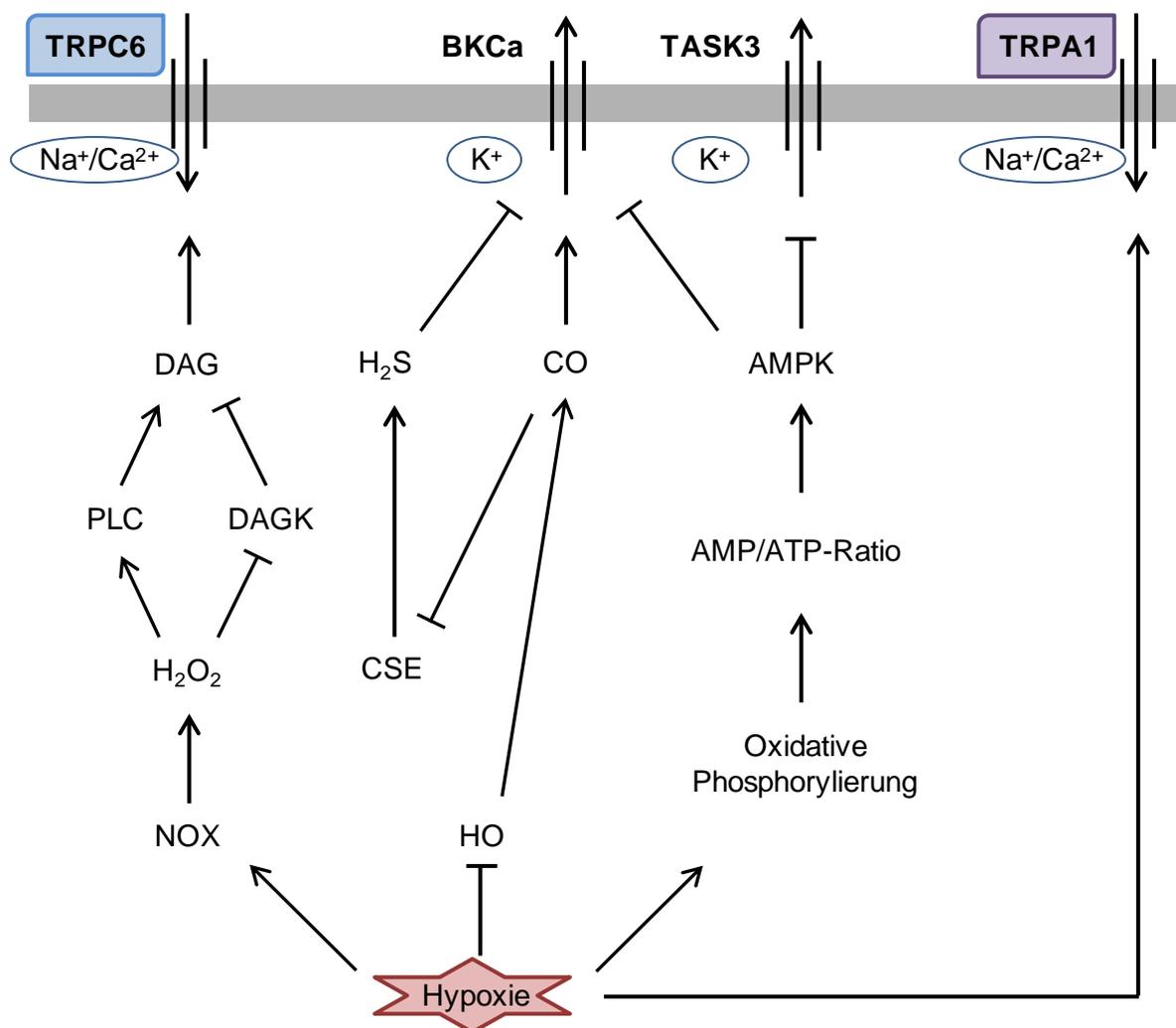


Abb. 13: Übersicht über Sensorkanäle zur Detektion von Hypoxie und Mechanismen ihrer Regulation. AMP, Adenosinmonophosphat; AMPK, AMP-Kinase; ATP, Adenosintriphosphat; CSE, Cystathionin- γ -Lyase; DAG, Diacylglycerol; DAGK, Diacylglycerolkinase; HO, Hämoxxygenase; NOX, NADPH-Oxidase; PLC, Phospholipase C.

3.6.4.4 Weitere, kovalent modifizierende TRPA1-Aktivatoren

In den letzten Jahren hat sich zunehmend gezeigt, dass viele inhalierbare Substanzen TRPA1-Aktivatoren sind, die ebenfalls durch Additionsreaktionen an Cysteinresten wirksam sind (Bessac &

Jordt, 2010). Dies ist natürlich vor allem im Zusammenhang mit der TRPA1-Expression in der Lunge interessant. So gehören zu dieser Gruppe z. B. Acrolein, Formaldehyd oder Acetaldehyd, also Stoffe, die sich im Tabakrauch wiederfinden. Da Raucher einem ganzen Cocktail von TRPA1-Aktivatoren ausgesetzt sind, kann davon ausgegangen werden, dass TRPA1-exprimierende Lungenzellen bei Rauchern wiederholt stimuliert werden und dieser Kanal im Hinblick auf biologische Effekte von Tabakrauch eine interessante Zielstruktur ist.

Auch in der Gruppe endogener, reaktiver Verbindungen gibt es eine große Bandbreite an kovalent modifizierenden TRPA1-Aktivatoren. Hervorzuheben sind dabei 4-Hydroxynonenal (4-HNE) und 4-Oxononenal (4-ONE), zwei Lipidverbindungen, die TRPA1 über die Ausbildung von Michael-Addukten an Cysteinresten aktivieren (Graepel et al, 2011; Taylor-Clark et al, 2008). Diese Verbindungen entstehen lokal in entzündlich verändertem Gewebe durch die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die durch die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter diesen Konditionen hervorgerufen wird (Sayre et al, 2006). In Abb. 14 wird die Struktur dieser α,β -ungesättigten Aldehyde dargestellt.

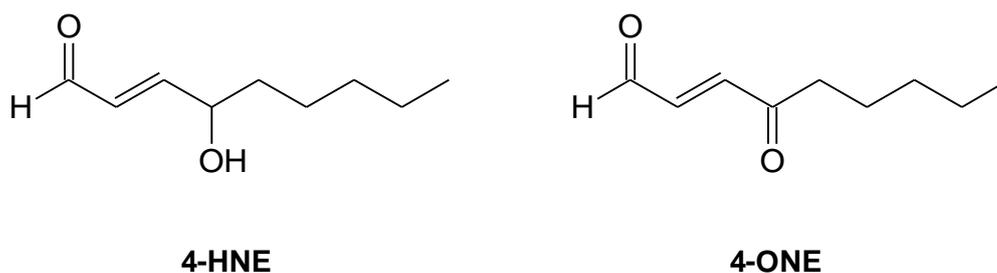


Abb. 14: *Strukturformeln zweier reaktiver Aldehyde: 4-Hydroxynonenal (4-HNE) und 4-Oxononenal (4-ONE), zwei Lipidverbindungen, die TRPA1 über die Ausbildung von Michael-Addukten an Cysteinresten aktivieren.*

3.6.4.5 Nicht-kovalente Aktivatoren von TRPA1

Allgemein wird das "Schlüssel-Schloss-Prinzip" (engl.: "Fischer lock-and-key-principle") für die agonistischen Eigenschaften von Liganden verantwortlich gemacht. Substanzen oder sekundäre Botenstoffe, die über diesen nicht-kovalenten Mechanismus zu einer Aktivierung von TRPA1 führen, interagieren reversibel und kompetitiv mit distinkten, aber größtenteils noch nicht genau charakterisierten Bindungsstellen innerhalb des TRPA1-Moleküls und führen über eine Konformationsänderung des Proteins zu einer gesteigerten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Ein Beispiel für eine synthetische Verbindung, die im Rahmen einer systematischen Suche nach neuen TRPA1-Agonisten gefunden wurde, ist URB597 (Niforatos et al, 2007). Diese Substanz ist ursprünglich als Inhibitor des Abbaus von Endocannabinoiden, wie Anandamid, beschrieben worden (Mor et al, 2004). Allerdings zeigten andere Hemmstoffe des Endocannabinoid-Abbaus keinen Effekt auf TRPA1 (Niforatos et al, 2007). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die

Wirkung von URB597 auf TRPA1 nichts mit der Wirkung dieser Substanz auf das Endocannabinoid-System zu tun hat. Interessanterweise zeigte URB597 auch eine inhibitorische Wirkung auf TRPM8 (Niforatos et al, 2007). Die Struktur der URB597-Bindungsstellen in TRPA1 und TRPM8 ist allerdings noch nicht näher identifiziert.

Weiterhin ist TRPA1 über eine spezifische Bindungstasche ein Sensor für Zinkionen, wobei davon auszugehen ist, dass endogen vorkommende Zn^{2+} -Konzentrationen ausreichend für eine TRPA1-Aktivierung sind. Eine direkte Aktivierung des Kanals durch Zn^{2+} über eine intrazelluläre Bindungsstelle im C-Terminus von TRPA1 (vgl. Abb. 8) wird vermutet (Hu et al, 2009). Im Fall einer Stimulierung von TRPA1-positiven Zellen durch exogene Zufuhr von Zn^{2+} muss dieses Ion zunächst in die Zellen einströmen. Da TRPA1 Zn^{2+} leitet, können Zinkionen aufgrund der basalen Aktivität des Kanals ins Zellinnere gelangen, an den C-Terminus binden und so den Kanal aktivieren und zu einer dauerhaft erhöhten Offenwahrscheinlichkeit führen (Hu et al, 2009).

Als weiterer Aktivator von TRPA1 wurde Bradykinin (Bk) beschrieben (Bandell et al, 2004), welches nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Bradykinin-Rezeptoren über einen unbekanntem, indirekten Mechanismus zu einer Aktivierung des Kanals führt. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist an der TRPA1-Aktivierung nach Stimulierung des Bradykinin (B2)-Rezeptors die $G_{q/11}$ -vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mitbeteiligt. In der Tat ist ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ über eine intrazelluläre Bindungsstelle ausreichend, um die Offenwahrscheinlichkeit von TRPA1 zu erhöhen (Jordt et al, 2004; Zurborg et al, 2007). Allerdings ist für einen bedeutenden Teil der Bradykinin-vermittelten exzitatorischen Effekte *in vivo* die Expression von TRPA1 nicht hinreichend sondern zusätzlich das Vorhandensein von TRPV1 notwendig (Katanosaka et al, 2008). Dies zeigt, dass TRPA1 nicht die alleinige distale Zielstruktur von Bradykinin ist sondern sich ein komplexes Zusammenspiel von TRPA1- und TRPV1-vermittelten Signalen ergibt und wahrscheinlich auch TRP-unabhängige Prozesse beteiligt sind.

Schließlich kann TRPA1 auch im Rahmen hypoxischer und hyperoxischer Zustände aktiviert werden (Takahashi et al, 2011). Dieser Aspekt ist vor allem im Hinblick auf mögliche non-neuronale Funktionen von TRPA1 in der Lunge und in Tumoren von besonderer Bedeutung und wird daher ausführlich in der Diskussion dieser Arbeit beleuchtet (vgl. Kap. 6.2).

3.6.4.6 Sonstige, nicht chemisch definierte Aktivatoren

Viel diskutiert ist weiterhin die Frage, ob TRPA1 in Säugetieren ein Thermosensor ist. So wurde zunächst vermutet, dass er durch schmerzhafte Kälte, also durch Temperaturen $\leq 17^\circ C$, aktiviert wird (Story et al, 2003). Dies konnte aber nicht von allen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Knowlton et al, 2010; Nagata et al, 2005) und auch Versuche mit TRPA1-defizienten Mäusen und pharmakologischen Inhibitoren des Kanals zeigten kein eindeutiges Ergebnis: Einerseits fehlte in

TRPA1-defizienten Mäusen eine Antwort bestimmter trigeminaler Schmerzneurone auf Kältereize (Karashima et al, 2009), andererseits konnten Kälte-induzierte Reaktionen nur in Mäusen mit vorgeschädigten Nerven, nicht aber in gesunden Mäusen durch den TRPA1-Inhibitor A-967079 verringert werden (Chen et al, 2011a). Eine Möglichkeit, die diese widersprüchlichen Daten zumindest teilweise erklären könnte, ist, dass die in einigen Studien beobachtete Aktivierung des TRPA1 durch starke Kältereize auf nichtspezifische Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zurückzuführen sind, welche wiederum das Öffnungsverhalten des Kanals beeinflussen könnten.

3.6.4.7 Inhibitoren von TRPA1

Ein effektiver Inhibitor des TRPA1-Kanals ist der Porenblocker Rutheniumrot (RR), der auch eine ganze Reihe anderer TRP-Kanäle, vor allem aus der TRPV-Familie, blockieren kann. Story et al. schlugen 2003 vor, dass die Struktur der Transmembrandomänen von TRPA1 eine wichtige Rolle für die Inhibierbarkeit des Kanals durch Rutheniumrot spielt, da die Aminosäuresequenz von TRPA1 in diesem Bereich eine größere Ähnlichkeit zu den homologen Domänen der TRPV-Mitglieder aufweist als zu allen anderen TRP-Kanälen (Story et al, 2003). Neben dieser Standardsubstanz wurde für eine ganze Reihe anderer Verbindungen eine inhibitorische Wirkung auf TRPA1 beschrieben. Hierzu zählen z. B. Gentamicin, Gadoliniumionen (Gd^{3+}) und Amilorid (Nagata et al, 2005); diese Verbindungen zeichnen sich allerdings alle durch eine nur sehr geringe Selektivität aus und bewirken daher auch eine ganze Reihe TRPA1-unabhängiger Effekte. Ein weiterer Inhibitor für TRPA1 ist Campher, das jedoch mit einem IC_{50} -Wert von ca. 0,7 mM (für den Ratten-TRPA1) keine hohe inhibitorische Potenz aufweist (Xu et al, 2005). Potenter und nach derzeitigem Kenntnisstand auch selektiver ist der synthetische Inhibitor AP-18 mit einem IC_{50} -Wert von 9,1 bzw. 39,9 μ M für den humanen bzw. den Ratten-TRPA1 (Bianchi et al, 2012). Interessanterweise scheint AP-18 als irreversibler TRPA1-Blocker zu fungieren (Petrus et al, 2007).

3.6.5 TRP-Kanäle und Krebs

In den letzten 10 Jahren wurden in verschiedenen Studien zunehmend Hinweise auf eine Veränderung der Expressionshöhe verschiedener Ca^{2+} -Kanäle in onkogen transformierten Zellen nachgewiesen, welche eine auffällige Korrelation mit dem Tumorwachstum oder auch mit dem Übergang zu einem metastatischen Stadium aufwiesen (Bodding, 2007; Capiod et al, 2007; Kunzelmann, 2005; Le Guennec et al, 2007; Munaron et al, 2004; Prevarskaya et al, 2007b; Schonherr, 2005).

In der Tat wurden auch für verschiedene TRP-Kanäle Assoziationen mit einer ganzen Reihe von Tumoren festgestellt. Interessanterweise scheinen dabei spezifische Zusammenhänge zwischen der Dysregulation bestimmter TRP-Kanäle und distinkten Tumorentitäten zu bestehen. Die alterierte Expression von TRP-Kanälen ist dabei, je nach Tumortyp, auf eine Regulation auf transkriptioneller, translationaler oder post-translationaler Ebene zurückzuführen. Aufgrund ihrer Fähigkeit, die

$[Ca^{2+}]_i$ zu modulieren, ist, vor dem Hintergrund der wichtigen Rolle von Ca^{2+} als Signalmolekül in Tumoren, eine Beteiligung von TRP-Kanälen an der Ätiopathogenese von Tumoren auch mechanistisch plausibel (Gudermann & Flockerzi, 2005; Monteith et al, 2007; Prevarskaya et al, 2007b). Wichtige Prozesse in der Tumorigenese von Zellen verstärken die Zellproliferation und inhibieren die Apoptose. Diese Prozesse werden unter anderem von der Ca^{2+} -Homöostase reguliert. Diese Vorgänge sind abhängig von der Amplitude und zeitlich-räumlichen Aspekten des Ca^{2+} -Signals. Eine erhöhte Expression von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran verstärkt den Ca^{2+} -Einstrom und dadurch auch eine Förderung von Ca^{2+} -abhängigen Proliferationswegen. TRP-Kanäle können die $[Ca^{2+}]_i$ auf verschiedenen Wegen beeinflussen: Zum einen als Plasmamembrankanäle durch einen Ca^{2+} -Influx über die Plasmamembran und zum anderen über Änderungen der Membranpolarisation als Modulatoren des Ca^{2+} -Eintritts über alternative Signalwege. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass TRP-Kanäle auch in der Membran interner Calciumionenspeicher exprimiert werden und so zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führen (Prevarskaya et al, 2007a).

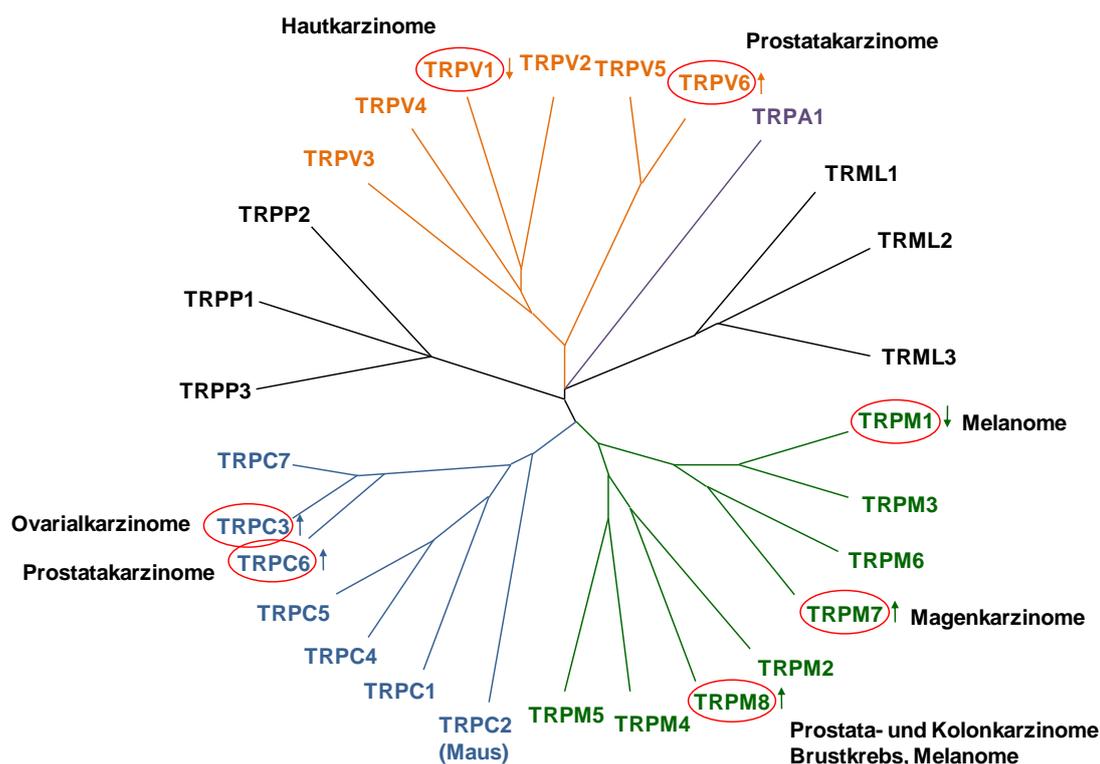


Abb. 15: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Familie mit Markierung der Kanäle, für die eine Beteiligung an onkogenen Veränderungen von Zellen untersucht wurde.

Die meisten Veränderungen der TRP-Funktion in Krebszellen werden nicht durch Mutationen hervorgerufen, wie es sonst bei der Krebsentstehung häufiger der Fall ist sondern durch eine erhöhte oder verminderte Expression des jeweiligen TRP-Proteins. TRP-Kanäle können

transkriptional, translational, in Hinsicht auf den intrazellulären Transport des Kanals zu der Plasmamembran oder aber in Bezug auf ihre Halbwertszeit in der Zelle reguliert werden. Ihre Expressionshöhe kann durch Hormone oder auch Wachstumsfaktoren beeinflusst werden, und ein alternatives "Splicing" kann zu einer veränderten Kanalfunktion führen. Im Folgenden sollen die wichtigsten Vertreter der TRP-Kanäle, für die bereits eine Implikation mit der Tumorigenese gezeigt werden konnte, sortiert nach ihrer Familienzugehörigkeit, behandelt werden. (Gkika & Prevarskaya, 2009).

3.6.5.1 TRPM-Kanäle

Der **TRPM1**-Kanal ist, wie bereits erwähnt wurde, in Melanomen gegenüber normalen Melanozyten herunterreguliert, wie mittels *in situ* Hybridisation gezeigt werden konnte (Carlson et al, 2005). Interessanterweise wurden keinerlei Transkripte bei metastatischen Melanomen entdeckt. Daher wurde frühzeitig vermutet, dass TRPM1 ein prognostischer Faktor für die Metastasierung und Aggressivität von Melanomen ist und einen Tumorsuppressor darstellt. Diese These wird von Experimenten gestützt, die zeigten, dass pigmentierte metastatische Melanomzellen, die mit dem Differenzierungs-induzierenden Stoff Hexamethylenbisacetamid behandelt wurden, TRPM1-Transkripte heraufregulierten (Bodding, 2007).

Im Falle des Prostata-Karzinoms wurde gezeigt, dass der **TRPM8**-Kanal in Abhängigkeit vom Tumorstadium hochreguliert war (Prevarskaya et al, 2007b). Entdeckt wurde die TRPM8 cDNA bei einem "Screening" von hochregulierter mRNA in Prostatakrebs (Tsavaler et al, 2001). Er ist darüber hinaus auch in anderen primären Krebsarten überexprimiert, u. a. in Melanomen, kolorektalen Adenokarzinomen und Brustkrebs. TRPM8 mRNA ist beim Prostatakarzinom bereits in frühen Tumorstadien stark hochreguliert. Demgegenüber konnten nur in geringem Maße Transkripte in gesundem Gewebe detektiert werden. Dieser Unterschied wurde auch auf Proteinebene gefunden. Der Unterschied in der TRPM8 mRNA Expression von gesundem Gewebe im Vergleich zu malignem Gewebe scheint vergleichbar mit den Unterschieden in dem zur Zeit benutzten Prostatakrebsmarker PSA zu sein; daher wurde TRPM8 auch als Marker für die Diagnose und Stadieneinteilung diskutiert. Schließlich wurde auch gezeigt, dass eine pharmakologische Inhibition von TRPM8 bzw. eine Herunterregulation mittels siRNA zu einer Verminderung der Zellviabilität von LNCaP-Zellen führt, evtl. durch Beeinflussung der Ca²⁺-Homöostase. Wie genau eine Beteiligung von TRPM8 an Pro-Proliferations- oder Pro-Apoptose-Mechanismen aussieht, ist noch nicht geklärt. Es wurde diskutiert, ob der Einfluss von TRPM8 auf Zell-Überleben oder -Proliferation von der intrazellulären Lokalisation abhängig ist. So konnte in Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen werden, dass eine TRPM8-Expression sowohl in der Plasmamembran als auch im endoplasmatischen Retikulum auftritt (Thebault et al, 2005; Zhang & Barritt, 2004).

Auch **TRPM5** wurde eine Beteiligung an der Progression verschiedener Tumore zugesprochen, weil sein Gen in einer chromosomalen Region liegt, die mit einer Anzahl von Neoplasien assoziiert wird, wie z. B. dem Wilm's Tumor und dem Rhabdomyosarkom (Bodding, 2007).

3.6.5.2 TRPV-Kanäle

TRPV6 mRNA wird in Prostata-Adenokarzinomen überexprimiert. Die TRPV6 Expression korreliert hierbei mit dem Tumorgrad und dessen Aggressivität. Bei *in situ* Hybridisierungsversuchen von humanen Biopsien wurde in gesundem Gewebe bzw. benignem prostaticen Hyperplasien keine oder zumindest nur eine äußerst geringe Expression von TRPV6 detektiert. Diese Expressionsunterschiede in humanem Gewebe konnten auch bei Untersuchungen von humanen Tumorzelllinien hinsichtlich der TRPV6-Expression auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Dabei wurden die Tumorzelllinien LNCaP und PC3 mit nicht malignen Prostataepithel-Zelllinien verglichen (PrEC und BPH1). Ob TRPV6 ein funktionsfähiger Kanal in malignem Gewebe ist, wurde noch nicht untersucht (Bodding, 2007).

Für **TRPV1** konnte schließlich gezeigt werden, dass er an der Steuerung von Apoptose und Zellmotilität von Cervix-Karzinomzellen beteiligt ist und durch das endogene Cannabinoid Arachidonylethylamid induziert wird (Ramer & Hinz, 2008; Ramer et al, 2010).

3.6.5.3 Andere TRP-Kanäle

In Prostata-Karzinomen und Neuroblastom-Zellen konnte eine Expression von TRPC3 identifiziert werden (Nasman et al, 2006; Prevarskaya et al, 2007b).

Für eine ganze Reihe anderer TRP-Kanäle wurden Dysregulationen, zumeist auf mRNA-Ebene, festgestellt. Die Datenlage hierzu ist allerdings nicht ganz eindeutig, und experimentelle Bestätigungen einer Beteiligung an der Entstehung oder Progression von Tumoren stehen noch aus (Bodding, 2007; Capiod, 2013).

3.7 Fragestellung

Ein wichtiger Anknüpfungspunkt der vorliegenden Arbeit sind Vorbefunde anderer Arbeitsgruppen sowie eigene Untersuchungen (Buchholz et al, 2006; Bunn et al, 1994; Koenig et al, 2010; Roelle et al, 2008; Wittau et al, 2000), wonach ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ein wichtiges Steuersignal für das Wachstum von Kleinzelligen Bronchialkarzinomen und dem Pankreaskarzinom darstellt. Aufbauend auf dieser Erkenntnis war eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit herauszufinden, welche Rolle Kationenkanäle der TRP-Familie, insbesondere TRPA1, bei der Ca^{2+} -Homöostase in diesen Karzinomzellen spielen. Die Arbeitshypothese war hierbei, dass TRP-Kanäle, die in diesen Tumorzellen exprimiert werden, aufgrund ihres Effektes auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel der Zellen eine attraktive therapeutische Zielstruktur darstellen könnten und ihre Inhibition sich wachstumshemmend auf die Tumorzellen auswirkt.

Der Fokus der Arbeit lag auf dem TRPA1-Kanal, da ich im Rahmen meiner Diplomarbeit zeigen konnte, dass Allylisothiocyanat (AITC), ein pflanzlicher Metabolit aus scharf schmeckenden Brassicaceen (Wasabi, Meerrettich oder schwarzer Senf), zu einem starken Ca^{2+} -Influx in SCLC-Zellen führt (Schafer et al, 2009). Da AITC ein typischer Aktivator von TRPA1 ist, war es naheliegend, genauer zu untersuchen, ob dieser Kanal in den genannten Tumorzelllinien funktionell exprimiert wird. Bisher ist TRPA1 vor allem als neuronaler Sensor für toxische Substanzen beschrieben worden, so dass eine nicht neuronale Expression dieses Kanals in Tumorzellen ein neuer Befund wäre. Aus diesem Grund sollten die Untersuchungen zu TRPA1 systematisch auf andere epitheliale Lungenzelllinien erweitert werden, um gegebenenfalls für diese Zellsysteme eine neue Funktion des Kanals bei der Antwort auf toxische Inhalantien zu definieren.

4. Material und Methoden

4.1 Geräte

Tab. 1: Liste der verwendeten Geräte

A	Autoklav	Varioklav H+P, Biomedis, Gießen
B	Brutschrank	HERA Cell 240, T6030 Kelvitron t, Heraeus, Hanau
D	Durchlichtmikroskop	Olympus CKX41SF, Olympus, Hamburg
F	Feinwaage	L610D, Sartorius, Göttingen
	Heizblock	Digitaler Blockheizer HX-1, Peqlab, Erlangen
H	Kreisschüttler	Orbital Shaker PSU-10I, Peqlab, Erlangen
K	Lumineszenzdetektionsgerät	ChemiSmart 5100, Peqlab, Erlangen
L	Mikrodosierspritze 25 µl	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
M	Mikroplatten-Lesegerät	FLUOstar OMEGA, BMG Labtech, Ortenberg
	Mikrowelle	Severin, Sundern
	PCR-Gerät	Primus 25 advanced, Peqlab, Erlangen
P	pH-Meter	Digital-pH-Meter Knick, Bachofer, Reutlingen
	Photometer	BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg
	Pipetten	2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Peqpette, Peqlab, Erlangen und Pipetman, Gilson, Frankreich
	Pipettierhilfe	Pipetus, Hirschmann, Heilbronn
	Präzisionswaage	AND HR-202, Bachofer, Reutlingen
	Real-Time-PCR-Gerät	LightCycler 480 System, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
R	Reinstwasseranlage	Millipore, Darmstadt
	Schüttelinkubator	MaxQ 6000, Thermo Scientific, Rockford, USA
S	Spannungsquelle	Electrophoresis Power Supply EPS 301, GE Healthcare, Freiburg
	Thermocycler	T3 Thermocycler, Whatman Biometra, Göttingen
T	Vortex-Gerät	IKA MS3 Basic, IKA Staufen
V	Wasserbad	WNE14, Memmert, Schwabach
W	Western Blot Kammersystem	miniVE Vertical Electrophoresis System GE Healthcare, Freiburg
	Western Blot Elektroblotting-System	Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System, Biorad, München
	Wippe	Duomax 1030, Heidolph, Schwabach
	Zählkammer	Neubauer Improved, Brand, wertheimDuomax 1030, Heidolph, Schwabach
Z	Zellkulturwerkbank	HERAsafe KS18, Heraeus, Hanau
	Zentrifugen	Tischzentrifuge, Fresco 21, Labofuge 400, Heraeus, Hanau; Zentrifuge RC5C, Sorvall Instruments, Langenselbold

4.2 Chemikalien und andere Materialien

4.2.1 Chemikalien

Tab. 2: Liste der verwendeter Chemikalien

A	Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Albumin (bovine Fraction V) (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
B	β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
D	Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
I	Isopropanol	Acros Organics, Geel, Belgien
P	Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
T	Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Alle anderen verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammen von Carl Roth GmbH (Karlsruhe).

4.2.2 Aktivatoren, Inhibitoren

Tab. 3: Liste der verwendeten Aktivatoren und Inhibitoren

A	Allylisothiocyanat 95 % (AITC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	AP-18	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
B	Bradykinin (Bk)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
C	Campher	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Carbachol (Cch)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Coelenterazin	Biaffin GmbH & CoKG, Kassel
E	Epidermal growth factor (EGF), Human, recombinant, expressed in <i>E.coli</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
F	Formalin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Fura-2-AM	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L	LY 294002	Enzo Life Sciences, Lörrach
P	PD98059	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	PP2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
R	Rutheniumrot (RR)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
T	Thapsigargin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
U	U-73122	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	URB597	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Z	trans-Zimtaldehyd 99 % (CA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

4.2.3 Enzyme, Kits und Größenstandards

Tab. 4: Liste der verwendeten Enzyme, Kits und Größenstandards

A	Acell small interference RNA (siRNA) TRPA1	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
C	cAbsolute SYBR Capillary Mix Calpain-Assay Cell Proliferation Kit II	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Invitrogen, Darmstadt Roche Applied Science, Mannheim
D	dNTP-Mix Dokumol	MBI Fermentas, St. Leon-Rot Tetenal, Norderstedt
P	Plasmid-DNA Purification Kit NucleoBond Xtra Midi Proteinmarker (prestained protein ladder 10-170 kda)	Peq Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen Macherey-Nagel, Düren
R	„random-hexamer-Primer“ Reaktionspuffer RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase Ribonukleaseinhibitor	MBI Fermentas, St. Leon-Rot MBI Fermentas, St. Leon-Rot MBI Fermentas, St. Leon-Rot MBI Fermentas, St. Leon-Rot
S	Senescence β -Galactosidase Staining Kit Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Trail Kit Super Signal West Pico Chemiluminiscence Substrate	Cell Signaling, Danvers, USA Pierce/Thermo Scientific, Rockford, USA Pierce/Thermo Scientific, Rockford, USA
T	Taq-DNA-Polymerase TRI-Reagent	MBI Fermentas, St. Leon-Rot Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
X	XTT Cell Proliferation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim

4.2.4 Verbrauchsmaterialien

Tab. 5: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

L	96-Loch-Mikrotiterplatte, weißer Boden 96-Loch-Mikrotiterplatte, Glasboden	Nunc GmbH & CoKG, Wiesbaden Nunc GmbH & CoKG, Wiesbaden
N	Nitrocellulosetransfermembran	Protran BA85, Whatman, Dassel
P	Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
R	Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; 15 ml; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
U	UV-Küvette UVette	Eppendorf, Hamburg
X	X-OMAT UV-Filme	Kodak, Stuttgart
Z	Zellkulturmaterialien	Sarstedt, Nümbrecht

4.2.5 Oligonukleotide ("Primer")

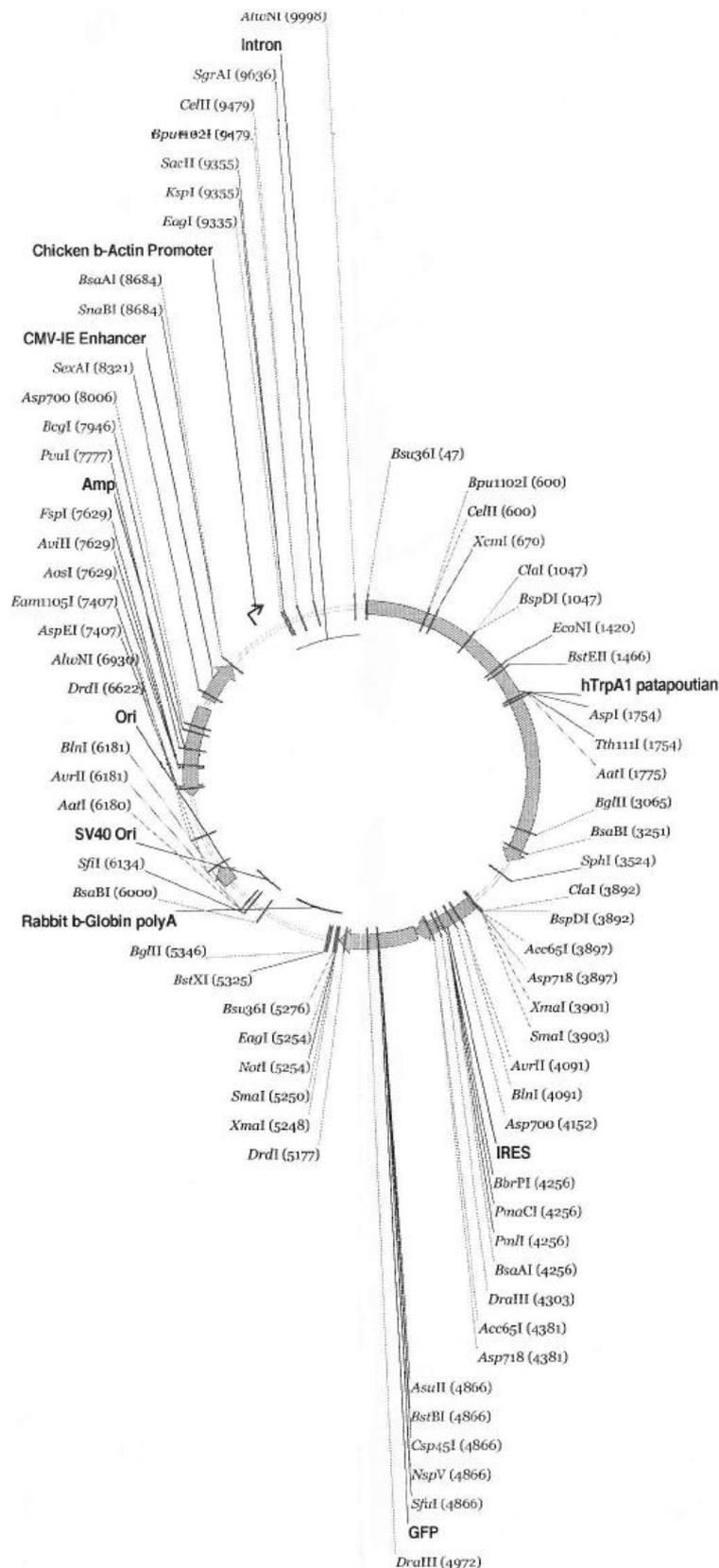
Alle PCR-Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Website <http://mgc.nci.nih.gov> abgeleitet. Es wurde ein Intron-übergreifender Suchalgorithmus zur Generierung der Oligonukleotidsequenzen angewendet. Dieses Verfahren soll sicherstellen, dass die Oligonukleotide spezifisch gegenüber den zu detektierenden Nukleotidsequenzen sind. Oligonukleotide sind idealerweise weniger als 20 Nukleotide lang, verfügen über eine Schmelztemperatur zwischen 58°C und 68°C und enthalten keine komplementären Sequenzen von mehr als drei Nukleotiden. Hergestellt wurden die Oligonukleotide von MWG-Biotech. Alle Oligonukleotide wurden in einer Endkonzentration von 1 µM (pro Oligonukleotid-Paar) verwendet.

Tab. 6: Oligonukleotidsequenzen

Gen	Vorwärts-Oligonukleotid	Rückwärts-Oligonukleotid	Gen-Nummer
β-actin	ccaaccgcgagaagatga	ccagaggcgtacagggatag	NM_001101.3
hTRPA1	tcaccatgagctagcagactattt	gagagcgtccttcagaatcg	NM_007332.2
hTRPC1	gagagcattgaaacttagtgctga	ttacattgccgggctagttc	NM_003304.4
hTRPC3 var1	ttcctggccattggctact	aaaagggcttcgcagaattt	NM_001130698.1
hTRPC4 varzeta	gttgagctgttattgaaccacaa	cactgcccagtgcttctcc	NM_001135958.1
hTRPC5	gggacttacagaagaaaatttaagg	ccaagaggtaagcacttcat	NM_012471.2
hTRPC6	atttactggttgctccatgc	tgcgtgtgctacaaactca	NM_004621.5
hTRPC7	tgatgtgaactccaagtctgg	ctgacagttaggatgagcaacg	NM_020389.1
hTRPV1 var2	cagcagcgagaccctaa	cctgcaggagtcggttca	NM_018727.5
hTRPV2	gatgagcgtggtgcttc	acagcgtaggcagcgtct	NM_016113.3
hTRPV3	ccaacacgaaggcttctacttc	aatctcgggctggttggt	NM_145068.2
hTRPV4 var2	ttccagcccaaggatgag	acaatgtgggctggttg	NM_147204.1
hTRPV5	agcacctggacaagcttcata	atgctcgaagcagtgagac	NM_019841.4
hTRPV6	agagccgagatgagcagaac	cagggcctggacatcata	NM_018646.2
hTRPM1	gctgaaagagcctgagctgt	ttttctatccaagatttctgacc	NM_002420.4
hTRPM2	cgaggacatcagcaataaggt	atggagcccagaccttc	NM_003307.3
hTRPM3 var1	gctgcagcaaaatgaaagc	tctttctatccaggatttctgagc	NM_020952.4
hTRPM3 var9	tcactccagaagataaacacaagaa	tccaaaacaatcgagatcaca	NM_001007471.2
hTRPM4	agtttgaaggcccttgta	agccaaacgcagctcatc	NM_017636.2
hTRPM5	ccactggacgagattgatga	atagaggctgggagcaggat	NM_014555.3
hTRPM6	aaggactccagtgccaat	tcctcttcagagatgctgtttc	NM_017662.4
hTRPM7	gagttgacattgcaaaaatca	ctgttccaaggatccaacc	NM_017672.3
hTRPM8	ggtcctgtactcgctggtct	cacccatttacgtaccactg	NM_024080.4
Mucin5A/C	ctctgtggggacttcaacg	tgggtgacagctggtgtt	AJ298317.1

4.2.6 Vektoren/Plasmide

Die cDNA des hTRPA1 wurde in einem pCAGGSM2-Plasmid zur Verfügung gestellt. Bei diesem Plasmid handelt es sich um einen bicistronischen Vektor mit einer internen ribosomalen



Eintrittsstelle (IRES). Hierdurch wird zusätzlich zur Expression des TRPA1-Kanals auch noch die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) ermöglicht, wodurch transfizierte Zellen fluoreszenzmikroskopisch identifizierbar sind. Die Expression dieser Gene steht unter der Kontrolle eines sog. CAG-Promotors, d. h. eines Aktin-Promotors aus dem Haushuhn (*Gallus domesticus*) mit einer zusätzlichen Verstärkersequenz aus dem Cytomegalovirus ("CMV enhancer"). Das Expressionsplasmid enthält außerdem eine Ampicillin-Resistenz zur selektiven Vermehrung in transformierten Bakterien. Das Plasmid ist ideal geeignet für diverse heterologe Expressionssysteme, z. B. HEK293- oder COS-7-Zellen. Die Plasmid-DNA wurde freundlicherweise von Prof. Bernd Nilius, Leuven, Belgien zur Verfügung gestellt.

Abb. 16: Vektorkarte des Expressionsplasmids pCAGGSM2-IRES-GFP/hTRPA1 für den humanen TRPA1 mit Angabe der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen. Aufgrund der bicistronischen Architektur des Plasmids werden in transformierten Zellen TRPA1 und GFP als separate Gene exprimiert.

4.2.7 Antikörper

Tab. 7: Liste der verwendeten Antikörper

E	Anti-P-ERK (E-4) sc-7383 mouse, monoclonal (IgG _{2a} aus Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
	Anti-ERK2 (K-23) sc-153 rabbit, polyklonal (IgG aus Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
	Anti-P-ERK1/2 (D13.14.4E) XP #4370, monoclonal (IgG aus Kaninchen)	Cell Signaling, Danvers, USA
	Anti-rabbit Peroxidase-gekoppelt A6154, polyclonal (IgG ganzes Molekül aus Ziege)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Anti-mouse Peroxidase-gekoppelt A2554, monoclonal (IgG Fc spezifisch aus Ziege)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
C	Anti-Procaspase #9662, polyclonal (aus Kaninchen)	Cell Signaling, Danvers, USA
	Anti-Cleaved-Caspase 3 (Asp175) #9661, polyclonal (aus Kaninchen)	Cell Signaling, Danvers, USA
	Anti-c-Fos (H-125) sc-7202 rabbit, Polyklonal (IgG aus Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
T	Anti-TRPA1 (C-4) sc-166469 mouse, monoclonal (IgG ₁ aus Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

4.2.8 Puffer und Lösungen

Tab. 8: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

	4 x Tris-HCl/SDS pH 6,8	0,5 M Tris-HCl, 0,4 % (w/v) SDS
	4 x TrisHCl/SDS pH 8,8	1,5 M Tris-HCl, 0,4 % (w/v) SDS
A	Ablösepuffer	25 mM Tris-HCl pH 8,2; 2 % (w/v) SDS; 60 mM β -Mercaptoethanol
D	DTT-Lysepuffer	25 mM Tris-HCl; 4 mM EGTA; 8 mM MgCl ₂ ; 1 % (v/v) Triton X-100; 1 mM DTT
F	Fixierlösung	1,26 M Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O; 0,11 M K ₂ S ₂ O ₅
H	HBS	140 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 10 mM HEPES; pH 7,4
L	Laemmli-Lysepuffer (zweifach konz.)	125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20 % (v/v) Glycerol; 4 % (w/v) SDS; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 10 μ g/ml Bromphenolblau
P	PBS	137 mM NaCl; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O; 2,7 mM KCl; 1,47 mM KHPO ₄ ; pH 7,4
	PBST	PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20
S	Sammelgellösung	3,9 % Acrylamid; 118 mM Tris-HCl/SDS pH 6,8; 0,045 % TEMED, 30 mg/l APS
	SDS-Lysepuffer	62,5 mM Tris (pH 6,8); 2 % (w/v) SDS; 10 % Glycerol; 50 mM DTT; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
	SDS-Laufpuffer	250 mM Tris; 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS

	SDS-Transferpuffer	25 mM Tris; 191 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 10 % (w/v) SDS
	TBS	20 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,6
T	TBST	TBS + 0,1 % (v/v) Tween 20
	TE-Puffer	10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA
	Trenngelösung 9 %	9 % (v/v) Acrylamid; 375 mM Tris-HCl/SDS pH 8,8; 0,045 % (v/v) TEMED; 30 mg/l APS
	Trenngelösung 12 %	12 % (v/v) Acrylamid; 375 mM Tris-HCl/SDS pH 8,8; 0,045 % (v/v) TEMED; 30 mg/l APS

4.3 Zellen

4.3.1 Zelllinien

Tab. 9: Liste der verwendeten Zelllinien

SCLC	NCI-H69	Humane SCLC-Zelllinie (klassischer Subtyp); Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA; im weiteren Text als H69 bezeichnet
	H69Aeq	Humane SCLC-Zelllinie (klassischer Subtyp), stabil Aequorin-GFP exprimierend (Lentivirale Tranfektion); Herkunft: Etabliert von Dr. Olaf Pinkenburg aus NCI-H69
	NCI-H82	Humane SCLC-Zelllinie (varianter Subtyp), Herkunft: American Type Culture Collection ATCC, Manassas, VA, USA; im weiteren Text als H82 bezeichnet
	NCI-H146	Humane SCLC-Zelllinie (klassischer Subtyp); Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA; im weiteren Text als H146 bezeichnet
	NCI-H187	Humane SCLC-Zelllinie (klassischer Subtyp); Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA; im weiteren Text als H187 bezeichnet
	NCI-H209	Humane SCLC-Zelllinie (klassischer Subtyp); Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA; im weiteren Text als H209 bezeichnet
	NCI-H510	Humane SCLC-Zelllinie (klassischer Subtyp); Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA; im weiteren Text als H510 bezeichnet
	H510Aeq	Humane SCLC-Zelllinie (klassischer Subtyp), stabil Aequorin-GFP exprimierend (Lentivirale Tranfektion); Herkunft: Etabliert von Dr. Olaf Pinkenburg aus NCI-H510

Sonst. Lungen- Zelllinien	A549	Humane Adenokarzinom-Zelllinie mit Alveolar-Typ-II-Differenzierung; Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
	H441	Humane Adenokarzinom-Zelllinie mit Alveolar-Typ-II-Differenzierung; Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
	16HBE14o-	Immortalisierte humane Lungenepithel-Zelllinie; Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
	1HAEo-	Immortalisierte humane Lungenepithel-Zelllinie; Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
Pankreas- karzinom- zellen	PaTu8988t	Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie (Adenokarzinom); Herkunft: DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; im weiteren Text als 8988t bezeichnet
	8988tAeq	Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie (Adenokarzinom), stabil Aequorin-GFP exprimierend (Lentivirale Transfektion); Herkunft: Etabliert von Dr. Hermann Kalwa aus PaTu8988t
	Panc-1	Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie (Adenokarzinom); Herkunft: DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
	IMIM-PC1	Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie (Adenokarzinom); Herkunft: DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
	IMIM-PC2	Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie (Adenokarzinom); Herkunft: DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
Prostata- karzinom- zellen	PC3	Humane Prostatakarzinom-Zelllinie; Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
	LNCaP	Humane Prostatakarzinom-Zelllinie (Lymphknotenmetastase); Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
Humane embryonale Nierenzellen	HEK293	Immortalisierte humane embryonale Nieren-Zelllinie; Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
	HEK293-A1-E	Immortalisierte humane embryonale Nieren-Zelllinie mit stabiler Überexpression des humanen TRPA1; Herkunft: etabliert im Rahmen dieser Arbeit aus HEK293

4.3.2 Zellkulturmedium

Tab. 10: Liste der verwendeten Zellkulturmedien

D	DMEM Komplettmedium	DMEM, 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum); Lagerung bei 4°C, bei Benutzung Erwärmung bei 37°C im Wasserbad
E	Einfriermedium	90 % (v/v) FCS, 10 % (v/v) DMSO
L	LB-Medium	1 % (w/v) Trypton/Pepton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 17 mM NaCl, pH 7,5; 1:1000 Ampicillin (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 1 ml NaOH/1l)
R	RPMI 1640 Komplettmedium	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640, 10 % (v/v) FCS (Lagerung bei 4°C, bei Benutzung Erwärmung bei 37°C im Wasserbad)

4.3.3 Zellkulturreagenzien und Zellkulturmaterialien

Tab. 11: Liste der verwendeten Zellkulturreagenzien und Zellkulturmaterialien

A	Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
F	Fötales Kälberserum (FCS)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
P	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) PromoFectin (PromoKine)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe PromoCell, Heidelberg
T	0,05 % Trypsin-EDTA	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Z	Zellkulturmedien	siehe Tab. 10

Zellkulturplastikwaren wurden von Sarstedt, Nümbrecht bezogen, wenn nicht anders angegeben.

4.3.4 Zellkultur: Kultivierung von Suspensionszelllinien

Bei den kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien handelt es sich um nicht-adhärenente Zellen, die in Suspension in Zellaggregaten wachsen. Die Verdopplungszeit dieser Zelllinien ist unter idealen Wachstumsbedingungen (Brutschrank bei 37°C, Wasserdampf-gesättigte Atmosphäre mit 95 % Luft und 5 % CO₂) relativ kurz und liegt bei ca. 30 Stunden (h).

Für die Kultivierung aller Suspensionzelllinien wurden Kulturflaschen (75 cm² oder 175 cm², Polystyren (PS), mit Filterkappe) verwendet. Die Zellzahl wurde alle 2-3 Tage verringert, indem mit einer serologischen Pipette die einzelnen Zellaggregate zunächst vereinzelt und anschließend 9/10 der Zellen abgenommen und entsorgt wurden. Abschließend wurde die Flüssigkeitsmenge mit Vollmedium aufgefüllt.

4.3.5 Zellkultur: Kultivierung von adhärenenten Zelllinien

Neben den Suspensionszelllinien wurden auch adhärenente Zellen (alle anderen Zelllinien mit Ausnahme der kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bis

zur 85-95 %igen Konfluenz. Die Zeiträume, bis die Zellen dieses Stadium erreichten, waren hierbei von Zelllinie zu Zelllinie sehr unterschiedlich. Die Pankreaskarzinomzellen hatten die geringsten Verdopplungszeiten von nur 1-2 Tagen, die HEK293-Zellen dagegen die längsten von bis zu 3-4 Tagen. Alle anderen Zelllinien zeigten Verdopplungszeiten von 2-3 Tagen. Anschließend wurden die Zellen passagiert, indem sie mit Trypsin abgelöst wurden und nach Reduktion der Zellzahl auf 1/10 neues Medium zu den Zellen gegeben wurde.

4.3.6 Kryokonservierung

Um die Zellen für mehrere Jahre unbeschadet lagern zu können, wurden sie kryokonserviert. Bei diesem Einfrierprozess wird eine Zerstörung der Zellen aufgrund der Bildung von Wasserkristallen dadurch verhindert, dass die Zellen in einer DMSO (Dimethylsulfoxid)-haltigen Lösung mit einer Temperaturerniedrigung von 1°C/Minute eingefroren wurden.

Dafür wurde die jeweilige Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt, bei 600 x g für 6 Minuten zentrifugiert, der Überstand mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und eine der Zellmenge entsprechende Menge Einfriermedium zugegeben. Nach Resuspendierung mit einer serologischen Pipette wurde jeweils 1 ml Suspension in ein Mikroschraubröhrchen gefüllt und dieses in einem Isopropanoltank bei -80°C eingefroren. Die Dauerlagerung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff.

4.3.7 Bestimmung der Zellzahl

Für bestimmte Versuche war es notwendig die Zellanzahl zu bestimmen. Dafür wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet, wobei es sich um eine 30 mm x 80 mm große und etwa 5 mm dicke Glasplatte handelt, die über eine Mittelfläche mit eingezähtem Liniennetz (Zählfläche) verfügt. Ein dünnes, plangeschliffenes Glasplättchen wird auf die Glasstege gelegt, wobei ein definierter Abstand zwischen dem Deckglas und den Zählquadraten von 0,1 mm entsteht. Die Zellsuspension wird seitlich aufpipettiert, wodurch sie sich durch Kapillarkraft in den Zwischenraum ziehen kann. Die Auszählung erfolgte mit dem Durchlichtmikroskop (Zehnfach-Objektiv). Ausgezählt wurden jeweils die Zellen von vier Großquadraten mit einer Kantenlänge von 1 mm.

Dadurch ergibt sich die Zellzahl pro ml:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}} \times 10^4 \quad (4.1)$$

4.3.8 Transfektion von Zellen

Für die transiente Expression von TRPA1 in HEK293-Zellen wurden die Zellen in 6-Loch-Platten in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Loch ausgesät und über Nacht inkubiert. Für die Transfektion wurde das PromoFectin Reagenz der Firma PromoKine unter Anwendung des Protokolls des Herstellers benutzt. 1 μ g Plasmid-DNA (hTRPA1) wurde in jedes Loch transfiziert. Dabei wurden 3 μ l PromoFectin pro 1 μ g Plasmid-DNA (hTRPA1) zur Herstellung der PromoFectin-DNA-Komplexe eingesetzt. Das Medium wurde 6 Stunden nach der Transfektion gewechselt. Die Zellen wurden für 18 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Am dritten Tag wurden die Zellen stimuliert (siehe jeweilige Abbildung im Ergebnisteil).

4.3.9 Etablierung einer TRPA1-positiven Zelllinie

Die TRPA1-positive HEK293-Zelllinie wurde etabliert, indem stabil TRPA1-exprimierende Zellklone nach Ko-Transfektion von Zellen mit einem humanen TRPA1-Plasmid und einem Geneticin (G418)-Resistenz-Plasmid in G418-haltigem Medium selektioniert wurden. Zu diesem Zweck wurde 1 μ g des G418-Resistenz-Plasmids zusammen mit 100 ng des TRPA1-Plasmids ko-transfiziert. Die Zellen wurden anschließend in einer Verdünnungsreihe in einer 96-Loch-Multititerplatte in Gegenwart von 150 μ g/ml G418 ausgesät. Einzelzell-Klone, die unter diesen Bedingungen wuchsen, wurden isoliert und auf die Expression des TRPA1-Kanals hin untersucht. Klon E der G418-resistenten HEK293-Zellen (HEK-A1-E) zeigte eine TRPA1-Expression in "Western-Blots" und wurde für weitere Experimente verwendet. Die Zelllinie wurde in RPMI1640, welches 10 % FCS enthielt, kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert.

4.3.10 Behandlung von Zellen mit Zigarettenrauch-Extrakt ("cigarette smoke extract", CSE)

Die Generierung des CSE erfolgte freundlicherweise durch Dr. Gerrit John, Comprehensive Pneumology Center, München, der uns entsprechende Aliquots zur Verfügung stellte. Die CSE-Stammlösung wurde gewonnen, indem der Hauptstromrauch von drei normierten Referenzzigaretten (2RF4, University of Kentucky, Lexington) durch 500 ml serumfreies RPMI-1640 Medium (mit Phenolrot, ohne weitere Zusätze) geleitet wurde. Diese Stammlösung entspricht 100 % CSE. Das Extrakt wurde sofort nach Gewinnung portioniert und eingefroren und anschließend nur einmalig verwendet, da bei wiederholten Auftau-Zyklen oder Lagerung im Kühlschrank ein deutlicher Wirkungsverlust, offenbar durch Ausgasen volatiler Komponenten, zu verzeichnen war. In den Versuchen wurde die Lösung 1:50 mit Zellkulturmedium verdünnt (2 % CSE).

4.3.11 RNA-Interferenz (RNAi)-vermittelte Herunterregulierung von hTRPA1

Hierfür wurden Zellen in einer 24-Loch-Platte in einer Dichte von 100.000 Zellen/Loch ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Transfektion wurde mit Hilfe der "Acell small interference RNA"

(siRNA) von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dafür wurde das Zellkulturmedium mit dem "siRNA Delivery" Medium ausgetauscht und modifizierte siRNA wurden in einer finalen Konzentration von 1 μ M dazugegeben. Nach 72 Stunden wurde die mRNA-Expression von TRPA1 mittels quantitativer RT-PCR überprüft.

4.4 Patientenproben

Da SCLC-Tumore selten operativ entfernt werden können, stehen für Expressionsuntersuchungen lediglich Tumorbiopsien zur Verfügung. Das im Rahmen der vorliegenden Untersuchung vorhandene Tumormaterial reichte aber nicht aus, um Nachweise von TRPA1 auf Proteinebene durchzuführen. Daher wurde ein Nachweis der entsprechenden mRNA durch quantitative RT-PCR Analysen anhand von Tumorproben von neun Patienten, die sich an der Thoraxklinik des Universitätskrankenhauses Heidelberg einer Resektion für primären Lungenkrebs unterzogen, durchgeführt. Für einen Vergleich wurden darüber hinaus auch zwölf Proben aus gesundem Lungengewebe untersucht. Die Proben wurden im Rahmen einer Kooperation von Dr. Michael Meister, Thoraxklinik Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Alle Patienten hatten der Verwendung ihrer Proben für wissenschaftliche Forschungsuntersuchungen zugestimmt. Die Tumorklassifizierung erfolgte anhand der dritten Edition des Weltgesundheitsorganisation-Klassifizierungssystems. Verglichen wurden hierbei fünf SCLC- mit vier N-SCLC-Proben. Die N-SCLC-Proben bestanden aus einer squamösen Lungenkrebsprobe und drei Adenokarzinomproben. Der durchschnittliche Tumorzellgehalt lag bei 61,5 % in den N-SCLC-Proben und 58,8 % in den SCLC-Proben.

4.4.1 Isolierung der totalen RNA

Die Isolierung der totalen RNA wurde von Mitarbeitern der Thoraxklinik Heidelberg durchgeführt: Dafür wurden die RNAs der Patientenproben mit Hilfe des "Qiagen DNA/RNA Allprep Kits" nach Anleitung des Herstellers isoliert. Um eine Kontamination der Proben mit genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Proben zuvor mit DNase I inkubiert. Die RNA-Menge wurde mittels eines NanoDrop ND-1000 Spektrometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, MA, USA) vermessen. Die Integrität der totalen RNA wurde mit Hilfe eines "Agilent 2100 Bioanalyzer" und des "Agilent RNA 6000 Nano Kit" (Agilent Technologies, Boeblingen, Deutschland) bestätigt.

4.4.2 RNA-Transkription/cDNA-Synthese und quantitative RT-PCR

Die Umschreibung der RNA, die quantitative RT-PCR und die Auswertung der Ergebnisse wurden wie in Kapitel 4.7.2 und Kapitel 4.7.3 beschrieben, durchgeführt.

4.5 Proteintransfer-Immunnachweis ("Western-Blot")

4.5.1 Stimulierungen und anschließende Gewinnung von Zelllysaten

Um bestimmte Proteine mittels Antikörperfärbungen in der SDS-Page nachweisen zu können, mussten zunächst dem jeweiligen Versuchsziel entsprechende Zelllysate gewonnen werden. Der hierfür verwendete Probenpuffer (siehe Tab. 8) enthielt Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol. SDS ist ein anionisches Detergens, das die Eigenladungen von Proteinen effektiv überdeckt, so dass sich eine konstante negative Ladung pro Masseneinheit ausbildet. Außerdem unterbindet SDS die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb des Proteins. Um eine noch vollständigere Denaturierung der Proteine zu erreichen, wird dem Probenpuffer β -Mercaptoethanol zugesetzt, das nach Temperaturerhöhung zu einer Reduktion der Disulfidbrückenbindungen in den Polypeptidketten führt. Durch diese Prozesse gehen alle höheren Proteinstrukturen, also die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen, verloren, so dass das Protein in einer einheitlich geladenen linearisierten Form vorliegt und nur nach seinem Molekulargewicht aufgetrennt wird (sog. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) siehe auch 4.5.3).

Die Zellen wurden 24 Stunden lang in einer 24-Loch-Platte (1.5×10^6 Zellen/Loch) im Inkubator kultiviert. Anschließend wurde das Vollmedium durch serumfreies Medium ausgewechselt und für weitere 18–20 Stunden inkubiert, wodurch ein niedriger basaler Aktivierungszustand der Zellen erreicht wurde. Nach erfolgter Stimulierung der Zellen (für Details siehe die jeweiligen Abbildungsunterschriften im Ergebnisteil) wurde das Medium abgesaugt, jeweils 200 μ l Probenpuffer (zweifach konzentrierter Laemmli-Puffer, Rezept siehe Tab. 8) zugefügt und die Lysate mit Hilfe eines Zellschabers (16 cm, Klinge 1,7 cm, Sarstedt) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Lysate für 5 Minuten (min) bei 95°C aufgeköcht und entweder sofort auf ein Gel aufgetragen oder für die weitere Verwendung bei -20°C eingefroren.

4.5.2 Gewinnung von Lysaten für Caspase-"Western-Blots"

Die Gewinnung der Lysate für die Caspase-"Western-Blots" folgte erfolgte wie unter 4.5.1 beschrieben. Allerdings wurden die Zellen schon an Tag 1 in serumfreiem Medium in 24-Loch-Platten (0.5×10^6 Zellen/Loch) ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen stimuliert und für weitere 48 Stunden im Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden dann in 100 μ l Lysepuffer solubilisiert und wie in 4.5.1 beschrieben behandelt.

4.5.3 SDS-Page (Sodiumdodecylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Mit Hilfe des SDS-Page-"Western-Blot" ist es möglich, Proteine durch den Einsatz von Antikörpern nach Auftrennung in einem SDS-Gel und anschließendem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran nachzuweisen.

4.5.3.1 SDS-Page

Das Prinzip der Übertragung von Biomolekülen auf Membranen wurde 1971 von E. Southern für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und nachfolgende Hybridisierung entwickelt (Southern, 1975). In Anlehnung an seinen Namen wurde die Auftrennung von DNA-Fragmenten dann als "Southern"- und die Auftrennung von Proteinen als "Western-Blot" bezeichnet. Die diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, ein 1970 von U. Laemmli (Laemmli, 1970) eingeführtes Verfahren basiert auf einem Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem und ermöglicht die Fokussierung der Proteine bevor die Trennung stattfindet. Dies liegt unter anderem an der relativ großen Polyacrylamid-Porenweite des Sammelgels im Gegensatz zum kleinporigen Trenngel. Polyacrylamid ist ein Polymer, das aus Acrylamidmonomeren besteht, die durch das quervernetzende Reagenz N, N'-Methylenbisacrylamid ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Für die Vernetzung der beiden Monomere wird TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyldiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) benötigt. Das Sammelgel enthält außerdem Chloridionen. Diese werden als Leitonen bezeichnet, da sie, im Gegensatz zu den Proteinen, eine hohe Wanderungsgeschwindigkeit besitzen. Die im Laufpuffer enthaltenen Glycinionen haben dagegen nur eine sehr geringe Wanderungsgeschwindigkeit (Glycin liegt bei einem pH-Wert von 6,8 hauptsächlich ungeladen vor) und wirken daher als Folgeionen. Das Trenngel besitzt dagegen einen höheren pH-Wert von 8,8, so dass die im Laufpuffer enthaltenen Glycinionen hier eine negative Nettoladung erhalten und so schneller wandern als die Proteine. Aufgrund der elektrischen Spannung zwischen Leit- und Folgeionen können auch die sich dazwischen befindlichen Proteine schneller wandern. Es folgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in klar abgegrenzte Proteinbanden. Dabei wird die Eigenladung der Proteine durch das negativ geladene Detergens (SDS) vollständig überdeckt.

Das zur Auftrennung der Proteine verwendete Trenngel bestand aus einer Trenngellösung mit 9 % bzw. 12 % Acrylamid, in *Aqua monodest.* Um die Polymerisation zu starten, wurden TEMED und 30 mg/l Ammoniumpersulfat (APS) zugefügt. Die Trenngellösung wurde zwischen die Glasplatten bis zu zwei Drittel der Kammerhöhe gegossen und sofort mit Isopropanol (100 %) überschichtet. Durch die Überschichtung bildet sich eine ebene Trennlinie zum anschließend eingefüllten Sammelgel aus. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgenommen und eventuelle Rückstände mit *Aqua monodest.* abgewaschen. Die Sammelgellösung, die aus 5,7 % Acrylamid in *Aqua monodest.* bestand, wurde über das Trenngel geschichtet und ein Kamm mit zehn Kammern eingesteckt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Jede Geltasche wurde mit Hilfe einer Hamiltonspritze mit 20 µl Probenlösung gefüllt. Anschließend wurde für ca. 3 Stunden ein Strom von 20-25 mA an das Gel angelegt.

4.5.3.2 Proteintransfer-Immunnachweis ("Western-Blot")

1979 beschrieben die Arbeitsgruppen J. Renart et al. und H. Towbin et al. gleichzeitig das Verfahren des ElektrobloTTings (Renart et al, 1979; Towbin et al, 1979). Dabei werden die aufgetrennten und zu einer Bande fokussierten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix über das senkrecht zum Gel angelegte elektrische Feld eluiert und anschließend auf eine Membran transferiert.

Das hier verwendete Nass-Blot-Verfahren (engl.: "wet-blot") stellt eine besonders schonende Art des Transfers mit einer geringen Erwärmung des Proteins dar. Dafür wurden zunächst die Glasplatten abgenommen und das Sammelgel abgetrennt. Die Nitrocellulosemembran sowie die Filterpapiere und Schwämme, die für den "Western-Blot" benötigt wurden, wurden mit Transferpuffer (Rezept siehe Tab. 8) durchtränkt.

Gel und Nitrocellulosemembran wurden zwischen zwei Lagen Filterpapier in einen Kunststoffhalter eingelegt und in eine Transferkammer eingesetzt, die mit Transferpuffer gefüllt und mit Hilfe eines Kühlaggregates gekühlt wurde. Der Transfer erfolgte bei einem angelegten Strom von 280 mA (abhängig von der Proteingröße) und einer Dauer von 1 ½ bis 2 Stunden. Die Nitrocellulosemembran wurde nach erfolgtem "Western-Blot" 1 Stunde in Blockierlösung (Roti-Block, Roth, 1:10 in *Aqua monodest.*) auf einer Wippe bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper auf der Membran zu blockieren. Um die gesuchten Proteine zu detektieren, wurde anschließend die Blockierlösung kurz mit PBS abgespült und der Erstantikörper gegen das jeweilige Protein in der entsprechenden Antikörperverdünnungslösung (Tab. 12) auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Nach 2-stündiger Inkubation auf einer Wippe wurde dreimal jeweils 10 Minuten mit PBS bzw. TBS (Rezepte siehe Tab. 8) gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der jeweilige Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper auf die Membran gegeben, 1 Stunde auf der Membran belassen und dann zweimal mit PBST bzw. TBST und einmal mit PBS bzw. TBS für jeweils 15 Minuten gewaschen.

Chemilumineszenzsignale zur Detektion der von dem Antikörper erkannten Proteinbanden wurden durch eine Reaktion des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers mit dem benutzten Substrat (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit und SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate) erzeugt.

Tab. 12: Liste der verwendeten Antikörper und deren jeweilige Verdünnung

	Antikörper (Zielprotein)	Spezies	Verdünnung
Erst-Antikörper	Anti-P-ERK1/2-XP	Kaninchen	1:1000 in TBS
	Anti-P-ERK1/2	Maus	1:500 in PBS
	Anti-ERK2	Kaninchen	1:1000 in PBS
	Anti-Cleaved-Caspase 3	Kaninchen	1:1000 in TBS
	Anti-Procaspase 3	Kaninchen	1:1000 in TBS
	Anti- c-Fos	Kaninchen	1:1000 in PBS
	Anti-TRPA1	Maus	1:100 in TBST, 5 % (w/v) BSA
Zweit-Antikörper	Anti-Kaninchen	Schaf	1:5000 in PBST bzw. TBST
	Anti-Maus	Schaf	1:5000 in PBST bzw. TBST

Die Emission von Licht durch die Chemilumineszenzreaktion ist eine Folge des Übergangs eines Elektrons aus einem angeregten Zustand in den Grundzustand. Diese Freisetzung von Lichtquanten ist Enzym-vermittelt. In dem hier vorliegenden Fall katalysiert die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) die Oxidation von Luminol (einem zyklischen Diacylhydrazid). Das Luminol wird in einen angeregten Zustand versetzt. Bei Rückkehr in den Grundzustand werden Lichtquanten freigesetzt. Für die Detektion der Chemilumineszenzsignale kamen in dieser Arbeit zwei verschiedene Verfahren zur Anwendung. Zum einen wurden die Signale durch Auflegen eines Films (X-OMat UV-Film), der in einer Dunkelkammer entwickelt wurde (Entwicklerlösung: Dokumol, 1+5 in *Aqua monodest.*) nachgewiesen, zum anderen wurde ein Chemilumineszenzdetektionsgerät (Chemismart detection system, Peqlab Biotechnologie) eingesetzt.

Für die Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen die p42 MAPK auf die Membranen gegeben. Dieser Antikörper erkennt nur die unphosphorylierte Form des Proteins, die immer in der Zelle vorhanden ist. Die phosphorylierte Form (Phospho-ERK, P-ERK) wird dagegen nur durch Stimulierung der MAPK-Kaskade produziert. Zunächst mussten alte, noch gebundene Antikörper von der bereits benutzten Membran abgelöst werden. Die Membran wurde dazu über Nacht in Ablösepuffer inkubiert und danach dreimal mit PBST bzw. TBST und einmal mit PBS bzw. TBS für jeweils 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen erneut mit Blockierlösung geblockt und wie oben beschrieben weiter verfahren.

4.6 Quantifizierung der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$)

Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) führt in vielen Zellen zur Induktion oder Modulation wichtiger Signalkaskaden. In dieser Arbeit kamen zwei verschiedenen Calciumionenmessmethoden zum Einsatz.

4.6.1 Aequorin-Messungen

In den Zelllinien H69Aeq, H510Aeq und 8988tAeq wurde mittels eines lentiviralen Expressionssystems Aequorin als rekombinantes Apoprotein heterolog exprimiert. Aequorin gehört zu der Klasse der biolumineszenten Proteine, den Photoproteinen. Biolumineszenz ist eine spezielle Art der Chemolumineszenz (Lichtemission einer chemischen Reaktion, in der chemisch angeregte Moleküle in den elektronischen Grundzustand zurückfallen und Photonen emittieren), die in einigen lebenden Organismen natürlich vorkommt und hier für analytische Zwecke genutzt wurde. 1962 beschrieb O. Shimomura erstmals die Extraktion und Purifikation von Aequorin aus der Qualle *Aequorea victoria* sowie einige Eigenschaften des Proteins (Shimomura et al, 1962). Ein Jahr später zeigte er dann, wie Aequorin für die Messung physiologisch niedriger Calciumionenkonzentrationen genutzt werden kann (Shimomura et al, 1963). Es besteht aus einem Apoprotein und einer hydrophoben, prosthetischen Gruppe, dem Coelenterazin. Seine Polypeptid-Sequenz beinhaltet drei Ca^{2+} -Bindungsstellen und hat somit eine hohe Sensitivität für Calciumionen. Durch Bindung von Ca^{2+} findet eine Konformationsänderung innerhalb des Proteins statt, was zu einem Bruch der kovalenten Bindung zwischen dem Apoprotein und der prosthetischen Gruppe führt. Dabei zerfällt das Aequorin in Apoaequorin, Coelenteramid und CO_2 , wobei ein Photon emittiert wird. Die Höhe dieser Lichtemission ist direkt von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig (Chiesa et al, 2001; Prendergast, 2000; Roda et al, 2000). Durch Fusionierung von Aequorin an GFP (grün fluoreszierendes Protein) konstruierten Baubet et al. Ca^{2+} -sensitive Biolumineszenz-Reporter-Gene (Baubet et al, 2000), die die Quantenausbeute der Biolumineszenzreaktion erhöhen. Nach Ca^{2+} -Bindung wird die Energie, die durch Aequorin erzeugt wurde, von dem aktivierten Oxycoelenterazin strahlungsfrei auf das GFP übertragen. Auf diese Art und Weise wird das GFP Akzeptor-Fluorophor angeregt. Kehrt das angeregte GFP in seinen Grundzustand zurück, wird ein grünes Licht emittiert ($\lambda_{max} = 509$ nm). Glyzin-Reste als Abstandhalter zwischen GFP und Apoaequorin optimieren den Energietransfer, da der strahlungsfreie Energietransfer zwischen dem angeregten Oxycoelenterazin und dem GFP-Chromophor abhängig von der allgemeinen Geometrie des Moleküls ist.

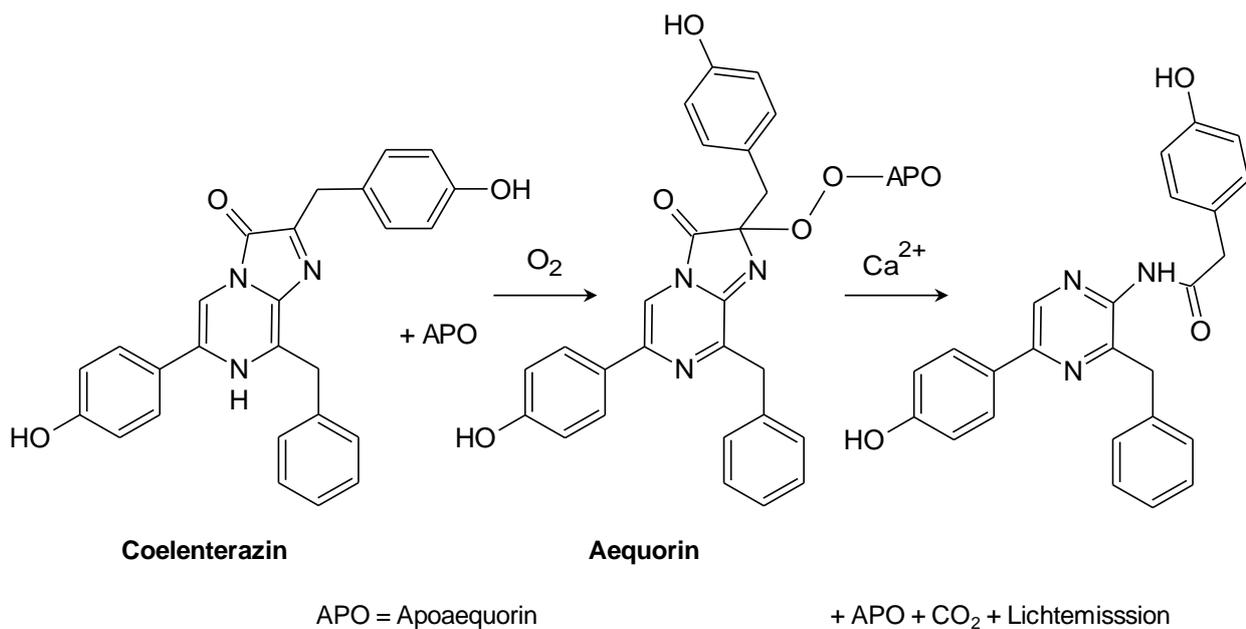


Abb. 17: *Biolumineszenzreaktion von Aequorin* adaptiert aus Roda et al. 2000. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Der Vorteil der Lumineszenzmessung liegt darin, dass durch eine spezifische Reaktion, an der der Analyt direkt beteiligt ist, Licht emittiert wird. Die Hintergrundemission ist sehr gering. Als Detektor dient ein Photomultiplier, der es ermöglicht, die geringe Lichtemission des Aequorins zu messen.

Die Zellen wurden mit Coelenterazin (1 μ l/1 ml) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, bei 600 x g für 6 Minuten zentrifugiert, der Überstand mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen in 2-2,5 ml HBS (Rezept siehe 4.2.8) dem 2 mM $CaCl_2$, 5,5 mM Glucose und 0,1 (w/v) % BSA zugesetzt wurde, resuspendiert, beziehungsweise für einige Messungen in Ca^{2+} -freiem HBS, resuspendiert. Jeweils 100 μ l der Zellsuspension/Loch wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (weißer Boden) pipettiert. Die Lumineszenzmessung wurde in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (FLUOstar Omega) durchgeführt. Das Gerät injizierte nach 20 Sekunden (s) automatisch 100 μ l HBS (Hintergrundmessung) bzw. 100 μ l des jeweiligen Stimulus dazu. Nach 50 Sekunden wurden die Zellen durch 20 μ l und nach 75 Sekunden durch weitere 80 μ l 0,5 % Triton in HBS (+ 2 mM Ca^{2+}) vollständig lysiert. Darüber hinaus wurden auch Messungen durchgeführt, bei welchen den mit Coelenterazin behandelten und in HBS resuspendierten Zellen verschiedene Inhibitoren zugesetzt wurden. Dabei wurden sowohl Proben, die mit Inhibitor behandelt wurden, als auch solche ohne Inhibitorvorbehandlung vermessen.

4.6.2 Fura-2-AM-Messungen

Fura-2 ist ein fluoreszierender Ca^{2+} -Chelator. Er wurde 1985 von R. Tsien et al. entwickelt (Tsien et al, 1985). Nach Bindung von Calciumionen (bei fast identischem Emissionsspektrum) wird das Exzitationsmaximum von 380 nm nach 340 nm verschoben. Der isobestische Punkt, also die Wellenlänge, die gegenüber Calciumionenkonzentrationen indifferent ist, liegt je nach verwendetem optischen Apparat zwischen 358 nm und 362 nm.

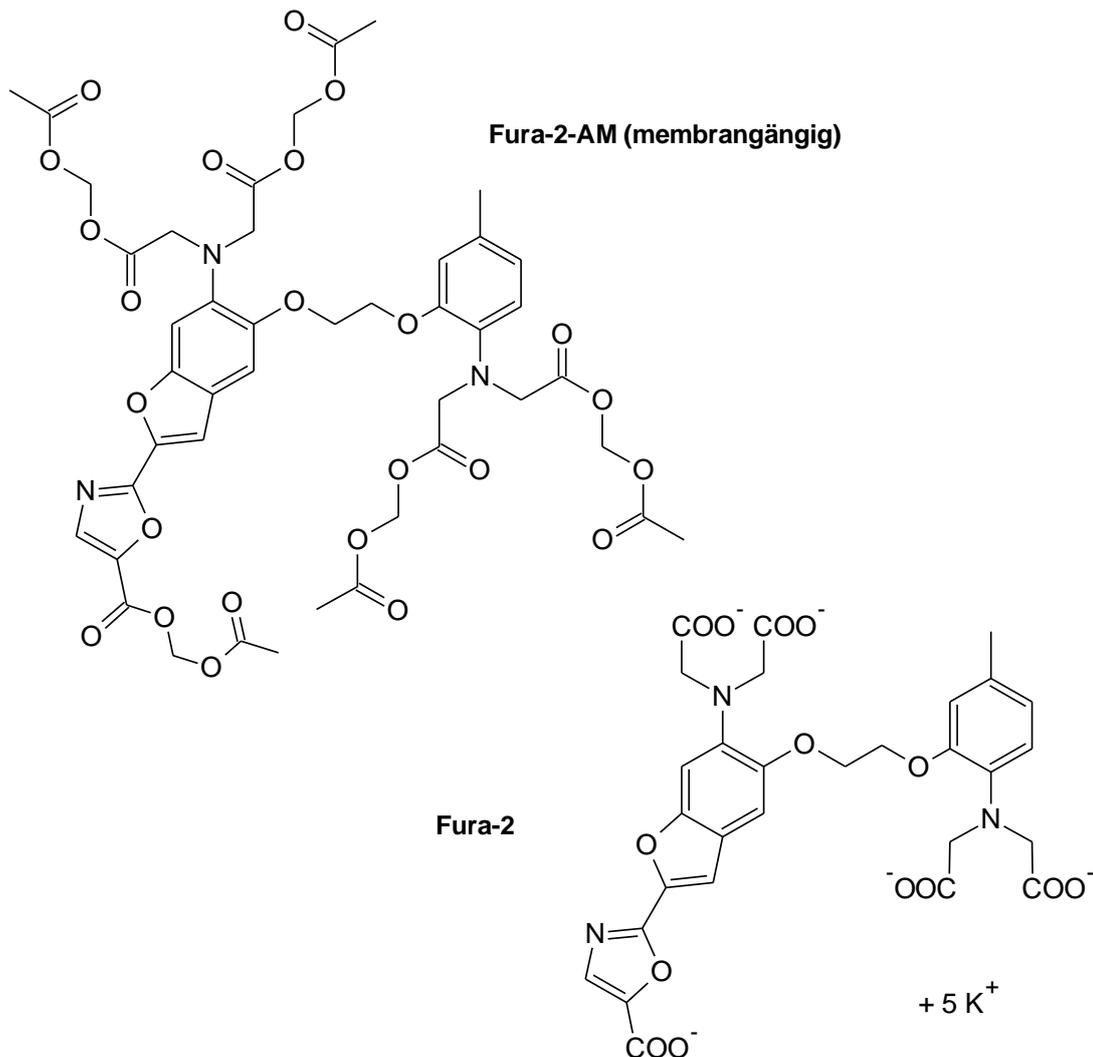


Abb. 18: Strukturformeln des membrangängigen Fura-2-AM und Fura-2.

Da Fura-2 selbst nicht membrangängig ist, werden die Zellen mit dem lipophileren Ester Fura-2-AM (Fura-2-Acetoxy-methylester), bei dem alle vier Carbonsäurereste zum lipophilen Acetoxy-methylester derivatisiert sind, inkubiert. Im Zytosol wird der Ester dann wieder durch ubiquitär exprimierte Esterasen zum freien Fura-2 verseift, indem die Acetoxy-methylester abgespalten werden. Dies verhindert darüber hinaus auch das erneute Austreten des hydrophilen Fura-2 aus der Zelle.

Die $[Ca^{2+}]_i$ ist Proportional zum Quotienten aus der Fluoreszenzintensität bei 340 nm und der Fluoreszenzintensität bei 380 nm:

$$[Ca^{2+}]_i \sim \frac{F(340 \text{ nm})}{F(380 \text{ nm})} \quad (4.2)$$

$F(340 \text{ nm})$ = absolute Fluoreszenzintensität bei 340 nm

$F(380 \text{ nm})$ = absolute Fluoreszenzintensität bei 380 nm

In vorliegender Arbeit wurde bei Bestimmungen der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Fura-2 der gemessene Ausgangswert (in unstimulierten Zellen) des Fluoreszenzquotienten auf 1 normiert und die im folgenden Beobachtungszeitraum gemessenen Quotienten auf diesen Wert bezogen.

Um die Zellen mit Fura-2 zu beladen, wurde die Zellsuspension mit 1,25 μM Fura-2-AM für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 6 Minuten bei 600 x g zentrifugiert und in dem Aequorin-Assay Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (Glasboden) in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/Loch pipettiert und die Fluoreszenzmessung wurde in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (FLUOstar Omega) durchgeführt. Die jeweiligen Agonisten wurden automatisch nach 10 Sekunden injiziert. Fluoreszenzsignale wurden für mindestens 30 Sekunden nach Agonistenzugabe gemessen.

4.7 RNA-Isolierung und quantitative, reverse Transkription (RT) PCR

4.7.1 RNA-Isolierung

Die Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode ist eine Einschnitt-Flüssigphasen-Separation, die 1987 von der Arbeitsgruppe P. Chomczynski und N. Sacchi erstmals beschrieben wurde (Chomczynski & Sacchi, 1987).

Für die RNA-Isolierung wurde dem Standardprotokoll der Firma Sigma gefolgt. Das hierbei verwendete TRI-Reagent enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat (GITC) in einphasiger Lösung. GITC ist ein chaotropes Salz, das auf Proteine eine denaturierende Wirkung ausübt. Phenol denaturiert ebenfalls im Zelllysat enthaltene Proteine, die in der Interphase zwischen der wässrigen Nukleinsäurelösung und der Phenolphase ausfallen. Für die RNA-Isolierung wird saures Phenol verwendet, welches nur in Wasser äquilibriert wurde, um mögliche DNA-Kontaminationen besser zu lösen. Chloroform verfügt ebenfalls über eine denaturierende Wirkung und festigt die instabile Phasengrenze zwischen der wässrigen Phase und der Phenolphase. Ein grundsätzliches

Problem stellen bei der RNA-Isolierung RNasen dar. Dies sind äußerst stabile Enzyme, die die Hydrolyse von Ribonukleinsäuren in kleinere Fragmente katalysieren und durch Autoklavieren nicht vollständig inaktiviert werden können. Zur Isolierung der RNA dürfen deshalb nur hochreine Puffer verwendet werden, in denen mit Hilfe von Diethylpyrocarbonat (DEPC) das aktive Zentrum der RNasen durch kovalente Modifikation vor allem der Histidinreste zerstört wurde. Daher wurde das für die Isolierung notwendige Wasser zunächst mit DEPC (1:100) behandelt, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend autoklaviert. Darüber hinaus wurden auch alle Isolierungsschritte auf Eis durchgeführt, um die Reaktivität der RNasen zu vermindern.

Zur RNA-Isolierung wurden adhärente Zellen (2×10^5 Zellen pro Ansatz) nach Aussaat zunächst für 24 Stunden in 6-Loch-Platten bei 37°C kultiviert, bis die Zellen wieder angewachsen waren. Suspensionszellen (2×10^5 Zellen pro Ansatz) wurden direkt in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 6 Minuten bei $600 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgenommen und 1 ml TRI-Reagent dazupipettiert. Im Falle der adhärennten Zellen wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Alle folgenden Versuchsschritte wurden auf Eis fortgesetzt. Die Zellsuspension wurde mit Chloroform (20 % Endkonzentration = $300 \mu\text{l}$ pro ml TRI-Reagent) überschichtet und die Proben anschließend gut geschüttelt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei $10.000 \times g$ in der Kühlzentrifuge bei 4°C , wodurch eine Phasentrennung erfolgte: Die untere, im Reaktionsgefäß befindliche Phase bildet die nicht-wässrige Phenol-Chloroform-Phase, in der sich der Hauptanteil der Proteine befindet. Diese ist durch eine Interphase, in der sich die genomische DNA sammelt, von der oberen, farblosen, wässrigen Phase getrennt. In dieser wässrigen Phase befindet sich die RNA. Dieser Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Nach Zusatz eines äquivalenten Volumens Isopropanol wurde die Probe erneut geschüttelt und bei -20°C für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt, bei dem für 20 Minuten bei $12.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert wurde. Nachdem das Lösungsmittel abdekantiert worden war, erhielt man ein durchsichtiges Pellet. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils $500 \mu\text{l}$ 75 %igem Ethanol und Zentrifugation bei $13.000 \times g$ und 4°C für jeweils 5 Minuten wurde das Ethanol vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet bei Raumtemperatur angetrocknet. Das fast trockene Pellet wurde dann in $20 \mu\text{l}$ *Aqua monodest.* aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

4.7.2 RNA-Transkription/cDNA-Synthese (reverse Transkription, RT)

Um aus RNA die komplementäre cDNA herzustellen, die für die folgende PCR benötigt wird, kann ein Enzym, die reverse Transkriptase, verwendet werden. (Sambrook & Gething, 1989). Reverse Transkriptasen sind Enzyme, die in der Natur von Retroviren genutzt werden, um DNA aus viraler RNA herzustellen. Unter den richtigen Reaktionsbedingungen ist die durch die reverse

Transkriptase hergestellte relative Menge cDNA proportional zu der relativen Menge der vorgelegten RNA.

Hierfür wurden 2 µg Gesamt-RNA und 1 µl "random-hexamer Primer" mit DEPC-Wasser auf 12,5 µl aufgefüllt und in einem kleinem Reaktionsgefäß (100 µl, Eppendorf, Hamburg) auf Eis gemischt. Anschließend wurde bei 70°C für 5 Minuten inkubiert und das Reaktionsgefäß dann auf Eis abgekühlt. Danach wurden 4 µl 5 x Reaktionspuffer dazugegeben sowie 2 µl dNTP-Mix und 0,5 µl Ribonukleaseinhibitor. Bei Raumtemperatur wurde für 5 Minuten inkubiert und anschließend 200 Einheiten = 1 µl reverse Transkriptase dazugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 25°C und einer 60-minütigen Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion durch Denaturierung der reversen Transkriptase gestoppt (10-minütige Inkubation bei 70°C). Die so erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

4.7.3 Quantitative PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: "polymerase chain reaction", PCR) ist eine in den 1980er Jahren von K. Mullis entwickelte Methode zur Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten (Mullis & Faloona, 1987). Dafür werden mehrere Komponenten benötigt: zum einen die Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält, und zum anderen zwei kurze, sequenzspezifische Oligonukleotide, sog. "Primer", um auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festzulegen, wodurch der zu vervielfältigende Bereich von beiden Seiten begrenzt wird. Darüber hinaus sorgt die DNA-Polymerase für eine Replikation des durch die Oligonukleotide festgelegten Abschnitts. Weiterhin werden der Reaktionsmischung Desoxynukleosidtriphosphate zugesetzt, die Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang. Die Amplifikation der cDNA geschieht in drei Schritten: Im ersten Schritt wird die Reaktion durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C gestartet, wodurch die DNA, die normalerweise in einer hochmolekularen Struktur vorliegt, in ihre Einzelstränge denaturiert wird. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, gelöst. In einem zweiten Schritt folgt die Anlagerung (engl.: "Annealing") der Oligonukleotide. Dafür werden die Proben auf eine durch die Oligonukleotide festgelegte Temperatur abgekühlt, so dass sich die Oligonukleotide an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Anschließend folgt eine erneute Temperaturerhöhung auf 72°C, die für die schnelle Verlängerung (Extension) der Oligonukleotide notwendig ist. Sie muss auf das jeweilige Enzym abgestimmt sein. Ein erneutes Aufheizen der Proben auf 95°C führt wieder zu einer Zerlegung der DNA in ihre Einzelstränge und ein erneuter Zyklus wird eingeleitet. 55 Zyklen sind ausreichend, um genügend Produkt für weitere Analysen zu erhalten. Bei einer quantitative PCR, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, bietet sich zusätzlich die Möglichkeit einer Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus (Valasek & Repa, 2005). Die

Fluoreszenz nimmt dabei durch Einlagerung und Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes (z. B. SYBRGreen) nur in die doppelsträngige DNA proportional zur Menge des PCR-Produktes zu und ermöglicht so eine Quantifizierung. Eine sog. Schmelzkurvenanalyse bietet zudem die Möglichkeit, die Fragmentlängen der PCR-Produkte zu bestimmen und eventuell aufgetretene Oligonukleotiddimere zu identifizieren. Dabei werden die DNA-Doppelstränge durch langsame, aber kontinuierliche Temperaturerhöhung in Einzelstränge überführt. So wird bei einer für das jeweilige Fragment spezifischen Temperatur der Doppelstrang erneut aufgebrochen, der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und so eine Abnahme der Fluoreszenz registriert. Die doppelsträngige DNA spezifischer PCR-Produkte verfügt über einen höheren Schmelzpunkt als unspezifische entstandene Oligonukleotiddimere, so dass eine Unterscheidung möglich ist. Der Schmelzpunkt eines PCR-Produktes ist abhängig von dessen Länge und Nukleotidzusammensetzung. Bei einer unspezifischen Amplifikation entstehen in der Regel mehrere PCR-Produkte, so dass auch unterschiedliche Schmelzpunkte detektiert werden.

Für jedes Oligonukleotid ("Primer") wurden 5 µl Absolute SYBR Capillary Mix mit 4 µl cDNA (1:100 mit *Aqua monodest.* vorverdünnt) vermischt und in eine 96-Loch-PCR-Platte (LightCycler, Roche Applied Science) zusammen mit 1 µl (10 pmol) "Primer" pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen, bei 3000 x g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in den Lightcycler (LightCycler 480, Roche Applied Science) eingesetzt. Folgende Bedingungen wurden gewählt: 15 Minuten initiale Aktivierung und 55 Zyklen von jeweils 10 Sekunden bei 95°C, 10 Sekunden bei 55°C und 10 Sekunden bei 72°C. Die Fluoreszenzintensitäten wurden nach dem Extensionsschritt (Verlängerung) bei 72°C in jedem Zyklus aufgezeichnet. Die sog. "Crossing points", der PCR-Zyklus, ab dem ein Schwellenwert der Fluoreszenzänderung überschritten wurde, wurden von der Computersoftware ausgewertet und die relative Genexpression wurde über folgende Formel quantifiziert:

$$2^{(\text{crossing point of } \beta\text{-actin} - \text{crossing point } X)} \times 100 = \% \text{ der Expression des Referenzgens} \quad (4.3)$$

4.8 Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA zu isolieren und aufzureinigen, wurde das Prinzip der alkalischen SDS-Lyse von Bakterien (siehe (Birnboim & Doly, 1979)) sowie eine anschließende Plasmid-DNA-Isolierung aus dem Bakterienlysat mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule und Elution genutzt. Die Anionenaustauschersäulen bestehen aus Methylaminoethanol-gekoppelten Silikakügelchen. Die im sauren pH-Bereich positiv geladene Methyl-Hydroxyethyl-Aminogruppe ist in der Lage, mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Die

gebundene DNA kann nun mit einem Hochsalzpuffer eluiert werden. Proteine, RNA und chromosomale DNA werden hingegen nur schwach gebunden und können so durch Waschen der Säule vor der eigentlichen Elution entfernt werden.

Um kompetente Bakterien (*E. Coli*) zu transformieren, wurden zunächst Kryopräservate von ca. 10^8 Bakterien in 30 μ l Glycerolhaltigem Nährmedium (20 % Glycerol v/v) langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde für jede Transformation die Bakteriensuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Ca. 1 μ l (10-50 ng) Plasmid DNA wurden zu den Bakterien gegeben und vorsichtig vermischt. Die Reaktionsgefäße wurden daraufhin für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in einem 42°C warmen Wasserbad für 40 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt und dann erneut für 2 Minuten auf Eis gestellt. Dann wurden 950 μ l vorgewärmtes LB-Medium zu den Zellen gegeben und die Reaktionsgefäße bei 37°C für 1 Stunde bei 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden 20 μ l von jedem Transformations-Ansatz auf vorgewärmte Agarplatten ausgestrichen. Diese enthielten das jeweilige Antibiotikum (z. B. 200 μ g/ml Ampicillin), dessen Resistenzgen auf dem Plasmid kodiert ist. Das Antibiotikum führt zu einem Selektionsdruck, so dass sich nur die Bakterien, die das Plasmid mit dem Resistenzgen replizieren, vermehren können. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, nach Wachstum der Bakterienkolonien am nächsten Tag mit Parafilm verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Plasmidproduktion wurde in einem 1 l Erlenmeyerkolben, der mit 200 ml autoklaviertem LB-Medium gefüllt sowie mit Ampicillin (200 μ g/ml) versehen war, eine Übernachtskultur angesetzt. Dafür wurde mit einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig eine Bakterienkolonie berührt und diese in den Erlenmeyerkolben überführt. Die Bakterien wurden dann bei 37°C und 280 rpm in einem Schüttelinkubator bis zum nächsten Morgen inkubiert.

Die Plasmid-Isolierung und -Aufreinigung wurde mit dem Reagenziensatz und nach der Anleitung der Firma Macherey-Nagel (NucleoBond Xtra Midi Reagenziensatz) durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C für 15 Minuten pelletiert (Sorvall Zentrifuge). Der Überstand wurde abdekantiert und das Sediment in 8 ml Resuspensionspuffer (Puffer RES) erneut in Suspension gebracht. Mit Hilfe eines NaOH-haltigen SDS-Puffers (LYS-Puffer; 8 ml) wurden die Bakterien lysiert. Dabei kam es zu einer Denaturierung von Proteinen und DNA. Durch Zugabe von RNase A im verwendeten Puffer kam es darüber hinaus auch zu einer Degradierung von vorhandener RNA. Anschließend folgte eine 5-minütige Inkubation der Bakterien im Lysepuffer. Durch Zugabe von je 8 ml kaliumhaltigen Neutralisationspuffers (Puffer NEU) sowie Schütteln der Proben wurde SDS zu Kaliumdodecylsulfat präzipitiert. Vorhandene Proteine, chromosomale DNA und Zellreste wurden dabei ebenfalls ausgefällt. Die Plasmid-DNA bleibt hierbei aber in Lösung. Die weiteren Aufreinigungsschritte erfolgten anhand von Säulen. Diese Säulen wurden mit einem Filter versehen, mit Äquilibrierungspuffer (Puffer EQU) durchfeuchtet und anschließend mit der Lösung, die noch die Präzipitationsprodukte enthielt, beladen. Die

Flüssigkeit wurde vollständig durch den Filter laufen gelassen. Lysatreste wurden mit 5 ml EQU-Puffer aus dem Filter heraus gespült. Der Filter wurde entfernt und entsorgt und die Säulen mit je 8 ml Waschpuffer (WASH) gewaschen. Die nun an die Säule gebundene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 8 ml eines alkalischen Hochsalzelutionspuffers (ELU) gelöst und aufgefangen. Die DNA wurde durch Zugabe von je 3,5 ml Isopropanol präzipitiert. Durch Invertieren der Reaktionsgefäße wurden die Lösungen gut vermischt und auf jeweils zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach einer 2-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein Zentrifugationsschritt bei 5000 x g für 15 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Der entstandene Niederschlag wurde in zwei Waschschrritten mit je 1 ml 70 %igem Ethanol und jeweiliger Zentrifugation gereinigt. Das DNA-Sediment wurde anschließend an der Luft trocknen gelassen und je nach Größe des Sedimentes dann in einer entsprechenden Menge TE-Puffer aufgenommen und gelöst. Die Kontrolle des DNA-Gehaltes erfolgte photometrisch.

4.9 Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA

Durch Extinktionsmessung im Photometer kann die RNA-oder DNA-Konzentration und -Reinheit bestimmt werden. Dafür wurde die Probe 1:100 mit RNase-freiem *Aqua monodest.* verdünnt. Die Extinktion wurde bei 260 nm in einer Quarzküvette gegen den Leerwert gemessen.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann anhand der gemessenen Absorption die DNA- bzw. RNA-Konzentration berechnet werden.

$$A = \varepsilon \times c \times d \quad (4.4)$$

A = Absorption bei 260 nm

ε = Absorptionskoeffizient ($\varepsilon = 50$ für DNA und $\varepsilon = 40$ für RNA)

c = Konzentration

d = Schichtdicke der Quarzglasküvette

Da das Extinktionsmaximum der RNA bei 260 nm (A_{260}), das von Proteinverunreinigungen aber bei 280 nm (A_{280}) liegt, ist der Quotient dieser beiden Parameter ein Maß für die Reinheit der RNA.

4.10 Methoden zur Bestimmung von Zellapoptose, Zellproliferation und Zellviabilität

Die Bestimmung von Zellapoptose, Zellproliferation und Zellviabilität sind in der Tumorforschung von besonderem Interesse. In den letzten Jahren wurden viele neue, hochempfindliche und quantitative Methoden entwickelt, um diese Zelleigenschaften zu erfassen. Neben Methoden, die radioaktiv markierte Substanzen verwenden (z. B. Einbau von $[^3\text{H}]$ -Thymidin), stehen auch Lumineszenz-basierte sowie kolorimetrische Analyseverfahren zur Verfügung.

4.10.1 Tetrazolium-(XTT) Verfahren

Dieses nicht-radioaktive, kolorimetrische Analyseverfahren zur Bestimmung der Zellviabilität wurde 1988 erstmals in der Arbeitsgruppe D. Scudiero et al. verwendet, um die Medikamentensensitivität von Tumorzellen zu quantifizieren (Scudiero et al, 1988). In den darauffolgenden Jahren wurde es von verschiedenen Arbeitsgruppen weiterentwickelt und verbessert (Roehm et al, 1991). Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es möglich, eine spektrometrische Quantifizierung der Viabilität vorzunehmen und so die Zellreaktion auf Wachstumsfaktoren, Zytokinen etc. zu messen bzw. auch die Zytotoxizität von Testsubstanzen zu bestimmen.

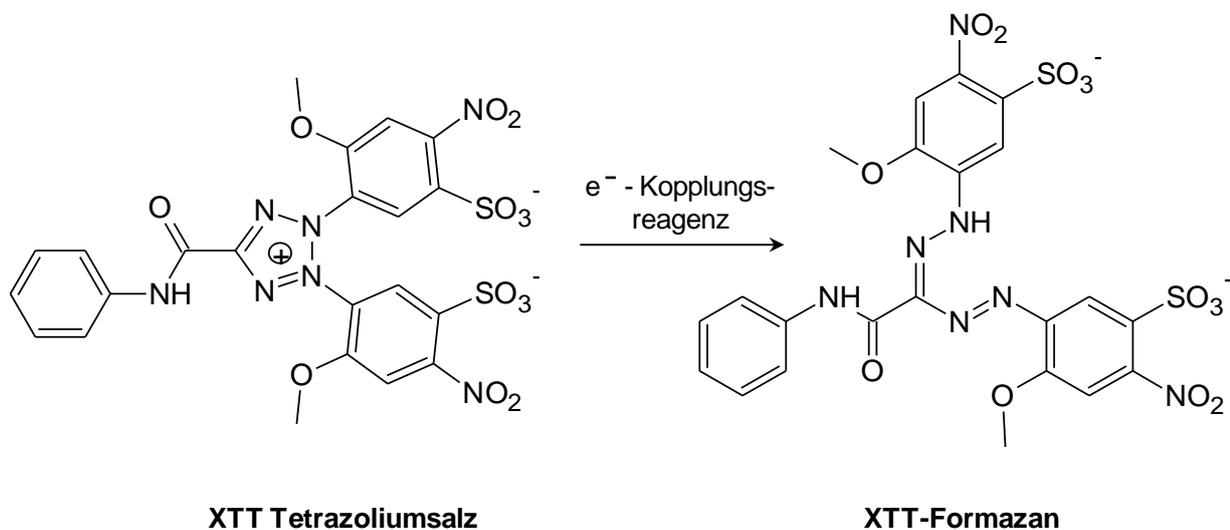


Abb. 19: Strukturformeln und Umwandlungsreaktion von XTT zu einem Formazan. Adaptiert aus Scudiero et al. 1988.

Metabolisch aktive Zellen setzen in den Mitochondrien einen Farbstoff um: gelbes Monotetrazoliumsalz (4-Methoxy-5-(3-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-(phenylcarbamoyl)tetrazol-3-ium-2-yl)-2-nitrobenzensulfonat, XTT) wird zu einem orangefarbenen, wasserlöslichen Farbstoff (5-((2Z)-2-(2-anilino-1-((2-methoxy-4-nitro-5-sulfonatophenyl)diazenyl)-2-oxoethyliden)hydrazinyl)-4-methoxy-2-nitrobenzensulfonat, XTT-Formazan) umgewandelt. Diese Reduktion geschieht durch Dehydrogenasen im Komplex I der

Atmungskette (siehe (Rich et al, 2001)). Zwischenstufe ist ein kurzlebiges Tetrazoliumradikal, das durch Elektronenaufnahme zu Formazan weiterreagiert. Die Absorption des Formazans kann bei 450 nm im Spektrophotometer quantifiziert werden und basiert auf der Annahme, dass die Absorption proportional zu der Anzahl metabolisch aktiver Zellen ist. Somit ist die Orangefärbung ein Maß der Zellviabilität.

Hierfür wurden die Zellen in 96-Loch-Platten in einer Dichte von 25.000 Zellen/Loch in serumfreiem Medium ausgesät und für mindestens 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit den jeweiligen Agonisten und gegebenenfalls Inhibitoren stimuliert und für weitere 48 Stunden inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und 100 µl frisch angesetzte XTT-Reagenzienlösung (900 µl HBS, 750 µl "XTT labeling reagent" (1 mg/ml XTT Benzensulfonsäurehydrat in RPMI 1640 ohne Phenolrot) und 12 µl "XTT electron coupling reagent" (1,25 mM N-Methyldibenzopyrazinmethylsulfat in PBS) in jedes Loch pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Spektrophotometer gegen einen Leerwert vermessen.

4.10.2 β -Galaktosidase-Seneszenz-Färbung

Die Seneszenz bezeichnet einen Zellzustand ohne Replikation. Dies bedeutet, dass die Zelle zwar noch metabolisch aktiv ist, allerdings in einem Stadium ohne Teilung arretiert ist (Goldstein, 1990). Eine seneszente Zelle zeichnet sich vor allem durch einen vergrößerten Zellumfang, eine erhöhte pH-Abhängigkeit der β -Galaktosidaseaktivität und eine Veränderung des Genexpressionsmusters aus. Die lysosomale β -Galaktosidase nicht-seneszenter Zellen hat normalerweise ein Optimum bei pH 4. Bei seneszenten Zellen dagegen ist auch bei pH 6 eine β -Galaktosidaseaktivität nachweisbar (Itahana et al, 2007). Mit diesem Assay ist es möglich eine optische Unterscheidung von seneszenten zu nicht-seneszenten Zellen vorzunehmen. Das zugegebene β -Galaktosidase-Substrat färbt sich pH-abhängig (nach Zugabe der Färbelösung) im Zytoplast seneszenten Zellen, und damit in Anwesenheit der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase, blau.

Für die Durchführung des Assays wurden die Zellen zunächst in 6-Loch-Platten ausgesät, für 24 Stunden inkubiert und anschließend in serumfreiem Medium weiterinkubiert. Nach 18 Stunden erfolgte dann die Stimulierung mit den jeweiligen Aktivatoren. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen in PBS gewaschen und bei Raumtemperatur mit einer Fixierlösung (2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in PBS) fixiert. Darauf folgten zwei 5-minütige Waschschrte mit PBS und eine Inkubation der fixierten Zellen mit je 1 ml einer frisch angesetzten β -Galaktosidase-Färbelösung (1 mg 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) pro ml (Stock 20 mg X-Gal in 1 ml DMF); 40 mM Zitronensäure; Natriumphosphatpuffer pH 6; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 5 nM Kaliumferricyanid; 5 nM Kaliumferrocyanid). Die 6-Loch-Platten wurden dann über Nacht in einem CO₂-freien 37°C-Schrank inkubiert. Am darauf folgenden Morgen

konnten die Zellen unter einem Durchlichtmikroskop auf eine Blaufärbung hin untersucht werden. Um die Zellen dauerhaft zu konservieren wurde die Färbelösung abgenommen und die fixierten Zellen mit 70 %igem Glycerol überschichtet und bei 4°C gelagert.

4.10.3 Bestimmung der Calpain-Aktivität

Die Aktivitäten von Calpain I und II wurden mittels Lumineszenzmessungen bestimmt. Die schnelle Inaktivierung von Calpainen nach Aktivierung durch Calciumionen macht sie zu schwer untersuchbaren Zielstrukturen und limitiert die Sensitivität und Nutzbarkeit von traditionellen fluorimetrischen und kolorimetrischen Analysen. Calpaine gehören zu einer Familie von Ca^{2+} -aktivierten Cystein-Proteasen und sind an der Spaltung verschiedener Proteine beteiligt. Beispielsweise spielen sie im Ca^{2+} -Signalweg eine wichtige Rolle, wo sie die biologischen Aktivitäten ihrer Substrate durch Proteolyse modulieren. Ihnen wurde eine Beteiligung an einer ganzen Reihe von Ca^{2+} -regulierten zellulären Prozessen zugesprochen, wie beispielsweise Zellmotilität, Zellzyklusprogression, Zellproliferation, Apoptose, Nekrose, Differenzierung und Membranfusion. Darüber hinaus sollen sie auch an zahlreichen pathologischen Zuständen beteiligt sein. Sie könnten daher auch als therapeutische Zielstrukturen dienen.

Die Analyse mit Hilfe der Calpain-Glo Protease-Methode beinhaltet ein Calpain-Substrat (Suc-LLVY-amino-Luciferin). Bei Anwesenheit von Calpain I oder Calpain II in den Proben kommt es durch Calpain-Spaltung des Substrates zu einem Lumineszenzsignal, das durch die Luciferase Reaktion produziert wird und proportional zu der vorhandenen Calpain-Aktivität ist.

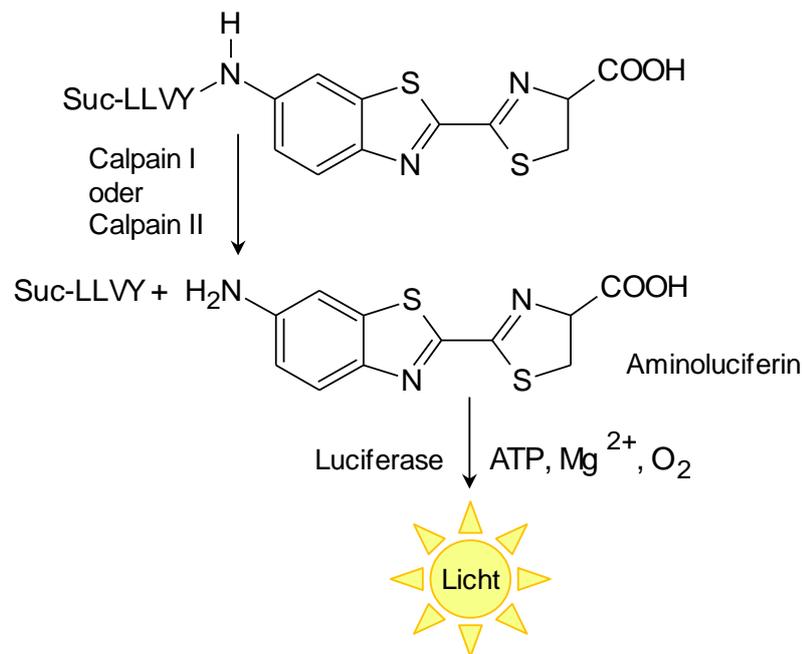


Abb. 20: Mechanismus der Lichtfreisetzung durch die Calpain-Glo Protease-Methode. Adaptiert aus der technischen Vorschrift von Promega, Abbildung 1 Seite 2.

Die verwendeten Reagenzien stammen von der Firma Promega und es wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Hierfür wurden die Zellen auf eine Poly-L-Lysin beschichtete 6-Loch-Platte in serumhaltigem Medium ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten ein Mediumwechsel und eine weitere Inkubation für mindestens 18 Stunden im Brutschrank. An Tag drei wurden die Zellen mit den entsprechenden Agonisten für 30 Minuten stimuliert und die Zellen nach Mediumabnahme mit je 400 µl Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 6,8-8,5; 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 % Triton-x-100), dem ATP zugesetzt war (1 mM) lysiert. Dann wurden die Zelllysate in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und kurz anzentrifugiert. Auf eine weiße 96-Loch-Platte mit undurchsichtigem Boden wurden 40 µl Lysat/Loch pipettiert und 50 µl/Loch "Glo-Mix" hinzugegeben. Dieser wurde aus 10 ml Calpain-Glo-Puffer und Luciferin-Detection-Reagenz sowie 100 µl Suc-LLVY-"Glo-Substrat" hergestellt und für maximal 1 Monat bei -20°C gelagert. Die Platte wurde nach 20 Minuten Inkubation in einem Lumineszenzdetektionsgerät vermessen.

4.10.4 Analyse des Tumorwachstums im semi-soliden Medium ("Soft-Agar")

Die Analyse mittels semisolidem Medium bietet gegenüber den anderen in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsverfahren zur Bestimmung des Zellwachstums den Vorteil, dass sie eine stärkere Annäherung an die *in vivo* Situation ermöglicht. Die Tumorzellen adhären nicht an einem Kunststoffboden, sondern werden in eine agarhaltige Matrix eingegossen, wodurch sie die Möglichkeit zur Koloniebildung erhalten. Zellen, die aus gesundem Gewebe gewonnen wurden, benötigen die Adhäsion an die Zellkulturflasche, um proliferieren zu können. Dies ist bei malignen Tumorzellen nicht der Fall.

Zur Vorbereitung des Assays wurden eine 6 %ige Agarlösung (1,5 g Agar in 25 ml *bidestilliertem* Wasser gelöst) und eine 3 %ige Agarlösung (0,75 g Agar in 25 ml *bidestilliertem* Wasser gelöst) hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert. Anschließend wurde die untere Agarschicht, die als Nährschicht für die Zellen dient, unter sterilen Bedingungen gegossen, indem der 6 %ige Agar in der Mikrowelle verflüssigt und anschließend in einem Wasserbad bei 50°C flüssig gehalten wurde. Im nächsten Schritt wurden 9 ml Medium in ein 50 ml Röhrchen gegeben und auf 37°C erhitzt. Anschließend wurde zu dem Medium 1 ml verflüssigter 6 %iger Agar gegeben und in eine 6-Loch-Platte pro Loch 1 ml der Mischung möglichst blasenfrei hineinpipettiert. Das Aushärten der Nährschicht erfolgte für 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für 1 Stunde bei 4°C. Für die Zellschicht wurden 8 ml Medium in ein 50 ml Röhrchen gegeben und auf 37°C erwärmt. Dazu wurden 1 ml 3 %iger, verflüssigter Agar gegeben sowie 1 ml Zellsuspension (ca. 300.000 Zellen/ml). Dabei wurden die Zellen vereinzelt, so dass keine Zellaggregate mehr vorhanden waren. In jedes Loch der 6-Loch-Platte wurde dann 1 ml dieser Suspension hineinpipettiert. Nach der Verfestigung des Agars bei Raumtemperatur wurde er bei 37°C und einer

5 %igen CO₂-Atmosphäre im Brutschrank für ca. 10 Tage inkubiert. Um die Zellkolonien anschließend anzufärben, wurde eine Farblösung frisch hergestellt. Hierfür wurden 1mg/ml p-Iodonitrotetrazoliumviolett in HBS gelöst und zum besseren Lösen bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Daraufhin wurde die Lösung steril filtriert und pro Petrischale 1 ml der Färbelösung zugegeben. Die Zellen inkubierten dann in der Färbelösung noch mindestens weitere 24 Stunden. Zur Auswertung wurden die Anzahl gebildeter Kolonien dann mit Hilfe eines Durchlichtmikroskopes unter starker Vergrößerung ausgezählt. Zur weiteren Dokumentation wurden die Agarplatten am Computer eingescannt.

4.10.5 Durchflusszytometrische-Messung (FACS)

Der Begriff FACS (engl.: "fluorescence activated cell sorting") ist ein Akronym, das synonym zum Begriff Durchflusszytometrie verwendet wird. Bei der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie fließen die Zellen aus einer Durchflusszelle an einem Laserstrahl vorbei und streuen dabei einen Teil des Lichts, welches mittels eines Photomultipliers detektiert wird. Dabei dienen Filter zur Auftrennung der Fluoreszenzsignale auf verschiedene Detektoren. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität. So streuen Granulozyten, die eine raue Oberfläche und in ihrem Inneren viele Vesikel haben, deutlich mehr Licht als die sehr glatten T-Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (engl.: "forward scatter", FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (engl.: "sideways scatter", SSC) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Meist wird keine Sortierung, sondern nur eine Messung der Eigenschaften von Zellen vorgenommen. Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie wurde um 1960 an der Westfälischen Wilhelms Universität Münster von Dittrich und Göhde (Dittrich & Gohde, 1969) entwickelt. Zunächst wurde diese Technik für die Untersuchung eukaryotischer Zellen verwendet. Heute findet sie allerdings auch Anwendung bei der Analyse der Zellzahl und des metabolischen Status von Bakterien.

Die FACS-Messungen wurden in Kooperation mit Ludmila Sytik durchgeführt. Die Zellen wurden hierbei mit Propidiumiodid (PI), einem Farbstoff, der in die DNA einer Zelle interkalieren kann, angefärbt. Propidiumiodid kann nur die perforierten Zellmembranen toter Zellen, jedoch nicht die intakte Zellmembran durchdringen. Die Sortierung bzw. genauer gesagt die Zählung der Zellen erfolgte dann mittels dieser Markierung. PI hat ein Absorptionsmaximum bei 488 nm und ein Emissionsmaximum bei 590 nm. Diese Maxima verschieben sich zu 535 nm respektive 617 nm, wenn PI in DNA interkaliert.

Für die Probengewinnung wurden die Zellen in einer Dichte von ca. 900.000 Zellen/Loch in serumhaltigem Medium in 6-Loch-Platten ausgesät. Anschließend wurden sie für 24 Stunden bei

37°C inkubiert und dann mit den jeweiligen Inhibitoren und Agonisten stimuliert. Nach einer weiteren Inkubationsdauer von 48 Stunden wurde mit Hilfe des FACS die Zellzahl lebender und toter Zellen bestimmt.

4.11 Enzym-gekoppelter Immunadsorptions-Nachweis (ELISA)

Der Enzym-gekoppelte Immunadsorptions-Nachweis (engl.: "enzym-linked immunosorbent assay") beruht auf der Spezifität einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Üblicherweise werden spezifische Antikörper zum Nachweis und zur Quantifizierung eines Antigens verwendet. In der Regel werden dabei zwei verschiedene Antikörper verwendet: einer ist an eine feste Phase (normalerweise die Plastikoberfläche einer Mikrotiter-Platte) gekoppelt und dient dazu das zu quantifizierende Antigen an die Oberfläche zu binden und so anzureichern. Ein zweiter, Enzym-gekoppelter Antikörper dient dann der eigentlichen Quantifizierung, indem mit steigender Antigen-Konzentration, die Menge an Komplexen zwischen dem Enzym-gekoppelten Antikörper und dem Antigen zunimmt. Die Immunkomplexe einschließlich des gebundenen Enzyms bleiben an die Plastikoberfläche der Multititerplatte adsorbiert und durch Zugabe eines Enzym-Substrats wird eine Farb- oder Lumineszenz-Reaktion in Gang gesetzt, deren Stärke mit der Menge gebundener Immunkomplexe und damit der Menge an vorhandenem Antigen korreliert. Ein Sonderfall des ELISAs ist der kompetitive ELISA, bei dem ein an die feste Phase (Plastikoberfläche) gekoppeltes Antigen mit dem nachzuweisenden Antigen um die Antikörper-Bindung konkurriert, so dass umso weniger Antikörper für eine Interaktion mit dem fest gebundenen Antigen zur Verfügung stehen je höher die Konzentration des freien, nachzuweisenden Antigens ist.

4.11.1 Konzentrationsbestimmung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) mittels ELISA

Dieser ELISA zur Bestimmung der Konzentration des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors wurde im Labor von Prof. Achim Aigner in Marburg durchgeführt. Die Probengenerierung wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Für die Probengenerierung wurden die Zellen in einer End-Zellkonzentration von ca. 2×10^6 Zellen/Loch zu je 1 ml in 12-Loch-Platten ausgesät. Je nach Versuchsansatz geschah dies in serumfreiem oder in serumhaltigem Medium. Anschließend wurden die Zellen bei einem Teil der Versuchsansätze über Nacht mit CoCl_2 vorstimuliert. Am nächsten Tag erfolgte bei einem Teil der Versuchsansätze zunächst eine Vorstimulierung mit Inhibitoren. Anschließend wurden die Zellen mit den jeweiligen Agonisten stimuliert. Zur Probenaufbereitung wurde das Medium abgenommen und vorsichtig bei $700 \times g$ für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und einem erneuten Zentrifugationsschritt unterzogen. Dann wurde die Flüssigkeit auf je zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei -80°C eingefroren. Der eigentliche

Nachweis von VEGF wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Achim Aigner wie in der Literatur beschrieben (Hobel et al, 2010) durchgeführt.

4.11.2 Konzentrationsbestimmung von Serotonin mittels ELISA

Hierfür wurden zunächst in 12-Loch-Platten pro Loch 1 ml Zellen in einer Endkonzentration von ca. 2×10^6 Zellen/ml ausgesät. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Fluoxetin-Vorbehandlung erfolgte, indem das Medium abgenommen wurde und die Zellen entweder in serumfreiem Medium mit Fluoxetinzusatz, oder in HBS mit Fluoxetinzusatz für 30 Minuten vorinkubiert wurden. Gegebenenfalls fand eine parallele Vorstimulierung mit Rutheniumrot statt, das 1:1000 den Zellen zugesetzt wurde. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen und durch serumfreies Medium oder HBS, jeweils mit Fluoxetinzusatz, ersetzt. Gegebenenfalls wurden die Zellen danach mit AITC entsprechend der Abbildungslegende stimuliert. Für die Probenaufbereitung wurde das Medium vorsichtig abgenommen und für 8 Minuten bei 700 x g abzentrifugiert. Dann wurde der Überstand in eine neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut für 8 Minuten bei 700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss auf zwei neue 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -80°C gelagert. Für die Durchführung des anschließenden ELISAs wurden zunächst die entsprechenden Lösungen neu angesetzt: Für den ELISA-Puffer ("Assay Buffer") wurden die 15 ml Stocklösung 1:10 mit 150 ml *bidestilliertem* Wasser verdünnt und maximal 2 Wochen bei 4°C aufbewahrt. Die 15 ml Stocklösung des Waschpuffers ("Wash Buffer") wurden 1:20 mit 300 ml *bidestilliertem* Wasser verdünnt und maximal 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt. Die in dem Assay mitzuführenden Kontrollen wurden mit je 500 µl *bidestilliertem* Wasser verdünnt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und vorsichtig gemischt. Die Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt. Am Versuchstag wurden folgende Lösungen frisch angesetzt: Für das Enzym-Konjugat wurde 60 µl Stocklösung 1:101 mit 6 ml ELISA-Puffer verdünnt und drei PNPP (p-Nitrophenyl-Phosphat) Substrattabletten wurden in 8 ml PNPP Substratpuffer ("PNPP Substrate Buffer") aufgelöst. Danach folgte die Acylierung der Proben. Jeweils 20 µl jeder Kontrolle bzw. Probe wurde in ein Glastestgefäß pipettiert. Dazu wurden jeweils 100 µl des verdünnten ELISA-Puffers gegeben und die Proben sehr gut gemischt. Anschließend wurden jeweils 25 µl des Acylierungsreagenzes in jedes Gefäß pipettiert und sofort sehr gut vermischt. Die Gefäße wurden mit Parafilm verschlossen und 15 Minuten bei 37°C in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Danach wurde jeweils 2 ml verdünnter ELISA-Puffer zu den Proben und Kontrollen dazugegeben, diese sehr gut gemischt und die Testgefäße für 10 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der ELISA zügig durchgeführt, da die Proben nicht über längere Zeit stabil sind. Hierzu wurden jeweils 50 µl der Standards, der acylierten Kontrollen und der acylierten Proben in die entsprechenden Löcher der Testplatte pipettiert und jeweils 50 µl Serotonin Biotin sowie 50 µl Serotonin Antiserum in jedes Loch gegeben. Die Platte wurde mit einer Folie abgedeckt und für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbital-Taumler inkubiert

(500 rpm). Nach dieser Zeit wurde die Folie entfernt und die Lösung entsorgt. Die Platte wurde dreimal mit jeweils 250 µl/Loch Waschpuffer gewaschen. Die überschüssige Lösung wurde durch leichtes Klopfen auf ein Papiertuch entfernt. Dann wurden jeweils 150 µl frisch angesetztes Enzymkonjugat in die Löcher pipettiert. Die Platte wurde erneut abgedeckt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbital-Taumler inkubiert. Die Folie wurde nach Ablauf der 60 Minuten entfernt und die Lösungen erneut entsorgt. Daraufhin erfolgt ein erneuter dreimaliger Waschschrift (siehe oben). Im Anschluss wurden jeweils 200 µl frisch angesetzte PNPP Substratlösung in die Löcher pipettiert und die Platte erneut für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Orbital-Taumler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von jeweils 50 µl PNPP Stopplösung beendet. Durch vorsichtiges Schütteln der Platte wurden die Proben nochmals gemischt. Die Messung erfolgte in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenzwellenlänge 600-605 nm) innerhalb von 60 Minuten nach Abstoppen der Proben und Kontrollen.

4.12 Statistik

Alle Versuche wurden, wenn nicht anders vermerkt, unabhängig voneinander mindestens dreimal durchgeführt. Im Ergebnisteil ist die Anzahl unabhängiger Versuche mit dem Buchstaben n gekennzeichnet. Gezeigt werden entweder ein repräsentatives Ergebnis (im Fall der "Western-Blots") oder die Mittelwerte (MW) +/- die Standardfehler des Mittelwertes ("standard error of the mean", SEM). Densitometrische Analysen von "Western-Blots" wurden mit Hilfe der frei verfügbaren ImageJ Software der Firma NIH, Bethesda, MD, USA durchgeführt. Um eine statistische Signifikanz zu ermitteln wurde der zweiseitige t-Test (Vergleich von zwei Gruppen) verwendet. Dabei gelten alle Werte unter $p < 0,05$ als signifikant.

5. Ergebnisse

Ein Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) übernimmt, wie in der Einleitung dargestellt, zentrale Steuerfunktionen in jeder Zelle. TRP-Kanäle beeinflussen dabei als direkt Ca^{2+} -leitende Kanäle oder als Aktivatoren von Spannungs-gesteuerten Ca^{2+} -Kanälen in kritischer Weise die Ca^{2+} -Homöostase. In Tumorzellen ist Ca^{2+} ein wichtiger Faktor der Zell-Überleben, Proliferation oder Metastasierung reguliert. Im Folgenden soll daher die Expression von TRP-Kanälen in einer Reihe von Tumorzellen dargestellt werden. Darüber hinaus sind TRP-Kanäle an der Regulation praktisch sämtlicher Funktionen der Lunge (Lungenperfusion und -belüftung, O_2 -Detektion, Epithelintegrität, mucoziliäre Reinigungsfunktion etc.) beteiligt. Aus diesem Grund wurde in die Untersuchungen zur Expression von TRP-Kanälen auch eine Alveolar-Typ-II-Zelllinie und weitere Lungenepithel-Zelllinien eingeschlossen.

5.1 TRP-Expressionsprofil in SCLC-Zellen

Da die Ca^{2+} -Homöostase eine wichtige Rolle in SCLC Zellen spielt, war es ein primäres Ziel, die Expression von TRP-Kanälen der TRPC-, TRPM- und TRPV-Unterfamilien sowie die Expression von TRPA1 in einer Reihe von humanen SCLC-Zellen zu untersuchen. Der TRPC2-Kanal, der im Menschen ein Pseudogen ist, wurde in diese Untersuchung nicht miteinbezogen. Zunächst wurde eine erste Analyse mittels semiquantitativer RT-PCR vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass die vier untersuchten SCLC-Zelllinien ein ähnliches Expressionsmuster aufwiesen (Tab. 13).

Eine ganze Reihe von TRP-Kanälen (TRPC6, TRPV3, TRPV5, TRPV6, TRPM1, TRPM5 und TRPM6) konnte in keiner der vier Zelllinien nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden sowohl TRPC1 als auch TRPM7 von allen Zelllinien in hohem Maße exprimiert, was in Übereinstimmung mit ihrem in der Literatur beschriebenen ubiquitären Vorkommen steht. Auch TRPV4, dessen Expression bereits in einer Vielzahl verschiedener Gewebe nachgewiesen werden konnte, fand sich in allen vier Zelllinien. Es wurden aber auch zwei weitere TRP-Kanäle, nämlich TRPV1 und TRPV2, in allen vier SCLC-Zelllinien gefunden, obwohl diese Kanäle im Allgemeinen Zelltyp-spezifischer (z. B. in neuronalen Zellen) auftreten und ihre Expression daher in dieser Tumorentität nicht unbedingt zu erwarten gewesen wäre. Darüber hinaus wurden TRPA1, TRPC3, TRPC5, TRPM2 und TRPM8 in jeweils drei der vier untersuchten SCLC-Zelllinien detektiert.

Tab. 13: Expressionslevel der TRP-Kanäle in verschiedenen SCLC-Zelllinien nach Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

	H69	H146	H510	H187
TRPA1	+	++	++	-
TRPC1	++	++	++	++
TRPC3	+	+	+	-
TRPC4	++	-	-	-
TRPC5	+	+++	+	-
TRPC6	-	-	-	-
TRPC7	-	-	-	-
TRPV1	+	+	+	+
TRPV2	++	++	+	+
TRPV3	-	-	-	-
TRPV4	+	+	+	+
TRPV5	-	-	-	-
TRPV6	-	-	-	-
TRPM1	-	-	-	-
TRPM2	+	+	++	-
TRPM3	-	+	-	++
TRPM4	-	-	-	++
TRPM5	-	-	-	-
TRPM6	-	-	-	-
TRPM7	++	++	++	++
TRPM8	++	+	+++	-

Bei einer anschließenden, genaueren Quantifizierung der TRP-Expression in den vier Zelllinien, zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung mit der initialen (Tab. 13), semiquantitativen Auswertung der TRP-Kanalexpression. So fand sich beispielsweise eine prominente Expression von TRPC1 in allen vier SCLC-Zelllinien, was mit obigen orientierenden Experimenten übereinstimmt. Diese genauere quantitative Analyse der vier untersuchten SCLC-Zelllinien ist in Abb. 21 – Abb. 24 wiedergegeben.

TRPC5 wies bei dieser Analyse in der Zelllinie H146 eine bemerkenswert hohe Expression auf (Abb. 21), die sich in den anderen drei Zelllinien nicht verifizieren ließ. Weiterhin zeigte sich für TRPM3 und TRPM4 nur in der Zelllinie H187 ein hoher mRNA-Gehalt (Abb. 22), während diese Kanäle in den anderen Zelllinien nicht oder nur schwach detektierbar waren. Für TRPC4 zeigte sich schließlich nur in der Zelllinie H69 eine ausgesprochen starke Expression (Abb. 23).

Für TRPM7 ließ sich in allen vier Zelllinien eine deutliche Expression nachweisen, wobei vor allem in H187- und H510-Zellen (Abb. 22 und Abb. 24) ein hoher mRNA-Gehalt auffiel.

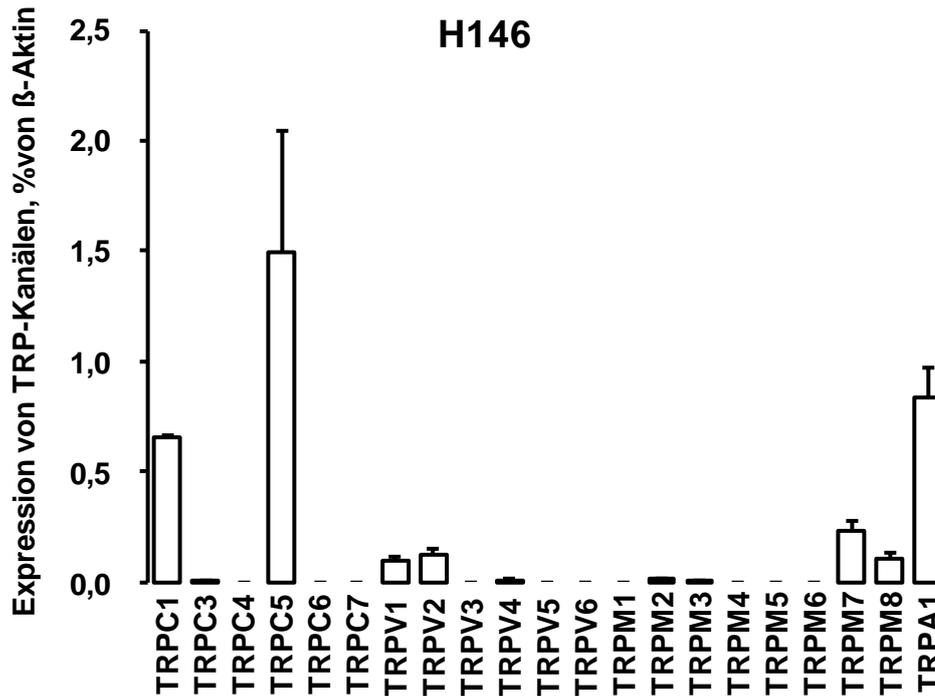


Abb. 21: mRNA-Expressionslevel verschiedener TRP-Kanäle normiert auf die β -Aktin mRNA-Expression in der SCLC-Zelllinie H146 nach Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

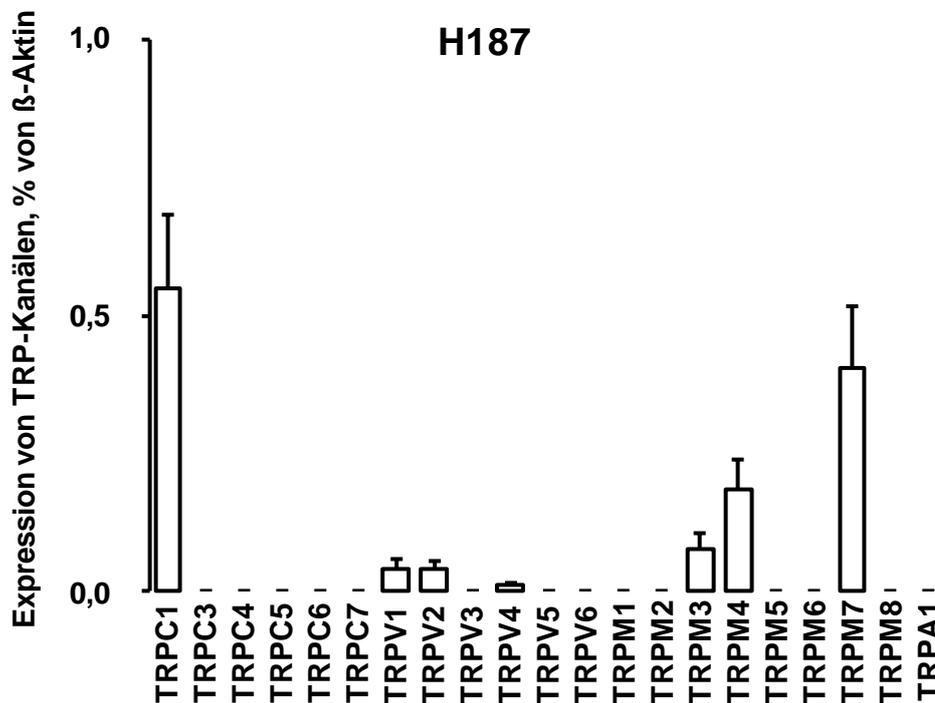


Abb. 22: mRNA-Expressionslevel verschiedener TRP-Kanäle normiert auf die β -Aktin mRNA-Expression in der SCLC-Zelllinie H187 nach Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

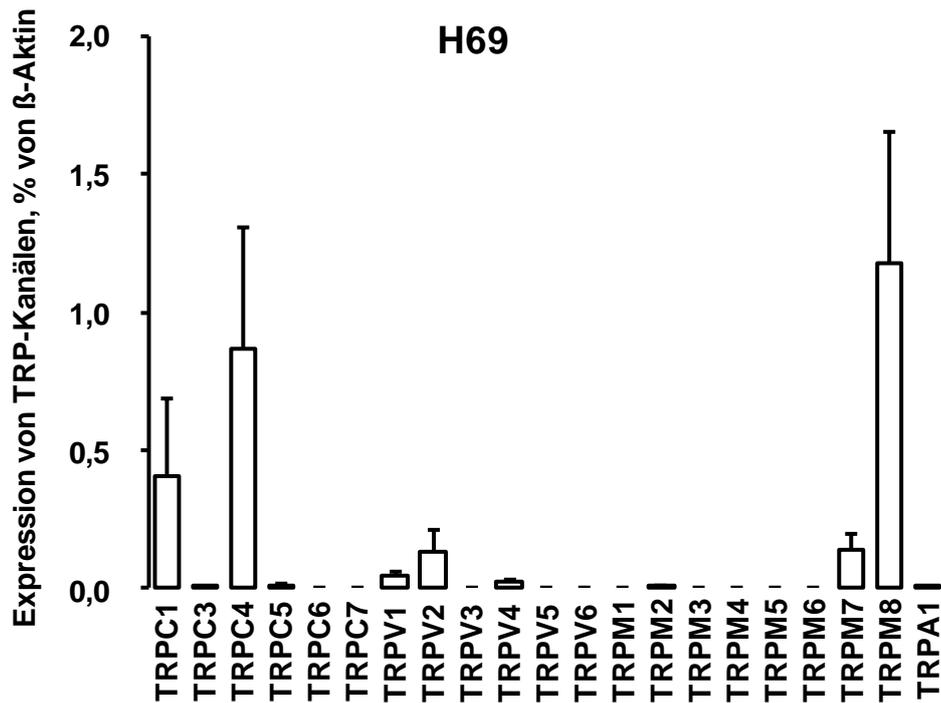


Abb. 23: mRNA-Expressionslevel verschiedener TRP-Kanäle normiert auf die β -Aktin mRNA-Expression in der SCLC-Zelllinie H69 nach Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

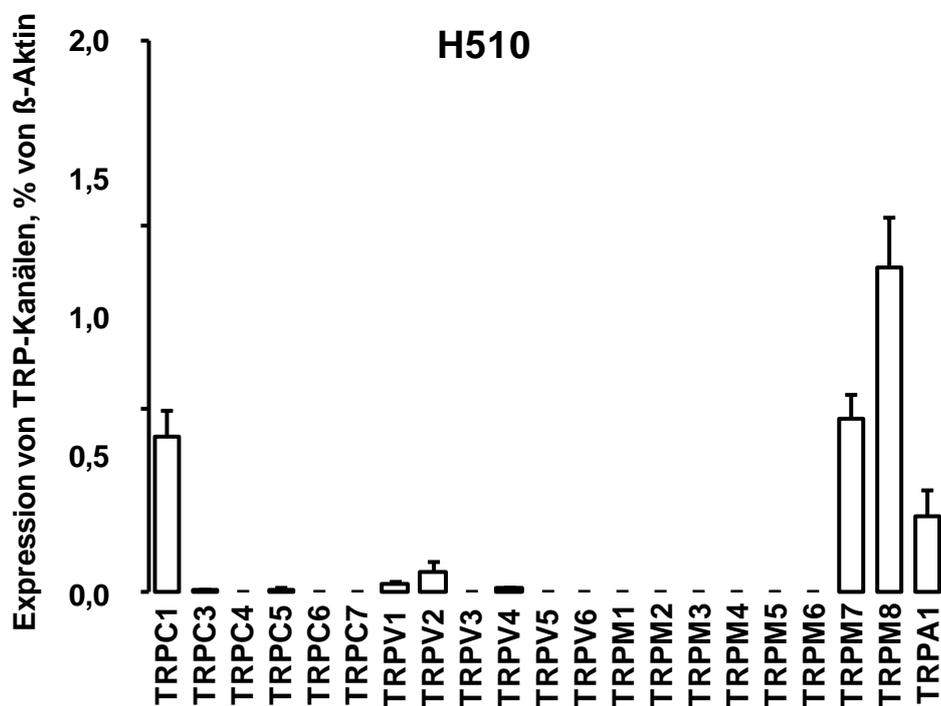


Abb. 24: mRNA-Expressionslevel verschiedener TRP-Kanäle normiert auf die β -Aktin mRNA-Expression in der SCLC-Zelllinie H510 nach Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Weiterhin war auffällig, dass drei der vier Zelllinien (nämlich H146, H69 und H510) eine Expression von TRPA1 zeigten, was wiederum den Befunden der semiquantitativen Auswertung (Tab. 13) entsprach.

5.2 TRPA1-Expressionsprofil in SCLC-Zellen

Ein bei der vorgestellten Auswertung der TRP-Expression besonders interessanter, weil unerwarteter, Befund war die Expression von TRPA1-mRNA in drei SCLC-Zelllinien, da dieser Kanal in erster Linie als ein neuronaler Nozizeptor mit Beteiligung an der Detektion von einer Vielzahl von Irritantien identifiziert wurde und ihm bisher keine Tumor-biologisch relevante Rolle zugeschrieben werden konnte. Für diesen TRP-Kanal wurde die Untersuchung daher durch weitere SCLC-Linien ergänzt (Abb. 25). In dieser erweiterten Analyse zeigte sich, dass fünf von sechs SCLC-Zelllinien den TRPA1-Kanal auf mRNA-Ebene exprimieren.

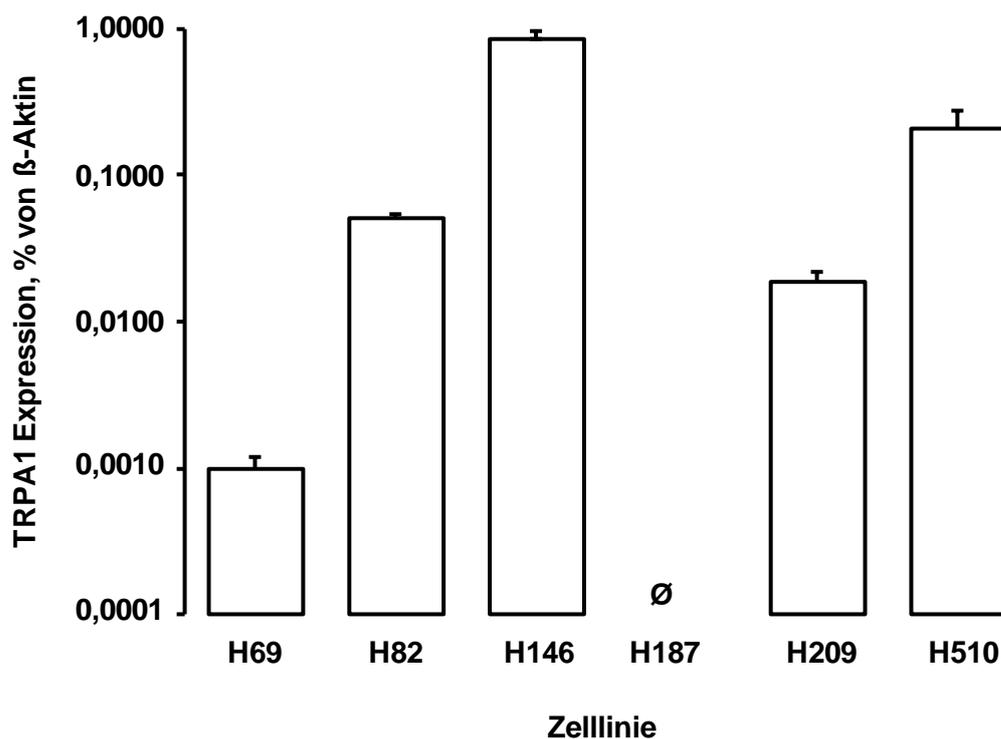


Abb. 25: mRNA-Expressionslevel des TRPA1-Kanals normiert auf die β -Aktin mRNA-Expression in einer Reihe verschiedener SCLC-Zelllinien nach Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.3 TRPA1-Expression in anderen Zellsystemen

Im nächsten Schritt wurden, aufgrund einer möglichen funktionellen Relevanz in der Lungenphysiologie, drei humane Bronchialepithel-Zelllinien (16HBE14o, 1HAEo, H441) und eine Alveolar-Typ-II-Linie (A549) in die Untersuchung miteinbezogen. Im Hinblick auf andere Tumormodelle, in denen TRPA1 eine Rolle spielen könnte, wurden zusätzlich vier Pankreas-Karzinomzelllinien (Panc-1, IMIM-PC1, IMIM-PC2 und 8988t) analysiert. Weiterhin wurden zwei Prostatakarzinom-Zelllinien (PC3 und LNCaP) untersucht.

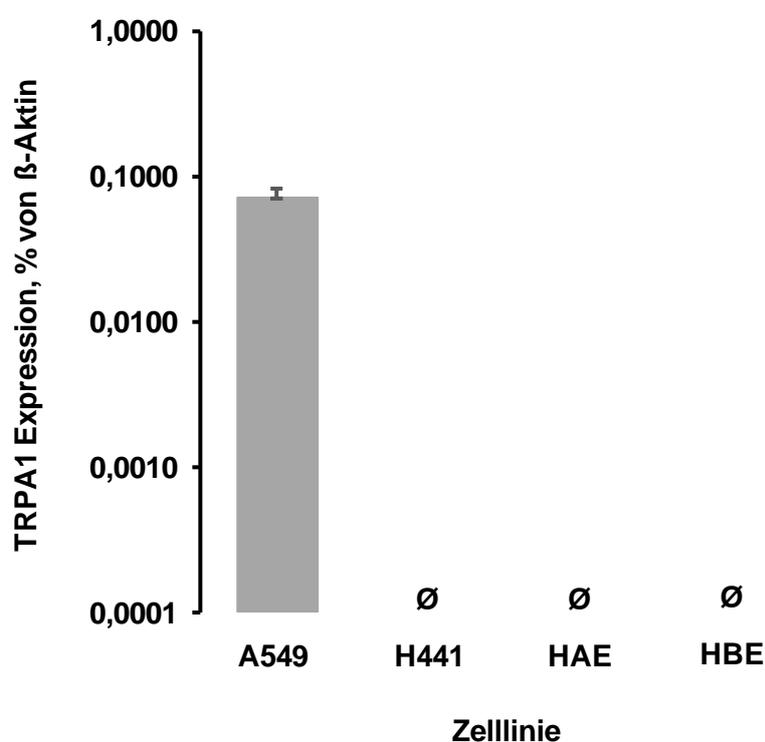


Abb. 26: mRNA-Expressionslevel des TRPA1-Kanals normiert auf die β -Aktin mRNA-Expression in einer Reihe verschiedener Lungenzelllinien (A549, H441, 1HAEo und 16HBE14o) nach Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Hierbei zeigte sich keinerlei Expression von TRPA1-mRNA in den drei Lungenepithel-Zelllinien (Abb. 26). Im Gegensatz dazu ließ sich in der Alveolar-Typ-II-Zelllinie A549 eindeutig der Nachweis einer TRPA1 mRNA-Expression erbringen (Abb. 26).

In den untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien war auf mRNA-Ebene eine niedrige TRPA1-Expression in IMIM-PC1- und eine hohe Expression in Panc-1-Zellen nachweisbar (Abb. 27). Demgegenüber konnte TRPA1 in 8988t- und IMIM-PC2-Zellen nicht detektiert werden (Abb. 27). Ebenfalls TRPA1-negativ waren die zwei untersuchten Prostatakarzinom-Zelllinien PC3 und LNCaP (Abb. 27).

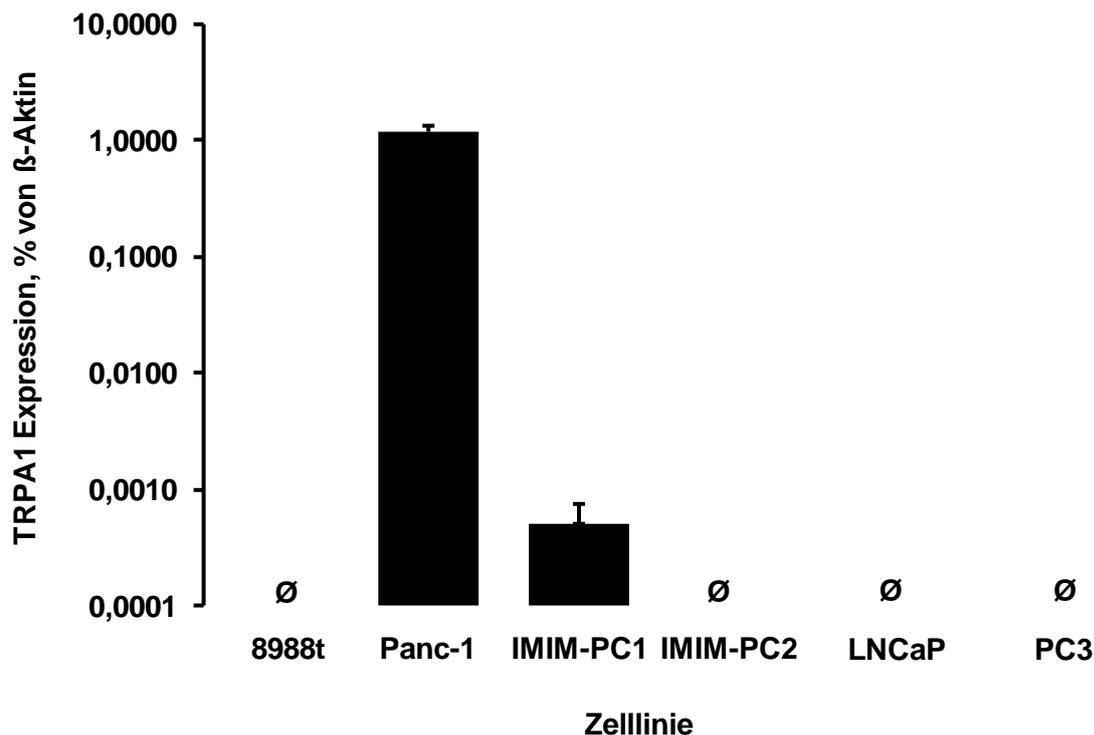


Abb. 27: mRNA-Expressionslevel des TRPA1-Kanals normiert auf die β -Aktin mRNA-Expression in einer Reihe verschiedener Pankreaskarzinom- (8988t, Panc-1, IMIM-PC1, IMIM-PC-2) und Prostatakarzinom-Zelllinien (LNCaP, PC3) nach Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.4 Funktionelle Expression von TRPA1 in Pankreaskarzinomzellen

In Ergänzung zum Nachweis von TRPA1-mRNA in Pankreas-Karzinomzellen wurden nun funktionelle Untersuchungen auf zellulärer Ebene vorgenommen. Zunächst wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2-AM quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass nach Stimulierung mit dem TRPA1-Aktivator Allylisothiocyanat (AITC) in Panc-1-Zellen eine deutliche Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nachweisbar war, welche durch Vorbehandlung der Zellen mit dem TRP-Blocker Rutheniumrot (RR) inhibiert werden konnte (Abb. 28).

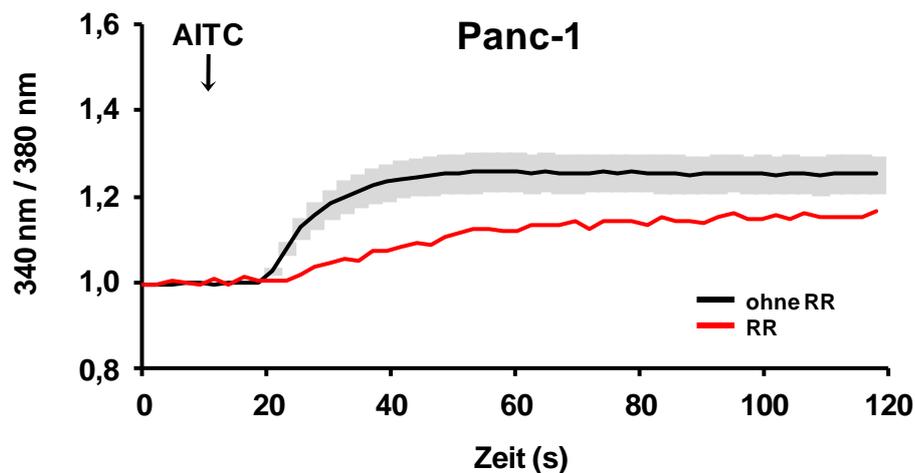


Abb. 28: Bestimmung der Allylthiocyanat (AITC)-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie Panc-1. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden Panc-1 Zellen, teils mit 100 μ M Rutheniumrot (RR) vorinkubiert und mit 100 μ M AITC stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei Messungen (AITC) bzw. einer Messung (RR).

In der TRPA1-negativen Zelllinie 8988t wurde, im Gegensatz zu Panc-1-Zellen, zur Ca^{2+} -Messung das Ca^{2+} -bindende Protein Aequorin verwendet, da dieses besonders sensitiv ist. Auf diese Weise sollten auch schwache Ca^{2+} -Signale nach Stimulierung zu detektieren sein. Hierzu wurde Aequorin stabil mittels eines lentiviralen Expressionssystems in die Zellen eingeschleust. Die auf diese Weise generierte Aequorin exprimierende Zelllinie erhielt die Bezeichnung 8988tAeq. In diesem Zellsystem war nach Injektion von HBS-Puffer ein transienter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zu registrieren (Abb. 29A). Dieses Signal stellte offensichtlich ein unspezifisches Zugabe-Artefakt dar, welches durch die Injektion hervorgerufen wurde. Möglicherweise wird diese Reaktion durch den mechanischen Stress hervorgerufen, dem die Zellen durch das Einspritzen des Puffers ausgesetzt sind. In ähnlicher Weise zeigte sich auch nach Stimulierung mit AITC eine kurze Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 29B). Es kam jedoch durch die Zugabe von AITC nicht zu einem für die Aktivierung von TRPA1 typischen lang anhaltenden Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Bei diesen Untersuchungen wurden AITC-Konzentrationen von bis zu 100 μ M getestet. Hingegen zeigte sich nach Applikation eines TRPA1-unabhängigen Stimulus (100 μ M Carbachol, Cch) ein deutlicher Anstieg $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 29C), so dass die prinzipielle Stimulierbarkeit der Zelllinie gezeigt werden konnte. Es kann also davon ausgegangen werden, dass diese Zelllinie, wie auch oben in der quantitativen RT-PCR-gezeigt (Abb. 27) in der Tat keinen TRPA1-Kanal exprimiert. Somit eignen sich 8988t-Zellen gut als Negativkontrolle, um AITC-vermittelte Effekte im Hinblick auf die Beteiligung von TRPA1 zu überprüfen.

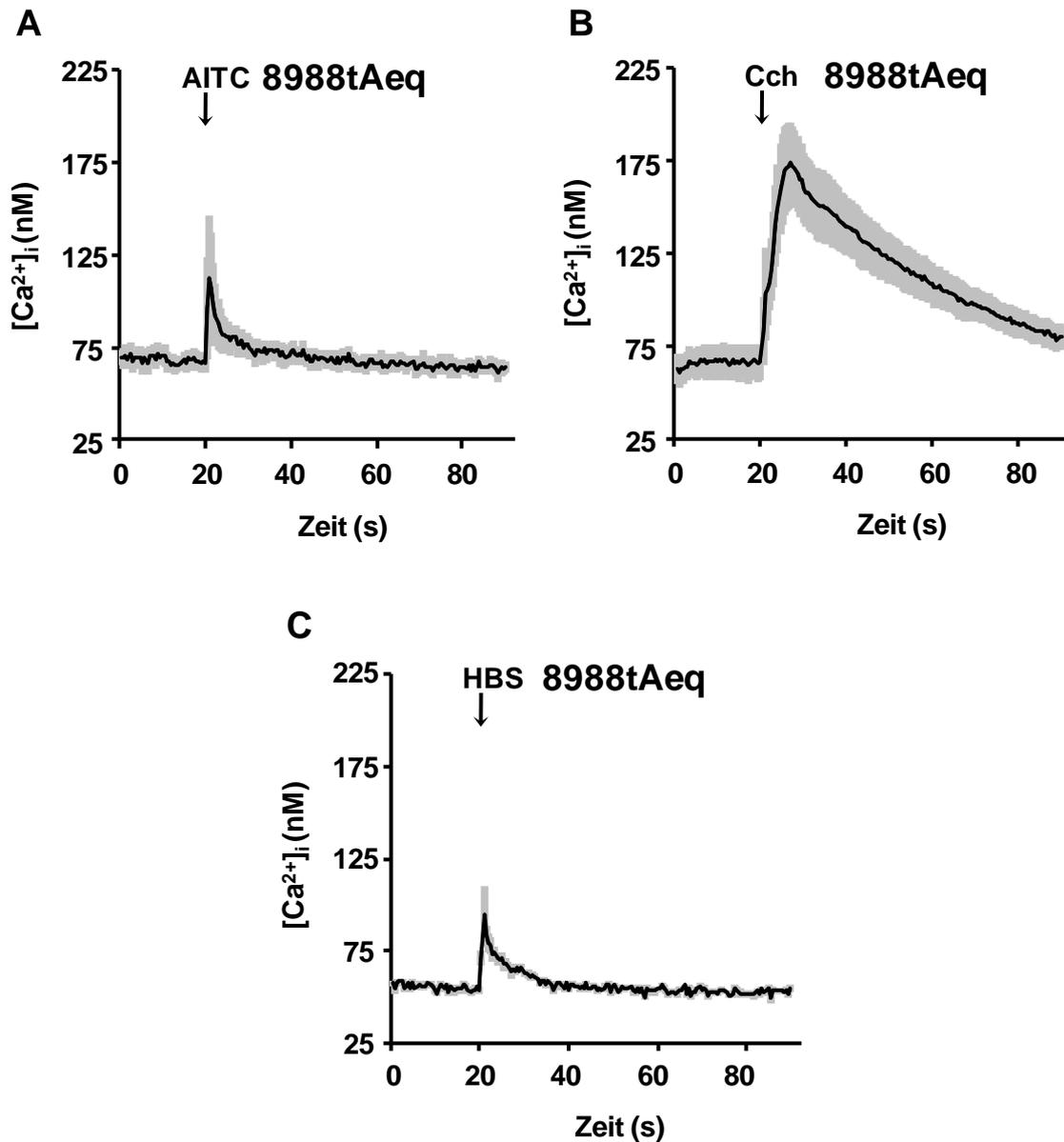


Abb. 29: Bestimmung der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Aequorin-Lumineszenzmessung nach Injektion der Testsubstanzen in der den TRPA1 nicht exprimierenden Zelllinie 8988t. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde ermittelt, indem Zellen, die das Ca^{2+} -Sensorprotein Aequorin-GFP stabil exprimieren, mit Coelenterazin markiert wurden und anschließend in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterlumineszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden 8988t Zellen mit 100 μ M AITC (A) oder 100 μ M Carbachol (Cch) (B) stimuliert. Abb. (C) zeigt die Kontrolle nach Pufferinjektion (HBS). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Als weitere funktionelle Antwort nach Applikation von TRPA1-Aktivatoren wurde die Stimulierbarkeit von ERK1/2 untersucht. Dabei führte AITC in einer Konzentration von 30 μ M zu einer transienten Phosphorylierung und einer damit verbundenen Aktivierung von ERK1/2 in Panc-1-Zellen (Abb. 30A), die bereits 1 Minute nach Gabe des Aktivators nachweisbar war und ihr Maximum nach 5 Minuten erreichte. Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigte sich nach 10 Minuten eine immer noch deutlich erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2, die im Vergleich zu dem Signal nach 5 Minuten jedoch geringer ausfiel. Nach 30 Minuten war die ERK1/2-Phosphorylierung immer noch deutlich höher als zum Ausgangszeitpunkt, hatte aber im Vergleich zu den Zeitpunkten 5 und

10 Minuten weiter an Intensität verloren. Schließlich war 2 Stunden nach Stimulierung beinahe wieder der Basalwert erreicht.

Im Gegensatz dazu ergab sich in 8988t-Zellen kein Hinweis für eine Aktivierung von ERK1/2 nach Gabe von AITC (Abb. 30B). Die Aktivierung von ERK1/2 durch 30 μ M AITC in Pankreaskarzinomzellen ist also mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Expression des TRPA1-Kanals abhängig. Diese Hypothese wird dadurch weiter gestützt, dass in Panc-1-Zellen eine Vorbehandlung mit dem TRP-Blocker Rutheniumrot die AITC-abhängige Aktivierung von ERK1/2 inhibierte, während eine Serumstimulierung mit fötalem Kälberserum (FCS) als Positivkontrolle nach wie vor zu einer ERK1/2-Stimulierung führte (Abb. 31).

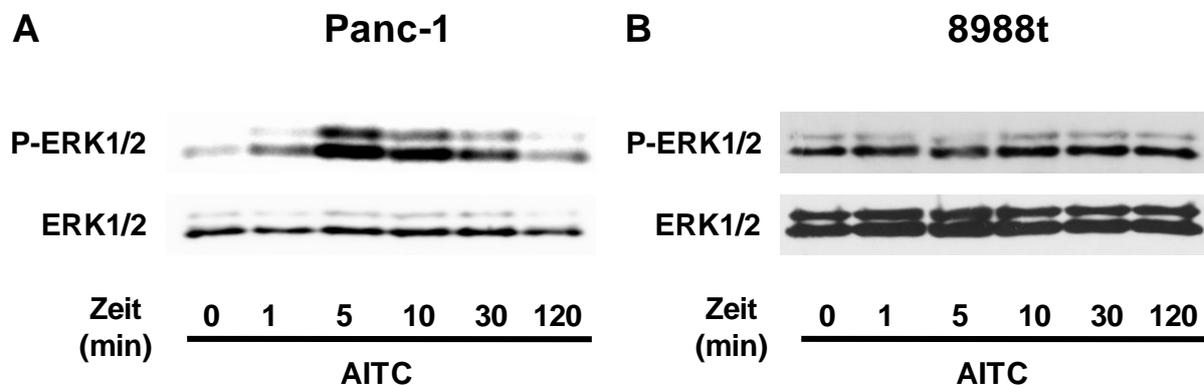


Abb. 30: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-positiven Panc-1 Zellen (A) und TRPA1-negativen 8988t Zellen (B) mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Beide Zelllinien wurden für 0-120 min mit 30 μ M AITC stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

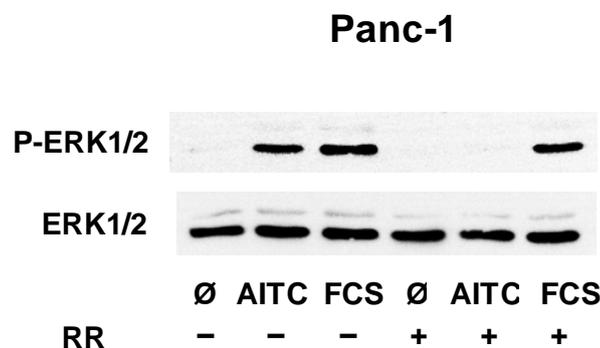


Abb. 31: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-positiven Panc-1 Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen wurden für 5 min mit 30 μ M AITC oder 10 % FCS, mit oder ohne 30-minütiger Vorinkubation der Zellen mit 10 μ M RR stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Um diese Befunde weiter zu untermauern, wurden zwei weitere Pankreaskarzinom-Zelllinien, nämlich die Zelllinien IMIM-PC1 und IMIM-PC2, in die Studie mit einbezogen. Für erstere konnte in der vorliegenden Arbeit durch quantitative RT-PCR gezeigt werden, dass sie ebenfalls TRPA1-mRNA exprimiert (Abb. 27), während die zweite Zelllinie TRPA1-negativ ist.

Interessanterweise zeigte sich nun für IMIM-PC1-Zellen ebenfalls eine deutliche ERK1/2-Aktivierung nach AITC-Behandlung, wohingegen dieser Effekt bei IMIM-PC2-Zellen nicht zu beobachten war (Abb. 32). Dieser Befund stützt die These, dass die Expression von TRPA1 in Pankreaskarzinom-Zellen notwendig für eine AITC-vermittelte ERK1/2-Aktivierung ist.

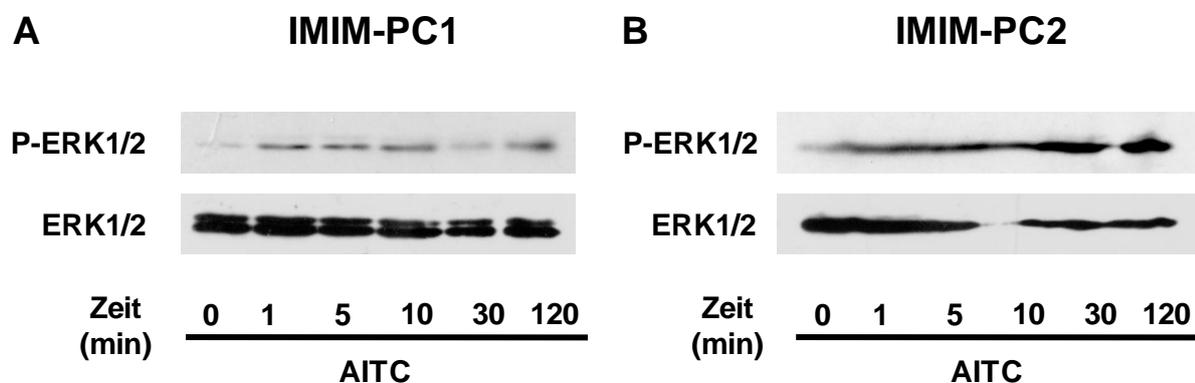


Abb. 32: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-positiven IMIM-PC1 Zellen (A) und TRPA1-negativen IMIM-PC2 Zellen (B) mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Beide Zelllinien wurden für 0-120 min mit 30 μ M AITC stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Nach einer Aktivierung von ERK1/2 durch Phosphorylierung können nach Translokation dieses Proteins in den Zellkern typischerweise schnell-reagible Effektoren (engl.: "immediate early genes") wie c-Fos induziert werden. Aus diesem Grunde wurde überprüft, ob AITC in Pankreaskarzinom-Zellen auch zu einer vermehrten Induktion dieses Proteins führt. Hierbei zeigte sich jedoch, dass eine AITC-Behandlung keine vermehrte Induktion von c-Fos nach sich zog (Abb. 33). Dieser Befund steht im Gegensatz zu den weiter unten näher beschriebenen Ergebnissen in den SCLC-Zelllinien H146 und H187, wo es nach AITC-Stimulierung zu einer Induktion von c-Fos kam (Abb. 81). In den getesteten Pankreaskarzinom-Zelllinien bleiben die distalen Zielmoleküle der ERK1/2-Aktivierung durch AITC daher vorerst noch unbekannt.

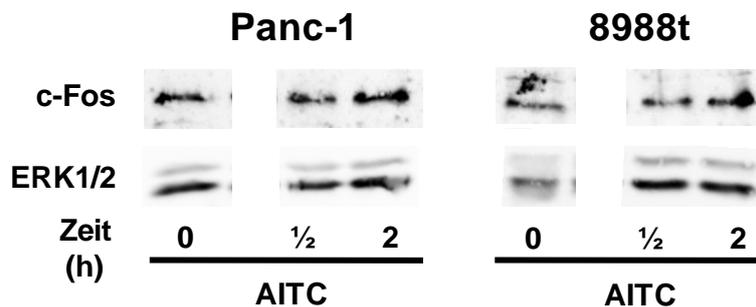


Abb. 33: Untersuchung zur Induktion von c-Fos nach AITC-Stimulierung mittels "Western-Blot" in TRPA1-positiven Panc-1 Zellen (links) und TRPA1-negativen 8988t Zellen (rechts). Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen die c-Fos-Expression, die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Beide Zelllinien wurden für 0, 0,5 oder 2 h mit 30 μ M AITC stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.5 Funktionelle Expression von TRPA1 in A549-Lungenzellen

Wie in Abb. 26 gezeigt konnte auch in der Alveolar-Typ-II-Zelllinie A549 TRPA1-mRNA nachgewiesen werden. Um diesen Befund auf seine mögliche biologische Relevanz hin weiter zu überprüfen, wurde daher für diese Zellen ebenfalls eine funktionelle Untersuchung mittels Fura-2-AM-basierter Ca^{2+} -Messungen durchgeführt.

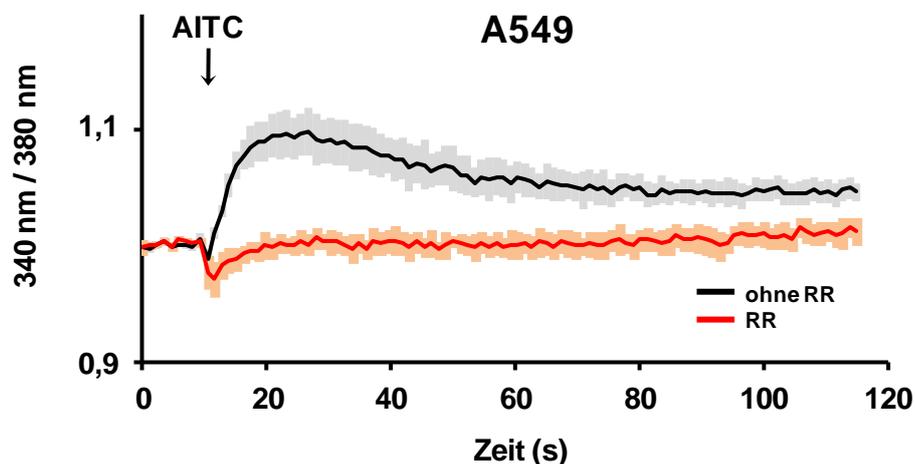


Abb. 34: Bestimmung der AITC-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie A549. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden A549 Zellen, teils mit 10 μ M Rutheniumrot (RR) vorinkubiert, mit 100 μ M AITC stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Dabei ergab sich, dass eine Stimulierung der Zellen mit 100 μM AITC zu einer deutlichen Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führte (Abb. 34). Diese Zellantwort war durch Vorbehandlung mit dem TRP-Blocker Rutheniumrot (RR) hemmbar, was ein Hinweis auf die Involvierung von TRPA1 sein könnte.

Analog zum Vorgehen in Pankreaskarzinom-Zelllinien wurde im nächsten Schritt die Aktivierbarkeit von ERK1/2 nach Behandlung mit AITC untersucht. Auch in den A549-Zellen war eine klare Aktivierung von ERK1/2 durch AITC nachweisbar, welche durch Rutheniumrot inhibiert werden konnte (Abb. 35). Um eine unspezifische Hemmwirkung von Rutheniumrot auszuschließen, wurde als TRPA1-unabhängiger ERK1/2-Aktivator auch in diesem Fall FCS mitgetestet. Dieser Stimulus führte ebenfalls zu einer Aktivierung von ERK1/2, welche aber nicht durch Rutheniumrot blockierbar war.

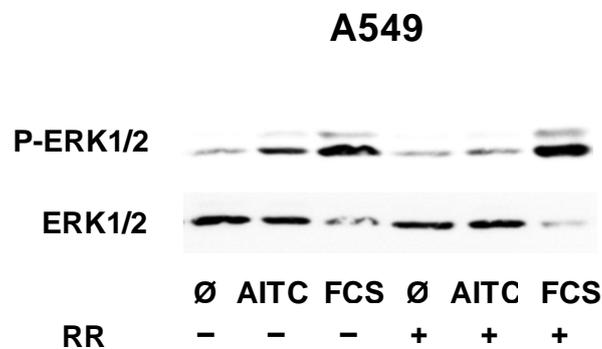


Abb. 35: *Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-positiven A549 Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen wurden für 5 min mit 30 μM AITC oder 10 % FCS, mit oder ohne 30-minütiger Vorinkubation mit 10 μM RR, stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.*

Da TRPA1 durch eine große Zahl toxikologisch relevanter Inhalantien aktiviert wird, sollte der Frage nachgegangen werden, ob TRPA1-vermittelte Signalwege eventuell an zellschädigenden oder wachstumshemmenden Effekten beteiligt sind, und somit eine Rolle von TRPA1 bei toxischen Lungenschäden denkbar wäre.

In einem orientierenden Experiment wurde daher getestet, ob AITC als prototypischer TRPA1-Aktivator einen Seneszenz-induzierenden Effekt auf A549-Zellen ausübt, was ein erster Hinweis auf eine Zellschädigung wäre. Als Positivkontrolle für vermehrte Seneszenz wurde Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als ein etablierter Induktor von Seneszenz in Lungenzellen (Oliva et al, 2008) verwendet. Die hierzu durchgeführten Versuche erbrachten jedoch kein eindeutiges Ergebnis. Zwar zeigte sich, dass 24 Stunden nach einer AITC-Behandlung eine vermehrte Seneszenz in A549-Zellen zu beobachten war (Abb. 36), dieser Effekt war jedoch nicht sehr ausgeprägt. Darüber hinaus ergab sich, dass in diesen Zellen nach 48 Stunden in Kultur eine ausgeprägte Zunahme β -Galaktosidase-positiver Zellen als Indikator für eine mögliche Seneszenz auch in

unbehandelten Ansätzen zu verzeichnen war (Abb. 36). Diese, womöglich auf eine Kontaktinhibition zurückzuführende, Zunahme des Seneszenz-Signals erschwert die Differenzierung zwischen unspezifischen und spezifischen Effekten in diesem Zellsystem. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auf weitere Untersuchungen mit diesem Testsystem unter diesen Bedingungen verzichtet.

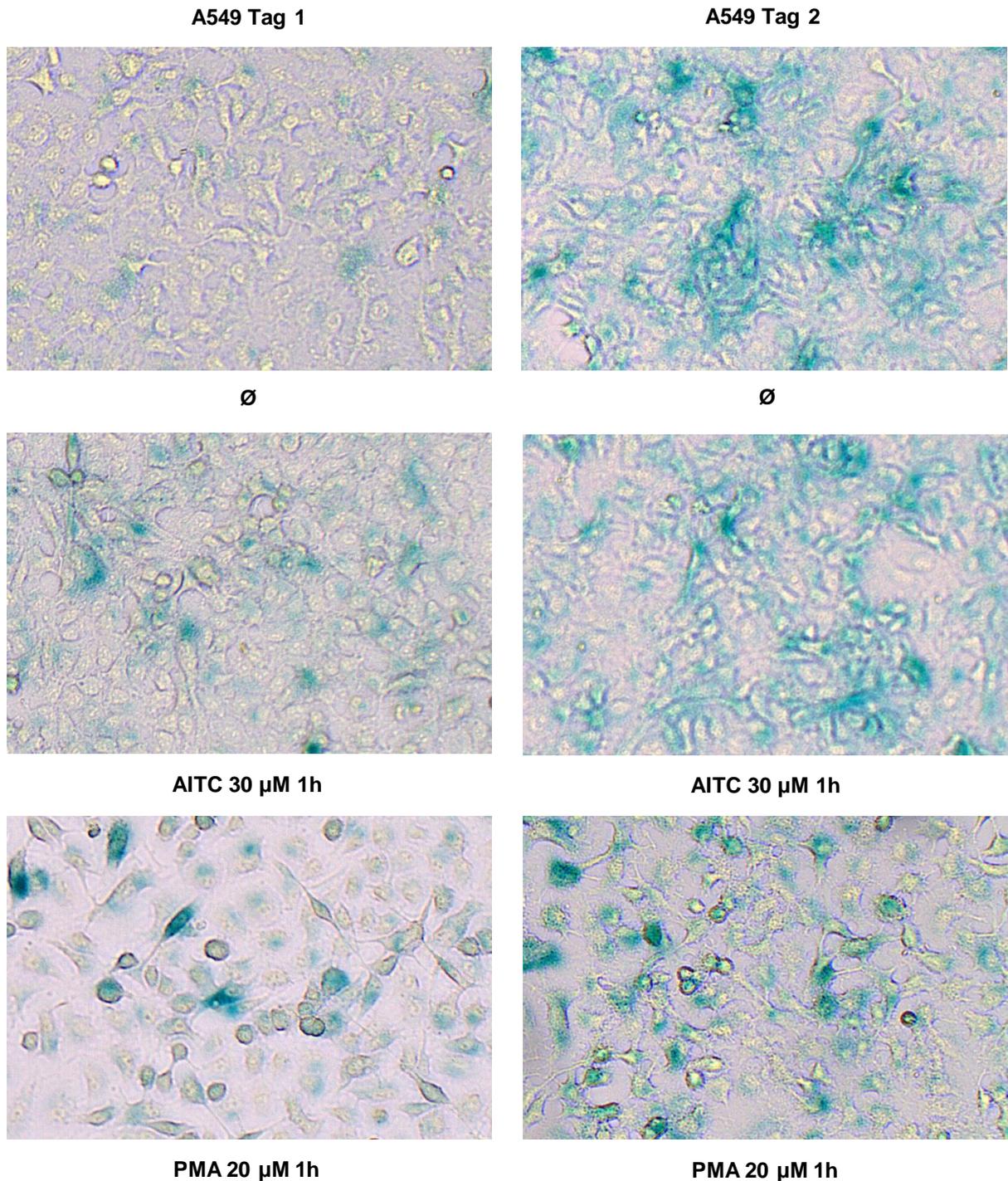


Abb. 36: *Untersuchung auf Induktion einer prämaternen Seneszenz mittels β -Galaktosidase-Färbung in A549-Zellen, die unbehandelt, mit AITC stimuliert oder mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Positivkontrolle) behandelt wurden. Die Seneszenzfärbung fand 24 h (links) bzw. 48 h (rechts) nach der jeweiligen Behandlung statt.*

In Lungenzellen ist ERK1/2 ein wichtiger Regulator inflammatorischer Prozesse, etwa im Rahmen chronischer Entzündungen bei obstruktiven Lungenerkrankungen wie Asthma oder COPD (Mercer & D'Armiento, 2006). Eine wichtige Funktion von ERK1/2 ist hierbei die Kontrolle der Expression von Mucinen, welche einen Hauptbestandteil des bronchialen Sekretes darstellen. Somit trägt eine chronische Aktivierung von ERK1/2 in der Lunge zu einer Hypersekretion bei, welche die bronchiale Obstruktion verstärkt. Interessanterweise ergab sich nun für A549-Zellen nach Stimulierung mit AITC eine erhöhte Mucin5A/C-Induktion, ein Effekt, der mit dem in der Literatur beschriebenen Stimulus EGF (Nie et al, 2012; Song et al, 2005) vergleichbar war (Abb. 37).

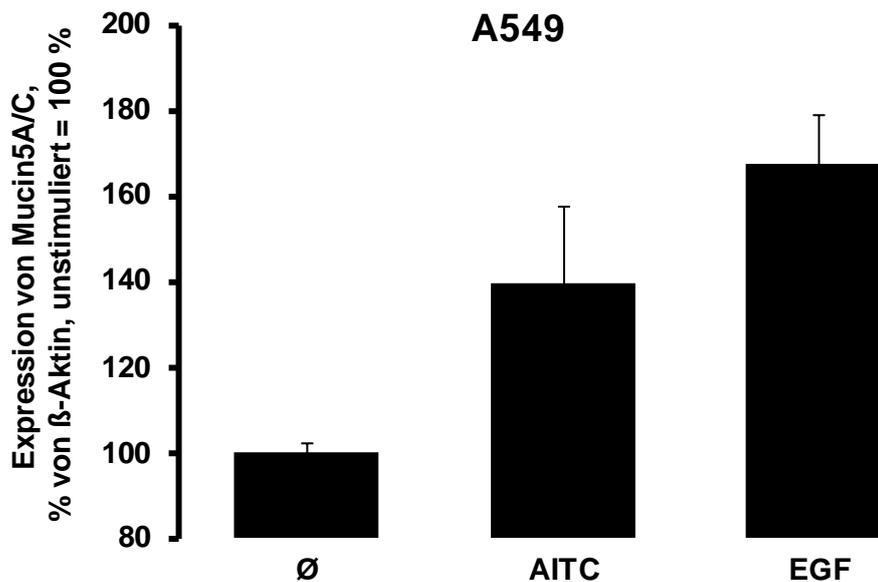


Abb. 37: mRNA-Expressionslevel von Mucin5A/C normiert auf die β -Aktin mRNA-Expression in A549 Zellen (unstimuliert (\emptyset), 100 μ M AITC oder EGF) nach Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.6 TRPA1-Expression in SCLC-Zelllinien auf Proteinebene

Wie oben (Abb. 25) dargestellt konnte in einer ganzen Reihe von SCLC-Zelllinien der Nachweis einer Expression von TRPA1 auf mRNA-Ebene erbracht werden. Da das Vorhandensein von mRNA aber nicht notwendigerweise mit einer Proteintranslation und einer funktionellen Relevanz einhergeht, wurde nachfolgend die Protein-Expression von TRPA1 in diesem Zellsystem untersucht. Dies geschah mittels "Western Blot" und spezifischen, gegen TRPA1 gerichteten Antikörpern. Durch Auftrennung von Zelllysaten mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Detektion des TRPA1-Proteins mittels "Western-Blot" konnten die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR bestätigt werden. In H69, H146 und H510 konnte mittels des anti-TRPA1-Antikörpers jeweils eine Bande mit einem für TRPA1 typischen Molekulargewicht von ca. 140 kDa nachgewiesen werden (Abb. 38). Diese Bande war in Lysaten der Zelllinie H187 nicht

nachzuweisen. Um die Spezifität des TRPA1-Antikörpers zu überprüfen, wurden außerdem HEK293-Zellen transient mit dem TRPA1-Konstrukt transfiziert und anschließend ebenfalls auf eine TRPA1-Expression hin untersucht. Auch hier zeigte sich eine Proteinbande mit dem entsprechenden Molekulargewicht (Abb. 38), die in nicht transfizierten HEK293-Zellen nicht nachweisbar war.

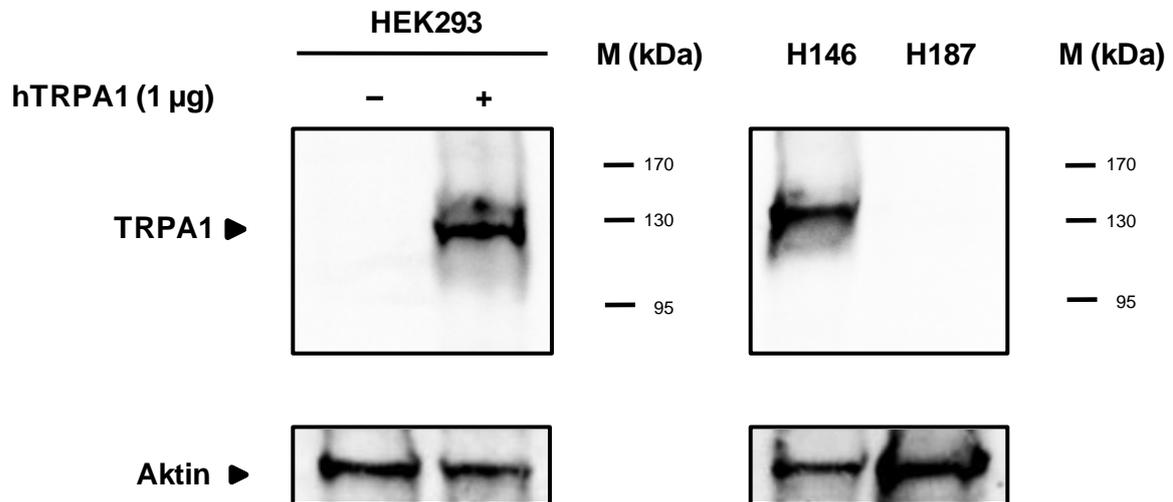


Abb. 38: *Nachweis der TRPA1-Proteinexpression mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus untransfizierten oder mit humanen TRPA1 (hTRPA1) transient transfizierten HEK293-Zellen (links) und endogen TRPA1 exprimierenden H146- sowie H187-Zellen, die TRPA1 nicht exprimieren (rechts). Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen die TRPA1-Proteinexpression, die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren β -Aktin (Ladekontrolle). Ein Maßstab für die Molekülmasse (M) in kDa, der mittels eines Proteinstandards ermittelt wurde, ist zur Veranschaulichung der Laufeigenschaft der TRPA1-Bande im Gel angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.*

Die Expression des TRPA1-Kanals ist für die Tumorbilogie des SCLC nur dann von potentieller Relevanz und translationaler Bedeutung, wenn sie auch in Patientenmaterial, also Tumorresektaten, identifiziert werden kann.

5.7 TRPA1-Expression in SCLC-Patientenmaterial

Daher wurden nun Patientenproben auf mRNA-Ebene untersucht. Verglichen wurden dabei zwölf Proben von normalem, nicht tumorös verändertem Lungengewebe mit vier N-SCLC Proben und fünf SCLC-Proben. Dabei zeigte sich, dass TRPA1 in vier von zwölf normalen Lungenbiopsien nicht detektierbar war und in den restlichen acht Normalproben nur in äußerst geringem Maße nachweisbar war. In allen fünf SCLC-Proben hingegen wurde eine hohe TRPA1-Expression identifiziert, während der Kanal nur in sehr geringem Ausmaß in N-SCLC-Proben zu detektieren war. Die TRPA1-Expression in SCLC-Proben war hierbei statistisch signifikant höher als in den Normal- und N-SCLC-Proben (Abb. 39).

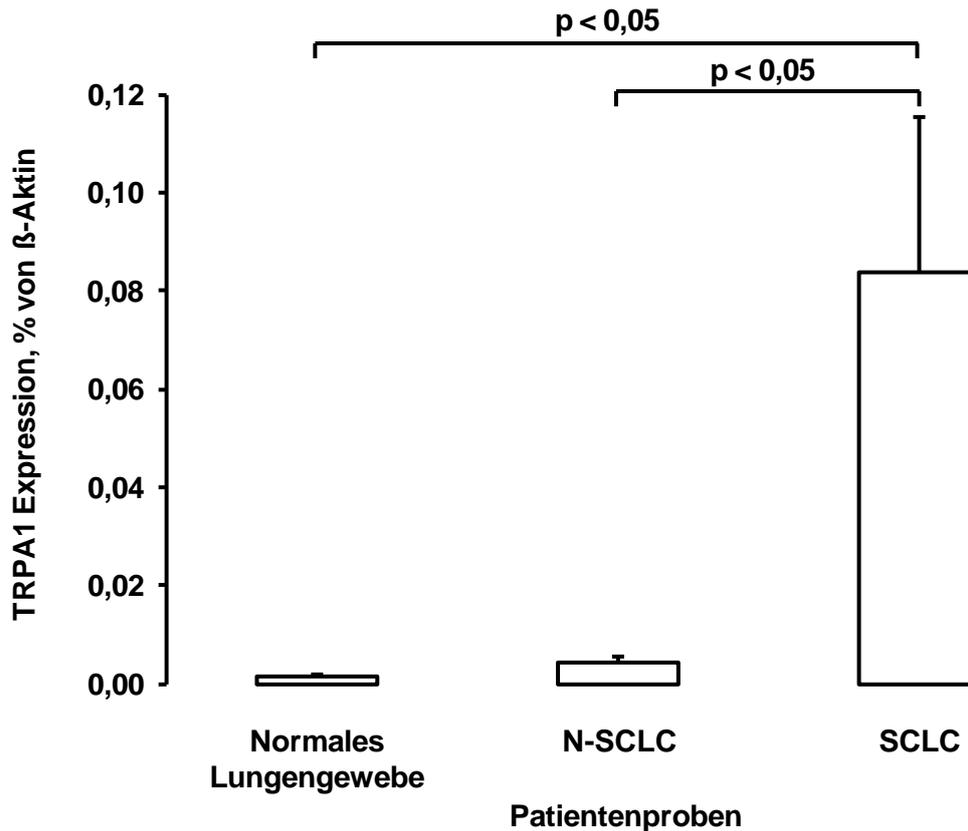


Abb. 39: mRNA-Expressionslevel des TRPA1-Kanals normiert auf die β -Aktin mRNA-Expression in einer Reihe von Patientenproben. Verglichen wurden normales Lungengewebe ($n = 12$), N-SCLC-Proben ($n = 4$) und SCLC-Proben ($n = 5$) nach Analyse mittels quantitativer RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei der TRPA1-Expression in SCLC-Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Tumor-spezifischen Befund handelt, und der TRPA1-Kanal daher eine potentielle therapeutische Zielstruktur darstellt. Da aber nicht auszuschließen ist, dass ein TRP-Kanal zwar auf mRNA- und eventuell auch Proteinebene exprimiert wird, funktionell aber nicht aktiv ist, wurde im nächsten Schritt die weitere funktionelle Bedeutung des Kanals in den vorliegenden Zelllinien untersucht.

5.8 AITC-vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in SCLC-Zellen

Um die funktionelle Relevanz von TRPA1 in SCLC-Zellen zu untersuchen, wurde daher die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Zugabe verschiedener TRPA1-Agonisten beobachtet. Dafür wurde der Ca^{2+} -sensitive fluoreszierende Farbstoff Fura-2 bzw. das biolumineszente Ca^{2+} -Sensorprotein Aequorin benutzt.

H146-Zellen, die in den mRNA-Untersuchungen und auch auf Proteinebene die stärkste TRPA1-Expression aufwiesen, reagierten auf eine AITC-Injektion von 30 μ M mit einer deutlichen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 40).

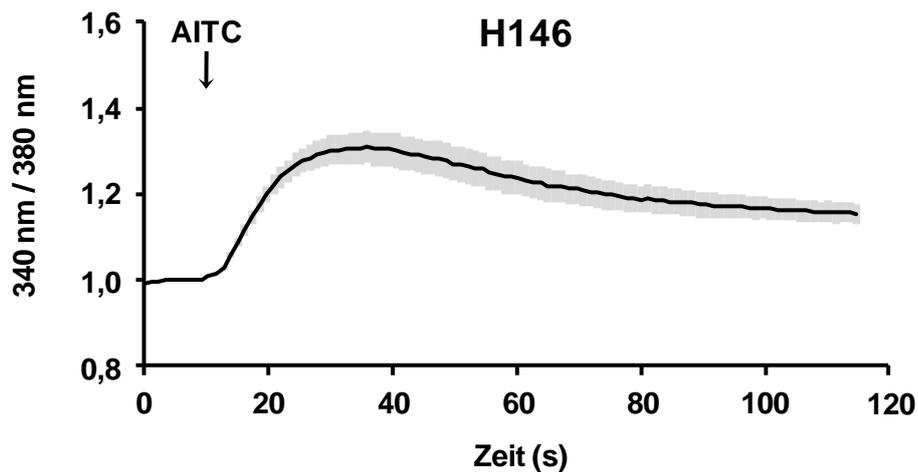


Abb. 40: Bestimmung der AITC-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H146. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden H146-Zellen mit 30 μ M AITC stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Um die Spezifität dieser Antwort zu zeigen, wurde ein äquivalentes Volumen mit reiner Pufferlösung injiziert, was keinerlei Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge hatte (Abb. 41). Demzufolge ist die Reaktion von H146-Zellen nicht als Antwort auf die mechanische Stimulierung der Injektion zu deuten sondern von AITC als Agonisten abhängig.

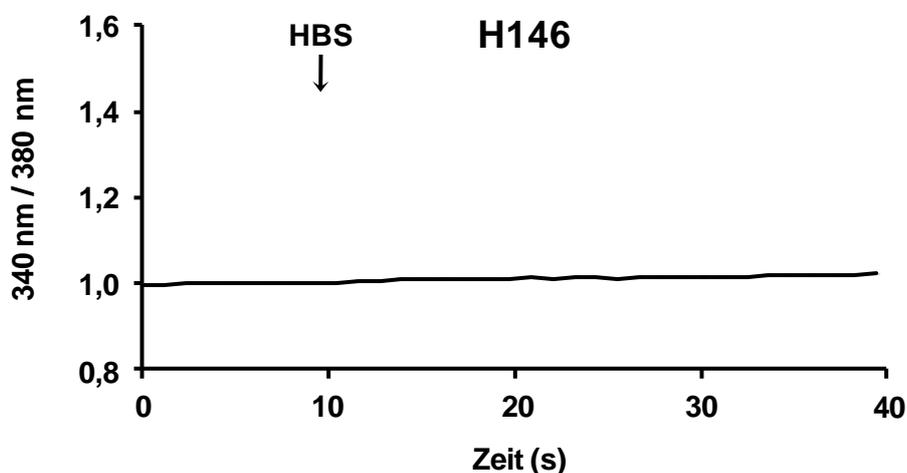


Abb. 41: Bestimmung des Effektes einer Puffer-Injektion (HBS) auf die $[Ca^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H146. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Aufgrund der sehr geringen Varianz der Datenpunkte ist die Streuung um den jeweiligen Mittelwert im dargestellten Maßstab nicht erkennbar.

Auch in der TRPA1-negativen SCLC-Zelllinie H187 konnte, wie zu erwarten war, keine Reaktion auf 30 μ M AITC beobachtet werden, woraus abgeleitet werden kann, dass die Reagibilität auf AITC von einer Expression des TRPA1-Kanals abhängt (Abb. 42).

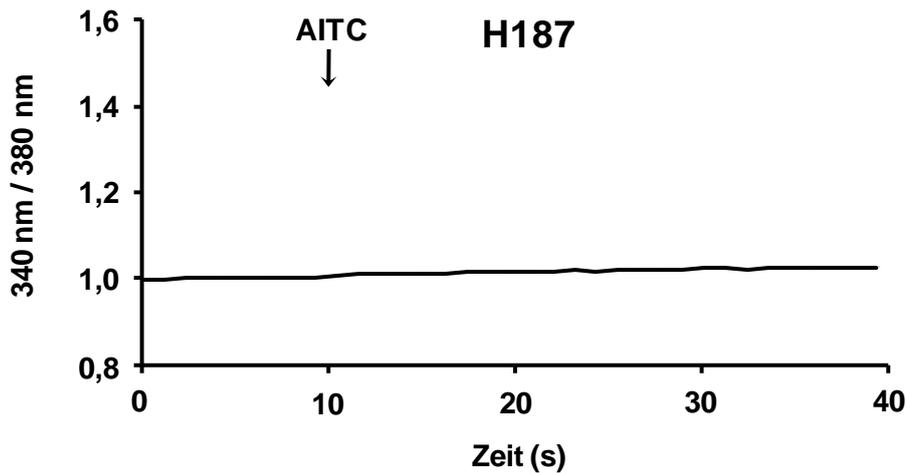


Abb. 42: *Bestimmung des Effektes einer AITC-Injektion auf die $[Ca^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der den TRPA1 nicht exprimierenden Zelllinie H187.* Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden H187-Zellen mit 30 μ M AITC stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Aufgrund der sehr geringen Varianz der Datenpunkte ist die Streuung um den jeweiligen Mittelwert im dargestellten Maßstab nicht erkennbar.

Um aber sicherzustellen, dass die H187-Zellen prinzipiell reagibel sind, wurde als Kontrollexperiment 10 μ M Bradykinin als TRPA1-unabhängiger Stimulus injiziert, was einen deutlichen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge hatte (Abb. 43).

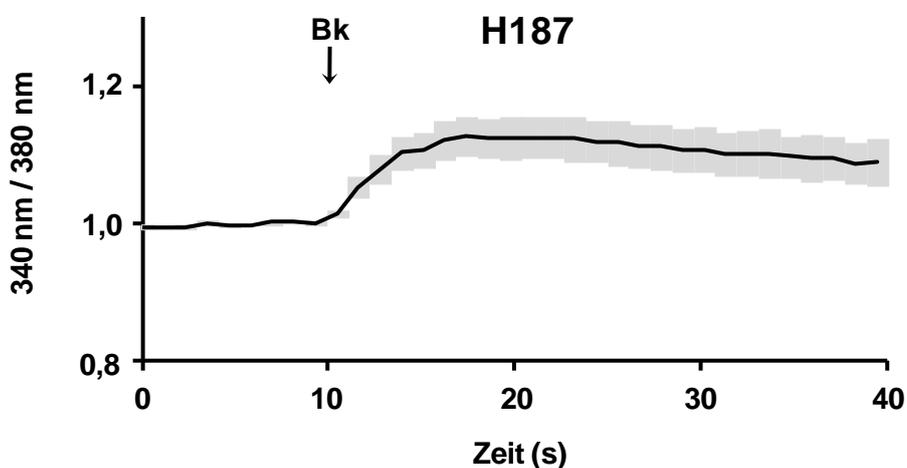


Abb. 43: *Bestimmung der Bradykinin (Bk)-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der den TRPA1 nicht exprimierenden Zelllinie H187.* Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden H187-Zellen mit 10 μ M Bradykinin stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass der durch AITC in H146-Zellen hervorgerufene Effekt spezifisch über eine Aktivierung des TRPA1-Kanals vermittelt wird.

Um den AITC-Effekt in H146-Zellen weiter zu charakterisieren, wurden steigende AITC-Konzentrationen getestet (5 – 120 μM). Hierbei zeigte sich bis zu einer Konzentration von 100 μM eine zunehmende Amplitude der Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Aus der sich hieraus ergebenden Dosis-Wirkungskurve ließ sich ein EC_{50} Wert von 69 μM berechnen.

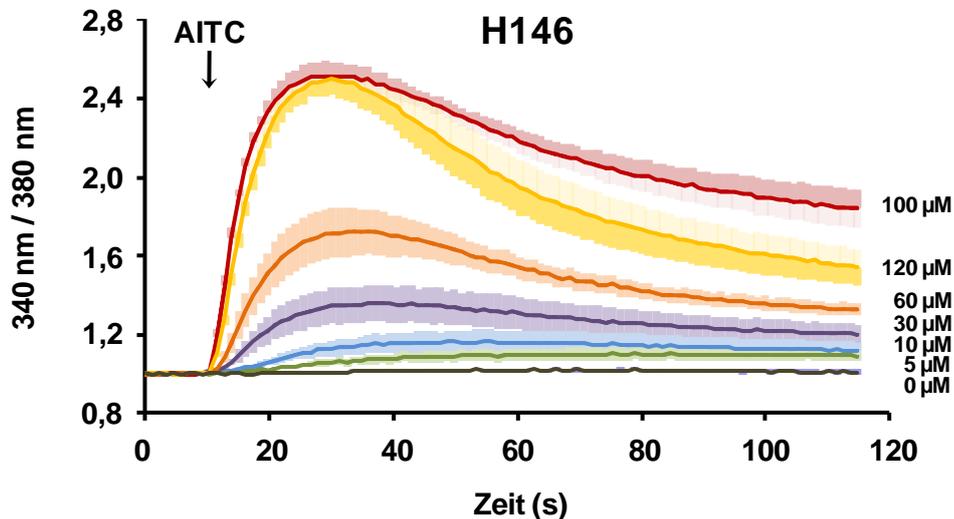


Abb. 44: Bestimmung der AITC-induzierten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H146. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Um einen Dosis-abhängigen Effekt zu ermitteln, wurden H146-Zellen mit 5 – 120 μM AITC stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

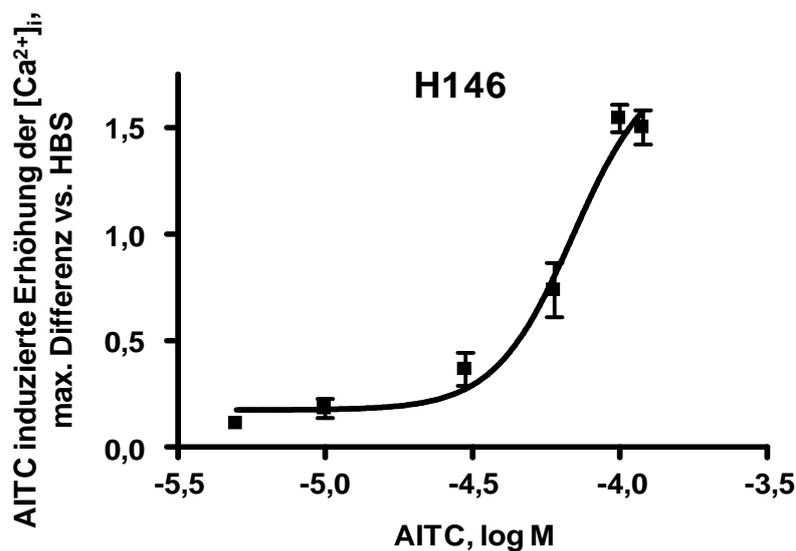


Abb. 45: Dosis-Wirkungskurve der Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in H146-Zellen nach AITC-Stimulierung. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit in der Literatur gefundenen Angaben in anderen TRPA1-exprimierenden Zellsystemen (Jordt et al, 2004).

Zusätzlich wurde in zwei weiteren TRPA1-positiven Zelllinien der Einfluss von AITC auf die $[Ca^{2+}]_i$ untersucht. Da für diese Untersuchungen bereits Zelllinien vorlagen, die stabil das Ca^{2+} -Sensorprotein Aequorin exprimieren (H69Aeq und H510Aeq), wurde dieses Nachweisverfahren benutzt.

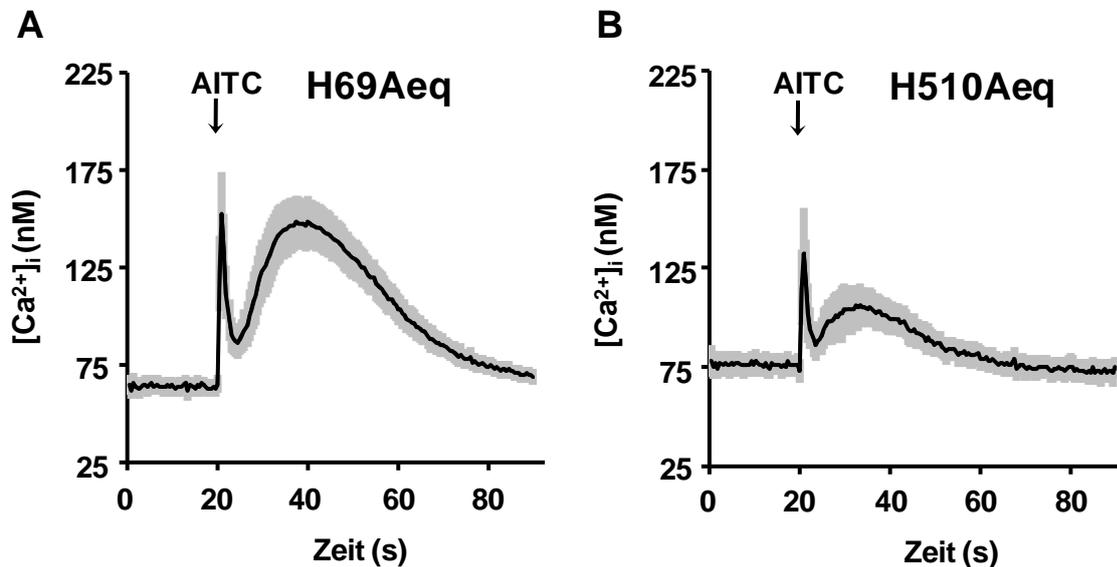


Abb. 46: Bestimmung der AITC-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Aequorin-Lumineszenzmessung in den TRPA1-exprimierenden Zelllinien H69 (A) und H510 (B). Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde ermittelt, indem Zellen, die das Ca^{2+} -Sensorprotein Aequorin-GFP stabil exprimieren, mit Coelenterazin markiert wurden und anschließend in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterlumineszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden die Zellen mit $10 \mu M$ AITC stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Diese Daten wurden in der Diplomarbeit (E. Schäfer 2007) erhoben und werden hier der Vollständigkeit halber gezeigt.

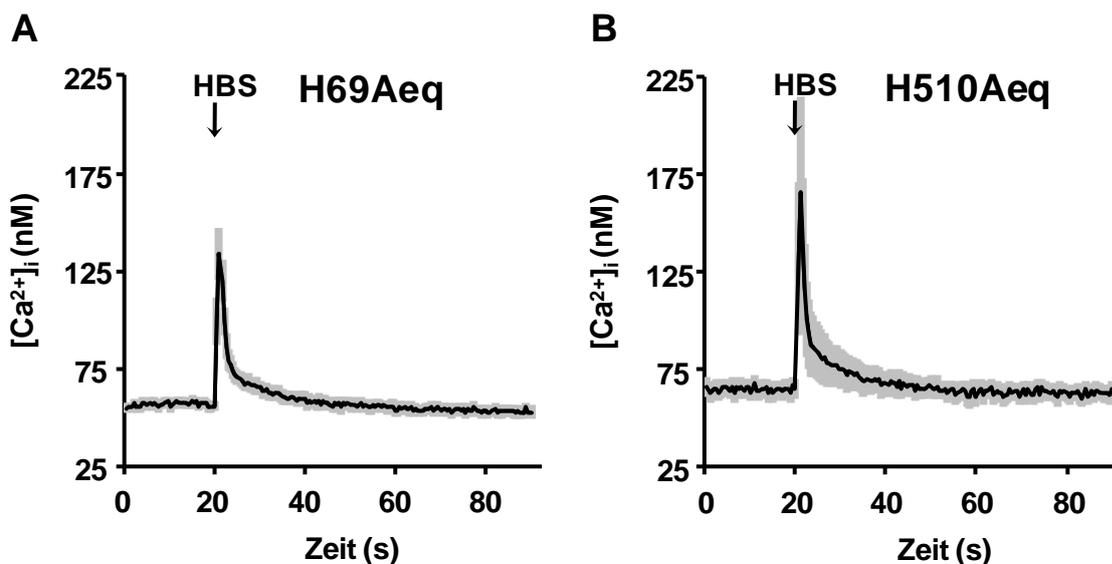


Abb. 47: Bestimmung des Effektes einer Puffer-Injektion (HBS) auf die $[Ca^{2+}]_i$ mittels Aequorin-Lumineszenzmessung in den TRPA1-exprimierenden Zelllinien H69 (A) und H510 (B). Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde ermittelt, indem Zellen, die das Ca^{2+} -Sensorprotein Aequorin-GFP stabil exprimieren, mit Coelenterazin markiert wurden und anschließend in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterlumineszenzlesegerät vermessen wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Bei diesen Untersuchungen konnte analog zu den Versuchen in H146-Zellen ebenfalls eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach AITC-Stimulierung gezeigt werden (Abb. 46). Auch bei diesen Messungen wurden Kontrollexperimente mit einer Injektion von wirkstofffreier Pufferlösung durchgeführt. Dabei zeigten alle Pufferkontrollinjektionen einen initialen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 47). Diese Reaktion entspricht somit der weiter oben auch in 8988tAeq-Zellen beschriebenen Antwort (vgl. 5.4) und ist höchstwahrscheinlich auf den durch die Injektion hervorgerufenen mechanischen Stimulus zurückzuführen.

5.9 Strukturell nicht verwandte TRPA1-Aktivatoren

Um Effekte auszuschließen, die zwar AITC-abhängig, aber dennoch TRPA1-unabhängig sind, wurden mit URB597 und Zimtaldehyd zwei weitere, strukturell mit AITC nicht verwandte TRPA1-Aktivatoren untersucht. Bei URB597 handelt es sich um eine synthetische Verbindung, die ursprünglich als Inhibitor des Endocannabinoid-Abbaus klassifiziert wurde, die aber unabhängig von diesem Effekt auch schon in niedrigen Konzentrationen direkt den TRPA1-Kanal aktivieren soll. URB597 soll dabei nach dem klassischen "Schlüssel-Schloss-Prinzip" an TRPA1 binden (Niforatos et al, 2007). Damit führt URB597 als nicht-elektrophile Verbindung im Gegensatz zu AITC nicht zu einer kovalenten Modifikation von Cystein-Resten und zeigt somit ein anderes Wirkprinzip als die reaktiven TRPA1-Aktivatoren.

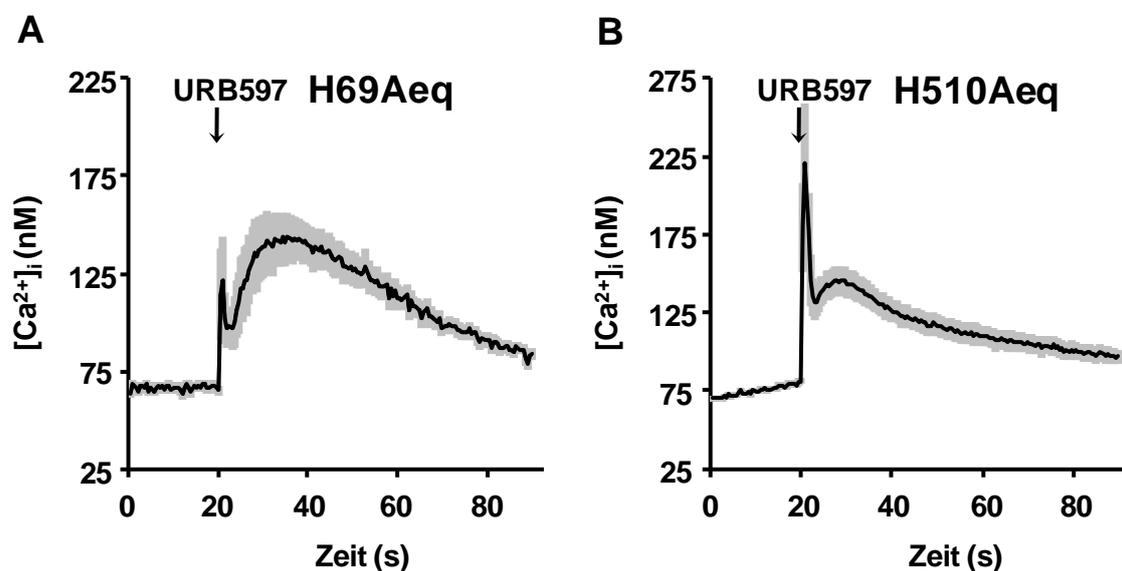


Abb. 48: Bestimmung der URB597-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Aequorin-Lumineszenzmessung in den TRPA1-exprimierenden Zelllinien H69 (A) und H510 (B). Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde ermittelt, indem Zellen, die das Ca^{2+} -Sensorprotein Aequorin-GFP stabil exprimieren, mit Coelenterazin markiert wurden und anschließend in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterlumineszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden die Zellen mit $20 \mu M$ URB597 stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

URB597 wurde, wie auch AITC (vgl. Abb. 46), in den beiden SCLC-Zelllinien H69Aeq und H510Aeq getestet. In beiden SCLC-Zelllinien wurde durch eine Injektion von 20 μM URB597 eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beobachtet (Abb. 48). Ähnlich wie im Falle von AITC zeigte sich auch hierbei eine stärkere Reaktion in den H69Aeq- als in den H510Aeq-Zellen; dies ist ein möglicher Hinweis auf eine höhere funktionelle Expression von TRPA1 in H69Aeq-Zellen.

Als ein dritter Aktivator wurde schließlich Zimtaldehyd getestet. Diese Verbindung ist ein α,β -ungesättigtes Aldehyd und aktiviert TRPA1, indem sie die Cysteinreste des N-Terminus des Kanals kovalent modifiziert (Macpherson et al, 2007a). Dieser Mechanismus ähnelt somit demjenigen von

AITC jedoch ist die zugrundeliegende chemische Reaktion bei α,β -ungesättigten Aldehyden, die sog. Michael-Addukte ausbilden, eine andere als bei Isothiocyanaten.

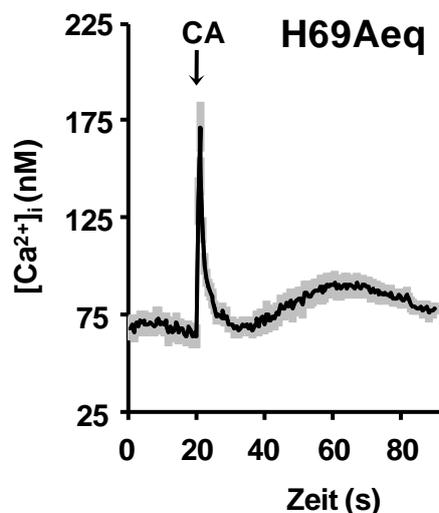


Abb. 49: Bestimmung der Zimtaldehyd (CA)-induzierten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mittels Aequorin-Lumineszenzmessung in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H69. Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde ermittelt, indem Zellen, die das Ca^{2+} -Sensorprotein Aequorin-GFP stabil exprimieren, mit Coelenterazin markiert wurden und anschließend in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterlumineszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden die Zellen mit 200 μM Zimtaldehyd stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Diese Daten wurden in der Diplomarbeit (E. Schäfer 2007) erhoben und werden hier der Vollständigkeit halber gezeigt.

Auch hier konnte in der TRPA1-positiven Zelllinie H69 eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach einer Injektion von 200 μM Zimtaldehyd gezeigt werden (Abb. 49). Zimtaldehyd ist kein besonders effizienter TRPA1-Aktivator und daher ist nur ein schwaches Ca^{2+} -Signal zu erwarten. So zeigte sich bereits in einer früheren Dosis-Wirkungsuntersuchung zum Ca^{2+} -Influx in TRPA1-exprimierenden enterochromaffinen Zellen, dass der maximale Effekt von Zimtaldehyd bei etwa 50 % des maximalen Effektes von Acrolein oder AITC liegt (Doihara et al, 2009). Auch in trigeminalen sensorischen Neuronen ergab sich nach Stimulierung mit Zimtaldehyd im Vergleich zu AITC (in der Publikation mit dem alternativen Namen "mustard oil" bezeichnet) eine deutlich niedrigere Reizantwort (Zanotto et al, 2007).

5.10 AITC-Desensibilisierung

Wie bereits erwähnt, aktiviert AITC TRPA1 auf eine für TRP-Kanäle ungewöhnliche Art und Weise, indem Cysteinreste der N-terminalen Domäne kovalent modifiziert werden. Obwohl die Cysteinaddukte, die so geformt werden, nicht spontan freigesetzt werden, desensibilisieren TRPA1 Kanäle Ca^{2+} -abhängig nach Stimulierungen mit hohen Konzentrationen von AITC.

Diese Agonisten-abhängige Desensibilisierung des Ca^{2+} -Signals, die als weiterer Hinweis für ein spezifisches, TRPA1-vermitteltes Ereignis zu verstehen ist, sollte nun auch im SCLC-System überprüft werden.

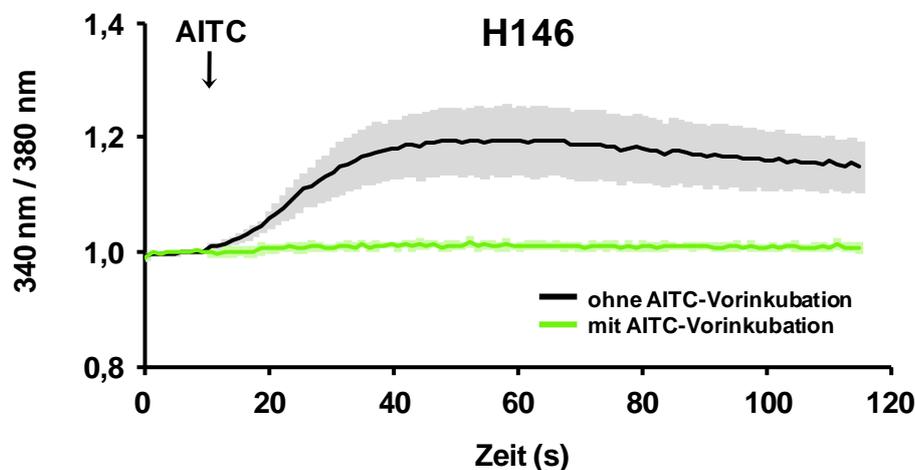


Abb. 50: Bestimmung der AITC-induzierten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H146. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden H146-Zellen, teils mit 60 μM AITC vorinkubiert (grüne Linie), mit 10 μM AITC stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Tatsächlich führte eine Prä-Inkubation der Zellen der SCLC-Linie H146 für 10 Minuten mit 60 μM AITC zu einer vollständigen Inhibition der Ca^{2+} -Antwort bei erneuter Stimulierung mit AITC (Abb. 50). Dieser Befund stützt somit die These, dass die AITC-vermittelte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch TRPA1 vermittelt wird.

5.11 Beteiligung interner Ca^{2+} -Speicher und des extrazellulären Ca^{2+} an der AITC-induzierten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in SCLC-Zellen

Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in SCLC Zellen sollte, wenn sie über TRPA1-Kanälen vermittelt wird, die sich in der Plasmamembran der Zelle befinden, von einem transmembranären Einstrom extrazellulärer Calciumionen abhängen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden H69 Zellen mit Thapsigargin inkubiert, das als Inhibitor der SERCA-Pumpen die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in die internen Speicher des Endoplasmatischen Retikulums (ER) unterbindet, was letztlich eine Entleerung der internen Ca^{2+} -Speicher bewirkt. Diese stehen dadurch nicht mehr als Ca^{2+} -Quelle zur Verfügung, so dass eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die unter diesen Bedingungen noch zu beobachten ist, höchstwahrscheinlich über einen Influx extrazellulärer Calciumionen vermittelt wird. Anschließend wurden die Zellen in einem Aequorin-Assay mit AITC stimuliert. Im eindeutigen Gegensatz zu einer Stimulierung mit dem Neuropeptid Bradykinin, welches bekanntermaßen zu einer Erhöhung der

$[Ca^{2+}]_i$ durch Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führt (Heasley, 2001), konnte die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach AITC-Stimulierung durch Thapsigargin nicht inhibiert werden (Abb. 51).

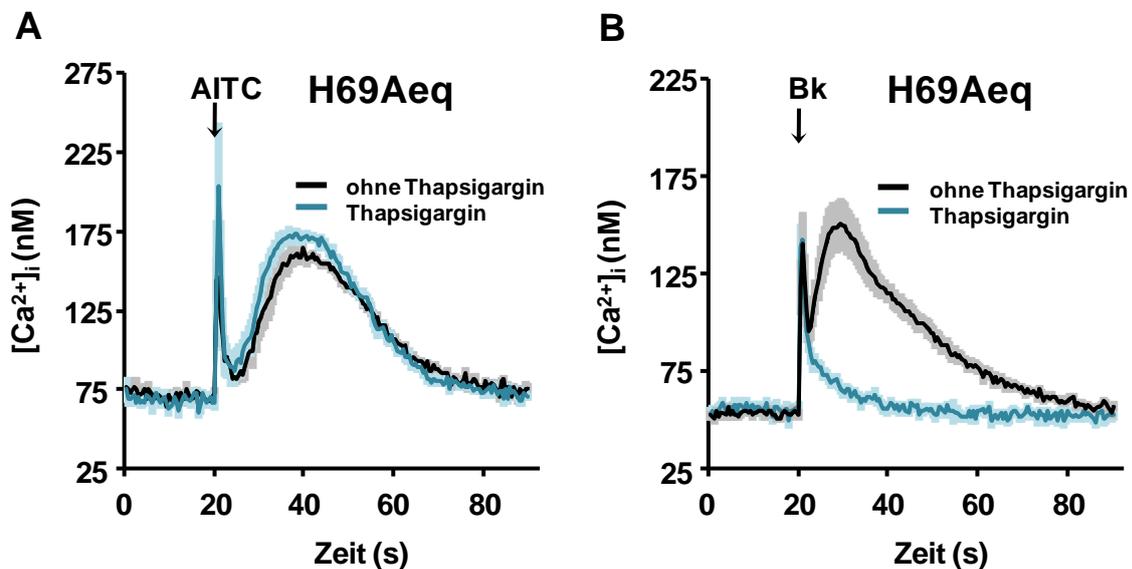


Abb. 51: Bestimmung der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Aequorin-Lumineszenzmessung in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H69 nach Applikation verschiedener Stimuli. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde ermittelt, indem Zellen, die das Ca^{2+} -Sensorprotein Aequorin-GFP stabil exprimieren, mit Coelenterazin markiert wurden und anschließend in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterlumineszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden die Zellen teils mit $0,2 \mu M$ Thapsigargin vorinkubiert und anschließend mit $10 \mu M$ AITC (A) oder $10 \mu M$ Bradykinin (Bk) (B) stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Diese Daten wurden in der Diplomarbeit (E. Schäfer 2007) erhoben und werden hier der Vollständigkeit halber gezeigt.

Darüber hinaus konnte das durch AITC hervorgerufene Ca^{2+} -Signal in H146-Zellen in einem Fura-2-Assay durch Zugabe von EGTA ($2,8 \text{ mM}$) verringert werden (Abb. 52).

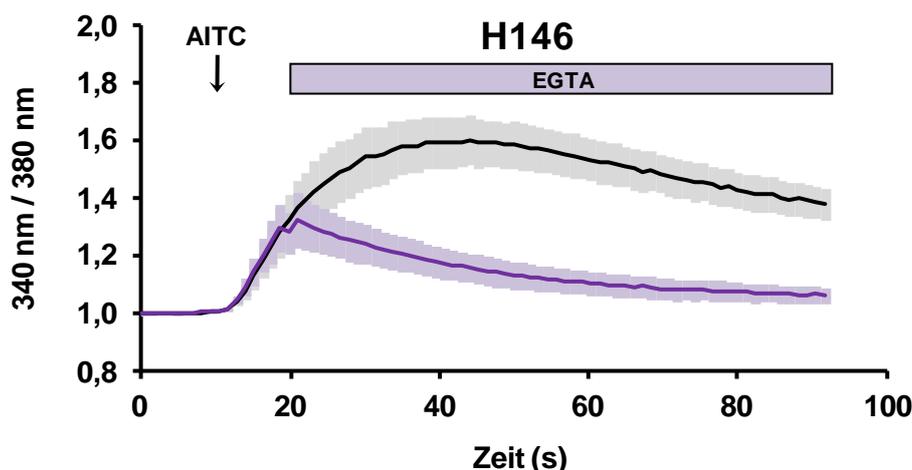


Abb. 52: Bestimmung der AITC-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H146. Die Ratio der Fluoreszenz ($340 \text{ nm}/380 \text{ nm}$) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden H146-Zellen mit $30 \mu M$ AITC stimuliert. Durch Zugabe von $2,8 \text{ mM}$ EGTA konnte der Einstrom von Ca^{2+} verringert werden. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Hierbei fungiert EGTA als ein nicht-zellpermeabler Calciumionen-Chelator, der extrazelluläres Ca^{2+} bindet und neutralisiert, jedoch keinen direkten Effekt auf interne Calciumionenspeicher besitzt. Der hemmende Effekt von EGTA auf die Antwort nach AITC-Stimulierung kann somit als ein Hinweis für einen Calciumionen-Influx verstanden werden.

Dieser inhibitorische Effekt war jedoch nur in sehr geringem Umfang zu beobachten, wenn die Zellen mit Carbachol als TRPA1-unabhängigem Stimulus behandelt wurden (Abb. 53). Im Falle dieser Stimulierung mit Carbachol ist von einer Aktivierung von muscarinischen Acetylcholin-Rezeptoren mit nachfolgender Stimulierung $G_{q/11}$ - und Phospholipase C-abhängiger Signalwege auszugehen. Da dieser Signalweg über einen Anstieg von Inositoltrisphosphat zu einer Entleerung interner Speicher führt (Berridge, 1993; Streb et al, 1983), ist die geringe Beeinflussung der Ca^{2+} -Antwort durch den extrazellulär wirkenden Calciumionenchelator EGTA plausibel. Die Tatsache, dass EGTA auch im Fall von Carbachol eine, wenn auch nur geringgradige, Abschwächung des Ca^{2+} -Signals verursachte, weist darauf hin, dass zusätzlich zu internen Speichern auch ein gewisser Ca^{2+} -Influx über die Plasmamembran an der Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Carbachol beteiligt ist. Dies deckt sich mit Befunden, dass Carbachol in HEK293-Zellen zu einer Aktivierung Rezeptor-operierter Kationenkanäle führen kann (Alexander Dietrich, persönliche Mitteilung).

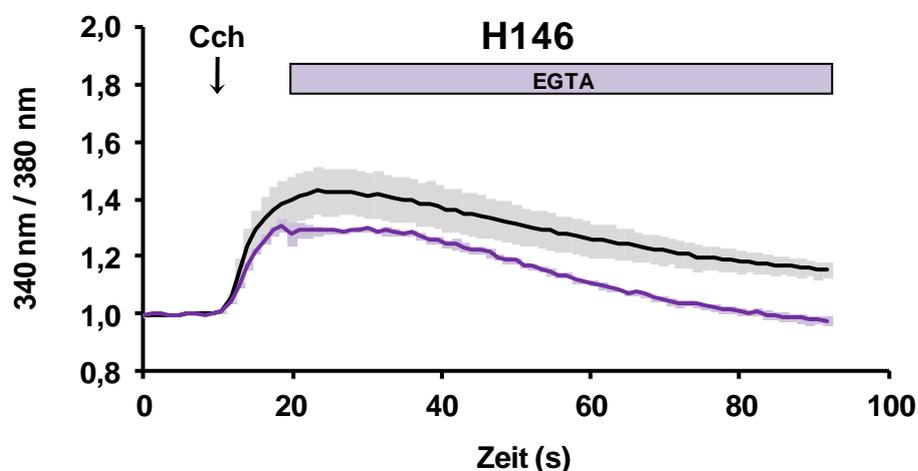


Abb. 53: Bestimmung der Carbachol (Cch)-induzierten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der Zelllinie H146. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden H146-Zellen mit 100 μM Cch stimuliert. Durch Zugabe von 2,8 mM EGTA konnte der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nur unwesentlich verringert werden. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.12 Analyse der SCLC-Zellen mittels Inhibitoren von TRPA1

Zur weiteren Analyse der TRPA1-Funktion wurden eine Reihe von Experimenten durchgeführt, in denen die durch AITC vermittelte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch verschiedene TRP-Kanalinhibitoren blockiert werden sollte.

Zunächst wurde hierzu Rutheniumrot eingesetzt, eine Verbindung, die als Porenblocker eine ganze Reihe von TRP-Kanälen inklusive TRPA1 verstopft und damit den Ionenstrom inhibiert. Obwohl dieser Inhibitor nicht spezifisch für TRPA1 ist, wird er in Untersuchungen zu TRPA1-abhängigen Funktionen häufig verwendet, da er den Kanal sehr effizient blockiert.

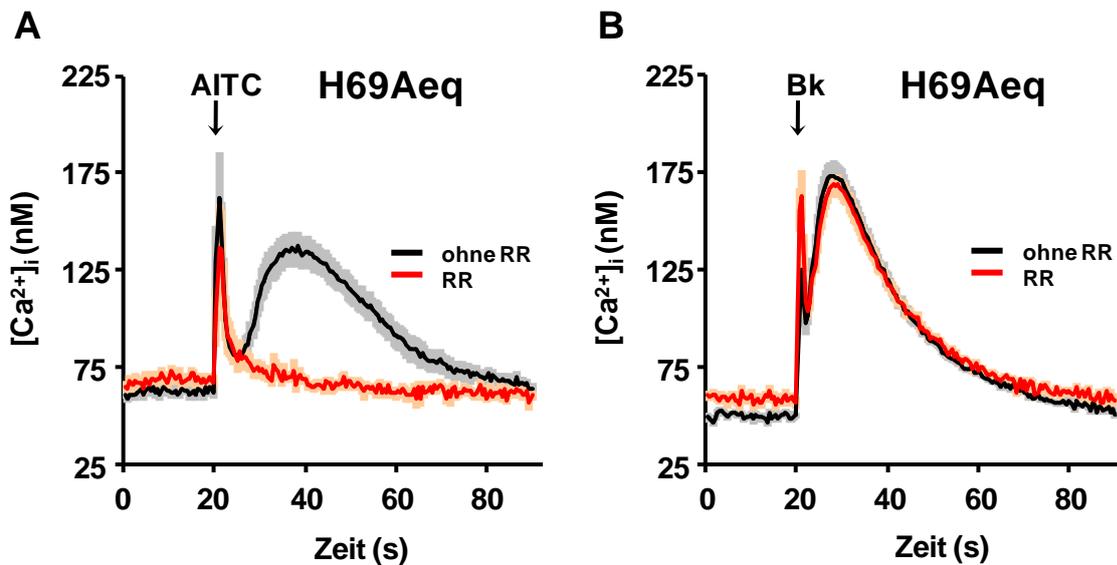


Abb. 54: Bestimmung der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels Aequorin-Lumineszenzmessung in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H69 nach Applikation verschiedener Stimuli. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde ermittelt, indem Zellen, die das Ca^{2+} -Sensorprotein Aequorin-GFP stabil exprimieren, mit Coelenterazin markiert wurden und anschließend in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterlumineszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden die Zellen zum Teil mit $10 \mu M$ Rutheniumrot (RR) für 30 min vorstimuliert und anschließend mit $10 \mu M$ AITC (A) oder $10 \mu M$ Bradykinin (Bk) (B) stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Diese Daten wurden in der Diplomarbeit (E. Schäfer 2007) erhoben und werden hier der Vollständigkeit halber gezeigt.

In der Tat inhibierte Rutheniumrot das durch AITC induzierte Ca^{2+} -Signal in H69-Zellen vollständig (Abb. 54A), wohingegen die durch Bradykinin-induzierte, TRPA1-unabhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in H69-Zellen nicht vermindert wurde (Abb. 54B).

Auch in H146-Zellen konnte die vollständige Blockierung des Ca^{2+} -Einstromes in die Zellen durch Vorinkubation mit Rutheniumrot bestätigt werden (Abb. 55). Diese Befunde stützen zusätzlich die Hypothese, dass TRPA1 in SCLC-Zellen funktionell exprimiert wird. Aufgrund der relativ geringen Spezifität von Rutheniumrot für TRPA1 sind diese Ergebnisse jedoch noch nicht beweisend für eine Rolle dieses Kanals beim AITC-vermittelten Ca^{2+} -Influx. Aus diesem Grund wurden weitere Inhibitoren von TRPA1 getestet.

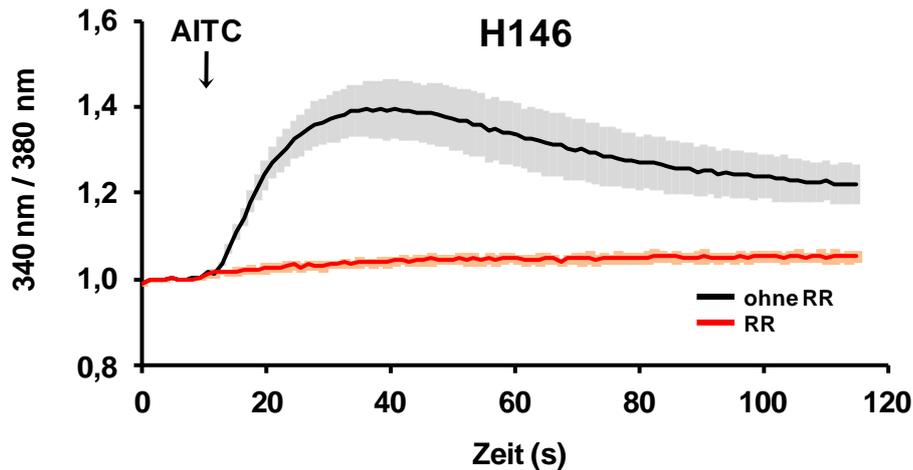


Abb. 55: Bestimmung der AITC-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H146. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden H146-Zellen, teils mit $10 \mu\text{M}$ RR vorinkubiert, mit $30 \mu\text{M}$ AITC stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Als strukturell nicht verwandter Inhibitor wurde Campher getestet, das als TRPA1-Blocker beschrieben (Xu et al, 2005) und seither in zahlreichen Untersuchungen zu TRPA1 verwendet wurde. Bei Campher handelt es sich um einen im Vergleich zu Rutheniumrot TRPA1-spezifischeren Blocker. So übte diese Substanz in einem heterologen Expressionssystem z. B. keinen Effekt auf TRPV2, TRPV4 und TRPC5 aus (Xu et al, 2005). Interessanterweise ist Campher aber in der Lage, die TRP-Kanäle TRPV1 und TRPV3 zu aktivieren (Xu et al, 2005).

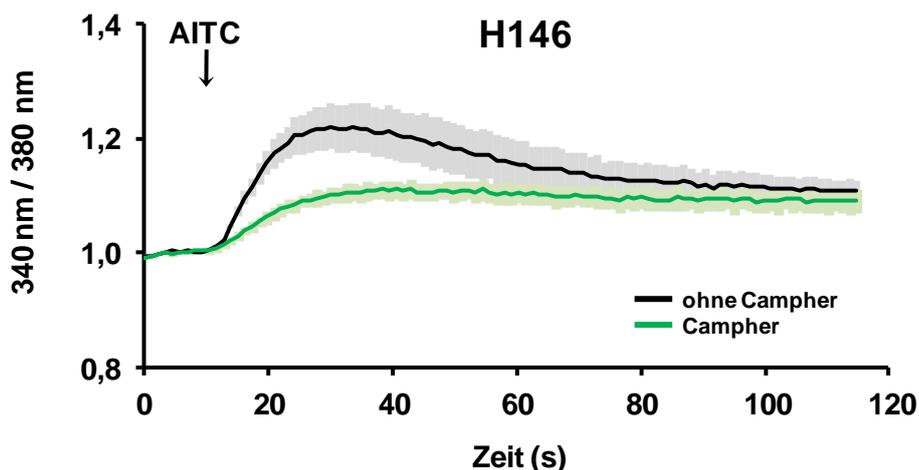


Abb. 56: Bestimmung der AITC-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H146. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden H146-Zellen, teils mit 2mM Campher vorinkubiert, mit $30 \mu\text{M}$ AITC stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

In der hier vorliegenden Untersuchung konnte Campher das durch AITC hervorgerufene Ca^{2+} -Signal deutlich inhibieren (Abb. 56), wenn auch im Gegensatz zu Rutheniumrot in der getesteten Konzentration keine vollständige Hemmung erzielt wurde.

Schließlich wurde der synthetische TRPA1-Blocker AP-18 getestet. AP-18 ist ein verhältnismäßig neuer TRPA1-Inhibitor mit einer gewissen strukturellen Ähnlichkeit zu Zimtaldehyd (Petrus et al, 2007). Für AP-18 wurde postuliert, dass diese Substanz, ähnlich wie die klassischen Aktivatoren von TRPA1, zu einer kovalenten Modifikation des Kanals führt und somit ein irreversibler Antagonist für TRPA1 ist (Defalco et al, 2010). AP-18 erwies sich in bisherigen Untersuchungen als spezifischer TRPA1-Inhibitor, der z. B. keinen Effekt auf TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 oder TRPM8 ausübte (Petrus et al, 2007).

Auch AP-18 konnte das Ca^{2+} -Signal inhibieren (Abb. 57) und ähnelte dabei in seiner Effektivität derjenigen von Campher. Ein inhibitorischer Effekt von AP-18 war jedoch nicht zu verzeichnen, wenn die Zellen mit Carbachol stimuliert wurden (Abb. 58), also ein Agonist an Acetylcholin-Rezeptoren verwendet wurde, der zu einer TRPA1-unabhängigen Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt.

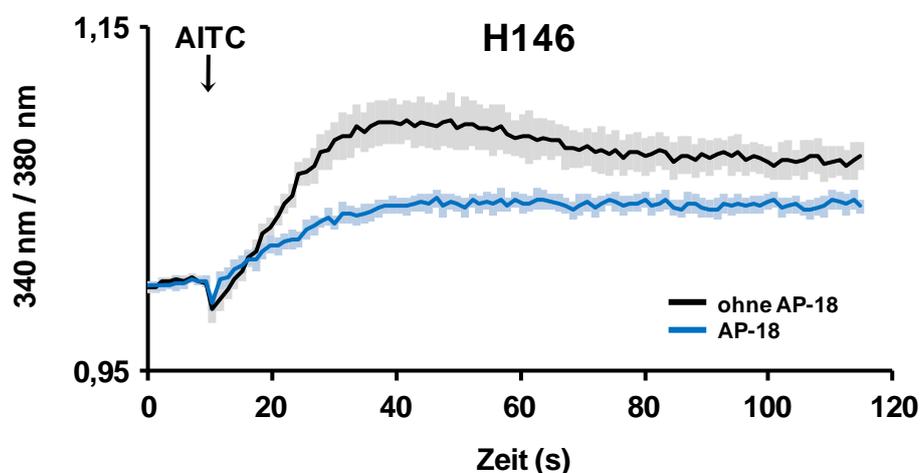


Abb. 57: Bestimmung der AITC-induzierten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H146. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden H146-Zellen, teils mit 5 μM AP-18 vorinkubiert, mit 30 μM AITC stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

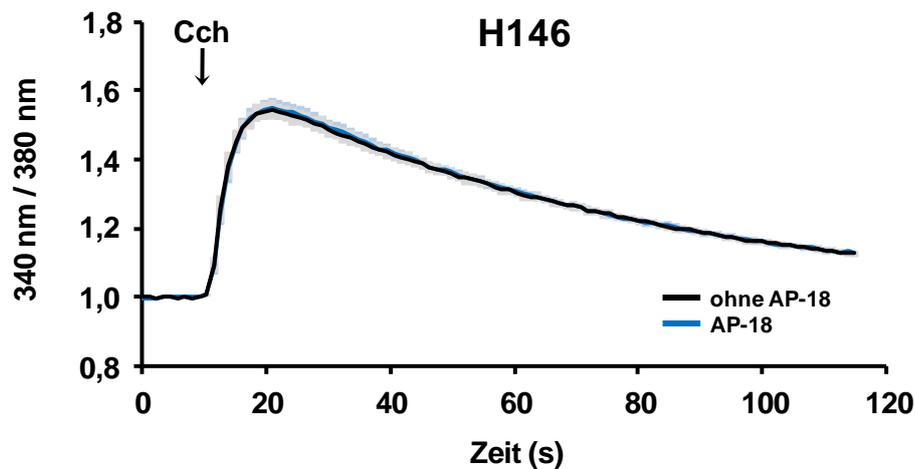


Abb. 58: Bestimmung der Carbachol (Cch)-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H146. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden H146-Zellen, teils mit 5 μ M AP-18 vorinkubiert, mit 100 μ M Cch stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Aufgrund des nahezu identischen Verlaufs liegen die Kurven für Cch und Cch + AP-18 übereinander.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich für drei strukturell nicht verwandte TRPA1-Inhibitoren ein jeweils ähnlicher Befund ergab, nämlich eine deutliche Abschwächung der AITC-vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Diese Befunde stützen daher in hohem Maße die These, dass der Ca^{2+} -Influx nach AITC-Stimulierung in den getesteten SCLC-Zellen tatsächlich durch den TRPA1-Kanal erfolgt.

5.13 TRPA1-Aktivierung im heterologen Expressionssystem in HEK293-Zellen

Die bisher vorgestellten Befunde stützen eine Rolle von TRPA1 bei den Effekten von AITC in SCLC-Zellen sowie in Pankreaskarzinomzellen (vgl. 5.4) und der Alveolar-Typ-II-Zelllinie A549 (vgl. 5.5).

Aus diesen Daten ergibt sich u. a. die Frage, inwieweit TRPA1 in diesen nicht neuronalen Zellsystemen an der Signaltransduktion durch endogene reaktive Verbindungen oder exogene Elektrophile beteiligt ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurde im nächsten Schritt ein Überexpressionssystem für den TRPA1-Kanal etabliert. Zu diesem Zweck wurden HEK293-Zellen stabil mit dem TRPA1 Konstrukt transfiziert (vgl. 4.3.9). Die so generierte TRPA1-positive Subzelllinie HEK293-A1-E wurde dann mit den nicht TRPA1-exprimierenden, ansonsten aber identischen, HEK293-Zellen (HEK293 Wt) verglichen.

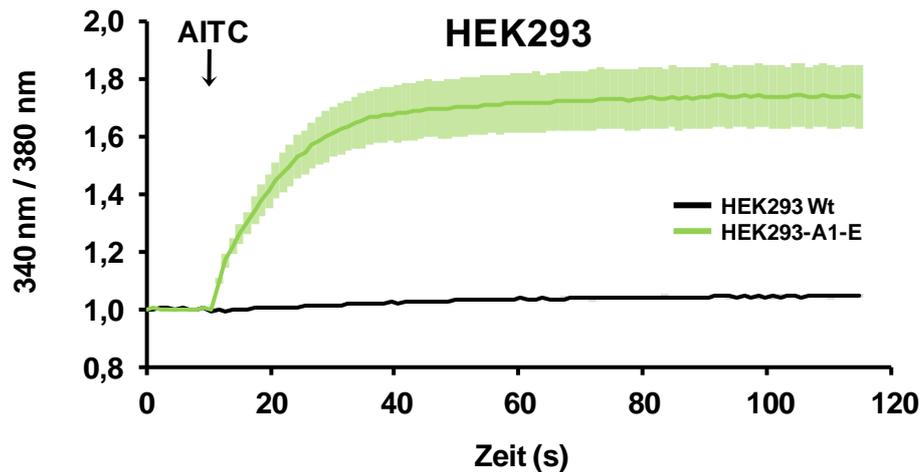


Abb. 59: Bestimmung der AITC-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der Zelllinie HEK293-A1-E, die den TRPA1-Kanal stabil heterolog exprimiert. Zum Vergleich sind auch untransfizierte HEK293-Zellen (HEK293 Wt) untersucht worden, die keine Expression von TRPA1 zeigen. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden die Zellen mit $30 \mu\text{M}$ AITC stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Auch diese Zellen zeigten, wie zu erwarten war, eine sehr deutliche Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Zugabe von $30 \mu\text{M}$ AITC (Abb. 59). Im Gegensatz dazu unterblieb eine Antwort vollständig nach AITC-Stimulierung von HEK293-Zellen, die den TRPA1-Kanal nicht heterolog exprimieren.

5.14 TRPA1-Aktivierung durch Stickstoffmonoxid (NO)-Donatoren in stabil transfizierten HEK293-Zellen

Mit Hilfe dieses neu etablierten Expressionssystems war es nun möglich, potentielle TRPA1-Aktivatoren zu untersuchen, die in der Literatur noch nicht abschließend charakterisiert sind. So wurde in einigen Arbeiten beschrieben, dass Stickstoffmonoxid (NO)-Donatoren zu einer Aktivierung dieses Kanals führen können (Miyamoto et al, 2009; Takahashi et al, 2008). Da NO ein wichtiges körpereigenes Signalmolekül ist, deuten diese Befunde auf mögliche endogene Aktivierungswege hin, über die TRPA1 z. B. unter entzündlichen Bedingungen aktiviert werden könnte. Aufgrund einer Vielzahl TRPA1-unabhängiger Signalwege, die durch NO stimuliert werden können, z. B. durch die Aktivierung löslicher Guanylylcyclasen, ist bei einer Testung von NO-Donatoren die Verfügbarkeit eines "Plus-Minus-Systems" sehr nützlich, was im Falle TRPA1-positiver und TRPA1-negativer HEK293-Zellen gegeben ist.

Tatsächlich zeigte sich nun, dass der NO-Donator Methylamin-hexamethylen-methylamin MAHMA-NONOat in HEK293-Zellen, welche TRPA1 stabil exprimieren, zu einem wesentlich höheren Calciumionen-Einstrom führte als in TRPA1-negativen HEK293-Kontrollzellen (Abb. 60). Aus diesem Grund ergab sich die Möglichkeit, durch Vergleich beider Zellsysteme nach neuen, TRPA1-

abhängigen Signalwegen von NO zu suchen. Diese weitergehenden Untersuchungen sind nicht primär Gegenstand dieser Arbeit sondern wurden in einer im Rahmen dieses Projektes betreuten medizinischen Dissertation von Frau Christina Berr verfolgt (Berr et al., 2013).

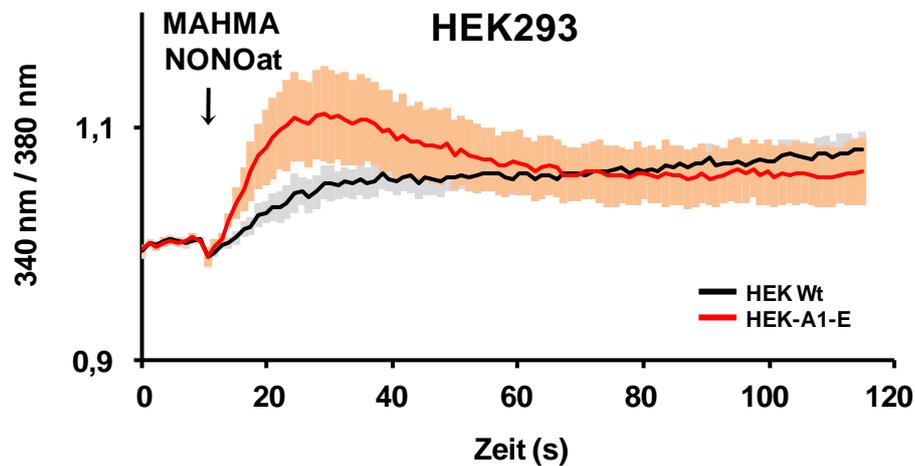


Abb. 60: Bestimmung der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch den NO-Donator MAHMA-NONOat anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der Zelllinie HEK293-A1-E, die den TRPA1-Kanal stabil heterolog exprimiert. Zum Vergleich sind auch untransfizierte HEK293-Zellen (HEK293 Wt) untersucht worden, die keine Expression von TRPA1 zeigen. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden die Zellen mit $50 \mu\text{M}$ MAHMA-NONOat stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.15 TRPA1-Aktivierung durch "cigarette smoke extract" (CSE) in stabil transfizierten HEK293-Zellen

Bei AITC handelt es sich um einen gut in der Literatur beschriebenen Stimulator von TRPA1. Daher ist diese Substanz zur Charakterisierung TRPA1-abhängiger Signalwege in SCLC Zellen sehr gut geeignet. Allerdings kommt AITC nicht endogen im Körper vor und bei diätetischer Aufnahme gelangt diese Substanz nicht in relevantem Umfang in die Lunge. Daher wurden zusätzlich weitere Experimente mit etablierten lungentoxischen Stoffen durchgeführt.

Ein erster Fokus lag auf Untersuchungen zu Effekten von Tabakrauch, da dieses komplexe Gemisch von Lungenschadstoffen eine hohe medizinische Relevanz besitzt und insbesondere als etablierter Auslöser für die Entwicklung eines SCLC ein naheliegender Untersuchungsgegenstand ist. Darüber hinaus sind etliche Bestandteile des Zigarettenrauchs, wie Formalin, Acrolein oder Crotonaldehyd als TRPA1-Agonisten beschrieben worden.

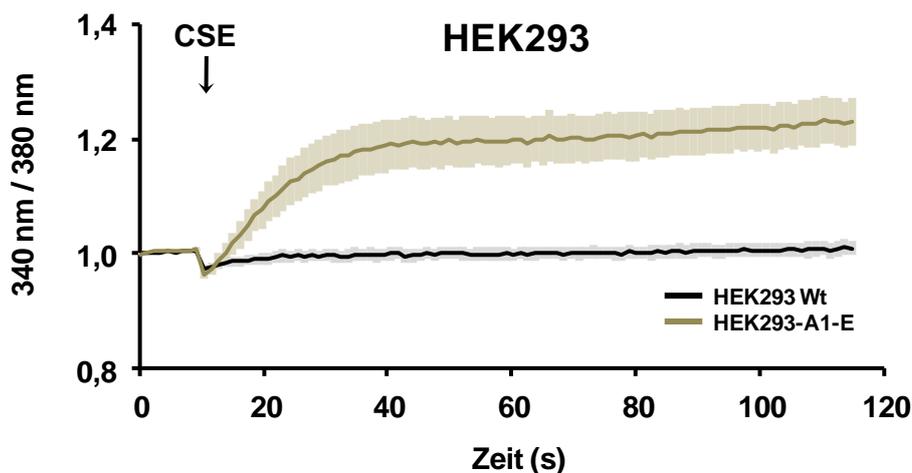


Abb. 61: Bestimmung der Zigarettenrauch-Extrakt (CSE)-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der Zelllinie HEK293-A1-E, die den TRPA1-Kanal stabil heterolog exprimiert. Zum Vergleich sind auch untransfizierte HEK293-Zellen (HEK293 Wt) untersucht worden, die keine Expression von TRPA1 zeigen. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden die Zellen mit CSE in einer Endkonzentration von 2 % stimuliert (vgl. 4.3.10 für Informationen zu Dosisangaben bei CSE). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Eine methodische Schwierigkeit liegt jedoch in der reproduzierbaren und quantifizierbaren Applikation eines gasförmigen bzw. feinpartikulären Substanzgemisches auf die in einer Flüssigphase befindlichen Zellen. Aus diesem Grund wurde ein wässriges Extrakt von Zigarettenrauch (CSE) für diese Untersuchungen verwendet. CSE wird durch die Extraktion von Zigarettenrauch (Hauptstromrauch normierter Zigaretten) gewonnen, der zu diesem Zweck durch Zellkultur-Medium geleitet wurde (vgl. hierzu auch 4.3.10 für weitere Informationen).

Auch hier konnte man in dem Überexpressionssystem einen deutlichen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verzeichnen (Abb. 61). Verglichen damit war dieser Calciumionen-Einstrom bei TRPA1-negativen HEK293-Wildtyp-Zellen nicht zu beobachten und scheint daher allein von der Expression des TRPA1 Kanals abhängig zu sein.

5.16 TRPA1-Aktivierung durch "cigarette smoke extract" (CSE) in H146-Zellen

Interessanterweise war eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in H146-SCLC-Zellen bei derselben CSE-Konzentration, die in Abb. 61 verwendet wurde noch weitaus ausgeprägter und durch den TRP-Kanalinhistor Rutheniumrot fast vollständig inhibierbar (Abb. 62).

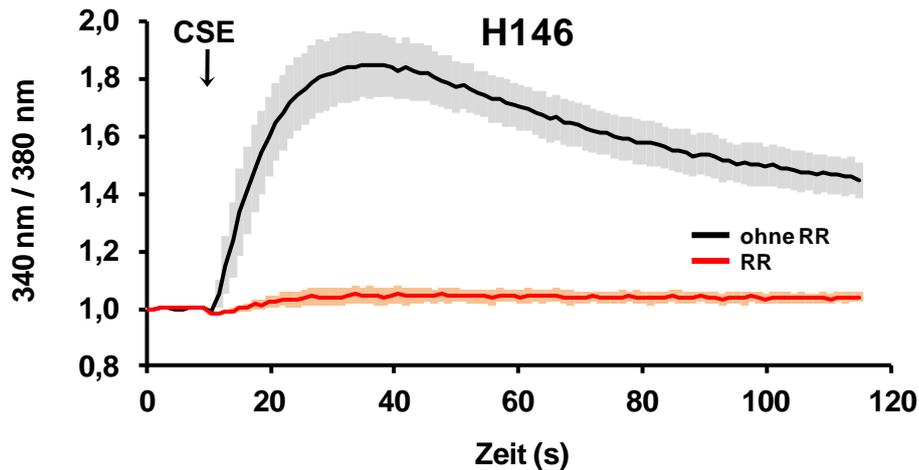


Abb. 62: Bestimmung der Zigarettenrauch-Extrakt (CSE)-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ anhand der Änderung der Fura-2 Ratio in der TRPA1-exprimierenden Zelllinie H146. Die Ratio der Fluoreszenz (340 nm/380 nm) wurde ermittelt, indem Fura-2-AM markierte Zellen in Suspension in einer 96-Loch-Platte in einem Microtiterfluoreszenzlesegerät vermessen wurden. Hierzu wurden H146-Zellen, teils mit $10 \mu\text{M}$ RR vorinkubiert, mit CSE in einer Endkonzentration von 2 % stimuliert (vgl. 4.3.10 für Informationen zu Dosisangaben bei CSE). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Betrachtet man die Befunde in heterolog den TRPA1 exprimierenden HEK293-A1-E-Zellen und in H146-Zellen ergeben sich starke Hinweise darauf, dass die CSE-abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ eine funktionelle Expression des TRPA1-Kanals erfordert.

5.17 Aktivierung der MAPK-Kaskade über TRPA1 in SCLC-Zellen

In SCLC-Zellen führen zahlreiche Stimuli, welche die $[Ca^{2+}]_i$ erhöhen, zur Zellproliferation durch die Aktivierung der MAPK-Kaskade über eine Phosphorylierung von ERK1/2.

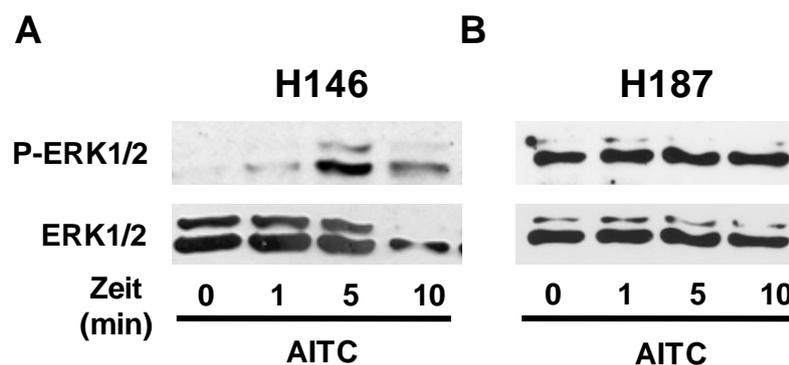


Abb. 63: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-positiven H146-Zellen (A) und TRPA1-negativen H187-Zellen (B) mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladkontrolle). Beide Zelllinien wurden für 0–10 min mit $30 \mu\text{M}$ AITC stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Auch in dem SCLC-Zellsystem führte eine Stimulierung der TRPA1-positiven H146-Zellen zu einer deutlichen Erhöhung der Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 63A). Dies war in H187-Zellen, die den TRPA1 nicht exprimieren, nicht der Fall (Abb. 63B). Daher ist auch hier ein TRPA1-spezifischer Effekt sehr wahrscheinlich.

Wie die quantitative Auswertung des ERK1/2-Signals zeigte (Abb. 64), war die ERK-Phosphorylierung in H146-Zellen, die für 5 Minuten mit AITC behandelt wurden, signifikant größer als in unbehandelten Zellen. Im Gegensatz dazu ergab sich bei H187-Zellen, die den TRPA1-Kanal nicht exprimieren, kein signifikanter Unterschied zwischen AITC-behandelten und nicht behandelten Zellen (Abb. 64).

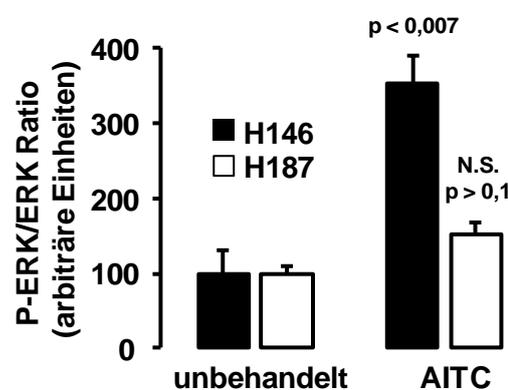


Abb. 64: Quantifizierung der ERK1/2-Phosphorylierung "Western-Blot" in Zelllysaten aus unstimulierten und AITC-stimulierten TRPA1-positiven H146-Zellen und TRPA1-negativen H187-Zellen. Evaluiert wurden jeweils die Intensitäten der phosphorylierten versus der unphosphorylierten Banden der unstimulierten Zellen und der Zellen die mit 30 μ M AITC für 5 min stimuliert wurden. Die angegebenen Signifikanzniveaus beziehen sich auf den jeweiligen Vergleich mit dem korrespondierenden Wert für unbehandelte Zellen. N.S. = nicht signifikant.

In HEK293-Zellen, die transient den humanen TRPA1 exprimierten, resultierte eine Stimulierung mit 30 μ M AITC in einer mit der Aktivierung im endogenen System vergleichbaren Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 65, links). In den nicht-transfizierten HEK293-Zellen dagegen konnte keinerlei Änderung im Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 festgestellt werden (Abb. 65, rechts).

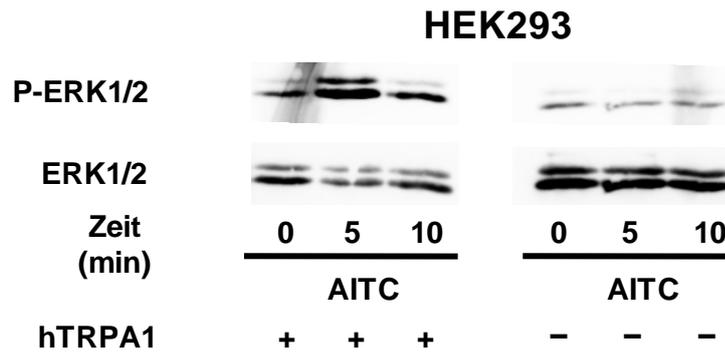


Abb. 65: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus HEK293-Zellen (rechts) und transient mit humanem TRPA1 (hTRPA1)-transfizierten HEK293-Zellen (links) mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Beide Zelllinien wurden für 0, 5 oder 10 min mit 30 μ M AITC stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Auch in diesem Fall wurde die Beteiligung des TRPA1 erneut überprüft, indem die durch AITC hervorgerufene Erhöhung der ERK1/2-Phosphorylierung in H146-Zellen durch vorherige Inkubation der Zellen mit Rutheniumrot inhibiert wurde. Um sicherzustellen, dass es nicht zu TRP-unabhängigen, inhibitorischen Effekten von Rutheniumrot kommt, wurde darüber hinaus auch die Wirkung von Rutheniumrot auf eine Stimulierung der Zellen mit FCS getestet.

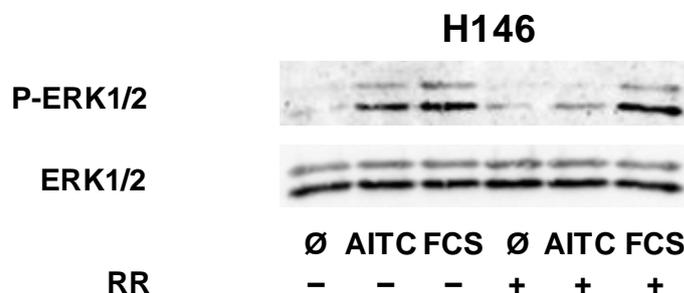


Abb. 66: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H146-Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen, teils für 30 min mit 10 μ M RR vorinkubiert, wurden für 5 min mit 30 μ M AITC oder 10 % FCS stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass die AITC-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 durch Vorbehandlung mit Rutheniumrot hemmbar war, während die TRPA1-unabhängige Wirkung von FCS durch Rutheniumrot nicht beeinflusst wurde (Abb. 66). Dieser Befund untermauert die These, dass TRPA1 entscheidend in die AITC-vermittelte Aktivierung der ERK1/2-Kaskade in SCLC-Zellen involviert ist.

Als weiterer Inhibitor zur Testung der Rolle von TRPA1 bei der AITC-vermittelten ERK1/2-Aktivierung wurde AP-18 verwendet, der, wie oben (Abb. 57 und Abb. 68) gezeigt, als effektiver und spezifischer Inhibitor der AITC-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ fungierte. In der Tat führte eine Vorbehandlung von H146-Zellen mit steigenden Konzentrationen von AP-18 dosisabhängig zu einer Inhibition der AITC-vermittelten ERK1/2-Aktivierung (Abb. 67).

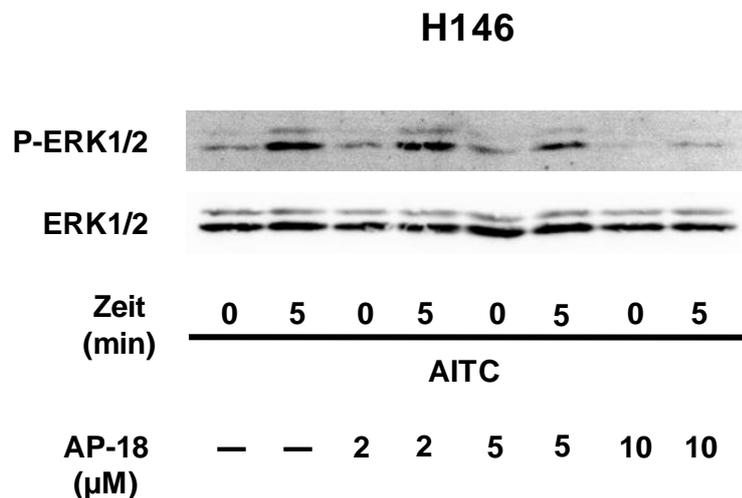


Abb. 67: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H146-Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladkontrolle). Die Zellen, teils für 30 min mit 2, 5 oder 10 µM AP-18 vorinkubiert, wurden für 5 min mit 30 µM AITC stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Weiterhin wurde zur Testung der TRPA1-Spezifität von AP-18 auch eine Behandlung der H146-Zellen mit FCS durchgeführt. Hierbei ergab sich jedoch ebenfalls ein inhibitorischer Effekt, der so eigentlich nicht zu erwarten gewesen wäre (Abb. 68).

Beim jetzigen Stand der Dinge ist noch nicht ganz klar, ob diese Inhibition auf eine Blockade von noch unbekanntem, im Serum enthaltenen TRPA1-Aktivatoren zurückzuführen ist, oder aber auf einen unspezifischen Effekt. Allerdings zeigte sich für den sehr effektiven TRP-Kanalblocker RR kein vergleichbarer inhibitorischer Effekt auf eine FCS-Stimulierung (Abb. 66). Da aus diesem Grund Zweifel an der Spezifität von AP-18 im Hinblick auf eine Inhibition von ERK1/2 angebracht sind, wurde er für die weiteren Experimente nicht mehr verwendet.

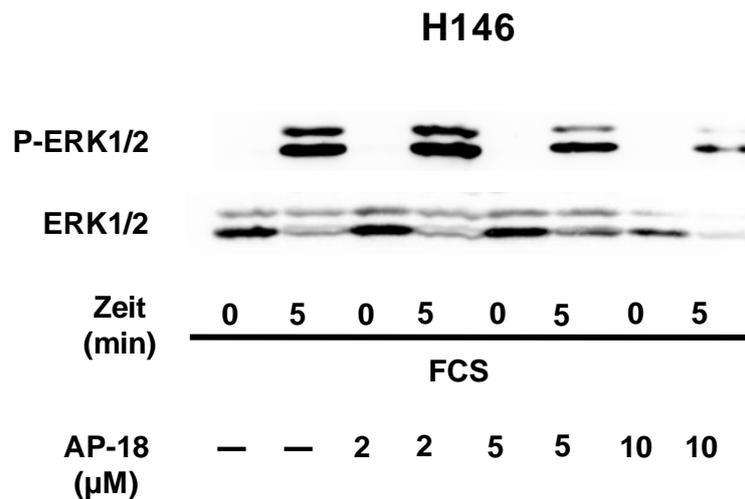


Abb. 68: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H146-Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen, teils für 30 min mit 2, 5 oder 10 µM AP-18 vorinkubiert, wurden für 5 min mit 30 µM AITC stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Um den Mechanismus der ERK1/2-Aktivierung näher zu untersuchen, wurde der Einfluss des extrazellulären Ca²⁺ und der Src-Aktivität genauer untersucht. Es konnte keine ERK1/2-Aktivität bei AITC-stimulierten Zellen festgestellt werden, die zuvor in Puffer ohne Calciumionen inkubiert wurden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die kritische Rolle des TRPA1-vermittelten Calciumionen-Einstroms von extrazellulär bei der Aktivierung von ERK1/2 durch AITC. Außerdem konnte die durch AITC induzierte ERK1/2-Phosphorylierung durch vorherige Inkubation der Zellen mit dem Src-Inhibitor PP2 vollständig unterdrückt werden.

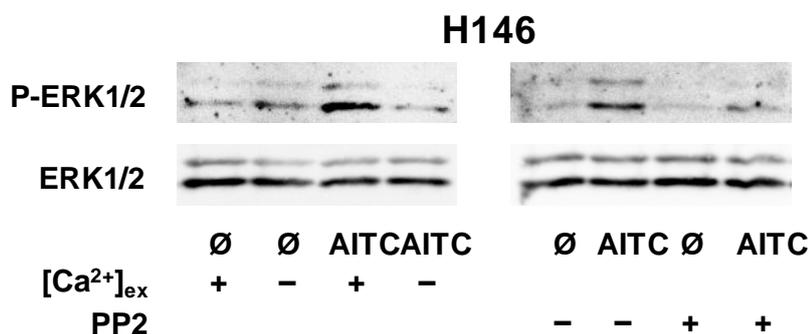


Abb. 69: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H146 Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen wurden teils für 30 min in Ca²⁺-freiem Medium vorinkubiert oder für 30 min mit 10 µM PP2 vorbehandelt. Die Stimulierungen erfolgten für 5 min mit 30 µM AITC. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Auch in den beiden SCLC-Zelllinien H69 und H510 konnte eine Rutheniumrot-hemmbare, AITC-vermittelte ERK1/2-Aktivierung festgestellt werden.

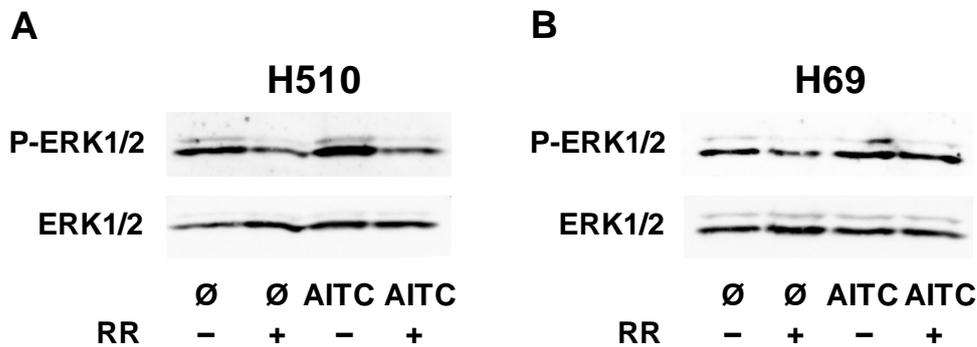


Abb. 70: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H510 (A)- und H69 (B)-Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen, teils für 30 min mit 10 μ M RR vorinkubiert, wurden für 5 min mit 30 μ M AITC stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.18 Aktivierung der MAPK-Kaskade durch Inhalantien

Viele TRPA1-Aktivatoren sind toxische Substanzen mit einer hohen praktischen Relevanz, da sie in der chemischen Industrie verbreitet genutzt werden oder häufige Umweltschadstoffe darstellen. Als Modellsubstanz für hochrelevante toxisch wirksame TRPA1-Aktivatoren kann Formalin dienen, welches ein etablierter Stimulus zur Untersuchung TRPA1-vermittelter Schmerzreaktionen ist (Macpherson et al, 2007b; McNamara et al, 2007). Da Formalin eine volatile Verbindung ist, stellt die Lunge ein wichtiges Aufnahmeorgan für diese Substanz dar. Weiterhin ist Formalin einer der toxikologisch wichtigsten Bestandteile des Zigarettenrauchs. Daher wurde im Anschluss untersucht, ob Formalin in der Lage ist, ERK1/2 TRPA1-abhängig zu phosphorylieren.

Eine Stimulierung der H146-Zellen mit Formalin in einem Dosisbereich von 100 bis 2500 μ M führte in der Tat zu einer gegenüber basalen Werten erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 71). Hierbei zeigte sich eine glockenförmige Dosis-Wirkungs-Beziehung, da es bis zu einer Formalin-Konzentration von 1000 μ M zu einer Dosis-abhängigen Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung kam, wohingegen eine Formalin-Konzentration von 2500 μ M einen gegenüber 500 und 1000 μ M niedrigeren Phosphorylierungsgrad bewirkte (Abb. 71). Bei einer nochmals höheren Formalin-Konzentration von 5000 μ M zeigte sich schließlich keine im Vergleich zu den basalen Werten vermehrte Phosphorylierung von ERK1/2 mehr. Diese Abnahme der Formalin-Wirksamkeit im Hinblick auf eine Aktivierung von ERK1/2 ist höchstwahrscheinlich auf unspezifisch toxische Effekte dieser Substanz im hohen Dosisbereich zurückzuführen.

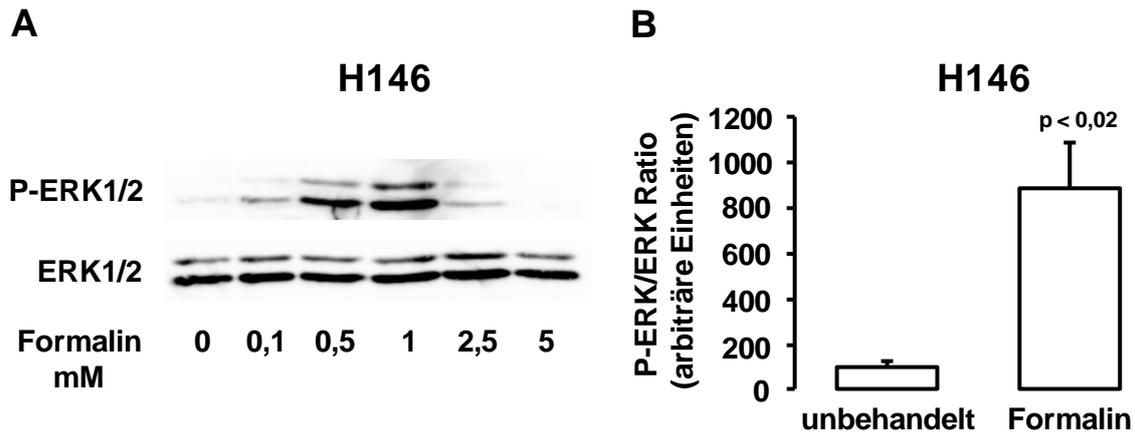


Abb. 71: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H146-Zellen (A) mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen wurden für 5 min mit Konzentrationen zwischen 0 – 5 mM Formalin stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (B) Quantifizierung des Verhältnisses von phosphoryliertem ERK1/2 zur Gesamtmenge von ERK1/2 in den durchgeführten "Western-Blot" von Zelllysaten unbehandelter bzw. für 5 min mit 1 mM Formalin behandelter Zellen. Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich auf den Unterschied von Formalin-behandelten zu unbehandelten Zellen.

Im Zusammenhang mit diesen Befunden ist zu betonen, dass bereits beim Einatmen von Formalin-Dämpfen in einem Arbeitsplatz-relevanten Dosisbereich (1 mg Formalin pro m³ Luft) an der Oberfläche der Bronchialschleimhaut Konzentrationen oberhalb von 100 µM auftreten können (Asgharian et al, 2011; Asgharian et al, 2012) und bei Einatmen von Zigarettenrauch noch deutlich höhere Formalin-Konzentrationen erreicht werden (Pang & Lewis, 2011). Aus diesem Grund sind die hier gezeigten Formalin-Effekte von praktischer Relevanz.

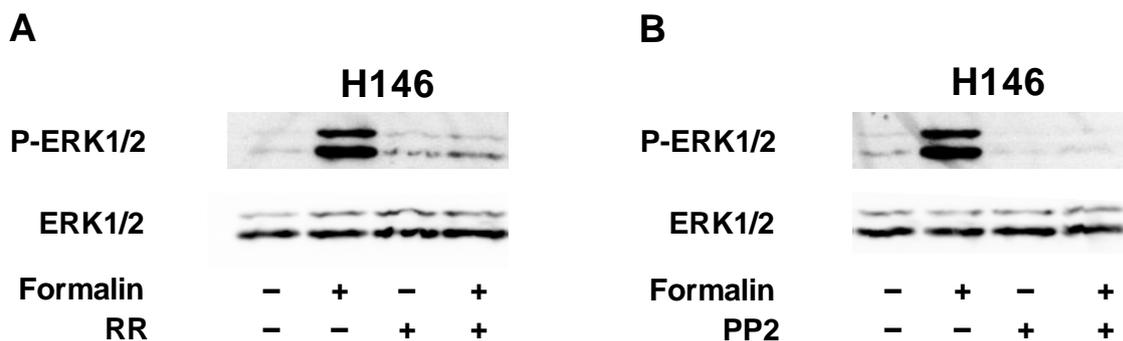


Abb. 72: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H146-Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen, teils für 30 min mit 10 µM RR (A) oder PP2 (B) vorinkubiert, wurden für 5 min mit 1 mM Formalin stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Im nächsten Schritt wurde der Effekt des TRP-Blockers Rutheniumrot und des Src-Inhibitors PP2 auf die Formalin-abhängige ERK1/2-Aktivierung getestet. Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung von ERK1/2 durch den TRP-Kanal-Inhibitor Rutheniumrot und den Src-Inhibitor PP2 blockierbar war. Somit ergaben sich für Formalin ganz analoge Befunde wie für den etablierten TRPA1-Aktivator AITC.

5.19 TRPA1 vermittelte Sekretion: VEGF und Serotonin

In weiteren Untersuchungen sollten Hinweise für die zellbiologische Funktion von TRPA1 in SCLC-Zellen gefunden werden. Da ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ein Reiz für Sekretionsprozesse darstellt, sollten zunächst zwei mögliche sekretorische Antworten nach Gabe von TRPA1-Agonisten überprüft werden, nämlich die Freisetzung von VEGF und die Abgabe von Serotonin. Beide Botenstoffe spielen beim SCLC eine wichtige Rolle für die Tumorprogression (Cattaneo et al, 1995; Pratesi et al, 1996). Außerdem wurde für beide Stoffe in anderen Zellsystemen gezeigt, dass eine Behandlung mit Isothiocyanaten zu einer vermehrten Sekretion führen kann (Doihara et al, 2009; Nozawa et al, 2009; Volpi et al, 2011). Eine Beteiligung TRPA1-abhängiger Effekte in SCLC-Zellen an der

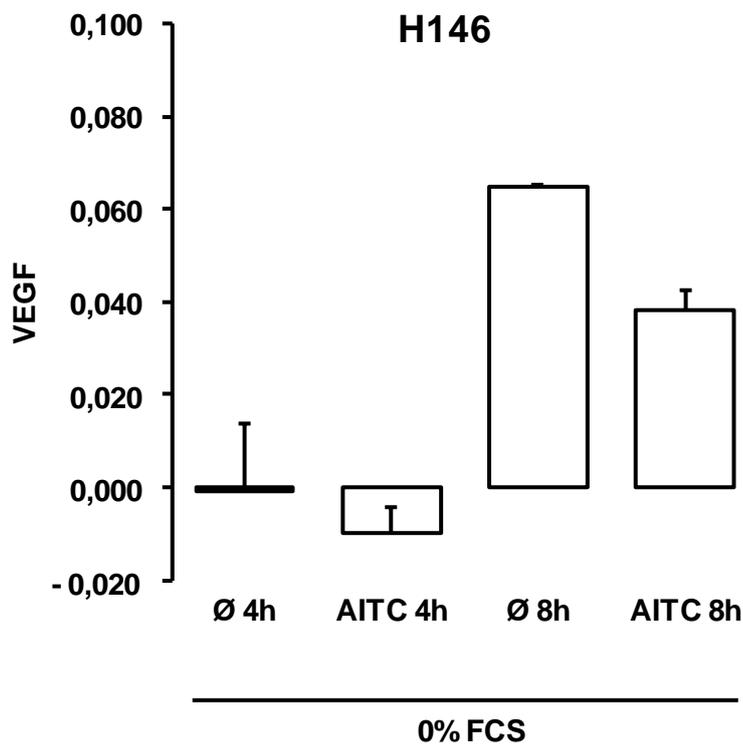


Abb. 73: VEGF-Spiegel im Mediumüberstand von serumfrei gehaltenen H146-Zellen, nach 4 h bzw. 8 h Inkubation mit AITC im Vergleich zu Kontroll-Überständen von nicht stimulierten Zellen. Die Einheiten der Ordinate entsprechen der bei 450 nm gemessenen Absorption im ELISA.

Freisetzung dieser Botenstoffe wäre daher durchaus denkbar.

Zur Bestimmung der VEGF-Sekretion wurden Zellen untersucht, die für 24 Stunden serumfrei gehalten wurden, um eventuelle im Serum enthaltene, die VEGF-Synthese oder -Sekretion beeinflussende Störfaktoren auszuschließen. Am zweiten Versuchstag wurde zunächst das serumfreie Medium gegen frisches Medium (serumfrei) ausgetauscht. Anschließend wurden Überstände von Zellen gewonnen, die für 4 Stunden oder 8 Stunden mit 100 μ M AITC stimuliert worden waren. Zum Vergleich wurden Zellüberstände untersucht,

die zu korrespondierenden Zeitpunkten gewonnen wurden, bei denen eine Stimulierung mit AITC unterblieben war. Hierbei zeigte sich, dass 4 Stunden nach dem Mediumwechsel im Überstand von unbehandelten Zellen keine Erhöhung der VEGF-Konzentration im Vergleich zu den Ausgangswerten bei 0 Stunden nachweisbar war. Demgegenüber zeigte sich nach 8 Stunden ein ausgeprägtes VEGF-Signal, ein Hinweis auf eine in diesem Zeitraum abgelaufene Abgabe des Botenstoffs ins Medium (Abb. 73). Die VEGF-Werte der mit AITC stimulierten Ansätze waren jeweils niedriger als die unstimulierten Vergleichsproben. Aus diesem Grund ist ein ausgeprägter sekretionsfördernder Effekt von AITC auf VEGF unwahrscheinlich. Im Fall des für 4 Stunden stimulierten Ansatzes fiel jedoch auf, dass die gemessenen Werte deutlich niedriger als der in zellfreien Proben gemessene Hintergrundwert waren, so dass sich nach Abzug dieses Wertes eine negative Zahl ergab (Abb. 73). Dieser Effekt ist nicht durch eine sekretionshemmende Wirkung zu erklären sondern spricht für einen zellunabhängigen Effekt der AITC-Behandlung.

Bei einer Wiederholung dieses Versuchsansatzes in FCS-haltigem Medium ergab sich in ähnlicher Weise ein offenbar methodenbedingter Effekt von AITC auf die VEGF-Spiegel im Überstand der SCLC-Zellen, wiederum nach einer Stimulationsdauer von 4 Stunden bzw. 8 Stunden (Abb. 74). Dieser zellunabhängige Effekt von AITC ist derzeit nicht abschließend erklärlich, könnte aber z. B. auf eine direkte Interaktion von AITC mit VEGF zurückzuführen sein, die zu einer Hemmung der Detektierbarkeit von VEGF führt.

Interessanterweise zeigten sich bei diesem Versuch in allen Ansätzen deutlich höhere VEGF-Signale als bei dem vorangegangenen Versuch in serumfreiem Medium. Dieser höhere VEGF-Gehalt kann nicht auf im FCS enthaltenes VEGF zurückzuführen sein, da von allen gemessenen Werten das VEGF-Signal aus zellfreiem serumhaltigem Medium abgezogen wurde. Offensichtlich bewirken also Faktoren aus dem FCS eine erhöhte Synthese oder Freisetzung von VEGF.

Nochmals deutlich höhere VEGF-Werte wurden in zwei Ansätzen erzielt, in denen die Zellen zuvor mit CoCl_2 , einem Stimulator der Hypoxie-induzierter Faktor (HIF)-vermittelten Transkription, behandelt wurden. Diese Reaktion der Zellen auf CoCl_2 war vor dem Hintergrund der Literatur zu erwarten, da die Synthese von VEGF durch HIF positiv reguliert wird (Litz & Krystal, 2006), so dass dieser Befund die prinzipielle Validität des ELISA untermauert. Bemerkenswerterweise kehrte sich unter diesen Bedingungen der AITC-Effekt um, und es war nun eine Stimulierung der VEGF-Abgabe zu beobachten (Abb. 74).

Da der stimulierende Effekt von AITC jedoch recht gering und statistisch nicht signifikant ausfiel und seine biologische Bedeutung daher unklar ist, wurden zu dieser Fragestellung keine weiteren Versuche durchgeführt.

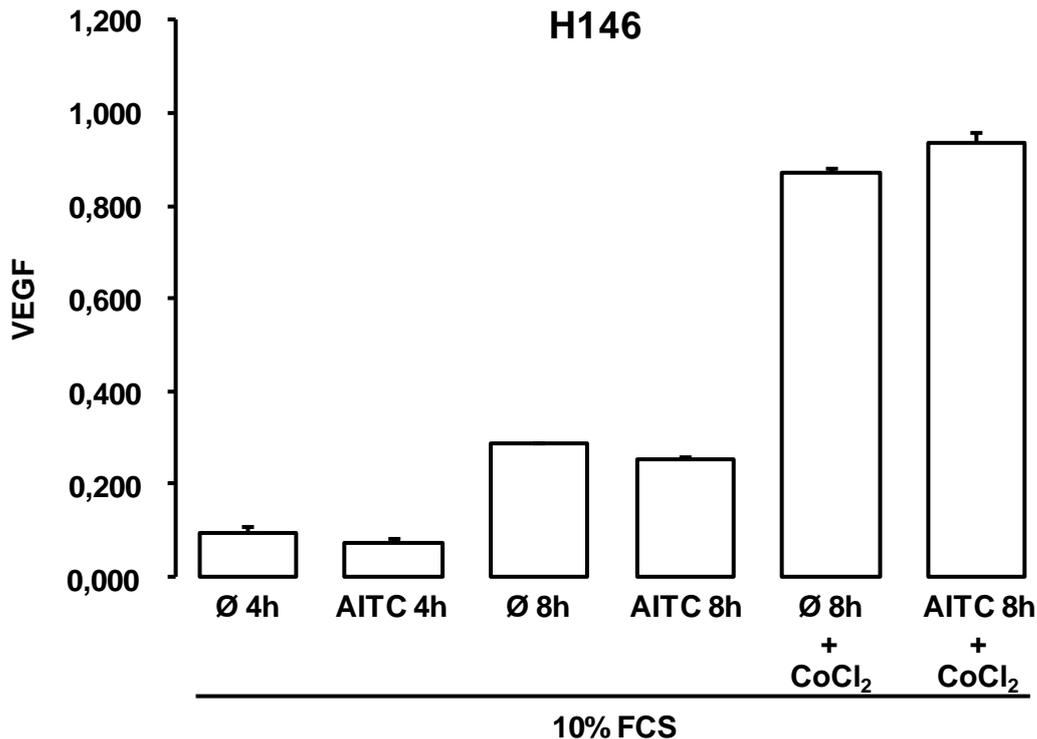


Abb. 74: VEGF-Spiegel im Mediumüberstand von H146-Zellen, die in normalem Kulturmedium (inkl. 10 % FCS) gehalten wurden, nach 4 h bzw. 8 h Inkubation mit AITC im Vergleich zu Kontroll-Überständen von nicht stimulierten Zellen. Zusätzlich wurden Überstände von Zellen untersucht, die für 24 h mit CoCl₂ vorbehandelt wurden und anschließend unstimuliert blieben oder für 8 h mit AITC stimuliert wurden. Die Einheiten der Ordinate entsprechen der bei 450 nm gemessenen Absorption im ELISA.

Im nächsten Untersuchungsschritt wurde die Frage untersucht, ob eine Stimulierung mit AITC zu einer vermehrten Sekretion von Serotonin führt. In analoger Weise wie in dem vorausgegangenen Versuch zum VEGF-Nachweis wurden auch für diese Fragestellung Medium-Überstände von H146-Zellen generiert. In diesem Fall wurde jedoch ein kompetitiver ELISA für den Serotonin-Nachweis durchgeführt, so dass die Signalstärke umgekehrt proportional zur im Überstand enthaltenen Serotonin-Menge ist. Je höher der Serotonin-Gehalt war, desto schwächer fiel also das Signal im ELISA aus.

Auch für den Serotonin-ELISA wurden Überstände von Zellen analysiert, die mit AITC stimuliert worden waren und mit Überständen verglichen, welche von nicht stimulierten Zellen stammten. Alle Zellen wurden vor Beginn der Stimulation für 24 Stunden auf serumfreies Medium umgesetzt. In einem zusätzlichen Ansatz wurden in dem Test Überstände untersucht, bei denen Zellen parallel zur AITC-Stimulierung mit dem Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin behandelt wurden. Der Ansatz mit dieser Kombinationsbehandlung von AITC zusammen mit Fluoxetin wurde dann Proben gegenüber gestellt, bei denen die Zellen lediglich mit Fluoxetin behandelt wurden.

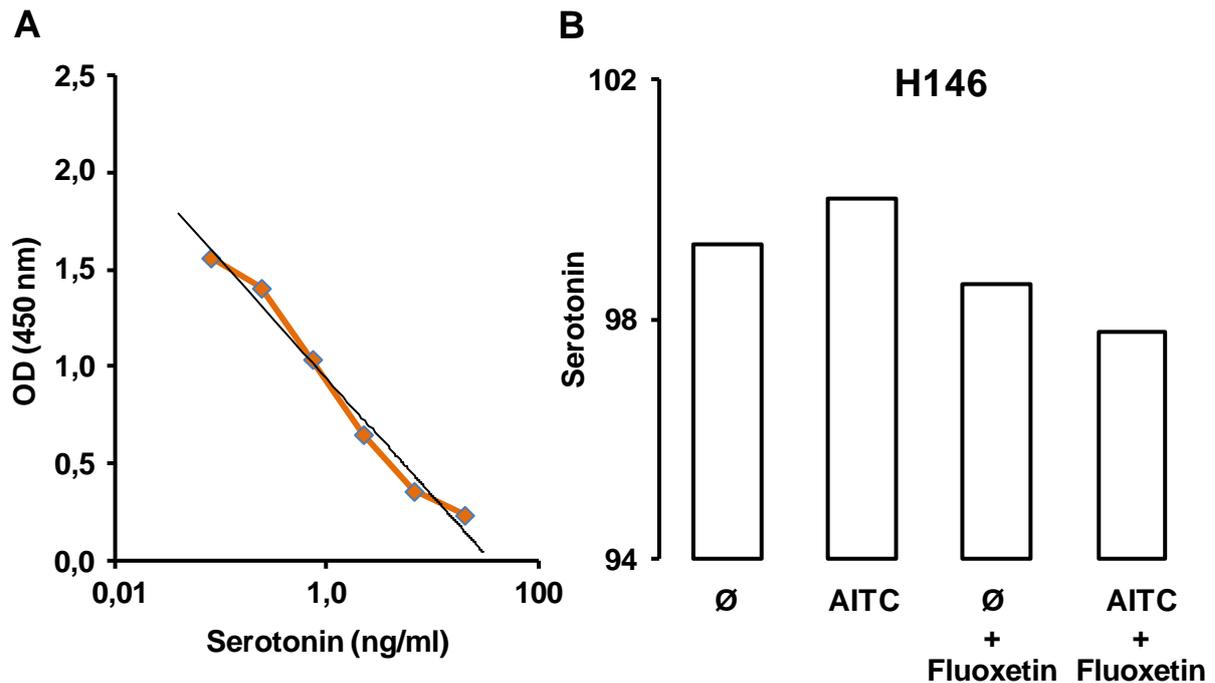


Abb. 75: Serotonin-Spiegel im Mediumüberstand von H146-Zellen, die für 12 h mit AITC stimuliert wurden im Vergleich zu Überständen von unbehandelten Zellen. Zusätzlich wurden Zellen für 12 h mit dem Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin inkubiert. Bei diesem kompetitiven ELISA ist zu beachten, dass eine Abnahme der OD_{450} -Werte mit einer Zunahme der Serotonin-Konzentration im Überstand einhergeht. Die gezeigten Daten entsprechen einem einzelnen durchgeführten Versuch.

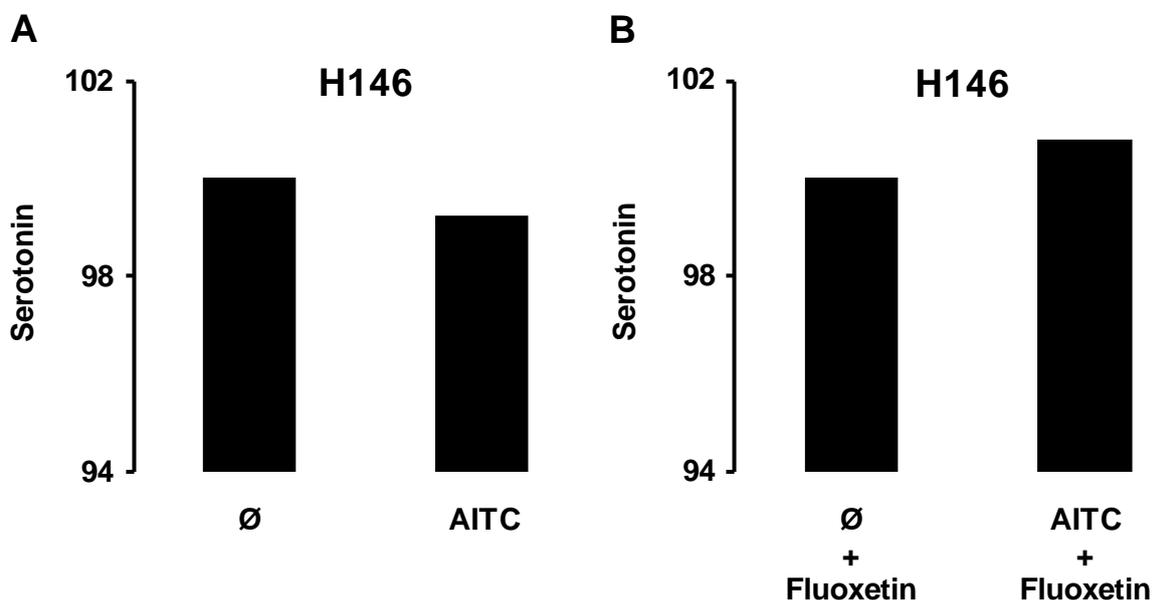


Abb. 76: Relative Serotonin-Spiegel in Zellüberständen von H146 (vgl. Abb. 75). Die nicht mit AITC stimulierten Ansätze wurden jeweils = 100 % gesetzt. In Abwesenheit eines Serotonin-Wiederaufnahmehemmers ergab sich durch AITC eine leichte Abnahme der Serotonin-Konzentration (A) in Anwesenheit von Fluoxetin zeigte sich ein geringer Anstieg. Die gezeigten Daten entsprechen einem einzelnen durchgeführten Versuch.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde zunächst eine Eichkurve mit einer Verdünnungsreihe definierter Serotonin-Konzentrationen generiert (Abb. 75A). Dabei zeigte sich, dass entsprechend

dem Testprinzip eine Zunahme der Serotonin-Konzentration mit einer Abnahme des ELISA-Signals einherging.

Für die Überstände der H146-Zellen zeigte sich zunächst, dass die Behandlung mit dem Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin zu einer Zunahme der Serotonin-Konzentration im Zellüberstand führte, was darauf hinweist, dass in H146 ein Amin-Transporter Serotonin in die Zelle zurückbefördern kann. Allerdings war diese Zunahme prozentual recht gering ausgeprägt. Weiterhin führte die AITC-Stimulierung in H146-Zellen, welche nicht zusätzlich mit Fluoxetin behandelt wurden, zu einer, allerdings geringfügigen, Abnahme der Serotonin-Konzentration gegenüber unbehandelten Zellen (Abb. 75B). Demgegenüber zeigte sich in den mit Fluoxetin behandelten Ansätzen eine Zunahme des Serotonin-Signals nach Zugabe von AITC (Abb. 75B). Letztlich waren diese Effekte jedoch insgesamt sehr schwach ausgeprägt. So unterschieden sich die mit AITC stimulierten Proben sowohl in Fluoxetin behandelten als auch in nicht mit Fluoxetin behandelten Ansätzen nur gering von den basalen Ansätzen ohne AITC (Abb. 76). Aus diesem Grund wurden zur Frage der Rolle von TRPA1 bei der Sekretion von Serotonin keine weiteren Versuche durchgeführt.

5.20 AITC-vermittelte Toxizität in SCLC-Zellen

In einer weiteren Untersuchungsreihe zur Aufklärung der Funktion von TRPA1 in SCLC-Zellen sollte nun der Hypothese nachgegangen werden, dass dieser Kanal für die Antitumor-Wirkung von Isothiocyanaten verantwortlich ist. Hintergrund dieser Hypothese ist, dass Isothiocyanate, inklusive AITC, bekanntermaßen eine antineoplastische Wirkung entfalten (zur Übersicht: (Zhang, 2010)). Die Möglichkeit, dass eine lang anhaltende Aktivierung von TRPA1 toxische Effekte vermitteln könnte, ist insofern plausibel, als ein starker Calciumionen-Einstrom in Zellen für sogenannte exzitotoxische Effekte verantwortlich sein kann und z. B. über eine Aktivierung der Ca^{2+} -regulierten Protease Calpain Apoptose induzieren kann (zur Übersicht: (Verkhatsky, 2007)). Weiterhin hatte sich in den vorausgegangenen Untersuchungen in SCLC-Zellen bereits gezeigt, dass AITC zu einer TRPA1-vermittelten Aktivierung von ERK1/2 führt (vgl. 5.17 und 5.18). In früheren Publikationen wurde beschrieben, dass eine Aktivierung von ERK1/2 eine wichtige Rolle bei wachstumshemmenden Effekten von Isothiocyanaten in Prostata-Karzinomzellen spielt (Xu et al, 2006). Dies verlieh der Vermutung, dass TRPA1 in diese Wirkung involviert ist, zusätzliche Plausibilität.

Zunächst wurde daher die Kinetik der ERK1/2-Aktivierung in SCLC-Zellen nach AITC-Stimulierung eingehender untersucht. Interessanterweise zeigt sich dabei, dass in H146-Zellen zusätzlich zu dem transienten ERK1/2-Signal, welches bereits weiter oben gezeigt wurde (Abb. 63), eine verzögerte und länger anhaltende Antwort zu verzeichnen war (Abb. 77A), die ihre maximale Ausprägung

2 Stunden bis 3 Stunden nach AITC-Gabe erreichte. Es zeigte sich allerdings, dass diese verzögerte ERK1/2-Aktivierung im Gegensatz zu der schnellen Antwort nicht durch Vorbehandlung der Zellen mit dem TRP-Blocker RR inhibierbar war (Abb. 77B). Ein analoger Befund ergab sich auch in den beiden Zelllinien H69 und H510 (Abb. 78). Somit spielen bei SCLC-Zellen auch TRPA1-unabhängige Effekte von AITC eine Rolle.

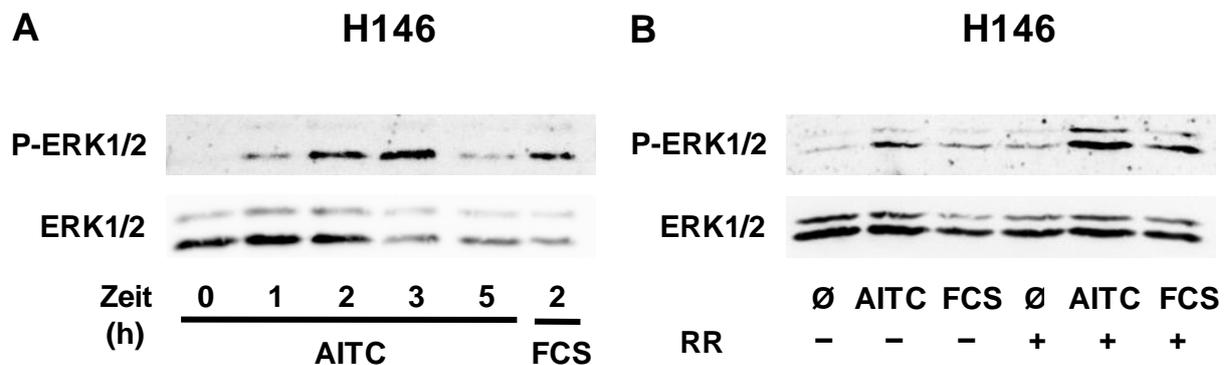


Abb. 77: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H146-Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen wurden für 0–5 h mit 30 μ M AITC, beziehungsweise 2 h mit 10 % FCS stimuliert (A). (B) Außerdem wurden H146-Zellen, teils für 30 min mit 10 μ M RR vorinkubiert, für 2 h mit 30 μ M AITC, beziehungsweise 10 % FCS stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

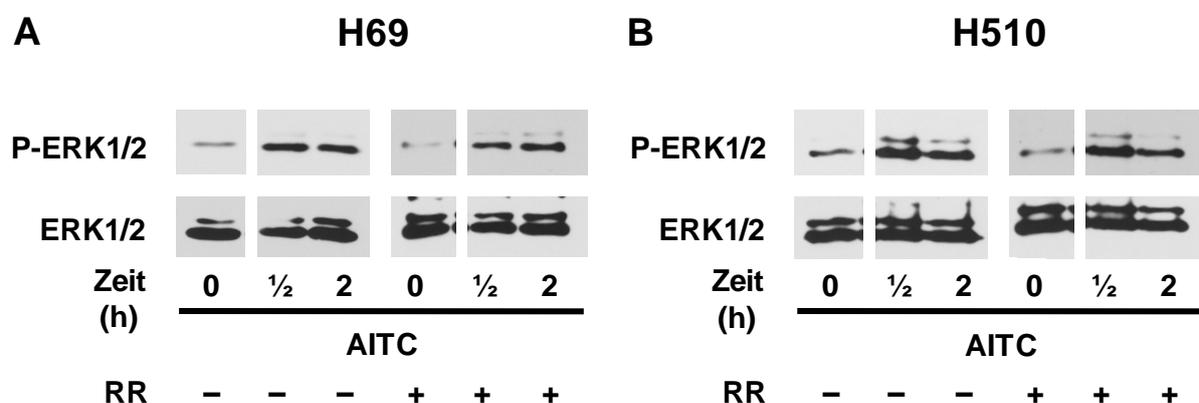


Abb. 78: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H69 (A)- und H510 (B)-Zellen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die H69-Zellen, teils für 30 min mit 10 μ M RR vorinkubiert, wurden für 0, 1/2 oder 2 h mit 30 μ M AITC stimuliert (A). (B) Außerdem wurden H510-Zellen, teils für 30 min mit 10 μ M RR vorinkubiert, für 0, 1/2 oder 2 h mit 30 μ M AITC stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich wurde nach Behandlung von SCLC-Zellen mit AITC untersucht, ob eine Aktivierung von Akt induziert werden kann, da in früheren Studien auch eine Aktivierung dieser Kinase durch Isothiocyanate beschrieben wurde (Jakubikova et al, 2005b; Liu et al, 2013). Eine Akt-Stimulierung wird häufig als grundsätzlich anti-apoptisches Signal beschrieben. In intestinalen Zellen hemmt

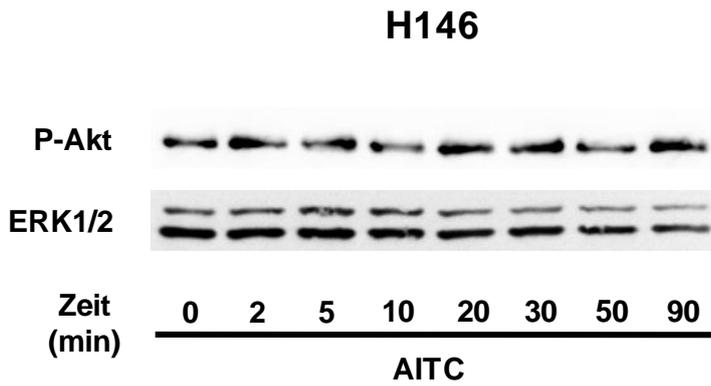


Abb. 79: Nachweis der Akt-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-positiven H146 Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die Phosphoryliertes Akt (P-Akt) erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes Akt, die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen wurden für 0–90 min mit 30 µM AITC stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

eine Inhibition von Akt jedoch die AITC-Toxizität, was zeigt, dass Akt zweiseitige Effekte auf das Zellüberleben ausüben kann (Jakubikova et al, 2005a). Hierbei ergab sich jedoch kein eindeutiger Effekt (Abb. 79), so dass Akt-vermittelte Signalwege in SCLC-Zellen keine besondere Rolle für zelluläre Effekte von AITC spielen dürften. Da die schnelle und transiente ERK1/2-Aktivierung durch TRPA1 in SCLC-Zellen Src-

abhängig war, wurde nun auch für das verzögert zu beobachtende Signal überprüft, ob Src involviert war. Hierbei zeigte sich jedoch kein Effekt eines Src-Inhibitors (Abb. 80), so dass die prolongierte TRPA1-unabhängige ERK1/2-Antwort offenbar auch Src-unabhängig erfolgt.

Abb. 80: Nachweis der ERK1/2- Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H146-Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen, teils für 30 min mit dem Src-Inhibitor PP2 (20 µM) vorinkubiert, wurden für 2 h mit 30 µM AITC beziehungsweise mit 10 µM Capsaicin (CAP) stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

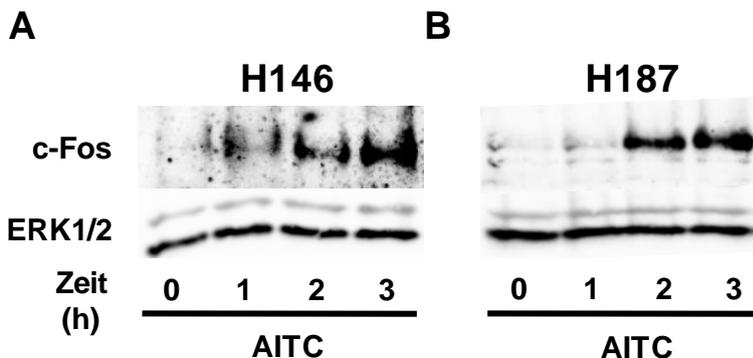
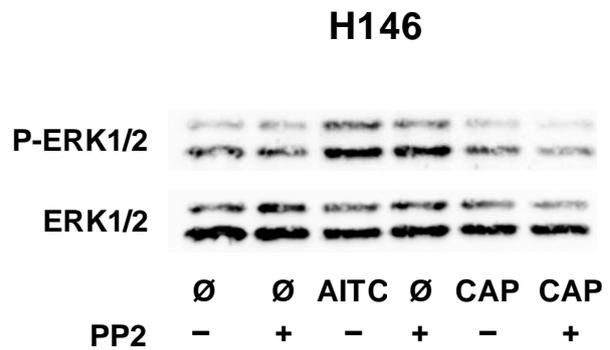
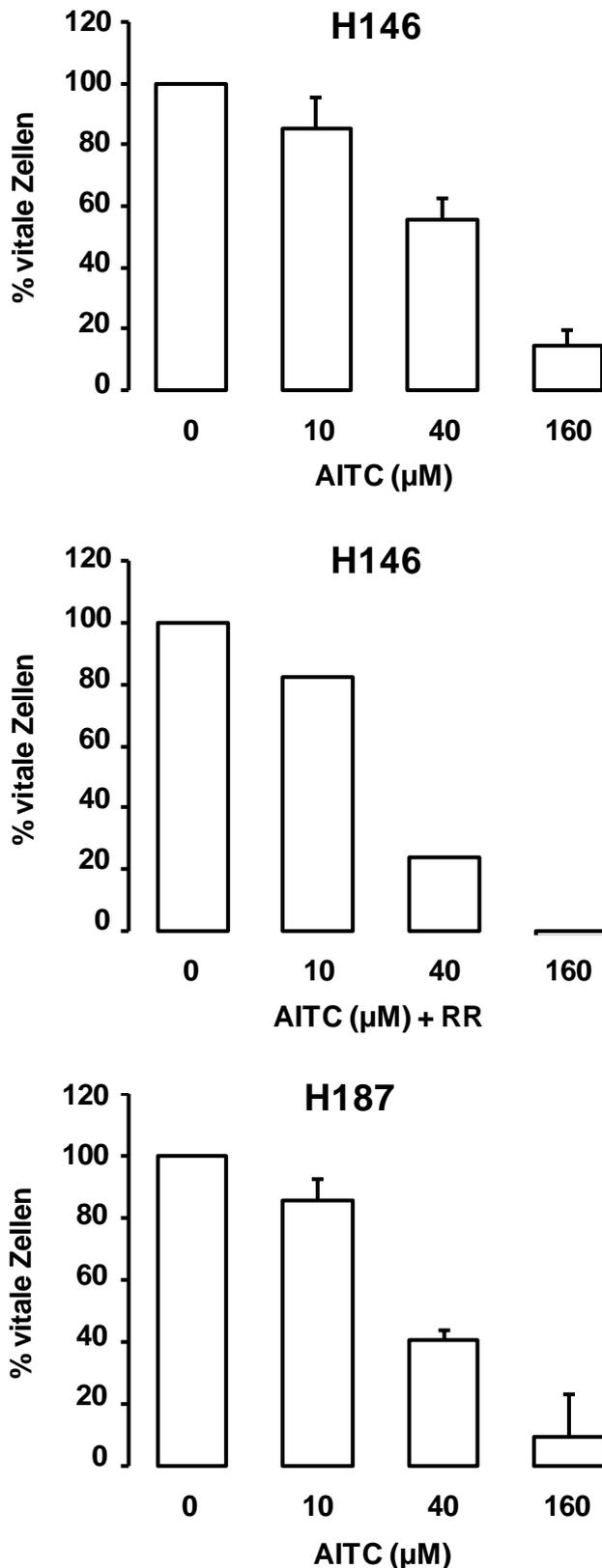


Abb. 81: Untersuchungen zur Induktion von c-Fos nach AITC-Stimulierung mittels "Western-Blot" in TRPA1-positiven H146-Zellen (A) und TRPA1-negativen H187-Zellen (B). Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen aktiviertes c-Fos, die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Beide Zelllinien wurden für 0–3 h mit 30 µM AITC stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Interessanterweise zeigte sich sowohl in TRPA1-exprimierenden H146-Zellen als auch in H187-Zellen, die keinen TRPA1 exprimieren, eine c-Fos-Induktion nach AITC-Gabe (Abb. 81), was dafür



spricht, dass in beiden Zellsystemen ein MAPK-vermittelter Signalweg aktiviert wird. Im Hinblick auf die Toxizität von AITC ergab sich, dass sowohl in TRPA1-exprimierenden H146-Zellen, als auch in nicht TRPA1-exprimierenden H187-Zellen eine Behandlung mit AITC dosisabhängig zu einer verringerten Zellviabilität führte, wobei sich in beiden Zelllinien bereits bei einer AITC-Konzentration von 40 µM deutliche Effekte zeigten (Abb. 82). Diese Versuche wurden in normalem Wachstumsmedium durchgeführt, welches auch 10 % FCS enthielt, um so eine optimale basale Wachstumsrate in unbehandelten Zellen zu erreichen, so dass wachstumshemmende Effekte deutlich zutage treten. Interessanterweise ergab sich auch in H146-Zellen, die mit dem TRP-Blocker RR behandelt wurden, eine deutliche, eher sogar noch ausgeprägtere Toxizität unter diesen Bedingungen, so dass der beobachtete toxische Effekt von AITC mit höchster Wahrscheinlichkeit unabhängig von TRPA1 ist.

Abb. 82: Bestimmung der Zellviabilität mittels XTT-Färbung in H146- und H187-Zellen. Für diese Untersuchung wurden die Zellen für 24 h in serumhaltigem (10 % FCS) RPMI 1640 inkubiert und anschließend mit den entsprechenden Inhibitoren (RR 10 µM) und 10–160 µM AITC stimuliert. Die metabolische Aktivität wurde 48 h nach Stimulierung ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten (Ausnahme: für die RR-Werte $n = 1$).

Da, wie oben erwähnt, in früheren Untersuchungen eine Beteiligung von ERK1/2 an der AITC-Toxizität beschrieben wurde (Xu et al, 2006), sollte in einem zusätzlichen Versuchsansatz überprüft werden, ob dies auch in SCLC-Zellen der Fall ist. Dafür wurden durchflusszytometrische Analysen in H146-Zellen durchgeführt, in denen der Zelltod durch eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) nachgewiesen wurde.

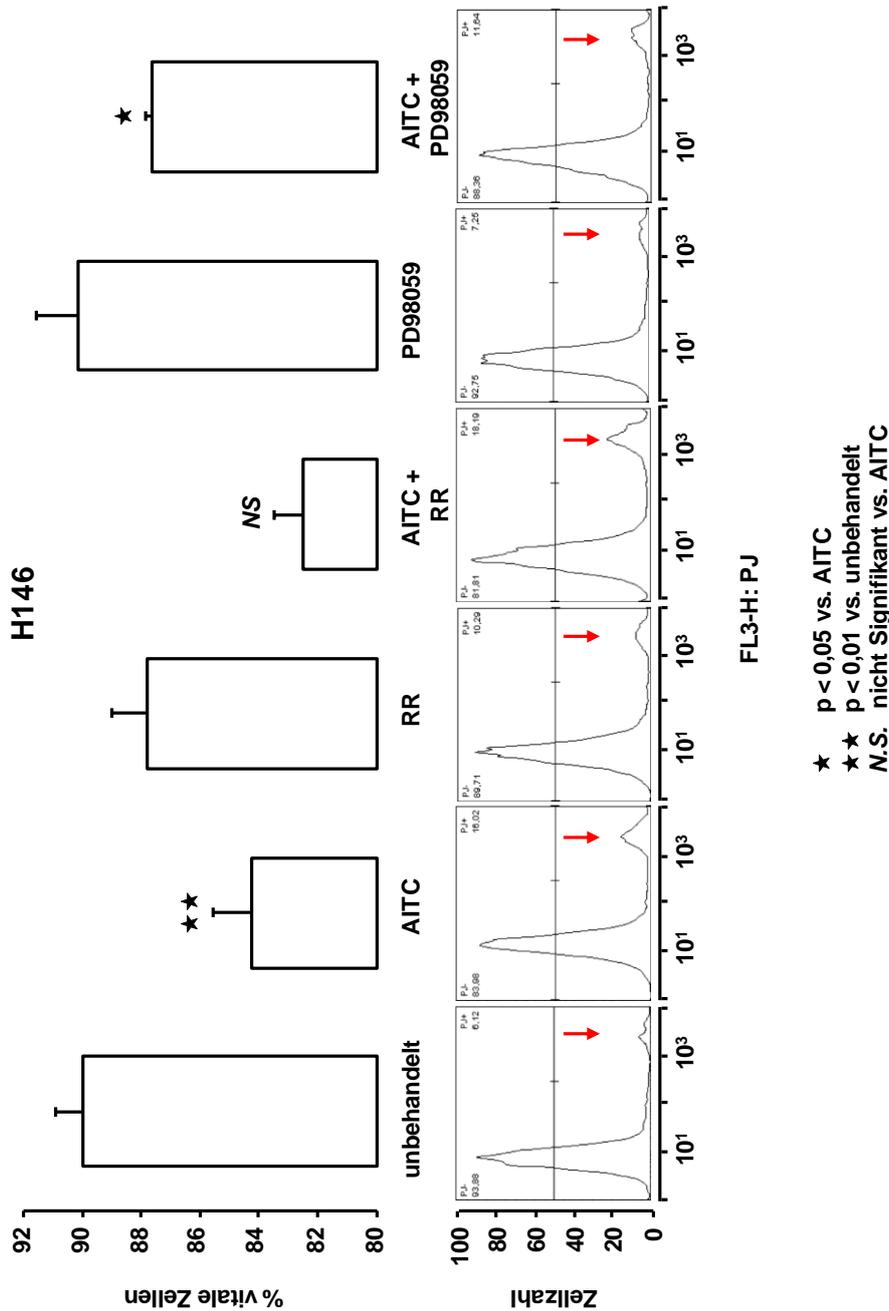


Abb. 83: Durchflusszytometrische (FACS)-Analyse der Zellviabilität mit dem Farbstoff Propidiumiodid (PI) in H146-Zellen ohne Behandlung sowie nach Behandlung mit 100 µM AITC für 24 h. Soweit angegeben, wurden die Zellen zusätzlich mit 5 µM Rutheniumrot (RR) bzw. dem MEK-Inhibitor PD98059 (10 µM) vorbehandelt. In den entsprechenden Ansätzen wurde der jeweilige Inhibitor 30 min vor der AITC-Stimulierung gegeben und war über den gesamten Beobachtungszeitraum anwesend. Im oberen Teil der Abbildung ist der Anteil der Zellen angegeben, die keine Propidiumiodidaufnahme zeigten und daher als vital einzustufen waren. Diese Angaben sind Mittelwerte ± S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Im unteren Teil der Abbildung ist für jeden Ansatz beispielhaft die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzsignale eines Experimentes gezeigt. Die Propidiumiodid-positive Fraktion (tote Zellen) ist jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Eine Zugabe von AITC zeigte eine deutlich negative Wirkung auf die Zellviabilität; ein Effekt, der durch Vorbehandlung mit RR nicht abgeschwächt sondern eher sogar verstärkt wurde (Abb. 83), was im Einklang mit obigen Ergebnissen steht. Darüber hinaus führte aber die Vorbehandlung mit dem MEK-Inhibitor PD98059 zu einer deutlichen Abschwächung der AITC-Toxizität (Abb. 83), so dass auch in diesem Zellsystem offenbar ein TRPA1-unabhängiger, aber ERK1/2-gesteuerter Signalweg hinter der zellschädigenden Wirkung von AITC steht.

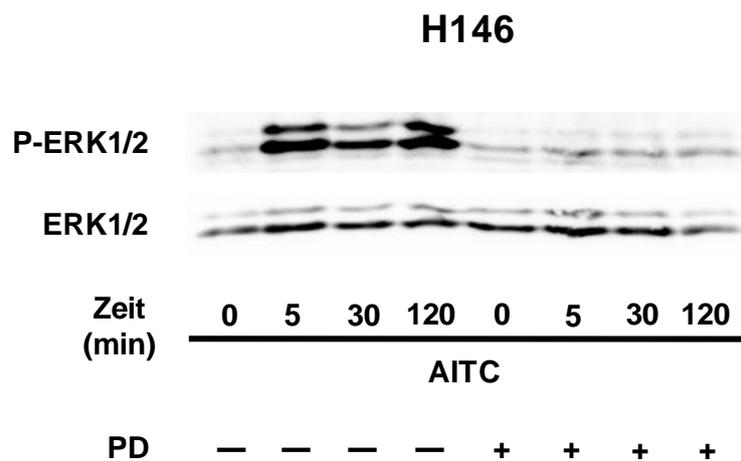


Abb. 84: Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H146-Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1/2 oder phosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2), die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren die Gesamtmenge der ERK1/2-Proteine (Ladekontrolle). Die Zellen wurden für 0 – 120 min mit 30 μ M AITC stimuliert und wo angegeben, zusätzlich für 30 min mit 10 μ M PD98059 (PD) vorinkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die inhibierende Wirkung von PD98059 wurde auch durch eine Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung bestätigt (Abb. 84).

Interessanterweise zeigte sich, dass eine Behandlung mit AITC zu einer Aktivierung der proapoptischen Protease Calpain führte (Abb. 85). Als Positivkontrolle wurden die Zellen in Vergleichsansätzen mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin behandelt, welches ein etablierter Aktivator von Calpain ist (Gil-Parrado et al, 2002). In den untersuchten Zellen war der Effekt von AITC größenordnungsmäßig mit der Wirkung einer Ionomycin-Gabe vergleichbar (Abb. 85). Eine Beteiligung von Calpain an der zellschädigenden Wirkung von AITC wäre somit vorstellbar.

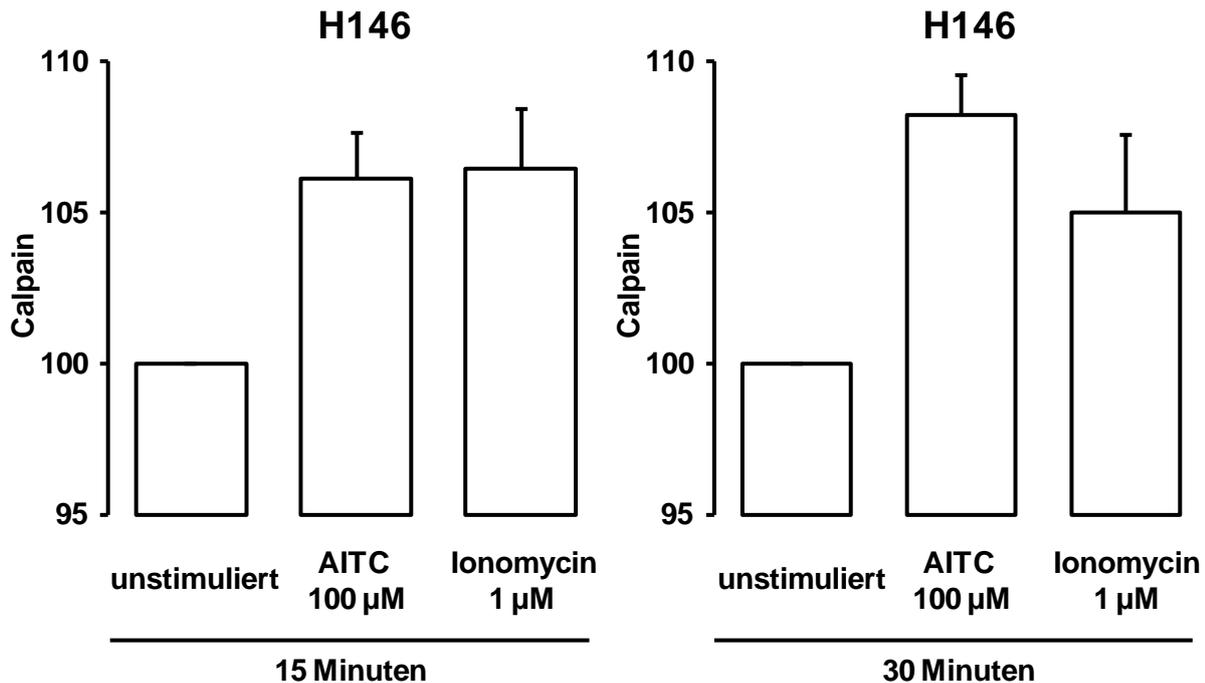


Abb. 85: Aktivierung der Ca^{2+} -regulierten Protease Calpain durch Behandlung von H146-Zellen mit AITC oder Ionomycin (Positivkontrolle) für 15 oder 30 min in der angegebenen Konzentration. Der Wert für unbehandelte Zellen wurde hierbei als 100 % definiert.

5.21 TRPA1-vermittelter Überlebens-Effekt in SCLC-Zellen

In SCLC-Zellen stellen Neuropeptide oder Neurotransmitter eine kritische Komponente für Proliferation und Zellüberleben dar. Daher wurde die Hypothese untersucht, ob dies auch für eine TRPA1-Aktivierung durch AITC der Fall sein könnte. Um diese Fragestellung nach einer tumorbiologisch relevanten Wirkung genauer zu beleuchten, wurde zunächst untersucht, inwieweit AITC für SCLC-Zellen toxisch ist, da eine AITC-vermittelte Toxizität für andere Zellmodelle bereits gut beschrieben ist (Oehler et al, 2012). Bei einer Konzentration oberhalb von 40 μM AITC zeigte die Substanz, wie oben bereits beschrieben (Abb. 82), auch in unserem Zellsystem eine deutliche Toxizität.

In einem niedrigeren Dosis-Bereich ließ sich jedoch kein toxischer Effekt von AITC feststellen. Bei einer Inkubation von H146-Zellen in serumfreiem Medium war sogar zu erkennen, dass die Anwesenheit von 10 μM AITC dazu führte, dass die Zellen insgesamt größer waren und glattere Zellgrenzen aufwiesen, ein Hinweis, dass AITC unter diesen Bedingungen die Viabilität gegenüber nicht mit AITC inkubierten Zellen womöglich erhöhte (Abb. 86). Interessanterweise war dieser Effekt durch Rutheniumrot blockierbar und trat in H187-Zellen, die TRPA1 nicht exprimieren, nicht auf (Abb. 86).

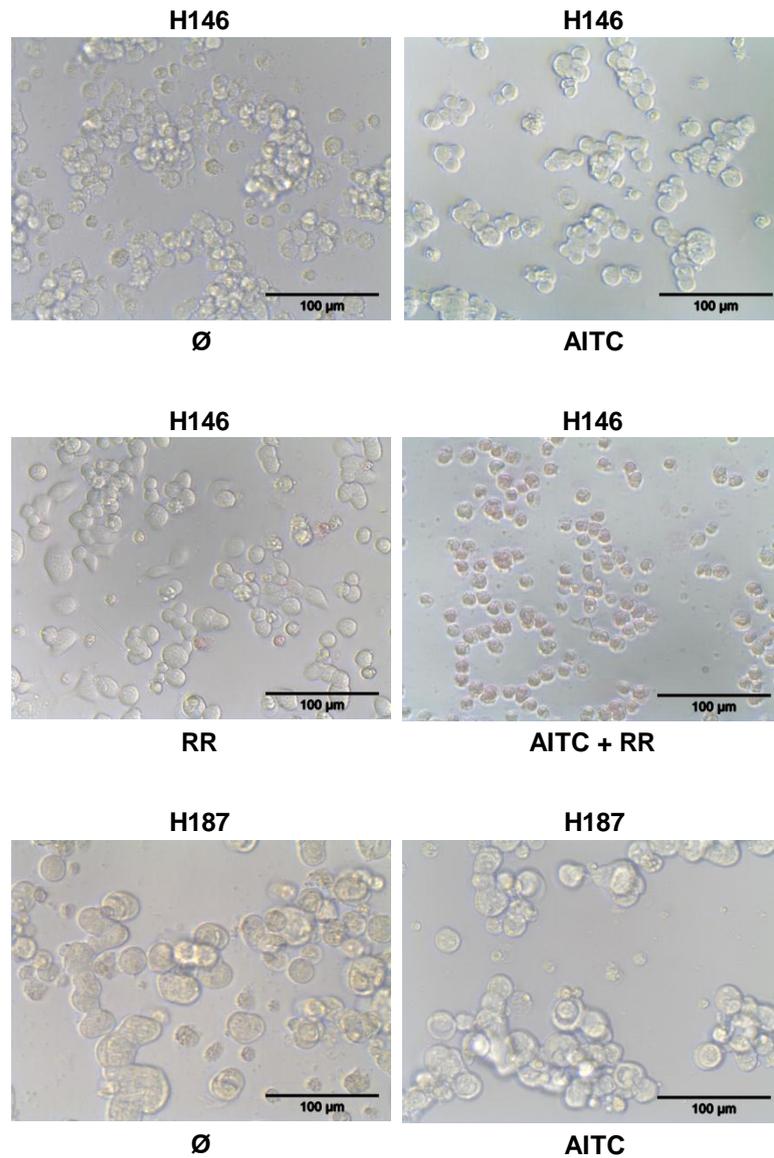


Abb. 86: *Morphologie von SCLC-Zellen* nach 48 h Inkubation in serumfreiem Medium ohne weitere Zusätze (erste und dritte Zeile, links) oder nach Gabe von 10 µM AITC (rechte Spalte), bzw. nach Applikation von 10 µM RR (mittlere Zeile).

Um diesen morphologischen Befund mittels quantitativer Untersuchungen zu überprüfen, wurde daher im nächsten Schritt mithilfe des XTT-Verfahrens die Wirkung von AITC auf SCLC-Zellen unter serumfreien Bedingungen weiter untersucht. Im Gegensatz zu den hohen Konzentrationen von >40 µM AITC führten niedrigere Konzentrationen von 10 µM AITC in XTT-Versuchen in H146-Zellen zu einer verstärkten Viabilität der Zellen (Abb. 87). In H187-Zellen dagegen führte eine Zellbehandlung mit 10 µM AITC nicht zu einer verstärkten Zellviabilität.

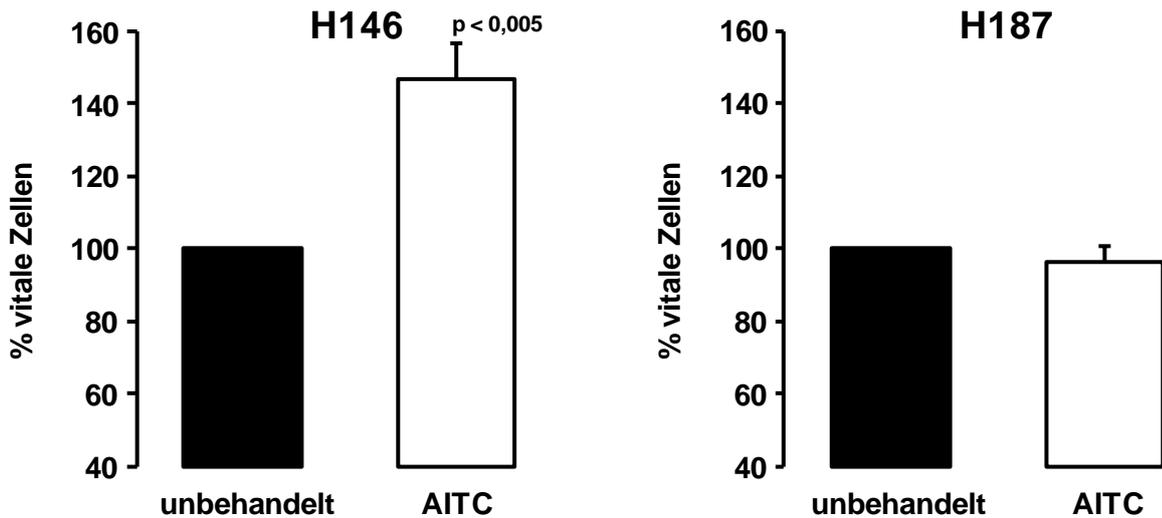


Abb. 87: Bestimmung der Zellviabilität mittels XTT-Färbung in H146- (links) und H187-Zellen (rechts). Für diese Untersuchung wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem RPMI 1640 inkubiert und anschließend teils mit 10 µM AITC stimuliert. Die metabolische Aktivität wurde 48 h nach Stimulierung ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Da in einem nächsten Schritt verschiedene Inhibitoren getestet werden sollten, wurde zunächst der Einfluss der Inhibitoren auf die Zellviabilität ohne AITC-Stimulierung getestet.

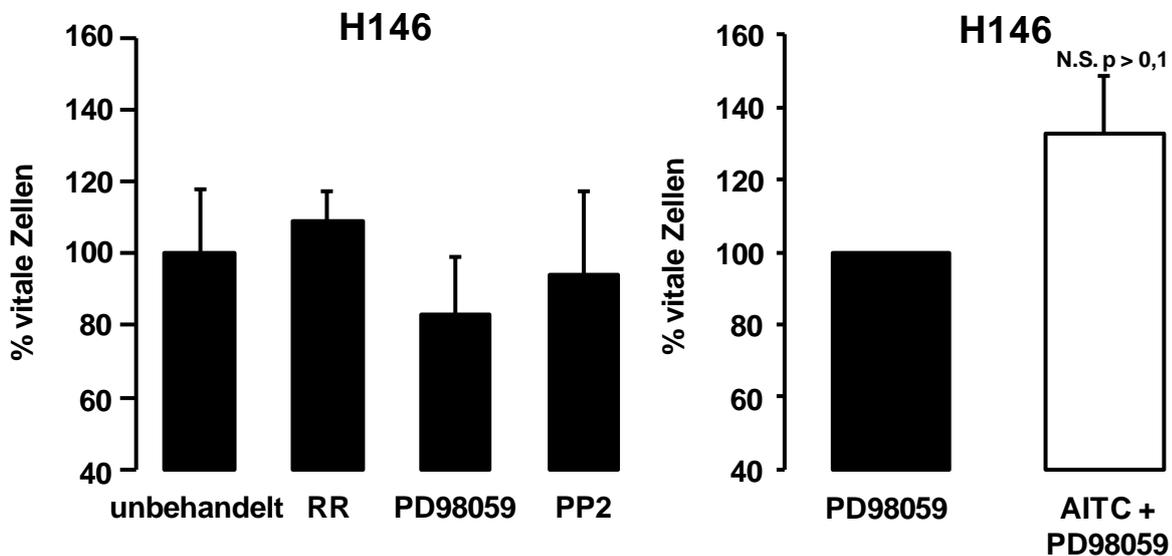


Abb. 88: Bestimmung der Zellviabilität mittels XTT-Färbung in H146-Zellen. Für diese Untersuchung wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem RPMI 1640 inkubiert und anschließend mit verschiedenen Inhibitoren (RR 10 µM, PD98059 10 µM und PP2 20 µM) (links) oder mit den entsprechenden Inhibitoren und 10 µM AITC stimuliert (rechts). Die metabolische Aktivität wurde 48 h nach Stimulierung ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Keiner der Inhibitoren hatte einen schädlichen Effekt auf die Zellen (Abb. 88, links).

Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem TRP-Kanalblocker Rutheniumrot oder dem SRC-Inhibitor PP2 konnte den durch AITC hervorgerufenen Effekt vollständig blockieren (Abb. 89). Der MEK-Inhibitor PD98059 dagegen konnte den AITC-Effekt nur teilweise inhibieren (Abb. 88, rechts).

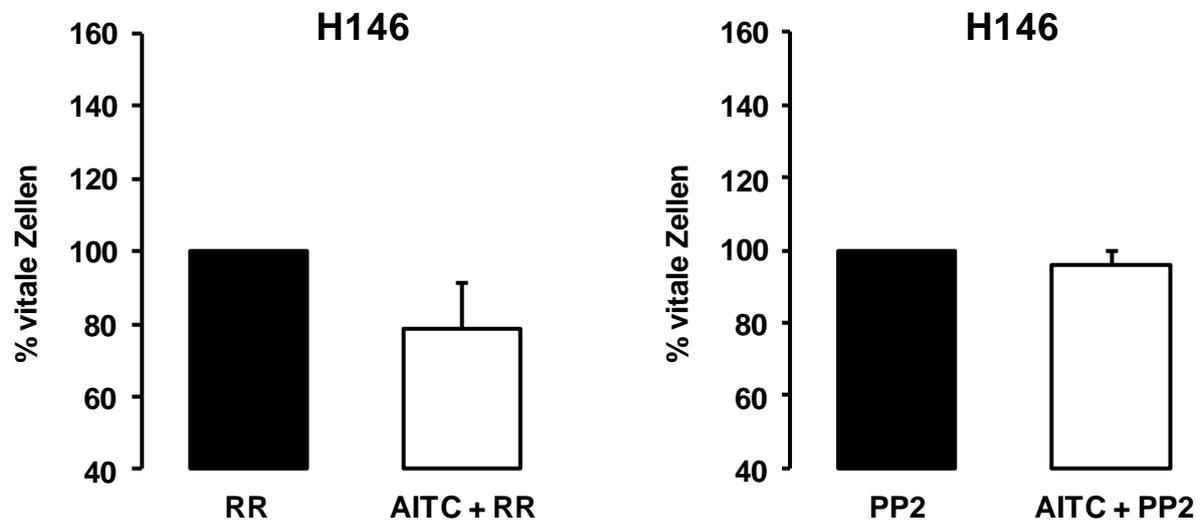


Abb. 89: Bestimmung der Zellviabilität mittels XTT-Färbung in H146-Zellen. Für diese Untersuchung wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem RPMI 1640 inkubiert und anschließend mit den entsprechenden Inhibitoren und 10 µM AITC stimuliert (links: 10 µM RR, rechts: 20 µM PP2). Die metabolische Aktivität wurde 48 h nach Stimulierung ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Eine methodische Limitation des XTT-Verfahrens ist jedoch, dass die Umsetzung des Farbstoffs XTT nicht allein von der Zellzahl im untersuchten Ansatz abhängt sondern auch durch die Stoffwechselaktivität der Zellen beeinflusst werden kann. Daher kann z. B. eine verminderte metabolische Aktivität von Zellen als verminderte Viabilität missdeutet werden. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt ein Verfahren zur Testung der Apoptose in SCLC-Zellen angewendet werden.

Zu diesem Zweck wurde zusätzlich zum XTT-Verfahren auch eine Methode verwendet, bei der die Caspase 3-Aktivierung als Indikator für Apoptose untersucht wurde (Abb. 90). Dafür wurden H146-Zellen für 72 Stunden unter serumfreien Bedingungen und teilweise mit AITC und entsprechenden Inhibitoren inkubiert. Unbehandelte Zellen zeigen dabei eine gut detektierbare gespaltene Caspase 3 als Ausdruck einer durch den Serum-Mangel erhöhten Apoptose-Rate (Abb. 91). Die Spaltung der Procaspase 3 wurde durch AITC signifikant vermindert, ein Hinweis auf eine verringerte Apoptose-Induktion in Gegenwart von AITC. Demgegenüber war dieser anti-apoptotische AITC-Effekt bei zusätzlicher Behandlung der Zellen mit Rutheniumrot oder PP2 nicht mehr vorhanden, vielmehr zeigte sich hier wieder das gleiche Bild wie in komplett unbehandelten, Serum-deprivierten Zellen (Abb. 91).

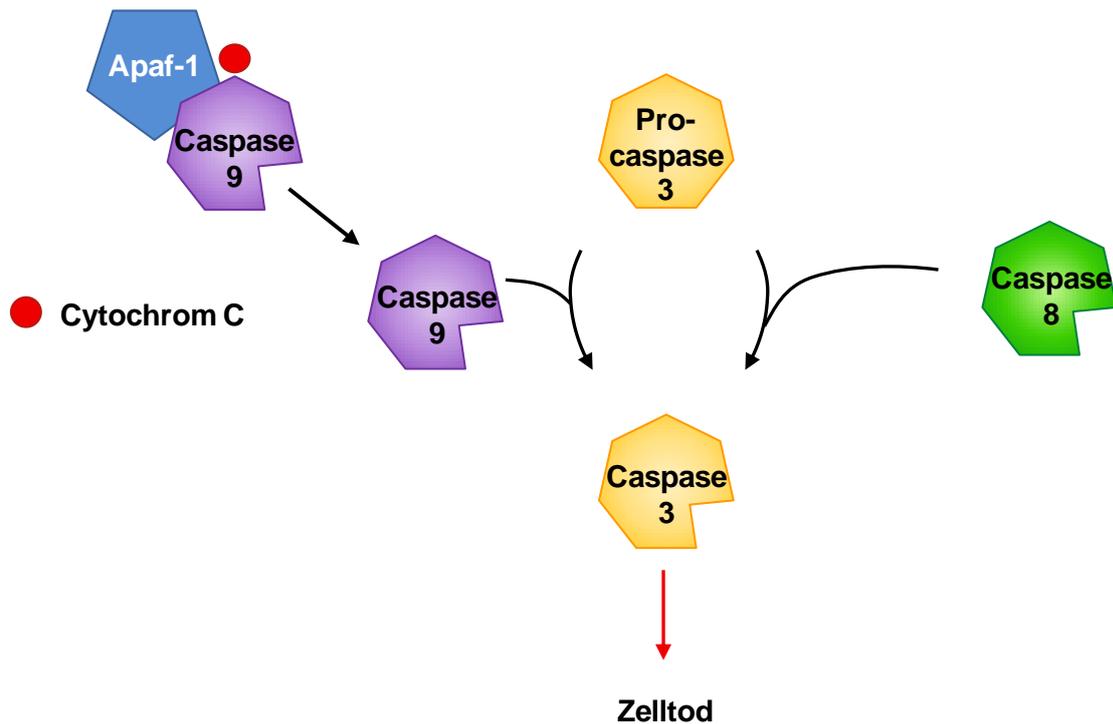


Abb. 90: Schematische Darstellung der Caspase-regulierten Apoptose. Die Umwandlung von Procaspase 3 (inaktiv) in Caspase 3 (aktiv) ist die gemeinsame Endstrecke Caspase 9- und Caspase 8-abhängiger Signalwege. Die Caspase 8 ist der distale Regulator des sogenannten extrinsischen Signalweges über Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie. Die Caspase 9 ist hingegen der distale Regulator des sogenannten intrinsischen Signalweges, der z. B. durch Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien und nachfolgende Aktivierung des apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) stimuliert wird.

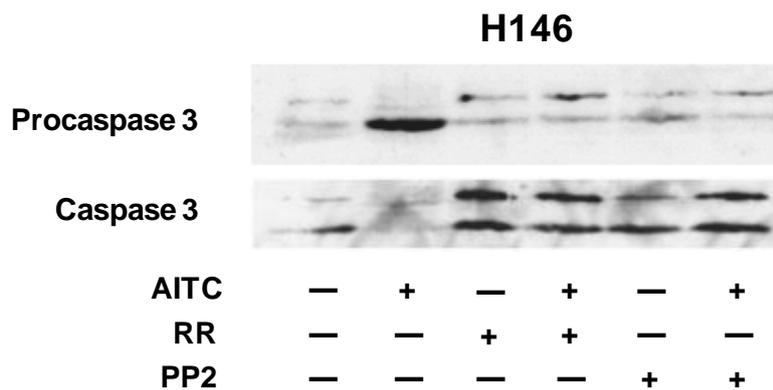


Abb. 91: Nachweis der Caspase 3-Aktivität mittels "Western-Blot" in Zelllysaten aus TRPA1-exprimierenden H146-Zellen mit Hilfe von Antikörpern, die Procaspase 3 (inaktiv) und gespaltene Caspase 3 (aktiv) erkennen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen Procaspase 3, die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren gespaltene Caspase 3. Das Verhältnis von inaktiver Procaspase 3 zu aktiver Caspase 3 in einem Zelllysate ist ein Maß für die proapoptische Aktivität. Für diese Untersuchung wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem RPMI 1640 inkubiert und anschließend mit 10 µM AITC und den entsprechenden Inhibitoren (RR 10 µM, 20 µM PP2) stimuliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Messung der ungespaltenen Procaspase 3 ergab bei diesen Ansätzen ein spiegelbildliches Verhalten: Nur bei Zellen, die mit AITC behandelt wurden, fand sich ein ausgeprägter Procaspase 3-Spiegel (Abb. 91), während in allen anderen Ansätzen die Procaspase 3 durch vermehrte Apoptose gespalten wurde. Dieses inverse Verhalten von gespaltenen Caspase 3 und ungespaltenen Procaspase 3 (vgl. auch Abb. 92) in den diversen Ansätzen zeigt, dass die detektierten Unterschiede nicht auf eine unterschiedliche Beladung im "Western-Blot" zurückzuführen sind.

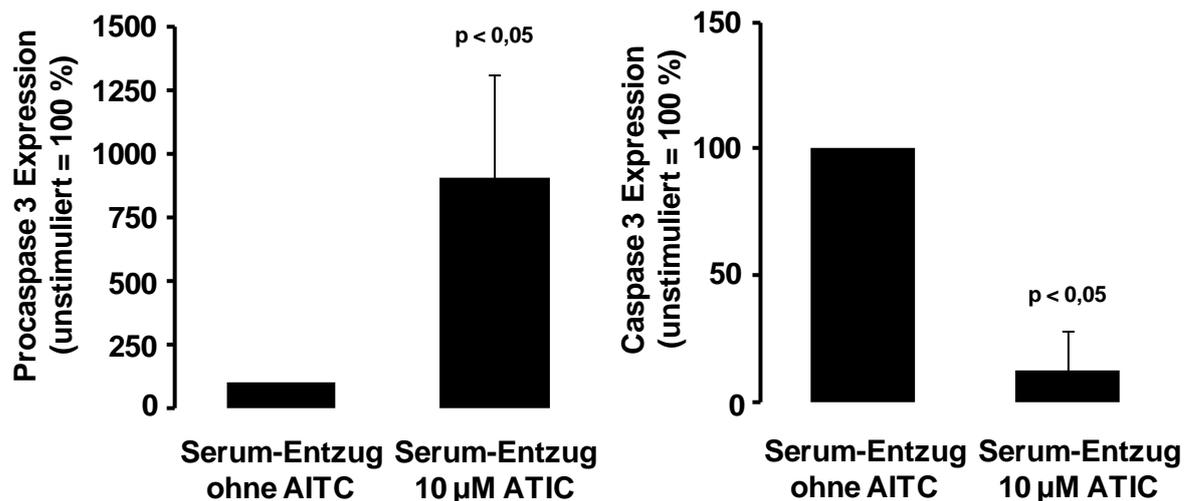


Abb. 92: Um die Unterschiede in Procaspase 3 (inaktiv)- und gespaltenen Caspase 3 (aktiv)-Aktivität zu quantifizieren, wurde die Stärke der unstimulierten Bande mit der der stimulierten Bande verglichen. Die Stärke der Bande der unstimulierten Zellen wurden jeweils = 100 % gesetzt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AITC die Apoptose von SCLC-Zellen inhibiert, indem TRPA1 aktiviert wird.

5.22 Inhibition der TRPA1-Expression mittels "small interference RNA" (siRNA)

Da die Stimulierung mit AITC auch TRPA1-unabhängige Effekte auslösen könnte, die dann zu dem beobachteten Phänotyp führen, wurde auch die Rolle von TRPA1 in Abwesenheit von AITC in SCLC-Zellen untersucht. Für diesen Zweck wurde eine Herunterregulation des TRPA1-Kanals mittels eines siRNA Ansatzes vorgenommen. Dafür wurde eine Sterol-modifizierte siRNA verwendet (Accel-siRNA von Thermo Fisher Scientific), die eine hohe Transfektionseffizienz in schwer zu transfizierenden Zellen aufweist.

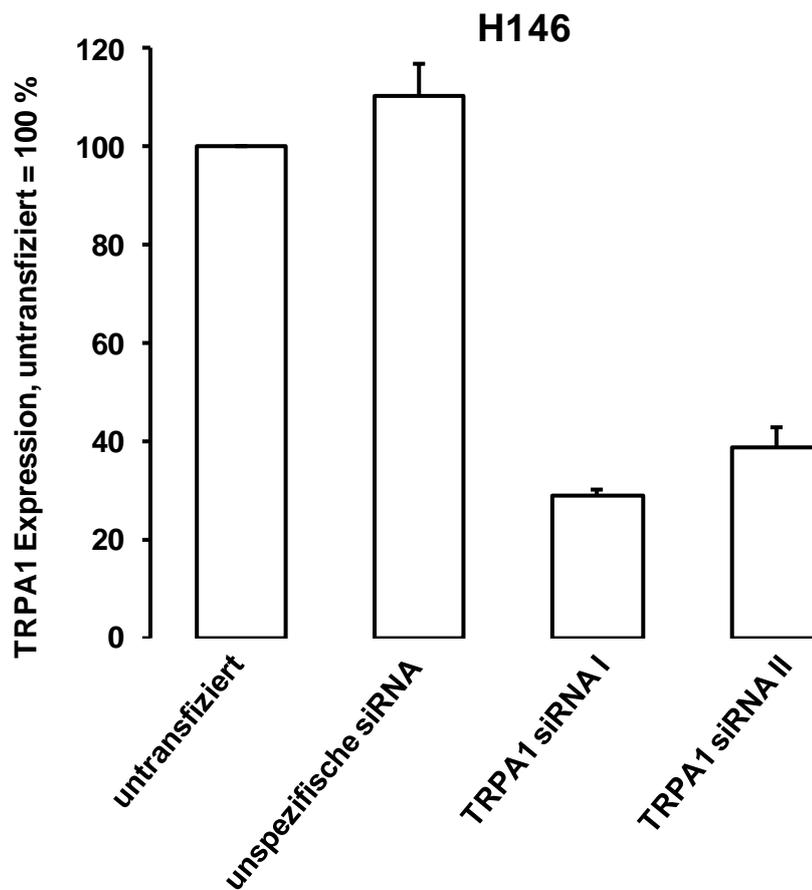


Abb. 93: *Quantifizierung der mRNA-Expressionslevel des TRPA1-Kanals normiert auf die β -Aktin mRNA-Expression in H146-Zellen, die entweder nicht transfiziert, mit unspezifischer siRNA oder mit TRPA1 siRNAI, bzw. TRPA1 siRNAII transfiziert wurden. Die Analyse wurde mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt. Die relative TRPA1-Expression in nicht transfizierten Zellen wurde = 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.*

In der quantitativen RT-PCR-Analyse zeigte sich, dass eine effiziente Inhibition der TRPA1-mRNA-Expression durch spezifische siRNAs möglich war. Dabei war die getestete TRPA1 siRNAI noch etwas effizienter als die getestete TRPA1 siRNAII. Aus diesem Grund wurde für alle folgenden Versuche die TRPA1 siRNAI verwendet.

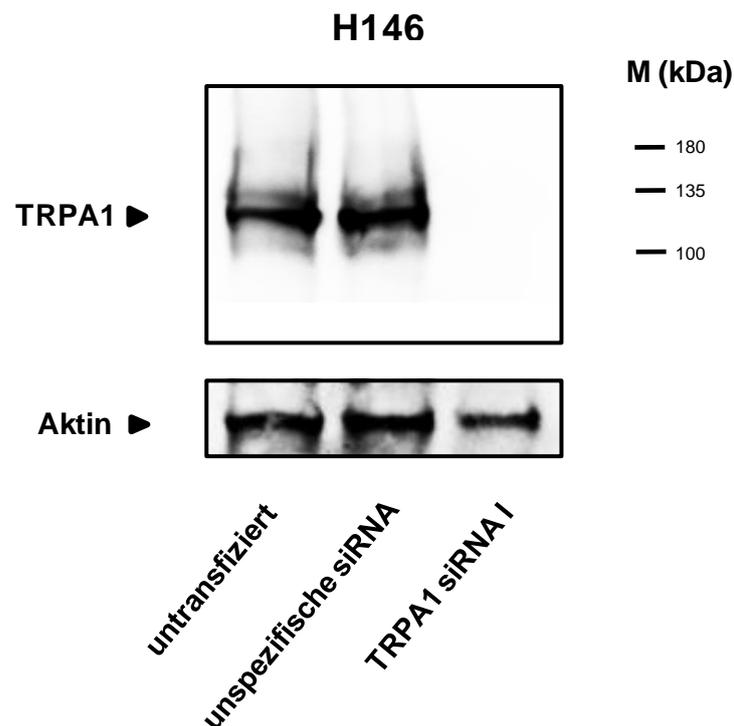


Abb. 94: Nachweis der TRPA1-Proteinexpression durch "Western-Blot" in Zelllysaten aus untransfizierten, mit unspezifischer oder mit TRPA1 siRNA transfizierten H146-Zellen. Die Banden im oberen Teil der Abbildung zeigen die TRPA1-Proteinexpression, die Banden im unteren Teil der Abbildung repräsentieren β -Aktin-Level (Ladekontrolle). Ein Maßstab für die Molekülmasse (M) in kDa, der mittels eines Proteinstandards ermittelt wurde, ist zur Veranschaulichung der Laufeigenschaften der TRPA1-Bande im Gel angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Auch im "Western Blot" konnte die Herunterregulation des TRPA1 mittels der TRPA1-spezifischen siRNAI auf Proteinebene gezeigt werden.

5.23 Analyse des Zellwachstums von H146-Zellen in semi-solidem Medium ("Soft-Agar"-Versuche) nach Transfektion mit TRPA1-spezifischen und -unspezifischen siRNAs

H146-Zellen wurden unbehandelt, mit Kontroll-siRNA oder mit der TPA1 siRNAI transfiziert und anschließend in einem sog. "Soft-Agar" ausgesät. Nach 2 Wochen wurden die Zellen gefärbt und die Kolonien ausgezählt. Dabei wurde deutlich, dass eine Transfektion der Zellen mit TRPA1-spezifischer siRNA zu einem deutlich verminderten Wachstum der Kolonien führte.

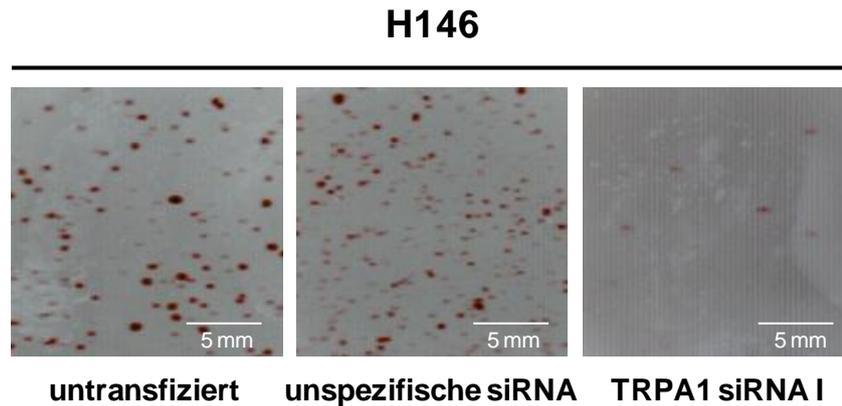


Abb. 95: *Analyse des Zellwachstums in semi-solidem Medium ("Soft-Agar").* Bei dieser Untersuchung wurden H146-Zellen entweder nicht behandelt oder mit unspezifischer siRNA oder TRPA1 siRNA transfiziert. Nach ca. 10 Tagen wurde der "Soft-Agar" angefärbt und die Zellkolonien gezählt. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die TRPA1-Expression scheint also von kritischer Relevanz für das Zellwachstum unter diesen Bedingungen zu sein. Hierbei ist anzumerken, dass die Wachstumsbedingungen in semi-solidem Medium der Situation *in vivo* weitaus näher kommen als die Konditionen in üblichem flüssigen Kulturmedium (Sarosdy & Von Hoff, 1983), da im sog. "Soft-Agar" z. B. ein komplexes dreidimensionales Wachstum von Kolonien möglich ist und eine Beschränkung der Nährstoffzufuhr durch verlängerte Diffusionsstrecken existiert.

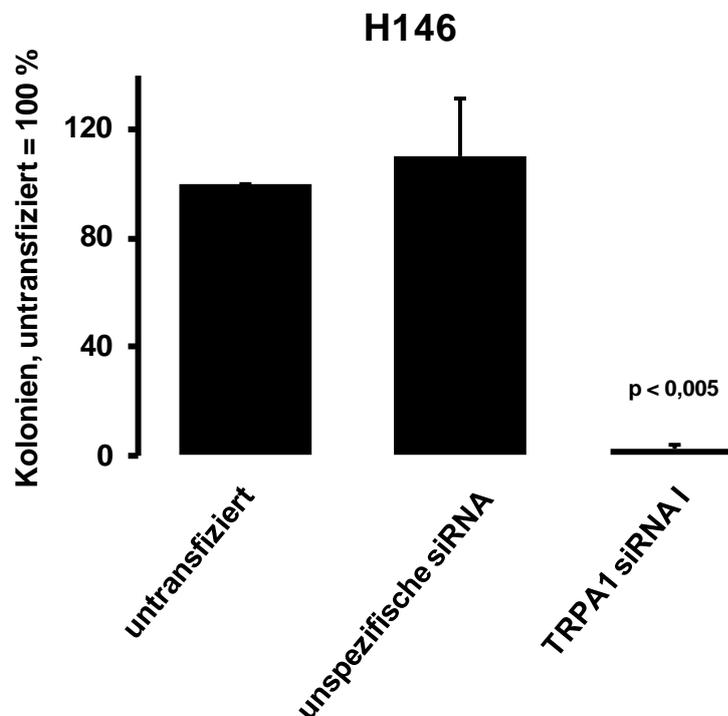


Abb. 96: *Ergebnis der Auszählung von Kolonien in semi-solidem Medium ("Soft-Agar").* Kolonien der nicht transfizierten Zellen wurden = 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

6. Diskussion

In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass der Kationenkanal TRPA1 funktionell in einer Reihe von humanen Tumorzelllinien, nämlich in SCLC- und Pankreaskarzinom-Zelllinien, exprimiert wird. Diese funktionelle Expression des TRPA1-Kanals konnte durch eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und eine vermehrte Phosphorylierung von ERK1/2 nach Stimulierung mit TRPA1-Agonisten wie z. B. AITC und Formalin nachgewiesen werden. Weiterhin ließ sich eine hohe Expression von TRPA1-mRNA auch in Biopsien, die aus SCLC-Tumorproben gewonnen wurden, wiederfinden, während normales Lungengewebe nur eine sehr niedrige TRPA1-Expression zeigte. Bemerkenswerterweise führte in SCLC-Zellen auch eine Stimulierung mit Zigarettenrauchextrakt zu einer Kanal-Aktivierung. Außerdem bewirkte eine Behandlung der Zellen mit AITC in niedriger Dosierung (10 μ M) ein erhöhtes Überleben unter serumfreien Bedingungen und zeigte anti-apoptotische Effekte. Diese Wirkungen konnten durch TRPA1- oder ERK1/2-Inhibitoren blockiert werden. Im Gegensatz dazu führten höhere Konzentrationen von AITC (> 40 μ M) in Serum-haltigem Kulturmedium zu einer ERK1/2-abhängigen aber TRPA1-unabhängigen Toxizität. Das wichtigste Ergebnis im Hinblick auf eine tumorbiologisch relevante Rolle von TRPA1 ergab sich nach Hemmung der TRPA1-Expression in SCLC-Zellen mittels TRPA1-spezifischer siRNA. Durch diese Untersuchungen konnte in sog. "Soft-Agar"-Assays gezeigt werden, dass der TRPA1-Kanal für eine normale Koloniebildung und das Überleben der Zellen notwendig ist. Diese Daten erweitern den bisherigen Stand der Kenntnis insofern, als sie eine funktionelle Wirkung von TRPA1 in SCLC-Zellen demonstrieren, wodurch ihm eine Tumor-propagierende Rolle zukommen könnte. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse in den Pankreaskarzinomzellen, dass TRPA1 auch in anderen Tumorentitäten eine wichtige Rolle spielen könnte.

Aus diesen Befunden in Tumorzelllinien und Patientenproben lassen sich drei mögliche Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen im Hinblick auf die Rolle von TRPA1 in Tumoren ableiten: So folgt erstens aus den Untersuchungen in Patientenproben, dass TRPA1 eine mögliche diagnostische Relevanz als Marker für das Kleinzellige Bronchialkarzinom besitzt, zweitens weisen die Ergebnisse auf eine Tumor-promovierende Wirkung von TRPA1-abhängigen Signalwegen hin, was diesen Kanal zu einer möglichen therapeutischen Zielstruktur macht, und drittens erweitern die vorliegenden Daten auch den Kenntnisstand über mögliche Effekte von Isothiocyanaten, denen bisher vor allem eine chemopräventive Rolle zugeschrieben wurde.

Unabhängig von den Untersuchungen im Tumorkontext zeigte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch in der humanen Alveolar-Typ-II-Zelllinie A549 eine funktionelle Expression von TRPA1, und es ergaben sich Hinweise auf eine Erhöhung der Mucin-Expression durch TRPA1-Aktivatoren in dieser Zelllinie. Somit eröffnen sich auch neue Forschungsansätze im Hinblick auf eine non-neuronale Rolle von TRPA1 im Rahmen eines toxischen Lungenschadens.

Im Folgenden soll der bisherige Stand der Literatur zur Frage der Expression von TRPA1 in der Lunge bzw. in non-neuronalen Zellen dargestellt werden. Weiterhin soll im Hinblick auf einen möglichen endogenen Aktivierungsmechanismus von TRPA1 noch einmal auf seine potentielle Rolle als O₂-Sensor hingewiesen werden (vgl. auch 3.6.4.3) und die Implikationen, die sich hieraus für das SCLC ergeben, erörtert werden. Im Anschluss hieran werden mögliche exogene Aktivatoren von TRPA1, insbesondere Isothiocyanate, diskutiert. Im nächsten Abschnitt wird die Funktion von TRPA1 in Tumoren, vor allem im SCLC, dargestellt. In diesem Zusammenhang wird der Kenntnisstand zu Tumor-relevanten Wirkungen von Isothiocyanaten eingehend erläutert. Neben der möglichen Rolle von TRPA1 in Tumoren soll auch der in der Literatur diskutierte Beitrag dieses Kanals zum toxischen Lungenschaden erörtert werden. Weiterhin soll mit Fokus auf die Lunge ein besonderer Schwerpunkt auf mögliche TRPA1-vermittelte Effekte von Zigarettenrauch gelegt werden, da dieses komplexe Substanzgemisch eine besondere Rolle bei der Schädigung der Lunge und im Rahmen der Promovierung von Lungentumoren spielt.

6.1 Non-neuronale Expression von TRPA1

Bezüglich der Expression von TRPA1 in non-neuronalen Zellen der Lunge sowie in Pankreaskarzinom-Zelllinien ist festzustellen, dass es sich hierbei um einen recht unerwarteten Befund handelt. Zur Expression dieses Kanals außerhalb von Nervenzellen existieren bisher nur relativ wenige Veröffentlichungen, auf die weiter unten näher eingegangen werden soll. Demgegenüber konnte in einer Vielzahl von Untersuchungen im Menschen oder in anderen Säugetieren ein positiver Nachweis von TRPA1 in neuronalen Zellen auf mRNA und Proteinebene erbracht werden (zur Übersicht: (Garcia-Anoveros & Nagata, 2007; Jiang et al, 2011)).

Diese früheren Untersuchungen führten zu der Sichtweise, dass TRPA1 relativ selektiv in nozizeptiven und chemosensorischen Neuronen exprimiert wird. So war bei einer breit angelegten Untersuchung der Expression von TRP-Kanälen in der Maus der Nachweis von TRPA1-mRNA mittels quantitativer PCR in der Hauptsache auf sensorische Ganglien (Nervenzellkörper) beschränkt (Jang et al, 2012). Dabei scheint in den Zellkörpern schmerzleitender Neurone im Rückenmark TRPA1 in die Regulation der glutamatergen, erregenden Reizübertragung involviert zu sein (Pertovaara & Koivisto, 2011). Insbesondere findet sich dieser Kanal aber in den peripheren Nervenendigungen von Schmerzneuronen (Anand et al, 2008; Kobayashi et al, 2005), welche gegenüber potentiellen schädlichen Agentien am ehesten exponiert sind. So zeigt sich z. B. eine Expression von TRPA1-Protein in den feinen Verästelungen sensorischer Nerven innerhalb der epithelialen Auskleidung der luftleitenden Atemwege (Geppetti et al, 2010; Simon & Liedtke, 2008). Diese Nervenendigungen sind, insbesondere bei einer durch chronische Entzündungen bedingten Störung des Bronchialepithels, inhalierten Schadstoffen relativ direkt ausgesetzt (Buc et al, 2009; Folkerts & Nijkamp, 1998). Eine Aktivierung von TRPA1 durch irritative Inhalantien führt in diesem

Zusammenhang zur Stimulierung vagaler Reflexe (Nassenstein et al, 2008), die sich in Hustenreiz (Geppetti et al, 2010; Grace & Belvisi, 2011) äußern; weiterhin werden in den Atemwegen über TRPA1 trigeminale oder vagale Schmerzfasern aktiviert (Bessac et al, 2008; Bessac et al, 2009; Kim et al, 2010). Hustenreiz und das Gefühl brennender Schmerzen fungieren somit als Warnsignale vor inhalativen Schadstoffen und zeigen dem betroffenen Individuum an, dass es sich in einem möglichen Gefahrenbereich befindet. Darüber hinaus kann eine längerfristige oder intensive Aktivierung von TRPA1 in bronchialen Schmerzfasern zu einer sogenannten neurogenen Entzündung führen, wobei im Bereich der Nervenendigung pro-inflammatorische Transmitter wie Bradykinin, CGRP (engl.: "calcitonin gene-related peptide") und Substanz P (Andre et al, 2008) sowie Proteasen (Barrios et al, 2003) ausgeschüttet werden, welche zu chronischen Reizzuständen und einem Funktionsverlust des betroffenen Gewebes führen. Interessanterweise konnte für einige dieser sezernierten Faktoren, z. B. Bradykinin oder bestimmte Proteasen, gezeigt werden, dass diese ihrerseits wiederum zu einer Sensibilisierung oder sogar direkten Aktivierung von TRPA1 führen können (Bandell et al, 2004; Chen et al, 2011b), womit sich ein sich selbst verstärkendes System ergibt. Zusammenfassend folgt hieraus, dass für TRPA1 in peripheren sensorischen Neuronen eine Rolle in der Perzeption schmerzvoller Reize gut etabliert ist.

Demgegenüber ist zur Funktion von TRPA1 in non-neuronalen Zellen bisher relativ wenig bekannt. Dies ist insofern erstaunlich, als TRPA1 zuerst aus Lungenfibroblasten kloniert wurde (Jaquemar et al, 1999). Darüber hinaus fanden Stokes et al. 2006 in einer systematischen Untersuchung TRPA1-Transkripte, wenn auch in sehr geringer Expressionshöhe, in verschiedenen primär nicht-sensorischen Geweben, so etwa in Dünndarm, Colon, Skelettmuskel, Herz, Gehirn und Bestandteilen des Immunsystems (Stokes et al, 2006). Da die Anwesenheit von Transkripten aber nicht unbedingt die Gegenwart von Proteinen bedingt, entwickelte die Arbeitsgruppe zusätzlich einen Antikörper gegen TRPA1. Mittels dieses Antikörpers konnte in Western-Blots eine Proteindoppelbande bei ungefähr 120 kDa in Proben von Geweben aus Gehirn, Herz, Dünndarm, Skelettmuskel, Pankreas und auch in der Lunge nachgewiesen werden. Ein Problem bei diesen Untersuchungen ist, dass natürlich auch in diesen primär nicht neuronalen Geweben Nervenzellen vorkommen, die theoretisch für den positiven Nachweis des Kanals verantwortlich sein könnten. Durch Untersuchungen auf Einzel-Zell-Ebene und durch Verwendung von non-neuronalen Zelllinien konnte in neuerer Zeit jedoch eine non-neuronale Expression von TRPA1 eindeutig nachgewiesen werden. So wurde der Kanal z. B. in der Haut beschrieben, wo er in Keratinozyten und melanozytären Zellen funktionell aktiv ist (Anand et al, 2008; Oehler et al, 2012). Weiterhin wurde TRPA1 in urothelialen Zellen der Blase beschrieben (Everaerts et al, 2010; Kullmann et al, 2009; Streng et al, 2008). Die in dieser Arbeit erbrachten Befunde einer Expression des Kanals in der Alveolar-Typ-II-Zelllinie A549 wurden außerdem kürzlich von einer unabhängigen Untersuchungsgruppe ebenfalls bestätigt (Mukhopadhyay et al, 2011). Auf die mögliche Rolle dieses

Kanals in diesem Kontext soll weiter unten näher eingegangen werden. Demgegenüber ist die hier erbrachte Beschreibung des Kanals in SCLC- und Pankreaskarzinomzellen bisher noch nicht von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden.

Bezüglich der Expression von TRPA1 in SCLC-Zellen ergibt sich die Frage, ob dieser Befund durch die neoplastischen Transformationen im Sinne einer aberranten Expression zu erklären ist, oder ob der Kanal ein Protein repräsentiert, das schon in nicht-neoplastischen Vorläuferzellen von SCLC-Zellen auftritt. Im ersten Falle wäre dieser Befund vor allem im tumorbiologischen Sinne relevant, im zweiten Falle würde er auch auf eine bisher unbekannte non-neuronale Funktion von TRPA1 in der Lunge hindeuten.

SCLC-Vorläuferzellen sind bisher noch nicht eindeutig identifiziert. Pulmonale neuroendokrine Zellen mit Stammzellcharakter, die gegen exogene Schadstoffe resistent sind, sind bisher die wahrscheinlichsten Kandidaten. Einige dieser Zellen verfügen über eine Reservoirfunktion in der chemisch geschädigten Lunge und tragen zu der epithelialen Regeneration nach Exposition gegenüber lungentoxischen Substanzen bei. Funktionell erfüllen diese Zellen damit in den luftleitenden Anteilen der Lunge eine ähnliche Rolle wie Alveolar-Typ-II-Zellen im für den Gasaustausch zuständigen Alveolarraum. Auch diese Zellen dienen als regenerative Reserve nach Schädigungen. Wenn sowohl SCLC-Vorläuferzellen, als auch Alveolar-Typ-II-Zellen TRPA1 funktionell exprimieren, könnte der Kanal in diesem Kontext als Sensor für toxische Inhalantien fungieren und somit als Indikator für einen Reparaturbedarf nach Lungenschädigung dienen. Diese Funktion ist insofern plausibel, als TRPA1 als polymodaler Chemosensor für Schadstoffe dient und, entsprechend den Befunden in dieser Arbeit, anti-apoptische Effekte in Zellen vermitteln kann.

Eine andere mögliche physiologische Funktion von TRPA1 in neuroendokrinen Lungenzellen ist diejenige als Sensor für Sauerstoff (O_2). Diese Rolle von TRPA1 ist in der Einleitung ausführlich dargestellt worden (vgl. 3.6.4.3); im Hinblick auf potentielle Funktionen von TRPA1 in nicht-neoplastische Vorläuferzellen des SCLC und in manifesten Tumoren soll dieser Aspekt aber hier noch einmal beleuchtet werden.

6.2 TRPA1 als O_2 -Sensor

Wie in der Einleitung dieser Arbeit dargestellt wurde, ist TRPA1 ein wichtiges Sensormolekül, das sowohl durch hypoxische also auch durch hyperoxische Zustände aktiviert werden kann (siehe 3.6.4.3). Diese Eigenschaft von TRPA1 ist im Hinblick auf die in vorliegender Untersuchung erstmals nachgewiesene Expression von TRPA1 in SCLC-Zellen besonders relevant, weil eine putative Funktion der nicht-neoplastischen Vorläuferzellen von SCLC als O_2 -Sensoren bereits seit einiger Zeit diskutiert wird (Gould et al, 1983). Insbesondere die Zelllinie H146, die in dieser Arbeit die höchste TRPA1-Expressionsrate zeigte, dient als Modellzelllinie für O_2 -detektierende Zellen

(Buttigieg et al, 2012; O'Kelly et al, 2000; O'Kelly et al, 2001), ohne dass die molekularen Korrelate dieser Funktion bisher abschließend charakterisiert wären.

Neben der denkbaren Funktion von TRPA1 als O₂-Sensor in nicht-malignen Vorläuferzellen des SCLC ist diese Eigenschaft auch im Tumorkontext relevant. In schnellwachsenden soliden Tumoren (zu denen gerade auch das SCLC gehört) herrscht eine chronische Hypoxie (Harris, 2002; Hockel & Vaupel, 2001), da in der Regel das Gefäßwachstum dem Tumorwachstum hinterher hinkt und sich Tumorgefäße zudem durch eine ungeordnete Struktur auszeichnen und damit bei der Blut- und Sauerstoffversorgung relativ ineffizient sind (Bergers & Benjamin, 2003; Harris, 2002). Aus diesem Grund könnte in SCLC-Tumoren, aber auch in anderen rasch wachsenden Malignomen, welche TRPA1 exprimieren, von einer Daueraktivität des Kanals auch unabhängig vom Vorhandensein exogener Stimuli ausgegangen werden. Der weiteren Aufklärung der Funktion von TRPA1 für das Tumorwachstum kommt daher besondere Bedeutung zu.

Nachdem mit Hypoxie und Hyperoxie mögliche endogene Aktivierungsmechanismen von TRPA1 angesprochen wurden, sollen im nächsten Abschnitt typische exogene Aktivatoren des Kanals diskutiert werden.

6.3 Isothiocyanate als Aktivatoren von TRPA1

Isothiocyanate sind die prototypischen Aktivatoren von TRPA1 und besitzen, wie oben (siehe 3.6.4.1) dargestellt, einen ungewöhnlichen Aktivierungsmechanismus für diesen Kanal, indem sie als reaktive elektrophile Verbindungen zu einer kovalenten Modifikation der für die Aktivierung des Kanals kritischen Cysteinreste im Aminoterminus führen.

Aufgrund der Tatsache, dass Isothiocyanate, insbesondere das Allylisothiocyanat (AITC), die gängigsten Aktivatoren in Untersuchungen zur Funktion von TRPA1 sind, wurde auch in dieser Arbeit die Mehrzahl der Versuche mit AITC durchgeführt. Hierbei wurden niedrige Dosierungen gewählt (überwiegend im Konzentrationsbereich von 10–30 µM), bei denen andere TRP-Kanäle nicht aktiviert werden, so dass z. B. im Falle von Ca²⁺-Antworten, die durch TRP-Blocker inhibierbar waren, von einer TRPA1-vermittelten Reaktion auszugehen war. Dies ist insofern wichtig, als auch für TRPV1 beschrieben wurde, dass dieser Kanal durch AITC aktiviert werden kann (Everaerts et al, 2011), wobei hier jedoch Konzentrationen von > 500 µM nötig sind. Als zusätzliche Kontrolle dafür, dass die verwendeten AITC-Konzentrationen keine TRPA1-unabhängigen Effekte verursachten, wurden rekombinant TRPA1-exprimierende HEK293-Zellen verwendet und mit TRPA1-negativen HEK293-Zellen (HEK293 Wt) verglichen. Weiterhin wurden zusätzliche TRPA1-negative Zelllinien für Kontrollexperimente herangezogen, insbesondere die einzige der untersuchten SCLC-Zelllinien die keinen TRPA1-Kanal exprimierte, nämlich die Zelllinie H187. Schließlich wurde eine siRNA-

vermittelte Hemmung der TRPA1-Expression ausgenutzt, um zusätzliche Sicherheit über die Rolle dieses Kanals in SCLC-Zellen zu gewinnen.

Diese verschiedenen Kontrollexperimente sind notwendig, da Isothiocyanate wie das AITC als reaktive Verbindungen durch Modifikation der verschiedensten Biomoleküle in der Lage sind, auch zahlreiche TRPA1-unabhängige Effekte zu mediieren, wie weiter unten ausführlicher diskutiert wird (siehe 6.7 und 6.8).

Obwohl AITC somit aus pharmakologischer Sicht den Nachteil einer eingeschränkten Selektivität in sich birgt, ist der in dieser Arbeit gewählte Fokus auf diese Verbindung aus zwei Gründen sinnvoll: Zum ersten sind Isothiocyanate ubiquitär vorkommende Pflanzeninhaltsstoffe, so dass praktisch jedermann mit diesen Substanzen in Kontakt kommt und dementsprechend Isothiocyanat-vermittelten biologischen Effekten von TRPA1 eine große Bedeutung zukommt. Zum anderen nehmen Isothiocyanat-vermittelte Effekte auf Krebszellen bereits seit langem einen breiten Raum in der Literatur ein, wobei jedoch die reine phänotypische Charakterisierung beobachteter zellulärer Effekte überwiegt und mechanistische Studien zu molekularen Zielstrukturen von Isothiocyanaten bisher vergleichsweise unterrepräsentiert sind. Aus diesem Grund bieten die in vorliegender Arbeit erzielten Ergebnisse einen wichtigen Anknüpfungspunkt für ein besseres Verständnis der Mechanismen, über welche Isothiocyanate ihre biologischen Wirkungen entfalten.

Im Folgenden sollen nun mögliche Quellen für eine Exposition gegenüber Isothiocyanaten und die wahrscheinlichsten Aufnahmerouten eingehender diskutiert werden. Der Stand der Literatur für biologische Effekte von Isothiocyanaten, namentlich in Bezug auf Krebszellen, wird weiter unten diskutiert (siehe 6.7), da zuvor die biologischen Funktionen von TRP-Kanälen im Allgemeinen und TRPA1 im Besonderen vertieft dargestellt werden sollen.

Isothiocyanate kommen als Biotransformationsprodukte vor allem in Pflanzen aus der Familie der Kreuzblütler oder Brassicaceen vor (Assayed & Abd El-Aty, 2009; Trials, 2008). Daneben finden sie sich z. B. in den verwandten Kapernpflanzen (s. u.). Aus der Pflanzenfamilie der Kreuzblütler entstammen einige der wichtigsten und weltweit verbreiteten Würz- und Nahrungspflanzen, wie z. B. Gemüsekohl (Weißkohl, Rotkohl, Rosenkohl, Wirsing, Kohlrabi, Blumenkohl, Broccoli etc.), Senfpflanzen (weißer, brauner und schwarzer Senf), Chinakohl sowie Speise-, Senf- und Steckrüben, Rettich, Meerrettich, Wasabi und Kresse. Die Nutzung dieser Pflanzen durch den Menschen geht bis in die Steinzeit zurück und letztlich existiert praktisch keine Kultur, in der nicht Vertreter der Brassicaceen eine wichtige Rolle bei der Ernährung spielen.

Aus phytochemischer Sicht zeichnet sich diese Pflanzenfamilie dadurch aus, dass ihre Vertreter unterschiedliche, hoch wirksame Abwehrstoffe gegen konkurrierende Nachbarpflanzen, Mikroben, Parasiten und Fressfeinde produzieren. Als volatile Verbindung mit einer Fernwirkung auf

Nachbarnpflanzen erzeugen Brassicaceen Methylhalide wie das Brommethan (Itoh et al, 2009). Man schätzt, dass über 10 % der weltweiten Brommethan-Emissionen auf die Kultivierung dieser Pflanzen zurückgehen. Darüber hinaus enthalten diese Pflanzen Glucosinolate oder Senfölglykoside, die indirekt als Fraßgift wirken. Diese Verbindungen machen teilweise bis zu 1 % der Trockenmasse von Kreuzblütlern aus. Sie sind in spezialisierte Zellen eingelagert, wo sie sich in Nachbarschaft mit dem Enzym Myrosinase befinden. Bei einer Zellschädigung, etwa durch Fressfeinde, wird die Myrosinase freigesetzt und gelangt in direkten Kontakt mit den Glucosinolaten, wodurch eine Abspaltung der S-glykosidisch gebundenen Glukose mit anschließender Umlagerung des freiwerdenden aktiven Restes katalysiert wird (siehe Abb. 97).

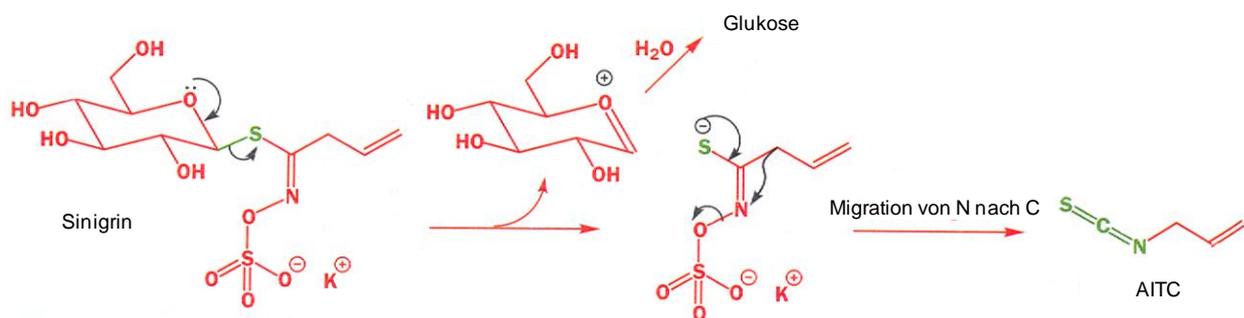
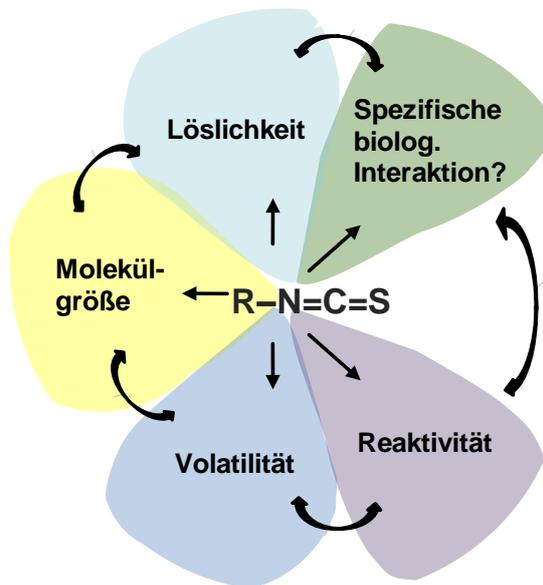


Abb. 97: Zu sehen ist der Reaktionsmechanismus, nach dem Sinigrin zu Allylisothiocyanat umgewandelt wird. Adaptiert nach Clayden, Greeves, Warren and Wothers (Edts.), *Organic Chemistry*, S. 1368.

Hierbei entstehen letztlich Isothiocyanate, die sich durch die funktionelle Gruppe S=C=N-R auszeichnen, wobei mit R variable Reste bezeichnet sind. Die wichtigsten Vertreter der Isothiocyanate sind (in Klammern typische Kreuzblütlergewächse, die die Verbindung beinhalten): Allylisothiocyanat (Wasabi, schwarzer und brauner Senf) (Tsao et al, 2002), 6-(Methylsulfinyl)hexylisothiocyanat (ebenfalls Wasabi) (Uchida et al, 2012), Methylisothiocyanat (Kaper) (Bianco et al, 2012), Phenethylisothiocyanat (Echte Brunnenkresse) (Chung et al, 1992), Benzylisothiocyanat (Kapuzinerkresse) (Pintao et al, 1995) und Sulforaphan (Brokkoli) (Zhang et al, 1992).

Da alle diese Verbindungen über die gleiche funktionelle Gruppe verfügen, unterscheidet sich das grundsätzliche Spektrum möglicher chemischer Reaktionen, welche diese Verbindungen mit Biomolekülen eingehen können, wenig. Durch die unterschiedliche Natur der Isothiocyanat-Reste werden jedoch eine Reihe physiko-chemischer Parameter beeinflusst, die das tatsächliche Verhalten dieser Verbindungen *in vivo* modulieren (vgl. Abb. 98). So entscheidet die Molekülgröße, welche von der Größe der Seitenkette R abhängt, über die Permeationsfähigkeit der Verbindung über biologische Membranen und die Zugänglichkeit zu potentiellen Bindestellen in Biomolekülen, wodurch die spezifischen biologischen Interaktionen beeinflusst werden. Auch hat die Seitenkette einen Einfluss auf die Lipophilie und Volatilität der Substanz, was ebenfalls das Verhalten *in vivo*

bestimmt. Schließlich unterscheiden sich die Isothiocyanate aufgrund induktiver und mesomerer



Effekte der Seitenkette auch in ihrer Reaktivität, was die unspezifische Toxizität und die Verweilzeit der intakten Verbindung *in vivo* nachhaltig determiniert. Obwohl also aus diesen Gründen die Isothiocyanate keineswegs ein einheitliches biologisches Wirkprofil besitzen dürften, sind systematische vergleichende Untersuchungen bisher rar, so dass beim derzeitigen Stand der Kenntnis Aussagen über biologische Effekte von Isothiocyanaten relativ allgemein bleiben müssen.

Abb. 98: *Beeinflussung der physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften von Isothiocyanaten durch den Molekülrest R.*

Im Hinblick auf eine Exposition gegenüber natürlich vorkommenden Isothiocyanaten ist zu beachten, dass diese Verbindungen alle einen relativ niedrigen Siedepunkt besitzen, so dass bereits vor Verzehr eine gewisse Fernwirkung auf die Augen und die Schleimhäute der oberen Atemwege besteht. Dieser Effekt ist biologisch im Sinne eines Warnsignals gegenüber Fressfeinden sinnvoll. Aufgrund dieser Wirkung treten schon aus einer gewissen Distanz Tränen- und Nasenfluss sowie Hustenreiz und gegebenenfalls schmerzhaftige Schleimhautsensationen auf. Diese Effekte werden im Wesentlichen durch eine Aktivierung von TRPA1 in Schmerzneuronen hervorgerufen. Da Isothiocyanate im Allgemeinen relativ gut wasserlöslich sind und sich damit effektiv im Bereich der feuchten Schleimhäute anreichern und zudem in der Regel keine allzu hohen Luftkonzentrationen auftreten, ist eine aerogene Exposition tiefer Atemwege gegenüber Isothiocyanaten jedoch unwahrscheinlich, zumal entsprechende Effekte auf die oberen Atemwege und die starke Reizwirkung dazu führen, dass eine längerfristige Exposition vermieden wird.

Eine andere Situation ergibt sich bei oraler Aufnahme Isothiocyanat-haltigen Pflanzenmaterials. Hier ist zwischen der Ingestion von rohen Pflanzenteilen und dem Verzehr von gegartem, hitzedenaturiertem Material zu unterscheiden. Beim Verzehr von z. B. frisch geriebenem Meerrettich, zerstoßenen Senfkörnern oder gehackter Kresse kommt es zu einer effektiven Umsetzung der in den Pflanzen enthaltenen Glucosinolate in Isothiocyanate, so dass der obere Verdauungstrakt (Speiseröhre, Magen, Zwölffingerdarm) in Kontakt mit diesen Verbindungen tritt.

Nach Resorption treten Isothiocyanate dann in der Leber auf, wo sie teilweise metabolisiert werden, um schließlich die systemische Zirkulation zu erreichen. Demgegenüber wird bei Aufnahme gekochter Pflanzen der obere Verdauungstrakt kaum exponiert, da beim Garungsvorgang die Myrosinase zerstört wird, so dass die biologisch weniger aktiven Glucosinolate in unveränderter Form eingenommen werden. Diese werden jedoch im Dickdarm durch die Pseudomyrosinase-Aktivität der residenten Flora aufgespalten, so dass es in diesem Szenario zu relativ hohen Konzentrationen von freien Isothiocyanaten in diesem Darmabschnitt kommt. Die Frage, welche weiteren Organe in welchem Umfang beim Verzehr von Glucosinolat-haltigen Pflanzen oder bei Ingestion von Isothiocyanat-haltigen Nahrungsergänzungsmitteln gegenüber diesen Verbindungen exponiert werden, wird weiter unten (siehe 6.7) noch einmal eingehender beleuchtet.

Zunächst soll noch einmal die Bedeutung der Identifizierung von TRPA1 als Zielstruktur reaktiver, elektrophiler Verbindungen diskutiert werden.

6.4 TRPA1 als polymodaler Sensor für elektrophile Substanzen

Nach der Entdeckung, dass TRPA1 durch kovalente Modifikation aktiviert werden kann, wurden in kürzester Zeit eine ganze Reihe von weiteren Substanzklassen als Aktivatoren des Kanals entdeckt und TRPA1 auch eine Vielzahl interessanter physiologischer Funktionen zugesprochen, wie z. B. in der Schmerzperzeption. Die Tatsache, dass hier ein Membranmolekül gefunden wurde, welches als Sensor für Elektrophile dient und nach Aktivierung durch die spezifischer Signalkaskaden definierte zelluläre Effekte vermittelt, war ein gewisser Paradigmenwechsel in der Betrachtung der biologischen Effekte von elektrophilen Substanzen. Bis dato war die vorherrschende Vorstellung, dass diese reaktiven Verbindungen ihre Effekte aufgrund eher unspezifischer Interaktionen mit Biomolekülen entfalten, eine Sichtweise, die seit langem etabliert schien (Comporti, 1989; Maynert & Hammond, 1976).

Dies ist nicht weiter verwunderlich, wenn man sich die lange geschichtliche Entwicklung vor Augen führt, welche die Untersuchungen zur Beteiligung von Elektrophilen an Prozessen im Körper genommen haben. Bereits vor ca. 60 Jahren wurde gezeigt, dass Elektrophile an noch unbekannte Strukturen im Lebergewebe kovalent binden können, als man Ratten mit karzinogenem p-Dimethylaminoazobenzen fütterte (Hughes, 1959; Kusama & Terayama, 1957). In den 1960ern wurde dann die Rolle der DNA als Zielmolekül für Elektrophile definiert und das Paradigma "DNA-Schädigung – Mutation – Karzinogenese" aufgestellt, das zur Grundlage hatte, dass DNA offensichtlich mit Karzinogenen Addukte bilden kann (Trosko & Chang, 1978; Zimmermann & Roberts, 1971). Diese wichtige Erkenntnis hatte zur Folge, dass Proteine als Zielstruktur für

elektrophile Substanzen unter dem Gesichtspunkt der mechanistischen Analyse toxischer Wirkungen lange Zeit weniger untersucht wurden.

Zwar gibt es eine ganze Reihe von Studien zur kovalenten Bindung von Elektrophilen an Serumproteine (Ehrenberg & Osterman-Golkar, 1980; Ehrenberg et al, 1996; Tornqvist & Kautiainen, 1993). Hierbei dienten die Analysen aber eher als Surrogatparameter für den Nachweis einer Exposition bzw. zur Extrapolation der exponierten Dosis. So wurden Hämoglobin-Addukte als Biomarker für den Kontakt mit Karzinogenen gemessen und eine entsprechende Dosimetrie etabliert. In den 1970igern zeigten Untersuchungen, dass mikrosomale Enzyme bestimmte Substanzen, z. B. Paracetamol (Acetaminophen), zu elektrophilen Metaboliten transformieren, die *in vitro* und *in vivo* kovalent an Leberproteine binden und so zur Zellschädigung führen, ein Vorgang, der durch zytoprotektive Faktoren wie Glutathion (GSH) verhindert werden kann (Black, 1980; Hinson, 1983; Prescott & Critchley, 1983). Diese Untersuchungen warfen ein Schlaglicht auf die Tatsache, dass die Interaktion elektrophiler Verbindungen mit Proteinen auch im funktionellen Sinn wichtig sein kann. Analoge Befunde existieren auch für endogen produzierte Elektrophile, z. B. solche, die im Rahmen von oxidativem Stress entstehen. So entdeckten Esterbauer et al. die Gruppe der konjugierten Aldehyde als potentiell toxische endogene Substanzen (Esterbauer et al, 1991). Auch Prostaglandin D2 kann durch Dehydrierung in reaktive Verbindungen wie 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 umgewandelt werden, welches durch eine Michael-Addition mit Nukleophilen, wie den freien Sulphydrylen von GSH und in zellulären Proteinen, reagiert. Interessanterweise wurde auch diese Verbindung kürzlich als Aktivator von TRPA1 beschrieben (Andersson et al, 2008; Cruz-Orengo et al, 2008).

Konjugierte Aldehyde und reaktive Prostaglandine stellen endogene Substanzen dar, welche das Potential besitzen, TRPA1 zu aktivieren. Außerdem kann auch Hypoxie (siehe 6.2) in gewisser Weise als endogen auftretender Prozess verstanden werden, der zu einer Aktivierung des Kanals führt. Daneben sind mittlerweile aber eine Vielzahl exogener Substanzen identifiziert worden, die aufgrund ihrer elektrophilen oder oxidierenden Eigenschaften (vgl. 3.6.4) als Aktivatoren für diesen Kanal fungieren. Die Rolle von Isothiocyanaten wurde im vorausgegangenen Abschnitt bereits intensiv diskutiert. Weitere, toxikologisch relevante inhalative Schadstoffe mit TRPA1-aktivierender Wirkung sind beispielsweise Tränengas (Brone et al, 2008), Ammoniak (Dhaka et al, 2009), Formalin (McNamara et al, 2007), Acrolein (Bautista et al, 2006), Ozon (Taylor-Clark & Udem, 2010) oder Methylisocyanat (Bessac et al, 2009). Diese Verbindungen sind chemisch-strukturell sehr unterschiedlich, besitzen jedoch als Irritantien und Lungenschadstoffe alle das Potential, die Atemwege zu schädigen. Die Tatsache, dass mit TRPA1 ein Molekül existiert, dass durch alle diese Verbindungen aktiviert wird und zudem in jedem Abschnitt der Lunge exprimiert wird, macht eine Rolle dieses Kanals als genereller Sensor für toxische Inhalantien wahrscheinlich.

Die Fähigkeit von TRPA1, ganz unterschiedliche Schadstoffe zu detektieren, bezeichnet man dabei als polymodale Aktivierbarkeit.

Da nun für reaktive Verbindungen bereits frühzeitig die Verbindung mit der Entstehung von Krebs gefunden wurde, stellt sich die Frage, inwieweit auch eine TRPA1-Aktivierung ein wichtiger Faktor bei einer durch reaktive Substanzen hervorgerufenen karzinogenen Wirkung ist. Hierzu soll nun zunächst auf die Rolle der Familie von TRP-Kanälen insgesamt bei Krebserkrankungen eingegangen werden.

6.5 TRPA1 und Krebs

Die Expression von TRPA1-mRNA wurde, wie bereits oben (6.1) erwähnt, erstmalig in Lungenfibroblasten beschrieben (Jaquemar et al, 1999). Daneben zeigte sich in dieser frühen Arbeit auch eine Expression des Kanals auf mRNA-Ebene in mesenchymalen Tumorzellen, insbesondere in einer Liposarkom-Zelllinie. In dieser Zelllinie fand sich, im Gegensatz zu den Fibroblasten, auch eine Expression auf Protein-Ebene. In anderen humanen Geweben war TRPA1 so schwach exprimiert, dass der Kanal mittels "Northern-Blotting"-Methoden nicht detektiert werden konnte und nur mit einer sehr sensitiven PCR-Methode überhaupt nachweisbar war. Auf mRNA-Ebene stellten Stokes et al. bei Untersuchungen von 195 Tumoren und entsprechendem normalen Gewebe nur bei zwei Proben signifikante Änderungen im Expressionslevel in den Tumoren gegenüber der Kontrolle fest. Auf Proteinebene zeigte sich allerdings bei 47 Gewebeproben eine deutliche Erhöhung im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe. In der Diskussion über eine mögliche Rolle von TRPA1 in Tumoren wurde jedoch zu dieser Zeit eher eine tumorsuppressive Wirkung postuliert. Ein Befund, der diese These stützt, ist die Tatsache, dass die rekombinante Überexpression von TRPA1 (damals als ANKTM1 bezeichnet) in CHO-Zellen zu einer schweren Beeinträchtigung ihrer Proliferationsfähigkeit führte und offensichtlich eine Zellschädigung bewirkte ("cells constitutively expressing ANKTM1 appeared unhealthy") (Story et al, 2003), was als Hinweis für einen grundsätzlich wachstumshemmenden Effekt dieses Kanals angesehen werden konnte. Diese Wirkung von TRPA1 in rekombinanten Überexpressionssystemen erschwerte auch in vorliegender Arbeit die Generierung einer HEK293-Zelllinie, die den Kanal permanent exprimierte. Durch eine sehr niedrige Expression des Kanals in einem HEK293-Zellklon (HEK293-A1 Klon E) gelang es jedoch, diesen wachstumshemmenden Effekt zu minimieren.

In der Folge konzentrierte sich die Mehrzahl von Untersuchungen zu von TRPA1 vor allem auf die Funktion des TRPA1-Kanals als Schmerz- und Schädigungssensor in neuronalen Zellen, so dass weitere systematische Untersuchungen oder funktionelle Studien zunächst im Wesentlichen ausblieben.

Erst in neuester Zeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Schäfer die funktionelle Expression von TRPA1 in Melanomzellen beschrieben (Oehler et al, 2012). In dieser Studie konnte die Expression des Kanals in Melanomzelllinien auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden und mittels Ca^{2+} -Messungen und elektrophysiologischen Untersuchungen eine Stimulierbarkeit des melanozytären TRPA1 mittels AITC oder Zimtaldehyd nachgewiesen werden. Die Funktion des Kanals in diesen Zellen bleibt bis dato aber noch unklar. Untersuchungen im Rahmen dieser Studie, welche sich mit der Toxizität von AITC in diesen Zellen beschäftigten, werden weiter unten (6.6) noch eingehender diskutiert, jedoch ist AITC als exogener Pflanzenstoff sicher nicht in physiologische Vorgänge in Melanozyten oder pathophysiologische Prozesse in malignen Melanomen involviert. Der endogene Aktivator von TRPA1 in diesem Zellsystem ist derzeit also noch nicht identifiziert. Immerhin ist in diesem Kontext darauf hinzuweisen, dass ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Schäfer (Hill & Schaefer, 2009) sowie einer späteren Untersuchung (Bellono et al, 2013) gezeigt werden konnte, dass UV-Licht zu einer Aktivierung des TRPA1-Kanals führen kann. Der Mechanismus ist hierbei noch nicht völlig klar, es könnten jedoch reaktive Sauerstoffspezies involviert sein, die unter Bestrahlung mit UV-Licht entstehen und den Kanal aktivieren könnten (Hill & Schaefer, 2009). Alternativ wird eine initiale Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch UV-Licht diskutiert (Hill & Schaefer, 2009), was in gewisser Analogie zu Phototransduktionsprozessen in der Retina stehen würde, wobei es nach dieser Hypothese in den melanozytären Zellen sekundär zur Aktivierung von TRPA1 käme. Unabhängig vom tatsächlichen Mechanismus lässt sich so zumindest spekulieren, dass TRPA1 in Melanomen und Melanozyten in Prozesse involviert ist, die durch UV-Bestrahlung ausgelöst werden und eventuell sogar eine Rolle in der Tumorprogression spielen könnten.

Eine weitere Tumorentität, welche im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit auf ihre Expression von TRPA1 untersucht wurde, ist das Karzinom des exokrinen Pankreas (duktales Pankreaskarzinom). Dieser sehr aggressive und bisher weitgehend Therapie-resistente Tumor (vgl. 3.2) ist aus zwei Gründen eine interessante Tumorentität im Hinblick auf die mögliche Expression chemosensibler Kationenkanäle der TRP-Familie: Zum einen konnte durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Prof. Volker Ellenrieder, in die auch eigene, in dieser Arbeit nicht gezeigte Daten eingeflossen sind, demonstriert werden, dass ein Calciumionen-Einstrom ein wichtiges Signal für die Proliferation dieser Tumorzellen darstellt (Koenig et al, 2010). Zum anderen ist für das exokrine Pankreaskarzinom gut belegt, dass bei diesem Tumor einer der wichtigsten äußeren Risikofaktoren das Rauchen ist (Maisonneuve & Lowenfels, 2010; Nitsche et al, 2011; Pandol et al, 2012). Da, wie weiter unten (6.9 und 6.10) eingehender diskutiert, Tabakrauch ein Cocktail chemisch-strukturell unterschiedlicher TRPA1-Aktivatoren ist, liegt es nahe, die funktionelle Expression dieses Sensorproteins in Pankreaskarzinom-Zellen näher zu untersuchen.

Der hierbei erbrachte Nachweis, dass die beiden Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc-1 und IMIM-PC1 diesen Kanal funktionell exprimieren, ist ein interessanter, nach meinem Wissensstand bisher noch nicht anderweitig beschriebener Befund, welcher weitergehende Untersuchungen rechtfertigt. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass bisher für TRPA1 eine Rolle im endokrinen Anteil des Pankreas (z. B. bei der Insulinsekretion) diskutiert wurde (Cao et al, 2012; Doihara et al, 2009; Numazawa et al, 2012) und es Hinweise auf eine Funktion des Kanals in nozizeptiven Neuronen in diesem Organ gibt (Ceppa et al, 2010; Schwartz et al, 2011). Demgegenüber ist jedoch eine Expression und Funktion von TRPA1 in exokrinen Zellen der Bauchspeicheldrüse, also in den Zellen, welche die Vorläufer des duktales Pankreaskarzinoms darstellen, nicht beschrieben worden. Somit könnte TRPA1, bei Nachweis des Kanals in entarteten Zellen im Pankreas, eine wertvolle Funktion als Tumormarker besitzen und eine relevante Rolle bei der Biologie dieses Karzinoms spielen.

In Bezug auf mögliche Funktionen von TRPA1-vermittelten Signalwegen in Pankreaskarzinomen ist auf die grundsätzliche Bedeutung des Ras-MEK-ERK1/2-Signalweges in diesen Zellen hinzuweisen (Neuzillet et al, 2012). Da aktivierende Mutationen im Onkogen Ras eine typische genetische Signatur im duktales Pankreaskarzinom darstellen (Costello et al, 2012; Zavoral et al, 2011), ist der zugehörige Signalweg in diesen Tumorzellen bereits konstitutiv aktiviert. Interessanterweise korreliert eine erhöhte ERK1/2-Aktivität in Pankreastumoren auch mit verringerten Überlebenszeiten (Handra-Luca et al, 2012), was die Bedeutung der Signalkaskade in diesem Tumor unterstreicht. Trotzdem ist die genaue Rolle Ras-MEK-ERK1/2-abhängiger Signalwege beim Pankreaskarzinom noch nicht wirklich gut verstanden. Insbesondere ist noch unklar, inwieweit bei diesem Tumor neben genetisch fixierten Aberrationen (wie den erwähnten Ras-Mutationen), welche zu einer Aktivierung des Signalweges führen, auch noch nicht durch Mutationen daueraktivierte, sondern funktionell regulierte Signalwege in zusätzliche Tumor-promovierende Effekte, z. B. von Zigarettenrauch-Komponenten, involviert sind. Bisher haben sich Untersuchungen zu Tabak-assoziierten, Tumor-promovierenden Signalwegen beim Pankreaskarzinom vor allem auf nikotinische Acetylcholinrezeptoren als mögliche Zielstruktur konzentriert (Chowdhury et al, 2002; Momi et al, 2013; Schuller & Al-Wadei, 2010). TRPA1-vermittelte, Ca²⁺-abhängige Signalwege, die zu einer Aktivierung von ERK1/2 führen, könnten bei diesem Tumor aber ebenfalls in eine durch Tabak-Komponenten induzierte Progression involviert sein. Somit ist TRPA1 auch in dieser Tumorentität ein potentiell interessanter Ansatzpunkt für therapeutische oder chemopräventive Ansätze.

6.6 Beteiligung von TRPA1 an der Pathogenese des SCLC

Wie oben (siehe 6.2) ausgeführt wurde, ist für TRPA1-exprimierende SCLC-Zellen eine erhöhte basale Kanalaktivität und eine damit einhergehende tumorbiologisch relevante Funktion plausibel,

da TRPA1 die Fähigkeit besitzt, als Hypoxiesensor zu fungieren, und da in SCLC-Tumoren von einer verringerten Sauerstoffspannung auszugehen ist. Darüber hinaus ist TRPA1 aber auch im Kontext seiner Funktion als Sensor für unterschiedliche inhalierbare Schadstoffe ein naheliegender Kandidat, der eine Rolle bei der Pathogenese des SCLC spielen könnte. Dies gilt insbesondere, da dieser Lungentumor eine sehr enge Assoziation mit einer Belastung gegenüber exogenen Inhalantien (z. B. Zigarettenrauch) besitzt. So zeigt sich in der Vorgeschichte von Patienten mit SCLC regelhaft eine Exposition gegenüber inhalierbaren Noxen, und die zu beobachtenden Primärtumore befinden sich in der Lunge ganz überwiegend in unmittelbarer Nähe zu den zentralen Bronchien, wo die Belastung gegenüber eingeatmeten Schadstoffen am größten ist (Chong et al, 2006; Rosado-de-Christenson et al, 1994). Da, wie weiter unten (siehe 6.9) ausgeführt, exogene Lungenschadstoffe und v. a. Inhaltsstoffe des Tabakrauchs, Aktivatoren von TRPA1 sind, ist eine Rolle dieses Kanals bei der Entwicklung von SCLC-Tumoren auch vor diesem Hintergrund postulierbar.

Der in SCLC-Zellen in vorliegender Arbeit beobachtete Phänotyp im Zusammenhang mit diesem Kanal unterstreicht seine potentielle Tumor-Relevanz. So war eine Stimulierung von TRPA1 wichtig für das Überleben von SCLC-Zellen unter serumfreien Bedingungen, während umgekehrt die Herunterregulation des Kanals mittels eines siRNA-Ansatzes zu einer massiven Beeinträchtigung der Koloniebildung in semisolidem Medium ("Soft-Agar") führte.

Auffällig hierbei ist, dass für das Überleben im flüssigen Kulturmedium unter serumfreien Bedingungen das bloße Vorhandensein des Kanals in den SCLC-Zellen nicht ausreichend war, sondern eine Stimulierung mit AITC erfolgen musste. Demgegenüber führte in den Versuchen auf "Soft-Agar" die Herunterregulierung des Kanals auch in Abwesenheit zugesetzter Stimuli zu einer Einbuße der Wachstumsfähigkeit, woraus im Umkehrschluss zu folgern ist, dass unter diesen Bedingungen das Vorhandensein des Kanals bereits ausreichend für das Wachstum der Tumorzellen war. Dieser Befund deutet darauf hin, dass in "Soft-Agar"-Versuchen eine erhöhte basale Kanalaktivität vorliegt oder endogene Aktivatoren gebildet werden. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass bei Versuchen in semisolidem Medium die Zellen in die "Soft-Agar"-Matrix eingegossen werden, was zu einer verlängerten Diffusionsstrecke gegenüber der Umgebungsluft führt und somit eine reduzierte Sauerstoffversorgung bedingen könnte. Damit wäre eine erhöhte basale Kanalaktivität unter diesen Bedingungen vorstellbar. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind jedoch weitergehende Untersuchungen notwendig.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass für die Koloniebildung in semisolidem Medium eine Poren-unabhängige Funktion von TRPA1 notwendig ist. Da zu Poren-unabhängigen Funktionen von TRPA1 im Besonderen oder TRP-Kanälen im Allgemeinen wenig bekannt ist, bleibt dieser Punkt sehr spekulativ. Weil TRPA1 aber neben der Kanalpore noch über eine ganze Reihe von

funktionellen Mikrodomänen verfügt, die namensgebenden Ankyrin-Domänen seien hier beispielhaft genannt, sind Kanal-unabhängige Funktionen dieses Proteins durchaus vorstellbar, so z. B. als Interaktionsplattform, welche Proteinkomplexe an die Plasmamembran dirigiert. So ist mittlerweile für eine Reihe von TRP-Kanälen (z. B. TRPV1 und TRPV4) beschrieben worden, dass diese in der Lage sind, Arrestin an die Plasmamembran zu rekrutieren, was mit einer Kanaldesensibilisierung einhergeht (Por et al, 2012; Shukla et al, 2010). Analog zur G-Protein-unabhängigen Signaltransduktion von Sieben-Transmembran-Rezeptoren via Arrestin und ERK1/2 (Shenoy & Lefkowitz, 2011; Shukla et al, 2011) ist somit auch eine Poren-unabhängige Signaltransduktion von TRP-Kanälen zumindest vorstellbar.

Leider war es aus methodischen Gründen nicht möglich, unter den Bedingungen der Soft-Agar-Kultur eine Stimulierung der Zellen mit TRPA1-Agonisten verlässlich zu testen, da keine homogene Konzentration des Agonisten innerhalb der semisoliden Agarose-Matrix sicherzustellen ist und AITC als relativ flüchtige Verbindung beim Eingießen der >42°C warmen Agarose in die Kulturschalen in hohem Maße abdampft. Es ist daher derzeit noch unklar, ob eine Stimulierung von TRPA1 mit exogenen Agonisten die Wachstumsfähigkeit von SCLC-Zellen in semisolidem Medium zusätzlich verbessert, was ein guter Hinweis für eine Poren-abhängige Funktion von TRPA1 in diesem Zusammenhang wäre.

Zumindest im Hinblick auf die in normalem Flüssigmedium erhobenen Befunde bleibt aber festzuhalten, dass ein TRPA1-vermittelter überlebensfördernder Effekt unter Serum-Entzug offenbar von einer Stimulierung des Kanals mit AITC abhing. Letztlich ist hieraus die Hypothese ableitbar, dass auch *in vivo* die wiederholte Aktivierung von TRPA1 durch natürliche oder endogene Aktivatoren zu einer Progression des Tumors beitragen könnte.

Abschließend ist festzuhalten, dass in vorliegender Arbeit zur Untersuchung von TRPA1-vermittelten Effekten auf Apoptose und Zellwachstum durchgängig AITC als Testsubstanz verwendet wurde, da diese Verbindung der am besten charakterisierte Aktivator von TRPA1 ist. Da AITC und andere, ebenfalls TRPA1 aktivierende Isothiocyanate weitverbreitete Inhaltsstoffe vieler pflanzlicher Nahrungsmittel sind, stellt sich mithin die Frage nach der Rolle von TRPA1 bei biologischen Effekten von Isothiocyanaten. Insbesondere unter onkologischen Gesichtspunkten ist diese Stoffgruppe in der Tat ausführlich untersucht worden, wobei aber TRPA1 als molekulare Zielstruktur dieser Verbindungsklasse erst kürzlich in den Fokus gerückt ist, so dass die Mehrzahl der Untersuchungen über Isothiocyanate diesen Kanal noch nicht einschließt. Im Folgenden soll nun ein kurzer Überblick über den Kenntnisstand der Wirkung von Isothiocyanaten auf Krebs gegeben werden.

6.7 Isothiocyanate und Krebs

Aufgrund ihrer hohen chemischen Reaktivität und ihrer Elektrophilität interagieren Isothiocyanate mit einer ganzen Reihe von Biomolekülen und üben dementsprechend zahlreiche biologische Effekte aus. Gut untersucht ist beispielsweise das DNA-schädigende Potential von Isothiocyanaten (Charron et al, 2012; Kassie et al, 1999; Kassie & Knasmuller, 2000; Kassie et al, 2001), eine Eigenschaft, die grundlegend für die keimabtötende und Lebensmittel-konservierende Wirkung (Azizan & Blevins, 1995; Nadarajah et al, 2005; Nielsen & Rios, 2000) dieser Substanzen sein dürfte. Vor dem Hintergrund der DNA-schädigenden Wirkung von Isothiocyanaten wurden auch Bedenken geäußert, dass diese Substanzklasse eine karzinogene Wirkung entfalten könnte (Kassie & Knasmuller, 2000; Murata et al, 2000). So wurde insbesondere über ein erhöhtes Auftreten gutartiger Blasen Tumore in Ratten berichtet, die mit Isothiocyanaten behandelt wurden (Hirose et al, 1998; National Toxicology, 1982), während die Gabe von Tumor-initiiierenden Nitrosaminen zusätzlich zur Behandlung mit Isothiocyanaten zur vermehrten Bildung von bösartigen Tumoren des Urothels führte (Hirose et al, 1998; Okazaki et al, 2003), was für eine inkomplette karzinogene Wirkung mit Tumor-promovierender Komponente spricht. In ähnlicher Weise zeigte sich, dass die synthetische Verbindung 6-Phenylhexyl-Isothiocyanat zu einem vermehrten Auftreten von Ösophaguskarzinomen bei Ratten führte, die mit N-Nitrosomethylbenzylamin vorbehandelt wurden (Stoner et al, 1995). Diese Befunde sind insofern mechanistisch etwas überraschend, als bei Tumor-promovierenden Substanzen eigentlich gerade keine DNA-schädigende oder mutagene Wirkung im Vordergrund steht, sondern epigenetische oder post-translationale Effekte wie eine Aktivierung von Proteinkinasen oder eine Inhibition von Phosphatasen (Carbone & Pass, 2004; Hennings et al, 1993; Parodi et al, 1992). Folglich sind die potentiell Tumor-promovierenden Effekte von Isothiocyanaten bisher nicht gut mit dem bekannten DNA-schädigenden Potenzial dieser Verbindungen erklärbar.

Im Hinblick auf die dietätische Zufuhr von Isothiocyanaten, z. B. in Form von Meerrettich, Senf oder Wasabi, herrscht bisher die Meinung vor, dass die hierbei üblicherweise erreichten Konzentrationen beim Menschen so weit unter den in Rattenversuchen karzinogenen oder *in vitro* genotoxischen Dosierungen liegen, dass kein erhöhtes Risiko zu befürchten ist (Fimognari et al, 2012). Im Hinblick auf künstlich mit Isothiocyanaten angereicherte Nahrungsergänzungsmittel wird allerdings zu einer gewissen Vorsicht gemahnt (Fimognari et al, 2012). Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die Datenlage zu Tumor-erzeugenden Effekten von Isothiocyanaten derzeit noch unklar ist und weitere Untersuchungen nötig sind.

Ganz im Gegensatz zur Literatur bezüglich putativer karzinogener Wirkungen von Isothiocyanaten steht eine enorme Anzahl an Publikationen, die eine sogenannte chemopräventive, d.h. antikarzinogene, Wirkung dieser Substanzklasse reklamieren. Diese Wirkung wird einerseits

aufgrund von epidemiologischen Daten postuliert, wonach der Konsum Isothiocyanat-haltiger Pflanzen das Tumorrisiko senkt (Kim & Park, 2009; Lam et al, 2009; Reszka et al, 2006), andererseits stützt sich die These von der Schutzwirkung dieser Substanzen auf experimentelle Ansätze, denen zufolge die Wirkung von Karzinogenen durch Ko-Applikation von Isothiocyanaten oder entsprechenden Pflanzenextrakten aufgehoben wurde oder eine Tumor-hemmende Wirkung *in vivo* oder *in vitro* zu verzeichnen war (zur Übersicht: (Hecht, 1996; Nishikawa et al, 2004; Stoewsand, 1995). Grundsätzlich werden zwei im Folgenden näher erläuterte Mechanismen aufgeführt, aufgrund derer diese chemopräventiven Wirkungen zustande kommen sollen: (1) eine nur *in vivo* bedeutsame Wirkung auf den Fremdstoffmetabolismus und (2) ein *in vitro* und *in vivo* relevanter Antitumor-Effekt.

In einem mechanistischen Erklärungsansatz, der die protektive Wirkung von Isothiocyanaten über ihre pharmakokinetischen Interaktionen erklärt, geht man u. a. davon aus, dass diese Substanzen in der Lage sind, die Aktivierung von Karzinogen-Vorstufen über Cytochrom-P450-abhängige Funktionalisierungsreaktionen zu hemmen. So konnte gezeigt werden, dass Isothiocyanate einerseits eine direkte Hemmwirkung auf das katalytische Zentrum der Cytochrom-P450-Enzyme ausüben und andererseits die Induktion dieses Systems inhibieren, was zusammengenommen zu einer geringeren Enzymaktivität in den kritischen Organen (insbesondere in der Lunge und in etwas geringerem Maße in der Leber) führt (Guo et al, 1991; Guo et al, 1993; Ishizaki et al, 1990; Morimoto et al, 1995; Smith et al, 1990; Yoxall et al, 2005). Auf diese Weise verhindern Isothiocyanate, dass bestimmte, nicht-karzinogen wirkende Xenobiotika im Körper zu Karzinogenen umgewandelt werden.

Eine hiervon unabhängige, noch stärker unspezifisch wirksame, protektive Wirkung von Isothiocyanaten auf den Metabolismus beruht auf der Induktion von detoxifizierenden Phase-II-Enzymen, z. B. von Glutathion-S-Transferasen oder UDP-Glucuronyltransferasen (Bogaards et al, 1990; Guo et al, 1992; Spornins & Wattenberg, 1981; Svehlikova et al, 2004; Zhang et al, 1992). Diese Enzyme können eine ganze Reihe von Karzinogenen inaktivieren, so dass für das entsprechende Organ oder Gewebe, in dem diese Enzyme induziert werden, ein erhöhter Schutz vor Karzinogenen besteht. Darüber hinaus sind Phase-II-Enzyme auch entscheidend daran beteiligt, die Wasserlöslichkeit von Karzinogenen zu erhöhen, was eine verbesserte Elimination über die Nieren bedingt und somit zum Schutz des Gesamtorganismus vor dem entsprechenden krebsauslösenden Stoff beiträgt. Hinsichtlich des Mechanismus, über den Isothiocyanate eine Induktion dieser Phase-II-Enzyme bewirken, konnte in letzter Zeit eine Beteiligung Keap1/Nrf2-gesteuerter Prozesse nachgewiesen werden (Keum, 2011; Nakamura & Miyoshi, 2010). Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor, der Antioxidantien-responsible-Elemente (ARE) in der Promoter-Region von Genen für Phase-II-Enzyme bindet und eine vermehrte Expression dieser Gene bewirkt. Normalerweise ist Nrf2 einer ausgeprägten Ubiquitin-abhängigen Proteolyse unterworfen, da

dieser Faktor ein Substrat der Aktin-gebundenen Ubiquitin-Ligase Keap1 darstellt. Die Aktivität von Keap1 und seine Interaktion mit Nrf2 hängen wiederum vom Redox-Status von Cysteinresten dieser Ubiquitin-Ligase ab. Im reduzierten Zustand ist Keap1 aktiv, eine Oxidation der Cysteinreste führt zu einer Inhibition des Proteins. Isothiocyanate bewirken durch direkte Adduktbildung oder indirekt durch Generierung reaktiver Sauerstoff-Spezies eine Oxidation der kritischen Cysteinreste von Keap1 und somit dessen Hemmung. Dies führt zu einer Disinhibition von Nrf2 und zu einer vermehrten Expression protektiver Enzyme, welche sogenannte Antioxidantien-responsible Elemente (ARE) in der Promotor-Region ihres Genabschnittes aufweisen und durch Nrf2 gesteuert werden (zur Übersicht: (Taguchi et al, 2011; Tkachev et al, 2011; Yu & Kensler, 2005)).

Sowohl die hemmende Wirkung von Isothiocyanaten auf Cytochrom-P450-Enzyme, als auch die Induktion von protektiven Phase-II-Enzymen entfalten jedoch nur dann eine Schutzwirkung gegenüber Karzinogenen, wenn die Einnahme von Isothiocyanaten in hinreichendem Abstand vor der Exposition gegenüber dem Karzinogen erfolgt. Ein anderer Mechanismus, der im Hinblick auf Isothiocyanate diskutiert wird, ist auch dann noch wirksam, wenn die Einwirkung eines Karzinogens bereits länger zurückliegt, ja sogar dann, wenn bereits Tumorzellen entstanden sind: Nach diesem alternativen Erklärungsansatz wirken Isothiocyanate nämlich antiproliferativ gegenüber Krebszellen, wodurch Isothiocyanate also als eine Art natürliches chemotherapeutisches Agens wirken. Eine derartige Wirkung wurde *in vitro* z. B. gegenüber Prostatakarzinomzellen (Bommareddy et al, 2009; Herman-Antosiewicz et al, 2007; Tang et al, 2011; Wiczek et al, 2012; Yin et al, 2009), malignen Melanomen (Hamsa et al, 2011; Oehler et al, 2012), Urothelkarzinomzellen der Harnwege (Pullar et al, 2004; Shan et al, 2009; Tang & Zhang, 2005) und N-SCLC-Zellen (Pawlik et al, 2012; Yan et al, 2011) beschrieben.

Teilweise wurde in diesem Zusammenhang auch postuliert, dass Isothiocyanate bei dieser antiproliferativen Wirkung eine gewisse Selektivität gegenüber Krebszellen entfalten, also stärker toxisch auf maligne entartete Zellen wirken als auf normale Zellen (Clarke et al, 2011; Powolny & Singh, 2010; Trachootham et al, 2006; Zeng et al, 2011). Es fehlt jedoch an Untersuchungen, die eindeutig belegen könnten, dass diese scheinbare Selektivität nicht nur darauf beruht, dass die in den Studien verwendeten Krebszellen eine höhere Proliferationsrate aufwiesen als die vergleichsweise herangezogenen "normalen" Zellen. Die Hypothese einer möglichen "Tumorselektivität" von Isothiocyanaten muss daher mit einem Fragezeichen versehen werden. Darüber hinaus scheinen die Befunde einer wachstumshemmenden Wirkung von Isothiocyanaten auf den ersten Blick den hier vorliegenden eigenen Ergebnissen entgegen zu stehen, wonach das Wachstum von SCLC-Zellen durch AITC sogar eher begünstigt wurde. Es muss hierbei jedoch die verwendete Dosierung berücksichtigt werden. In Untersuchungen, in denen AITC einen hemmenden Effekt auf Tumorzellen ausübte, wurden in der Regel Dosierungen von mehr als 40 µM, teilweise von bis zu 1 mM verwendet. Demgegenüber zeigte sich der hier berichtete

wachstumsfördernde Effekt von AITC in SCLC-Zellen bei einer Konzentration von 10 μM . Wie im nächsten Kapitel eingehender diskutiert wird, zeigte sich auch in vorliegender Arbeit bei einer AITC-Konzentration von mehr als 40 μM eine deutliche Toxizität in SCLC-Zellen.

Somit stellt sich im Hinblick auf die Lunge bzw. das SCLC die Frage, ob die Aufnahme von Isothiocyanaten über die Nahrung *in vivo* wohl eher Tumor-hemmende, Tumor-fördernde oder neutrale Effekte ausüben würde. Hierbei kann man beim derzeitigen Kenntnisstand wohl davon ausgehen, dass die Mengen AITC, die man beim Verzehr entsprechender Brassicaceen zu sich nimmt, wohl grundsätzlich nicht hoch genug sind, um überhaupt Effekte in der Lunge auszulösen, da Isothiocyanate zu einem großen Teil in der Leber eliminiert werden und zusätzlich recht effektiv über die Nieren ausgeschieden werden (Bollard et al, 1997; Borghoff & Birnbaum, 1986). Somit ergeben sich nach oraler Aufnahme keine hohen Isothiocyanat-Konzentrationen im Blut, und die Lunge ist als Zielorgan diätetischer Isothiocyanate unwahrscheinlich. Letztlich ist das Organ mit der höchsten Exposition gegenüber AITC aus Nahrungsmitteln die Harnblase, da sich hier über den Urin ausgeschiedenes AITC wieder ankonzentriert. Daher könnten AITC-Effekte (oder solche von AITC-Abbauprodukten) in diesem Zielorgan weitaus interessanter sein. Jedoch ist für die *In-vivo*-Situation schwer vorherzusagen, ob AITC-Effekte in der Harnblase letztlich eher antikarzinogen oder Tumor-promovierend wären. Wie oben bereits diskutiert, finden sich für beide Hypothesen gewisse Hinweise aus experimentellen Untersuchungen. So zeigte sich eine non-neuronale Expression von TRPA1 in Zellen des Übergangsepithels der Harnwege (Everaerts et al, 2010; Streng et al, 2008), was Tumor-promovierende Effekte über diesen Kanal zumindest möglich erscheinen lässt. Weiterhin wurde, wie oben angesprochen, für die Harnblase ein Tumor-promovierender Effekt von Isothiocyanaten in Ratten bereits belegt (Hirose et al, 1998; National Toxicology, 1982). Diesen Befunden stehen jedoch die Hinweise auf eine Tumor-hemmende Wirkung von Isothiocyanaten in Urothelkarzinomzellen entgegen (Bhattacharya et al, 2010a; Bhattacharya et al, 2010b). Beim derzeitigen Stand der Erkenntnis ist jedoch zumindest eine gewisse Vorsicht gegenüber der gezielten Aufnahme von Isothiocyanaten bei Patienten mit Harnblasenkrebs oder einem erhöhten Risiko für diese Tumorerkrankung anzuraten; der Vorschlag, gerade bei dieser Erkrankung Isothiocyanate als Chemopräventivum einzusetzen (Tang & Zhang, 2004), erscheint derzeit als riskant. Eine Reihe von Isothiocyanat-Präparaten sind jedoch in Deutschland als Nahrungsergänzungsmittel verfügbar (z. B. Sulforaphan Kapseln mit 50 mg Wirkstoff pro Kapsel), wobei diese Präparate z. T. Isothiocyanatdosierungen enthalten, welche deutlich über den natürlicherweise durch den Verzehr von Brassicaceen aufgenommenen liegen. Insofern ist in diesem Punkt eine kritische Aufklärung der Verbraucher durchaus dringend geboten.

6.8 Mögliche Mechanismen der TRPA1-unabhängigen Toxizität von Isothiocyanaten

Im Hinblick auf die toxische Wirkung von Isothiocyanaten auf Tumorzellen ist der Mechanismus bisher noch nicht abschließend geklärt. Die hier vorgestellten eigenen Befunde konnten eine Rolle von TRPA1 beim vermehrten Überleben von SCLC-Zellen nach Stimulierung mit niedrigen Dosierungen von AITC demonstrieren. Somit stellt sich die Frage, welche Rolle der TRPA1-Kanal bezüglich toxischer Effekte von höheren AITC-Dosierungen spielt.

Hierbei wäre vorstellbar, dass die Toxizität von AITC durch eine Überaktivierung des TRPA1-Kanals bei hohen Dosierungen des Aktivators vermittelt wird. Diese Hypothese ist insofern plausibel, als intrazelluläres Ca^{2+} eine durchaus ambivalente Rolle als Regulator von Zellwachstum und -überleben spielt (Monteith et al, 2007). Gerade für das SCLC wurde, wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit ausgeführt (vgl. 3.5), eine wachstumsfördernde Rolle von Ca^{2+} beschrieben. Andererseits ist ein starker und anhaltender Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ein klassisches Apoptose-förderndes Signal, welches in Form der sogenannten Exzitotoxizität z. B. für einen Glutamat-vermittelten Zelluntergang von Nervenzellen durch Sauerstoffmangel oder Unterbrechungen der Blutzufuhr verantwortlich ist (Aarts & Tymianski, 2004; Arundine & Tymianski, 2003; Taoufik & Probert, 2008). Auch in Tumoren wurden Ca^{2+} -abhängige zellschädigende Signalwege beschrieben (Amantini et al, 2007; Ohkubo & Yamazaki, 2012; Yanamandra et al, 2011), so dass eine zu starke Stimulierung von TRPA1 durchaus für die toxischen Effekte bei höheren Dosierungen von AITC verantwortlich sein könnte. Wenn diese Hypothese zutrifft, müssten TRPA1-exprimierende Zellen eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber toxischen Dosierungen von AITC zeigen als TRPA1-negative Zellen. Außerdem sollte eine Blockade von TRPA1 diese toxischen Effekte von AITC verringern können.

Tatsächlich zeigte sich aber, dass die TRPA1-positive Zelllinie H146 genauso empfindlich auf AITC in einer Dosierung $> 40 \mu\text{M}$ reagierte wie die TRPA1-negative Zelllinie H187. Außerdem führte die Inhibition von TRPA1 mittels Rutheniumrot in H146-Zellen nicht zu einer verringerten Toxizität von AITC, sondern eher zu einer, wenn auch nicht statistisch signifikanten, Erhöhung der Wachstums-inhibierenden Wirkung. Diese Befunde sprechen dafür, dass die Toxizität von AITC unabhängig von TRPA1 ist und über diesen Kanal, wenn überhaupt, dann eher ein die zellschädigende Wirkung von AITC antagonisierender Effekt vermittelt wird. In ähnlicher Weise konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Michael Schäfer zeigen, dass Melanomzellen zwar TRPA1 funktionell exprimieren, die toxischen Effekte von AITC aber nicht über diesen Kanal erfolgen (Oehler et al, 2012). Im Hinblick auf TRPA1-vermittelte Effekte in Tumorzellen kann mithin gefolgert werden, dass dieser Kanal eine durchaus vielversprechende therapeutische Zielstruktur darstellt, da seine Inhibition mit einer Tumor-hemmenden Wirkung einherzugehen verspricht,

ohne dass hierdurch eine Hemmung möglicher pro-apoptotischer, Ca^{2+} -abhängiger Effekte einherginge.

Im Hinblick auf TRPA1-unabhängige Mechanismen der Antitumor-Wirkung von AITC wurde in früheren Untersuchungen in Prostatakarzinom-Zellen bereits eine Beteiligung von ERK1/2 postuliert. So bewirkte eine Behandlung der Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 mit AITC, Sulforaphan oder Phenethylisothiocyanat eine nach einigen Stunden zu beobachtende Aktivierung von ERK1/2 und JNK, wobei eine Co-Applikation von ERK1/2-Inhibitoren die toxische Wirkung der Isothiocyanate verringerte (Xu et al, 2006). Damit scheint in diesem Zellsystem ein ERK1/2-vermittelter Signalweg an der wachstumshemmenden Wirkung der Isothiocyanate beteiligt zu sein. Die in der Untersuchung von Xu et al. verwendete PC3-Zelllinie (Xu et al, 2006) wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit auf die Expression von TRPA1 untersucht, wobei sich keinerlei Expression auf mRNA-Ebene zeigte. Dies unterstützt weiter die These, dass TRPA1 an der Toxizität von Isothiocyanaten nicht beteiligt ist.

Bezüglich der Rolle von ERK1/2 bei der Tumor-hemmenden Wirkung von Isothiocyanaten wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit der Effekt von ERK1/2-Inhibitoren in SCLC-Zellen getestet. Auch hierbei zeigte sich, analog zu den Untersuchungen von Xu et al. (Xu et al, 2006), dass die Inhibition der ERK1/2-Aktivierung mittels des MEK-Inhibitors PD98059 zu einer verringerten AITC-Toxizität führte (vgl. Abb. 83). Dieses Ergebnis ist zunächst einmal insofern überraschend, als die überlebensfördernden Effekte von niedrig dosiertem AITC unter serumfreien Bedingungen ebenfalls ERK1/2-abhängig waren. Demzufolge hätte ERK1/2 in SCLC-Zellen je nach Signalkontext entweder wachstumshemmende oder -fördernde Effekte. Tatsächlich gibt es aus früheren Untersuchungen Hinweise, die diese These stützen. So zeigte sich bereits für die wachstumsfördernden Effekte von Neuropeptiden in SCLC-Zellen, dass diese über einen Ca^{2+} - und Src-abhängigen Signalweg zu einer transienten Aktivierung von ERK1/2 führten, wobei die Stimulierung von ERK1/2 für die Effekte der Neuropeptide auf das Wachstum der Zellen notwendig war (Roelle et al, 2008). Im Gegensatz dazu führte in denselben Zellen die Herunterregulierung von $\text{G}_{12/13}$ -abhängigen Signalwegen zu einer tonischen Aktivierung von ERK1/2, welche mit einer Wachstumshemmung einherging (Grzelinski et al, 2010). Aus diesen Befunden lässt sich die Hypothese ableiten, dass die differenziellen Effekte von ERK1/2 in SCLC-Zellen auch über die Kinetik der Aktivierung kodiert werden. Für diese Deutung spricht die Tatsache, dass auch für AITC-Effekte ein entsprechender Unterschied zu beobachten war, indem die TRPA1-vermittelte und das Zellüberleben-fördernde Wirkung auf die ERK1/2-Stimulierung schnell (innerhalb von wenigen Minuten) einsetzte und nach > 10 Minuten rückläufig war, während eine toxische AITC-Dosis zu einer TRPA1-unabhängigen ERK1/2-Stimulierung führte, welche erst nach 2 Stunden ihr Maximum erreichte (vgl. Abb. 99). Die Hypothese, dass somit eine kurzfristige ERK1/2-Aktivierung in diesem Zellsystem eher das Zell-Überleben fördert, während eine langfristige Aktivierung

hemmend auf das Überleben bzw. das Zellwachstum wirkt, sollte in Zukunft in weiteren Untersuchungen näher überprüft werden.

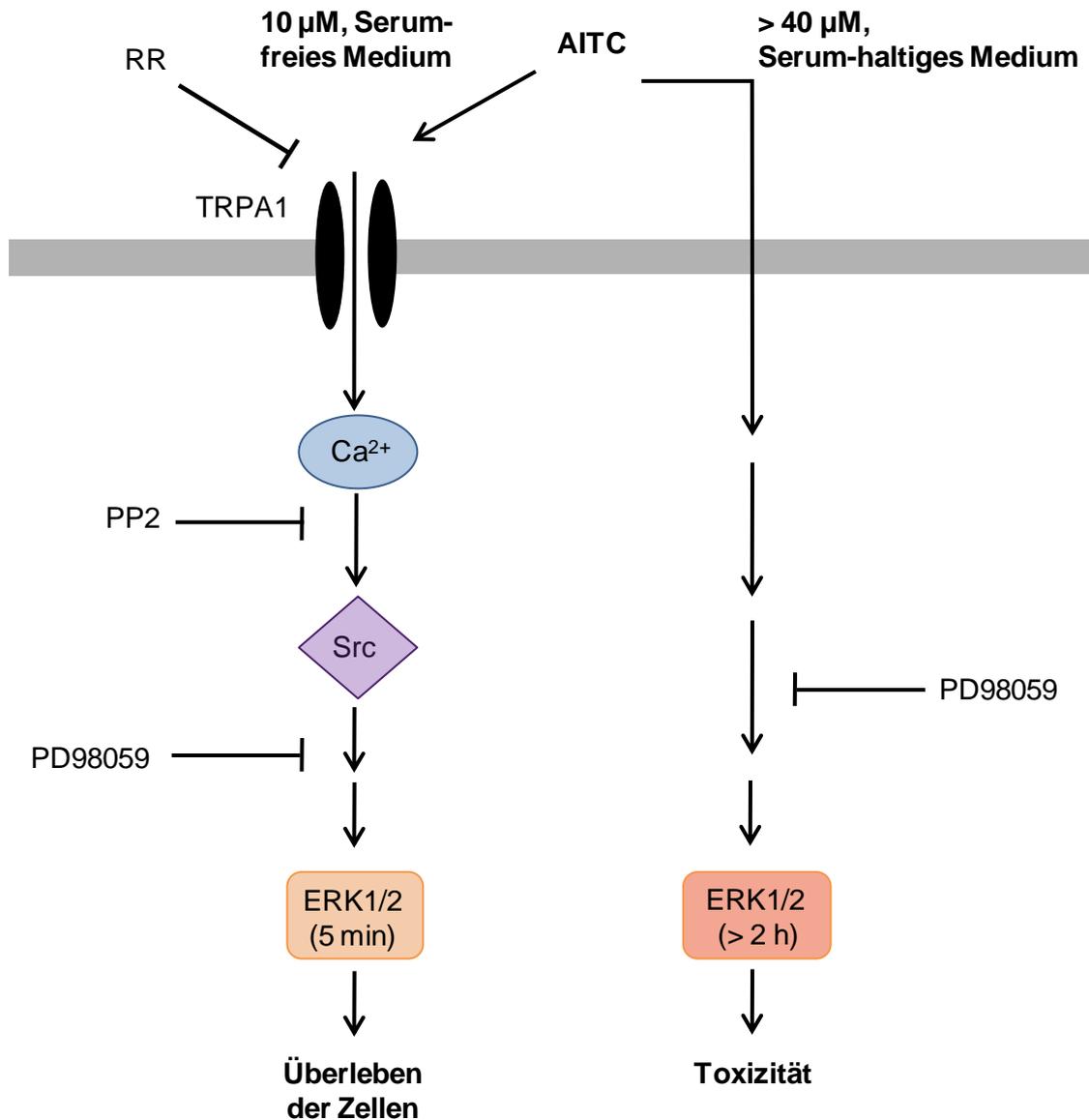


Abb. 99: Schematische Übersicht über mögliche TRPA1-abhängige und -unabhängige Effekte von AITC auf das Überleben von SCLC-Zellen.

Letztlich muss mit Blick auf die Mechanismen der Isothiocyanat-Toxizität jedoch bedacht werden, dass diese Substanzklasse aufgrund ihrer hohen chemischen Reagibilität eine Vielzahl biologischer Zielstrukturen beeinflusst und entsprechend in eine Reihe unterschiedlicher molekularer Mechanismen in ihre zellschädigenden Wirkungen involviert ist. So wurde beispielsweise auch eine Hemmung von Histon-Deacetylasen als alternativer Mechanismus angeführt, über den Isothiocyanate wachstumshemmende Effekte auf Tumorzellen ausüben (Batra et al, 2010; Clarke et al, 2011; Lu et al, 2008; Nian et al, 2009).

6.9 Beteiligung von TRPA1 an der Pathogenese des akuten toxischen Lungenschadens

Nachdem somit die möglichen tumorbiologischen Funktionen von TRPA1 diskutiert wurden – mit einem eingehenden Seitenblick auf TRPA1-unabhängige Effekte von Isothiocyanaten – soll im Folgenden der Fokus auf einen anderen pathologischen Prozess in der Lunge gerichtet werden, an dem dieser Kanal beteiligt sein dürfte, nämlich den akuten toxischen Lungenschaden.

TRPA1 wird, wie oben dargestellt wurde (siehe 3.6.4ff und 6.4), durch eine ganze Reihe von volatilen oder gasförmigen elektrophilen Substanzen und Oxidantien direkt aktiviert, die eine große toxikologische Bedeutung als inhalative Lungenschadstoffe besitzen. In oberen Abschnitten der Atemwege ist für TRPA1 vor allem eine Rolle in nozizeptiven Neuronen etabliert (Geppetti et al, 2010; Nassenstein et al, 2008; Simon & Liedtke, 2008). Eine Aktivierung des Kanals in diesen Neuronen stellt einen irritativen Schmerzreiz dar und bewirkt Nasenfluss, Augentränen und Husten (Geppetti et al, 2010). Auf diese Weise erfüllt TRPA1 eine Warnfunktion und löst Flucht- und Abwehrreaktionen aus. Diese Rolle ist vor allem für hydrophile Inhalantien wie Tränengas oder Ammoniak relevant, da diese Substanzen sich beim Einatmen in erster Linie in den oberen Atemwegen anreichern. Demgegenüber lösen lipophile Substanzen wie Phosgen, trotz ihrer Fähigkeit TRPA1 zu aktivieren, kaum Abwehrreaktionen aus (Glass et al, 2009). Dieser Effekt beruht darauf, dass stark fettlösliche Substanzen sich in der hydrophilen Umgebung der oberen Atemwege nicht einlagern und daher diesen Lungenabschnitt ohne größere Interaktionen passieren. Die in dieser Arbeit gefundene funktionelle Expression von TRPA1 in der Alveolar-Typ-II-Zelllinie A549 zeigt nun, dass selbst in den distalen Abschnitten der Lunge, also den terminalen Bronchiolen und dem Alveolarraum, TRPA1-vermittelte biologische Effekte auftreten können. In Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Dr. Dirk Steinritz und PD Annette Schmidt des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr gelang zusätzlich der Nachweis einer TRPA1-Expression im distalen Bronchialepithel von Schweinelungen sowie in humanen Lungenschnitten. Diese Untersuchungen am Lungengewebe ergaben sich in direkter Anknüpfung an die hier vorgelegten Ergebnisse, sind jedoch nicht Bestandteil dieser Dissertation. Der Nachweis einer Gewebsexpression von TRPA1 in Epithelzellen in Lungenabschnitten, die dem Gasaustausch dienen, stützt jedoch die Hypothese, dass dieser Kanal auch wichtige non-neuronale Funktionen erfüllt.

In vorliegender Arbeit zeigte sich, dass eine Aktivierung von TRPA1 zur Stimulierung der MAPK-Kaskade in Lungenepithelzellen führt. Die MAPK-Kaskade ist im Lungenepithel ein etablierter Regulator inflammatorischer Effekte (Mercer & D'Armiento, 2006). Grundsätzlich können dabei zytosolische Effektoren durch die MAPK aktiviert oder aber nach Translokation der MAPK in den Zellkern Effekte auf Transkriptionsebene vermittelt werden. Für die MAPK ERK1/2, welche nach

vorliegender Arbeit durch AITC oder Formalin in einer TRPA1-abhängigen Weise aktiviert wird, konnte gezeigt werden, dass die Phospholipase A2 (PLA2) ein typischer zytosolischer Effektor ist und über eine ERK1/2-Stimulierung in Verbindung mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ die Generierung von Arachidonsäure vermittelt (Clark et al, 1995). Dieser pro-inflammatorische Signalweg wäre in der Lunge sehr interessant. Eigene, orientierende Untersuchungen ergaben jedoch noch keinen Hinweis auf eine Stimulierung der PLA2 in A549-Zellen durch TRPA1-Aktivatoren (Daten nicht gezeigt). Eine Beteiligung der PLA2 an non-neuronalen Signalwegen des TRPA1 in der Lunge ist damit aber noch keineswegs ausgeschlossen, und es sollten zur Überprüfung dieser Kaskade noch weitere Untersuchungen mit anderen TRPA1-positiven Zelllinien (z. B. Lungenfibroblasten) und unter Verwendung weiterer TRPA1-Aktivatoren (z. B. Zigarettenrauch oder Acrolein) erfolgen.

Im Hinblick auf ERK1/2-vermittelte Effekte in der Lunge ist ein weiterer, diesmal transkriptioneller Signalweg bemerkenswert. Die Regulation der Mucin-Synthese als Hauptbestandteils des Schleims, der für die Selbstreinigung und den Schutz der Atemwege essentiell ist (Rose & Voynow, 2006). Wie verschiedene Arbeitsgruppen zeigen konnten, führt eine ERK1/2-Stimulierung in Lungenepithelzellen, z. B. auch in der Zelllinie A549, zur Induktion von Mucin (Kitazaki et al, 2005; Song et al, 2007; Yuan-Chen Wu et al, 2007). Aus diesem Grunde wurde auch in vorliegender Arbeit untersucht, ob TRPA1-Aktivatoren zu einer vermehrten Mucin-Synthese in A549-Zellen führen. In der Tat zeigte sich dabei, dass AITC zu einer vergleichbaren Mucin-Induktion führt, wie der etablierte, TRPA1-unabhängige Stimulus EGF.

Diese zelluläre Antwort nach Aktivierung von TRPA1 und ERK1/2 könnte eine wichtige adaptive Reaktion auf Lungenschadstoffe sein, welche in tiefe Lungenabschnitte gelangt sind. Durch die vermehrte Schleimsekretion könnten so eingedrungene Schadstoffe neutralisiert und über die mucoziliäre Reinigungsfunktion wieder aus der Lunge entfernt werden. Ein Problem ist jedoch, dass eine überschießende Schleimproduktion, wie sie bei einer intensiven oder chronischen Exposition gegenüber Schadstoffen auftreten kann, zu einer Verstopfung der Atemwege führt. In diesem Szenario treten in vielen Fällen auch noch eine spastische Kontraktion der glatten Muskulatur der Bronchien und eine toxische Lähmung des Zilienschlags mit konsekutivem Ausfall der Selbstreinigungsfunktion der Lunge auf. Zusammengenommen ergibt sich dann das Bild einer obstruktiven Lungenerkrankung, wie sie etwa als akuter Asthmaanfall oder als chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD) auftritt.

Zur symptomatischen Behandlung der bronchialen Kontraktion stehen bei obstruktiven Lungenerkrankungen schon seit langem β_2 -Mimetika zur Verfügung, welche zu einer Erschlaffung der glatten Muskulatur in den Atemwegen führen. Gerade bei toxischen Lungenschäden haben sich diese Substanzen jedoch nicht sonderlich bewährt und werden nicht mehr generell empfohlen, da hier Effekte an der glatten Muskulatur meist nicht im Vordergrund stehen. Demgegenüber wären

Substanzen, die zu einer Senkung der Schleimproduktion führen, ein interessanter neuer Therapieansatz, der auch zu einer Senkung des Atemwegwiderstandes beitragen würde, wenn durch den toxischen Lungenschaden ein akuter Ausfall der Lungenfunktion (engl.: "acute respiratory distress syndrome" oder ARDS) auftritt, der eine längerfristige Beatmung notwendig macht. Inhibitoren von TRPA1 wären in dieser Situation also Substanzen, die einen potentiellen Nutzen entfalten könnten. Somit sollten an die vorliegende Arbeit weitere Untersuchungen anknüpfen, die die Eignung von TRPA1-Blockern als Inhibitoren der Schleimproduktion in der Lunge testen.

6.10 Karzinogene Wirkungen von Tabakrauch: Tumorinitiierende vs. Tumorpromovierende Effekte

Die Befunde in vorliegender Arbeit, dass TRPA1 in SCLC-Tumoren überexprimiert wird sowie in SCLC-Zellen funktionell aktiv ist und in diesem Zellsystem auch durch Zigarettenrauch-Extrakte aktiviert werden kann, sind im Hinblick auf die Theorien zur Lungen-Karzinogenese von Tabakrauch bedeutsam. Dies gilt insbesondere, da eine Aktivierung von TRPA1 in SCLC-Zellen einen anti-apoptotischen Effekt hatte und das Überleben der Zellen unter Serumdeprivation förderte. Aus diesen Befunden lässt sich die Hypothese ableiten, dass eine wiederholte Inhalation von Tabakrauch einen Überlebensvorteil für SCLC-Zellen in der Lunge erzeugt. Dieser TRPA1-vermittelte, putative Effekt von Tabakrauch wäre als eine sogenannte Tumor-promovierende Wirkung einzustufen und TRPA1-unabhängigen, Tumor-initiiierenden Effekten von Tabakrauch gegenüberzustellen.

Unter Tumorinitiation bzw. Tumorpromotion versteht man zwei Prozesse, die regelhaft im Rahmen der Krebsentstehung auftreten, insbesondere bei Tumoren, die durch exogene Substanzen hervorgerufen werden. In diesem Szenario wirken zunächst Tumorinitiatoren als mutagene Substanzen, die eine Schädigung der DNA und dabei krebsfördernde Mutationen hervorrufen. Im Falle des SCLC wären Mutations-bedingte Inaktivierungen der Tumorsuppressor-Gene p53 und Rb die entscheidenden genetischen Ereignisse, die dazu führen, dass Zellklone mit einem malignen Potential entstehen. In der Regel sind solche Mutationen jedoch nicht ausreichend, um einen manifesten, klinisch in Erscheinung tretenden Tumor zu erzeugen. Zusätzlich sind meist noch Effekte von sogenannten Tumorpromotoren notwendig, also von Substanzen, die kein DNA-schädigendes Potenzial besitzen und daher auch keine Mutationen erzeugen, die aber auf funktioneller Ebene das Wachstum von bereits mutierten Zellen begünstigen. Solche Substanzen sind typischerweise als Wachstumsfaktoren oder als Inhibitoren der Apoptose wirksam.

Im Fall der Tabakrauch-bedingten Krebsentstehung, insbesondere mit Bezug auf das SCLC, wird bereits seit längerem angenommen, dass diese Noxe sowohl Tumor-initiiierende als auch Tumor-

promovierende Wirkungen entfaltet (Abb. 100). Dabei werden vor allem Nitrosamine als DNA-schädigende Substanzen im Tabakrauch für die Tumor-initiiierende Wirkung verantwortlich gemacht (Nilsson, 2011; Peterson, 2010; Sugimura & Nagao, 1981). Im Hinblick auf Tumor-promovierende Effekte wird seit längerem nach Aktivatoren der ERK1/2-Kaskade gesucht, welche das Wachstum von SCLC-Zellen begünstigen. Eine bisher geäußerte Vermutung war, dass Nikotin selbst, durch seine Wirkung auf Acetylcholin-Rezeptoren, als ein solcher Tumorpromoter wirksam ist (Catassi et al, 2008; Codignola et al, 1994; Quik et al, 1994; Schuller et al, 2003).

Die Befunde in vorliegender Arbeit sprechen jedoch dafür, dass im Falle des SCLC (und möglicherweise auch in anderen durch Tabakrauch verursachten Tumoren) TRPA1-Aktivatoren über eine Stimulierung der ERK1/2-Kaskade als Tumor-promovierende Substanzen wirksam sind. Dies ist eine bedeutsame Ergänzung zur bisherigen Fokussierung auf Nikotin als mögliche Tumor-promovierende Substanz, da somit der Nikotingehalt eines Tabakproduktes keine Voraussage für dessen Tumor-förderndes Potenzial ergäbe. Darüber hinaus wären auch Tabakrauch-unabhängige Lungenschadstoffe mit TRPA1-aktivierender Wirkung mögliche Kandidaten für eine Promotion von Lungentumoren, was eine interessante mechanistische Basis für die Risikobewertung inhalativer Noxen darstellt (Hecht, 2003).

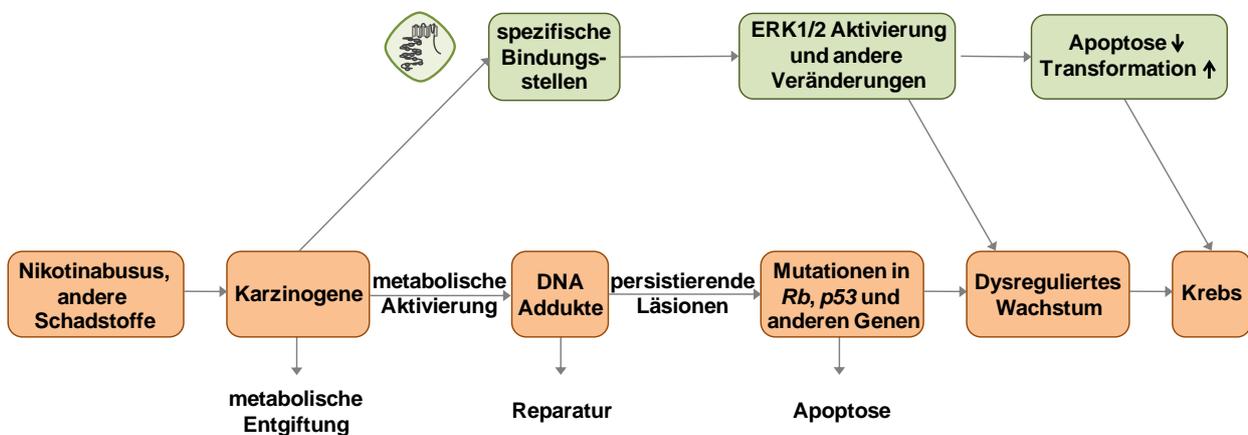


Abb. 100: Tabakrauch-vermittelte Karzinogenese: Darstellung der tumorigenen Schlüsselereignisse im Rahmen genotoxischer und nicht-genotoxischer Effekte von Rauch-Inhaltsstoffen. Adaptiert aus Hecht 2003.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Tab. 14: Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

	∅	Unstimuliert	
A	A	Ampère	
	AC	Adenylylcyclase	
	Ach	Acetylcholin	
	ADP	Adenosindiphosphat	
	Aeq	Aequorin	
	AITC	Allylithiocyanat	
	AK	Antikörper	
	Akt	Proteinkinase B	
	AMP	Adenosinmonophosphat	
	AMPK	AMP-Kinase	
	Apaf-1	Protease-Aktivierungsfaktor-1	
	APS	Ammoniumpersulfat	
	ARDS	Akutes Atemnot-Syndrom (engl.: "acute respiratory distress syndrome")	
		ARE	Antioxidantien-responsible-Elemente
		ATP	Adenosintriphosphat
	B	BB2	Bombesin-Rezeptor Typ 2
		Bk	Bradykinin
BKCa		Ca ²⁺ -sensitive K ⁺ -Kanäle der BK-Familie	
BSA		Rinderserum Albumin (engl.: Bovine serum albumin)	
BIM		Bisindolylmaleimide	
BITC		Benzylisothiocyanat	
B2R, B3R		Bradykinin-Rezeptor Typ 2, Bradykinin-Rezeptor Typ 3	
C		°C	Grad Celsius
		CA	Zimtaldehyd (engl.: "cinnamaldehyde")
		Ca ²⁺	Calciumionen
	[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Calciumionenkonzentration	
	CAG	Cytomegalovirus-verstärkter Aktin-Promotor aus <i>Gallus domesticus</i>	
	cAMP	Zyklisches Adenosin- Monophosphat	
	Cch	Carbachol	
	Cd ²⁺	Cadmiumionen	
	CDC	Engl.: "Centers for Disease Control and Prevention"	
	cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure; engl.: "copy DNA"	
	c-Fos	Protein, kodiert durch das gleichnamige <i>c-fos</i> -Gen	
	CGRP	Neuropeptid (engl.: "calcitonin gene-related peptide")	
	CHO	Hamster Ovarialkarzinom-Zelllinie (engl.: "chinese hamster ovary")	
	CK-BB	Cholezystokinin-BB	
	CMV	Cytomegalovirus	

	CO	Kohlenstoffmonoxid
	COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung (engl.: "chronic obstructive pulmonary disease")
	CSE	1. Cystathion- γ -Lyase; 2. Zigarettenrauchextrakt (engl.: "cigarette smoke extract")
D	DAG	1,2-Diacylglycerol
	DAGK	DAG-Kinase
	DDC	L-DOPA-Decarboxylase
	DEPC	Diethylpyrocarbonat
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: "deoxyribonucleic acid")
E	e	Extrazellulär
	e ⁻	Elektron
	ECL	Engl.: "enhanced chemiluminescence"
	E.coli	Escherichia coli
	ED	Fortgeschrittenes Erkrankungsstadium (engl.: "extensive disease")
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: "epidermal growth factor")
	EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: "epidermal growth factor receptor")
	EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
	ELISA	Engl.: "enzym-linked immunosorbent assay"
	ER	Endoplasmatisches Retikulum
	ERK	Extrazellulär signalregulierte Kinase (engl.: "extracellular signal-regulated kinase")
F	FACS	Engl.: "fluorescence activated cell sorting"
	FCS	Fötales Kälberserum (engl.: "fetal calf serum")
	FSC	Vorwärtsstreuung (engl.: "forward scatter")
	Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxymethylester
G	g	1. Gramm; 2. Erdbeschleunigung
	GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
	GALR1-3	Galanin-Rezeptor Typ 1-3
	Gd ³⁺	Gadoliniumionen
	GDP	Guanosindiphosphat
	GFP	Grün fluoreszierendes Protein (engl.: "green fluorescent protein")
	GITC	Guanidinisoithiocyanat
	GluR	Glutamatrezeptoren
	GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
	GRP	Gastrin-freisetzendes Peptid
	GSH	Glutathion
	GTP	Guanosintriphosphat
H	h	Stunde (lat.: <i>hora</i>)
	HBS	Engl.: "HEPES buffered saline"
	HEK	Humane Nierenzelllinie (engl.: "human embryonic kidney")
	HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
	HER	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

	HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
	HMBA	Hexamethylenbisacetamid
	4-HNE	4-Hydroxynonenal
	HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: "horseradish peroxidase")
	H ₂ S	Schwefelwasserstoff
I	i	Intrazellulär
	IgG	Immunglobulin G
	IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
	IP4	Inositoltetrakisphosphat
	IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
L	l	Liter
	LD	Begrenztes Krankheitsstadium (engl.: "limited disease")
	Log	Logarithmus
M	μ	Mikro-
	m	1. Milli-; 2. Meter
	M	1. Mega-; 2. Molar; 3. Marker
	MAHMA- NONOat	Methylamin-hexamethylen-methylamin-NONOat
	MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
	β-ME	β-Mercaptoethanol
	MEK	MAPK-Kinase
	Mg ²⁺	Magnesiumionen
	mGluR	Metabotrope Glutamatrezeptoren
	Min	Minute
	MITC	Methylisothiocyanat
	MW	Mittelwert
N	N	1. Nano-; 2. Zahl unabhängiger Versuche
	NADPH	Nicotinadenindinucleotidphosphat
	NC	Nitrozellulose
	NCAM1	Neuronales Zell-Adhäsions-Molekül 1
	NO	Stickstoffmonoxid
	NOX	NADPH Oxidase;
	N.S.	Nicht signifikant
	N-SCLC	Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (engl.: "non-small cell lung cancer")
	NSE	Neuron-spezifische Enolase
O	O ₂	Sauerstoff
	OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
	4-ONE	4-Oxononenal
P	P	Signifikanz
	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	PBS (PBS-T)	Engl.: "phosphate buffered saline" (+ Tween 20)
	PC	Polycarbonat
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: "polymerase chain reaction")
	PDGF	Aus Thrombozyten entstammender Wachstumsfaktor (engl.: "platelet-derived growth factor")
	P-ERK1/2	Phosphoryliertes ERK1/2
	PI	Propidiumiodid

	PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-kinase
	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
	PKA	Proteinkinase A
	PKC	Proteinkinase C
	PLA2	Phospholipase A2
	PLC β/γ	Phospholipase C $\beta/C\gamma$
	PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
	PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
	PNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
	PP	Polypropylen
	PS	Polystyren
	PSA	Prostataspezifisches Antigen (Prostatakrebsmarker)
R	R	Variable Reste
	Raf	Engl.: "rapidly accelerated fibrosarcoma oncogene"
	Ras	Engl.: "rat sarcoma oncogene"
	Rb	Retinoblastom-Gen
	RNA	Ribonukleinsäure (engl.: "ribonucleic acid")
	RNase	Ribonuklease
	ROC	Rezeptor-gesteuerter Kanal (engl.: "receptor-operated-channel")
	Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: "rounds per minute")
	RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
	RR	Rutheniumrot
	RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
S	s	Sekunde
	SCLC	Kleinzelliger Lungenkrebs (engl.: "small cell lung cancer")
	SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: "sodium dodecyl sulfate")
	SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl.: "standard error of the mean")
	SERCA	Sarkoplasmatisches/Endoplasmatisches-Retikulum-Ca ²⁺ -ATPase
	SFN	Sulforaphan
	SOC	Speicher-gesteuerter Kanal (engl.: "store-operated-channel")
	Src	Engl.: "sarcoma oncogene"
	SSC	Seitwärtsstreuung (engl.: "sidewards scatter")
T	TAE	Tris-Acetat
	TASK-3	Zwei-Porendomänen-Kanäle der TASK-Familie
	TBS (TBS-T)	Engl.: "tris buffered saline" (+ Tween 20)
	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
	TM	Transmembran-Domäne
	TNT	Tumor-Nekrose-Faktor
	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	TRP	Engl.: "transient receptor potential"
	TRPC	TRPCanonical
	TRPV	TRPVanilloid
	TRPM	TRPMelastatin
	TRPA	TRPAnkyrin
	TRPP	TRPPolycystin
	TRPML	TRPMucolipin
	TAE	Tris-Acetat

V	V	Volt
	v	Volumen
	VCAM	Spannungs-gesteuerter Ca ²⁺ -aktivierter monovalent-selektiver Kationenkanal (engl.: "voltage-modulated Ca ²⁺ -activated, monovalent cation channel")
	VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: "vascular endothelial growth factor")
	VGCC	Spannungs-gesteuerter Ca ²⁺ -Kanal (engl.: "voltage-gated-Ca ²⁺ -channel")
	VHL	Von-Hippel-Lindau-Protein
W	w	Gewicht (engl.: "weight")
X	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
	XTT	4-Methoxy-5-(3-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-(phenylcarbamoyl)tetrazol-3-ium-2-yl)-2-nitrobenzensulfonat
Z	Zn ²⁺	Zinkionen
	ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Literaturverzeichnis

- Aarts MM, Tymianski M (2004). Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. *Curr Mol Med* **4**: 137-147.
- Abriel H, Syam N, Sottas V, Amarouch MY, Rougier JS (2012). TRPM4 channels in the cardiovascular system: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Biochem Pharmacol* **84**: 873-881.
- Agam K, Frechter S, Minke B (2004). Activation of the Drosophila TRP and TRPL channels requires both Ca²⁺ and protein dephosphorylation. *Cell Calcium* **35**: 87-105.
- Amantini C, Mosca M, Nabissi M, Lucciarini R, Caprodossi S, Arcella A *et al* (2007). Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation. *J Neurochem* **102**: 977-990.
- Amrein H, Bray S (2003). Bitter-sweet solution in taste transduction. *Cell* **112**: 283-284.
- Anand U, Otto WR, Facer P, Zebda N, Selmer I, Gunthorpe MJ *et al* (2008). TRPA1 receptor localisation in the human peripheral nervous system and functional studies in cultured human and rat sensory neurons. *Neurosci Lett* **438**: 221-227.
- Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* **28**: 2485-2494.
- Andre E, Campi B, Materazzi S, Trevisani M, Amadesi S, Massi D *et al* (2008). Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. *J Clin Invest* **118**: 2574-2582.
- Arundine M, Tymianski M (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* **34**: 325-337.
- Asgharian B, Price OT, Schroeter JD, Kimbell JS, Jones L, Singal M (2011). Derivation of mass transfer coefficients for transient uptake and tissue disposition of soluble and reactive vapors in lung airways. *Ann Biomed Eng* **39**: 1788-1804.
- Asgharian B, Price OT, Schroeter JD, Kimbell JS, Singal M (2012). A lung dosimetry model of vapor uptake and tissue disposition. *Inhal Toxicol* **24**: 182-193.
- Assayed ME, Abd El-Aty AM (2009). Cruciferous plants: phytochemical toxicity versus cancer chemoprotection. *Mini Rev Med Chem* **9**: 1470-1478.
- Azizan A, Blevins RD (1995). Mutagenicity and antimutagenicity testing of six chemicals associated with the pungent properties of specific spices as revealed by the Ames Salmonella/microsomal assay. *Arch Environ Contam Toxicol* **28**: 248-258.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ *et al* (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**: 849-857.
- Bandell M, Macpherson LJ, Patapoutian A (2007). From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr Opin Neurobiol* **17**: 490-497.
- Barrios VE, Jarosinski MA, Wright CD (2003). Proteinase-activated receptor-2 mediates hyperresponsiveness in isolated guinea pig bronchi. *Biochem Pharmacol* **66**: 519-525.
- Batra S, Sahu RP, Kandala PK, Srivastava SK (2010). Benzyl isothiocyanate-mediated inhibition of histone deacetylase leads to NF-kappaB turnoff in human pancreatic carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* **9**: 1596-1608.

- Baubet V, Le Mouellic H, Campbell AK, Lucas-Meunier E, Fossier P, Brulet P (2000). Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca²⁺ reporters at the single-cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7260-7265.
- Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED *et al* (2005). Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12248-12252.
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J *et al* (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**: 1269-1282.
- Bellono NW, Kammel LG, Zimmerman AL, Oancea E (2013). UV light phototransduction activates transient receptor potential A1 ion channels in human melanocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 2383-2388.
- Benham CD, Gunthorpe MJ, Davis JB (2003). TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium* **33**: 479-487.
- Bergers G, Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**: 401-410.
- Berr C, Schaefer EAM, Gudermann T, Buech TRH (2013). "Guanylyl cyclase independent signaling of nitric oxide via TRPA1." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **386**(Suppl 1): 9.
- Berridge MJ (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.
- Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt SE (2008). TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest* **118**: 1899-1910.
- Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Caceres AI, Escalera J, Jordt SE (2009). Transient receptor potential ankyrin 1 antagonists block the noxious effects of toxic industrial isocyanates and tear gases. *FASEB J* **23**: 1102-1114.
- Bessac BF, Jordt SE (2010). Sensory detection and responses to toxic gases: mechanisms, health effects, and countermeasures. *Proc Am Thorac Soc* **7**: 269-277.
- Bhattacharya A, Li Y, Wade KL, Paonessa JD, Fahey JW, Zhang Y (2010a). Allyl isothiocyanate-rich mustard seed powder inhibits bladder cancer growth and muscle invasion. *Carcinogenesis* **31**: 2105-2110.
- Bhattacharya A, Tang L, Li Y, Geng F, Paonessa JD, Chen SC *et al* (2010b). Inhibition of bladder cancer development by allyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* **31**: 281-286.
- Bianchi BR, Zhang XF, Reilly RM, Kym PR, Yao BB, Chen J (2012). Species comparison and pharmacological characterization of human, monkey, rat, and mouse TRPA1 channels. *J Pharmacol Exp Ther* **341**: 360-368.
- Bianco G, Lelario F, Battista FG, Bufo SA, Cataldi TR (2012). Identification of glucosinolates in capers by LC-ESI-hybrid linear ion trap with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-FTICR MS) and infrared multiphoton dissociation. *J Mass Spectrom* **47**: 1160-1169.
- Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Black M (1980). Acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* **78**: 382-392.
- Blackford A, Parmigiani G, Kensler TW, Wolfgang C, Jones S, Zhang X *et al* (2009). Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer. *Cancer Res* **69**: 3681-3688.

- Bodding M (2007). TRP proteins and cancer. *Cell Signal* **19**: 617-624.
- Bogaards JJ, van Ommen B, Falke HE, Willems MI, van Bladeren PJ (1990). Glutathione S-transferase subunit induction patterns of Brussels sprouts, allyl isothiocyanate and goitrin in rat liver and small intestinal mucosa: a new approach for the identification of inducing xenobiotics. *Food Chem Toxicol* **28**: 81-88.
- Bollard M, Stribbling S, Mitchell S, Caldwell J (1997). The disposition of allyl isothiocyanate in the rat and mouse. *Food Chem Toxicol* **35**: 933-943.
- Bommareddy A, Hahm ER, Xiao D, Powolny AA, Fisher AL, Jiang Y *et al* (2009). Atg5 regulates phenethyl isothiocyanate-induced autophagic and apoptotic cell death in human prostate cancer cells. *Cancer Res* **69**: 3704-3712.
- Borghoff SJ, Birnbaum LS (1986). Age-related changes in the metabolism and excretion of allyl isothiocyanate. A model compound for glutathione conjugation. *Drug Metab Dispos* **14**: 417-422.
- Brone B, Peeters PJ, Marrannes R, Mercken M, Nuydens R, Meert T *et al* (2008). Tear gasses CN, CR, and CS are potent activators of the human TRPA1 receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* **231**: 150-156.
- Buc M, Dzurilla M, Vrlik M, Bucova M (2009). Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **57**: 331-344.
- Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G *et al* (2006). Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J* **25**: 3714-3724.
- Bunn PA, Jr., Chan D, Stewart J, Gera L, Tolley R, Jewett P *et al* (1994). Effects of neuropeptide analogues on calcium flux and proliferation in lung cancer cell lines. *Cancer Res* **54**: 3602-3610.
- Buttigieg J, Pan J, Yeger H, Cutz E (2012). NOX2 (gp91phox) is a predominant O₂ sensor in a human airway chemoreceptor cell line: biochemical, molecular, and electrophysiological evidence. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **303**: L598-607.
- Califano R, Abidin AZ, Peck R, Faivre-Finn C, Lorigan P (2012). Management of small cell lung cancer: recent developments for optimal care. *Drugs* **72**: 471-490.
- Cao DS, Zhong L, Hsieh TH, Abooj M, Bishnoi M, Hughes L *et al* (2012). Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One* **7**: e38005.
- Capiod T, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N (2007). Calcium signalling and cancer cell growth. *Subcell Biochem* **45**: 405-427.
- Capiod T (2013). The need for calcium channels in cell proliferation. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **8**: 4-17.
- Carbone M, Pass HI (2004). Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen? *Semin Cancer Biol* **14**: 399-405.
- Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J *et al* (2005). Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol* **52**: 743-775; quiz 775-748.
- Carney DN, Gazdar AF, Minna JD (1980). Positive correlation between histological tumor involvement and generation of tumor cell colonies in agarose in specimens taken directly from patients with small-cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* **40**: 1820-1823.

- Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Marangos PJ, Moody TW *et al* (1985). Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res* **45**: 2913-2923.
- Catassi A, Servent D, Paleari L, Cesario A, Russo P (2008). Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: implications on lung carcinogenesis. *Mutat Res* **659**: 221-231.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-824.
- Cattaneo MG, Fesce R, Vicentini LM (1995). Mitogenic effect of serotonin in human small cell lung carcinoma cells via both 5-HT1A and 5-HT1D receptors. *Eur J Pharmacol* **291**: 209-211.
- Cebi M, Koert U (2007). Reactivity recognition by TRPA1 channels. *Chembiochem* **8**: 979-980.
- Ceppa E, Cattaruzza F, Lyo V, Amadesi S, Pelayo JC, Poole DP *et al* (2010). Transient receptor potential ion channels V4 and A1 contribute to pancreatitis pain in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**: G556-571.
- Cerny AC, Huber A (2011). Regulation of TRP signalling by ion channel translocation between cell compartments. *Adv Exp Med Biol* **704**: 545-572.
- Charron CS, Clevidence BA, Albaugh GA, Kramer MH, Vinyard BT, Milner JA *et al* (2012). Assessment of DNA damage and repair in adults consuming allyl isothiocyanate or Brassica vegetables. *J Nutr Biochem*.
- Chen J, Joshi SK, DiDomenico S, Perner RJ, Mikusa JP, Gauvin DM *et al* (2011a). Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. *Pain* **152**: 1165-1172.
- Chen Y, Yang C, Wang ZJ (2011b). Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience* **193**: 440-451.
- Chiesa A, Rapizzi E, Tosello V, Pinton P, de Virgilio M, Fogarty KE *et al* (2001). Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling. *Biochem J* **355**: 1-12.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.
- Chong S, Lee KS, Chung MJ, Han J, Kwon OJ, Kim TS (2006). Neuroendocrine tumors of the lung: clinical, pathologic, and imaging findings. *Radiographics* **26**: 41-57; discussion 57-48.
- Chowdhury P, MacLeod S, Udupa KB, Rayford PL (2002). Pathophysiological effects of nicotine on the pancreas: an update. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**: 445-454.
- Chung FL, Morse MA, Eklind KI, Lewis J (1992). Quantitation of human uptake of the anticarcinogen phenethyl isothiocyanate after a watercress meal. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1**: 383-388.
- Clapham DE (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**: 517-524.
- Clark JD, Schievella AR, Nalefski EA, Lin LL (1995). Cytosolic phospholipase A2. *J Lipid Mediat Cell Signal* **12**: 83-117.
- Clarke JD, Hsu A, Yu Z, Dashwood RH, Ho E (2011). Differential effects of sulforaphane on histone deacetylases, cell cycle arrest and apoptosis in normal prostate cells versus hyperplastic and cancerous prostate cells. *Mol Nutr Food Res* **55**: 999-1009.

- Clayden J, Greeves N, Warren S, Wothers P, (Hrsg.) (2001). "Organic Chemistry". *Oxford University Press* **49**: 1368.
- Codignola A, Tarroni P, Cattaneo MG, Vicentini LM, Clementi F, Sher E (1994). Serotonin release and cell proliferation are under the control of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in small-cell lung carcinoma cell lines. *FEBS Lett* **342**: 286-290.
- Comporti M (1989). Three models of free radical-induced cell injury. *Chem Biol Interact* **72**: 1-56.
- Cortright DN, Szallasi A (2004). Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur J Biochem* **271**: 1814-1819.
- Cosens DJ, Manning A (1969). Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. *Nature* **224**: 285-287.
- Costello E, Greenhalf W, Neoptolemos JP (2012). New biomarkers and targets in pancreatic cancer and their application to treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**: 435-444.
- Cruz-Orengo L, Dhaka A, Heuermann RJ, Young TJ, Montana MC, Cavanaugh EJ *et al* (2008). Cutaneous nociception evoked by 15-delta PGJ2 via activation of ion channel TRPA1. *Mol Pain* **4**: 30.
- Defalco J, Steiger D, Gustafson A, Emerling DE, Kelly MG, Duncton MA (2010). Oxime derivatives related to AP18: Agonists and antagonists of the TRPA1 receptor. *Bioorg Med Chem Lett* **20**: 276-279.
- Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, Mathur J, Petrus M, Bandell M *et al* (2009). TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci* **29**: 153-158.
- Dietrich A, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T (2005). The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. *Pflugers Arch* **451**: 72-80.
- Dietrich A, Kalwa H, Fuchs B, Grimminger F, Weissmann N, Gudermann T (2007). In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. *Cell Calcium* **42**: 233-244.
- Dittrich W, Gohde W (1969). [Impulse fluorometry of single cells in suspension]. *Z Naturforsch B* **24**: 360-361.
- Doihara H, Nozawa K, Kojima R, Kawabata-Shoda E, Yokoyama T, Ito H (2009). QGP-1 cells release 5-HT via TRPA1 activation; a model of human enterochromaffin cells. *Mol Cell Biochem* **331**: 239-245.
- Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA *et al* (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* **58**: 1515-1520.
- Ehrenberg L, Osterman-Golkar S (1980). Alkylation of macromolecules for detecting mutagenic agents. *Teratog Carcinog Mutagen* **1**: 105-127.
- Ehrenberg L, Granath F, Tornqvist M (1996). Macromolecule adducts as biomarkers of exposure to environmental mutagens in human populations. *Environ Health Perspect* **104 Suppl 3**: 423-428.
- Eid SR, Cortright DN (2009). Transient receptor potential channels on sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol*: 261-281.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**: 81-128.

- Everaerts W, Vriens J, Owsianik G, Appendino G, Voets T, De Ridder D *et al* (2010). Functional characterization of transient receptor potential channels in mouse urothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**: F692-701.
- Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A *et al* (2011). The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Curr Biol* **21**: 316-321.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**: 2893-2917.
- Fimognari C, Turrini E, Ferruzzi L, Lenzi M, Hrelia P (2012). Natural isothiocyanates: genotoxic potential versus chemoprevention. *Mutat Res* **750**: 107-131.
- Fleig A, Penner R (2004). The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 633-639.
- Folkerts G, Nijkamp FP (1998). Airway epithelium: more than just a barrier! *Trends Pharmacol Sci* **19**: 334-341.
- Fuchs B, Rupp M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F *et al* (2011). Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respir Res* **12**: 20.
- Garcia-Anoveros J, Nagata K (2007). Trpa1. *Handb Exp Pharmacol*: 347-362.
- Gazdar AF, Gao B, Minna JD (2010). Lung cancer cell lines: Useless artifacts or invaluable tools for medical science? *Lung Cancer* **68**: 309-318.
- Geppetti P, Trevisani M (2004). Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br J Pharmacol* **141**: 1313-1320.
- Geppetti P, Patacchini R, Nassini R, Materazzi S (2010). Cough: The Emerging Role of the TRPA1 Channel. *Lung* **188 Suppl 1**: S63-68.
- Gil-Parrado S, Fernandez-Montalvan A, Assfalg-Machleidt I, Popp O, Bestvater F, Holloschi A *et al* (2002). Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem* **277**: 27217-27226.
- Gkika D, Prevarskaya N (2009). Molecular mechanisms of TRP regulation in tumor growth and metastasis. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 953-958.
- Glass D, McClanahan M, Koller L, Adeshina F (2009). Provisional Advisory Levels (PALs) for phosgene (CG). *Inhal Toxicol* **21 Suppl 3**: 73-94.
- Goldstein S (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* **249**: 1129-1133.
- Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG *et al* (2011). Non-small-cell lung cancer. *Lancet* **378**: 1727-1740.
- Gould VE, Linnoila RI, Memoli VA, Warren WH (1983). Neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract: hyperplasias, dysplasias, and neoplasms. *Lab Invest* **49**: 519-537.
- Grace MS, Belvisi MG (2011). TRPA1 receptors in cough. *Pulm Pharmacol Ther* **24**: 286-288.
- Graepel R, Fernandes ES, Aubdool AA, Andersson DA, Bevan S, Brain SD (2011). 4-oxo-2-nonenal (4-ONE): evidence of transient receptor potential ankyrin 1-dependent and -independent nociceptive and vasoactive responses in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **337**: 117-124.

- Grzelinski M, Pinkenburg O, Buch T, Gold M, Stohr S, Kalwa H *et al* (2010). Critical role of G(alpha)12 and G(alpha)13 for human small cell lung cancer cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res* **16**: 1402-1415.
- Gudermann T, Mederos y Schnitzler M, Dietrich A (2004). Receptor-operated cation entry--more than esoteric terminology? *Sci STKE* **2004**: pe35.
- Gudermann T, Flockerzi V (2005). TRP channels as new pharmacological targets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**: 241-244.
- Gudermann T, Roelle S (2006). Calcium-dependent growth regulation of small cell lung cancer cells by neuropeptides. *Endocr Relat Cancer* **13**: 1069-1084.
- Guinamard R, Demion M, Launay P (2010). Physiological roles of the TRPM4 channel extracted from background currents. *Physiology (Bethesda)* **25**: 155-164.
- Guinamard R, Salle L, Simard C (2011). The non-selective monovalent cationic channels TRPM4 and TRPM5. *Adv Exp Med Biol* **704**: 147-171.
- Guo Z, Smith TJ, Thomas PE, Yang CS (1991). Metabolic activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone as measured by DNA alkylation in vitro and its inhibition by isothiocyanates. *Cancer Res* **51**: 4798-4803.
- Guo Z, Smith TJ, Wang E, Sadrieh N, Ma Q, Thomas PE *et al* (1992). Effects of phenethyl isothiocyanate, a carcinogenesis inhibitor, on xenobiotic-metabolizing enzymes and nitrosamine metabolism in rats. *Carcinogenesis* **13**: 2205-2210.
- Guo Z, Smith TJ, Wang E, Eklind KI, Chung FL, Yang CS (1993). Structure-activity relationships of arylalkyl isothiocyanates for the inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone metabolism and the modulation of xenobiotic-metabolizing enzymes in rats and mice. *Carcinogenesis* **14**: 1167-1173.
- Hamsa TP, Thejass P, Kuttan G (2011). Induction of apoptosis by sulforaphane in highly metastatic B16F-10 melanoma cells. *Drug Chem Toxicol* **34**: 332-340.
- Handra-Luca A, Lesty C, Hammel P, Sauvanet A, Rebours V, Martin A *et al* (2012). Biological and prognostic relevance of mitogen-activated protein kinases in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* **41**: 416-421.
- Harris AL (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**: 38-47.
- Heasley LE (2001). Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene* **20**: 1563-1569.
- Hecht SS (1996). Chemoprevention of lung cancer by isothiocyanates. *Adv Exp Med Biol* **401**: 1-11.
- Hecht SS (2003). Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 733-744.
- Heinemann V (2009). [Medical-oncological aspects in the treatment of pancreatic cancer]. *Radiologe* **49**: 144-148.
- Helliwell RJ, McLatchie LM, Clarke M, Winter J, Bevan S, McIntyre P (1998). Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci Lett* **250**: 177-180.
- Hennings H, Glick AB, Greenhalgh DA, Morgan DL, Strickland JE, Tennenbaum T *et al* (1993). Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* **202**: 1-8.

- Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM (2008). Lung cancer. *N Engl J Med* **359**: 1367-1380.
- Herman-Antosiewicz A, Xiao H, Lew KL, Singh SV (2007). Induction of p21 protein protects against sulforaphane-induced mitotic arrest in LNCaP human prostate cancer cell line. *Mol Cancer Ther* **6**: 1673-1681.
- Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D (2002). The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* **25**: 511-518.
- Hill K, Schaefer M (2009). Ultraviolet light and photosensitising agents activate TRPA1 via generation of oxidative stress. *Cell Calcium* **45**: 155-164.
- Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19564-19568.
- Hinson JA (1983). Reactive metabolites of phenacetin and acetaminophen: a review. *Environ Health Perspect* **49**: 71-79.
- Hirose M, Yamaguchi T, Kimoto N, Ogawa K, Futakuchi M, Sano M *et al* (1998). Strong promoting activity of phenylethyl isothiocyanate and benzyl isothiocyanate on urinary bladder carcinogenesis in F344 male rats. *Int J Cancer* **77**: 773-777.
- Hobel S, Koburger I, John M, Czubyko F, Hadwiger P, Vornlocher HP *et al* (2010). Polyethylenimine/small interfering RNA-mediated knockdown of vascular endothelial growth factor in vivo exerts anti-tumor effects synergistically with Bevacizumab. *J Gene Med* **12**: 287-300.
- Hockel M, Vaupel P (2001). Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol* **28**: 36-41.
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* **397**: 259-263.
- Hu H, Bandell M, Petrus MJ, Zhu MX, Patapoutian A (2009). Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol* **5**: 183-190.
- Hughes PE (1959). Concerning the origin of substituents in polarbound derivatives of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Br J Cancer* **13**: 751-756.
- Immke DC, Gavva NR (2006). The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol* **17**: 582-591.
- Ishizaki H, Brady JF, Ning SM, Yang CS (1990). Effect of phenethyl isothiocyanate on microsomal N-nitrosodimethylamine metabolism and other monooxygenase activities. *Xenobiotica* **20**: 255-264.
- Islam MS (2011). TRP channels of islets. *Adv Exp Med Biol* **704**: 811-830.
- Itahana K, Campisi J, Dimri GP (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol* **371**: 21-31.
- Itoh N, Toda H, Matsuda M, Negishi T, Taniguchi T, Ohsawa N (2009). Involvement of S-adenosylmethionine-dependent halide/thiol methyltransferase (HTMT) in methyl halide emissions from agricultural plants: isolation and characterization of an HTMT-coding gene from *Raphanus sativus* (daikon radish). *BMC Plant Biol* **9**: 116.
- Jakubikova J, Sedlak J, Bacon J, Goldson A, Bao Y (2005a). Effects of MEK1 and PI3K inhibitors on allyl-, benzyl- and phenylethyl-isothiocyanate-induced G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Int J Oncol* **27**: 1449-1458.
- Jakubikova J, Sedlak J, Mithen R, Bao Y (2005b). Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* **69**: 1543-1552.

- Jang Y, Lee Y, Kim SM, Yang YD, Jung J, Oh U (2012). Quantitative analysis of TRP channel genes in mouse organs. *Arch Pharm Res* **35**: 1823-1830.
- Jaquemar D, Schenker T, Trueb B (1999). An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem* **274**: 7325-7333.
- Jett JR, Schild SE, Kesler KA, Kalemkerian GP (2013). Treatment of small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* **143**: e400S-419S.
- Jiang LH, Gamper N, Beech DJ (2011). Properties and therapeutic potential of transient receptor potential channels with putative roles in adversity: focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1. *Curr Drug Targets* **12**: 724-736.
- Jordt SE, McKemy DD, Julius D (2003). Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 487-492.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED *et al* (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**: 260-265.
- Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R *et al* (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1273-1278.
- Kassie F, Pool-Zobel B, Parzefall W, Knasmuller S (1999). Genotoxic effects of benzyl isothiocyanate, a natural chemopreventive agent. *Mutagenesis* **14**: 595-604.
- Kassie F, Knasmuller S (2000). Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chem Biol Interact* **127**: 163-180.
- Kassie F, Laky B, Nobis E, Kundi M, Knasmuller S (2001). Genotoxic effects of methyl isothiocyanate. *Mutat Res* **490**: 1-9.
- Katanosaka K, Banik RK, Giron R, Higashi T, Tominaga M, Mizumura K (2008). Contribution of TRPV1 to the bradykinin-evoked nociceptive behavior and excitation of cutaneous sensory neurons. *Neurosci Res* **62**: 168-175.
- Katz M, Amit I, Yarden Y (2007). Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1161-1176.
- Keum YS (2011). Regulation of the Keap1/Nrf2 system by chemopreventive sulforaphane: implications of posttranslational modifications. *Ann N Y Acad Sci* **1229**: 184-189.
- Kim MK, Park JH (2009). Conference on "Multidisciplinary approaches to nutritional problems". Symposium on "Nutrition and health". Cruciferous vegetable intake and the risk of human cancer: epidemiological evidence. *Proc Nutr Soc* **68**: 103-110.
- Kim W, Kaelin WG, Jr. (2003). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 55-60.
- Kim YS, Son JY, Kim TH, Paik SK, Dai Y, Noguchi K *et al* (2010). Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* **518**: 687-698.
- Kitazaki T, Soda H, Doi S, Nakano H, Nakamura Y, Kohno S (2005). Gefitinib inhibits MUC5AC synthesis in mucin-secreting non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* **50**: 19-24.

- Knowlton WM, Bifolck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD (2010). TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* **150**: 340-350.
- Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A *et al* (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* **493**: 596-606.
- Koenig A, Linhart T, Schlegemann K, Reutlinger K, Wegele J, Adler G *et al* (2010). NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* **138**: 1189-1199 e1181-1182.
- Kullmann FA, Shah MA, Birder LA, de Groat WC (2009). Functional TRP and ASIC-like channels in cultured urothelial cells from the rat. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**: F892-901.
- Kunzelmann K (2005). Ion channels and cancer. *J Membr Biol* **205**: 159-173.
- Kusama K, Terayama H (1957). Study on the nature of binding of dimethylaminoazobenzene with liver proteins in rats fed the carcinogen. I. Isolation and purification of the amino acid bound aminoazo dye. *Gan* **48**: 181-188.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lam TK, Gallicchio L, Lindsley K, Shiels M, Hammond E, Tao XG *et al* (2009). Cruciferous vegetable consumption and lung cancer risk: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**: 184-195.
- Laskin J, Sandler A, Johnson DH (2003). An advance in small-cell lung cancer treatment--more or less. *J Natl Cancer Inst* **95**: 1099-1101.
- Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vargas G (2007). ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* **42**: 427-438.
- Le Guennec JY, Ouadid-Ahidouch H, Soriani O, Besson P, Ahidouch A, Vandier C (2007). Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **2**: 189-202.
- 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.
- Levesque M, Martineau C, Jumarie C, Moreau R (2008). Characterization of cadmium uptake and cytotoxicity in human osteoblast-like MG-63 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **231**: 308-317.
- Lieben L, Carmeliet G (2012). The Involvement of TRP Channels in Bone Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**: 99.
- Liedtke W, Simon SA (2004). A possible role for TRPV4 receptors in asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**: L269-271.
- Liman ER (2007). TRPM5 and taste transduction. *Handb Exp Pharmacol*: 287-298.
- Little R, Muimo R, Robson L, Harris K, Grabowski PS (2011). The transient receptor potential ion channel TRPV6 is expressed at low levels in osteoblasts and has little role in osteoblast calcium uptake. *PLoS One* **6**: e28166.
- Litz J, Krystal GW (2006). Imatinib inhibits c-Kit-induced hypoxia-inducible factor-1alpha activity and vascular endothelial growth factor expression in small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* **5**: 1415-1422.

- Liu BN, Yan HQ, Wu X, Pan ZH, Zhu Y, Meng ZW *et al* (2013). Apoptosis Induced by Benzyl Isothiocyanate in Gefitinib-Resistant Lung Cancer Cells is Associated with Akt/MAPK Pathways and Generation of Reactive Oxygen Species. *Cell Biochem Biophys* **66**: 81-92.
- Lu Q, Lin X, Feng J, Zhao X, Gallagher R, Lee MY *et al* (2008). Phenylhexyl isothiocyanate has dual function as histone deacetylase inhibitor and hypomethylating agent and can inhibit myeloma cell growth by targeting critical pathways. *J Hematol Oncol* **1**: 6.
- Ludwig WD (2012). [Possibilities and limitations of stratified medicine based on biomarkers and targeted therapies in oncology]. *Z Evid Fortbild Qual Gesundheitswes* **106**: 11-22.
- Ma W, Quirion R (2007). Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets* **11**: 307-320.
- Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF *et al* (2007a). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* **445**: 541-545.
- Macpherson LJ, Xiao B, Kwan KY, Petrus MJ, Dubin AE, Hwang S *et al* (2007b). An ion channel essential for sensing chemical damage. *J Neurosci* **27**: 11412-11415.
- Maisonneuve P, Lowenfels AB (2010). Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Dig Dis* **28**: 645-656.
- Martineau C, Abed E, Medina G, Jomphe LA, Mantha M, Jumarie C *et al* (2010). Involvement of transient receptor potential melastatin-related 7 (TRPM7) channels in cadmium uptake and cytotoxicity in MC3T3-E1 osteoblasts. *Toxicol Lett* **199**: 357-363.
- Maynert EW, Hammond BG (1976). Modes of action of toxic agents. *Ann Clin Lab Sci* **6**: 322-331.
- McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**: 52-58.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M *et al* (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13525-13530.
- Mercer BA, D'Armiento JM (2006). Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **1**: 137-150.
- Meuwissen R, Linn SC, Linnoila RI, Zevenhoven J, Mooi WJ, Berns A (2003). Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell* **4**: 181-189.
- Minchinton AI, Tannock IF (2006). Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* **6**: 583-592.
- Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A (2009). TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One* **4**: e7596.
- Momi N, Ponnusamy MP, Kaur S, Rachagani S, Kunigal SS, Chellappan S *et al* (2013). Nicotine/cigarette smoke promotes metastasis of pancreatic cancer through alpha7nAChR-mediated MUC4 upregulation. *Oncogene* **32**: 1384-1395.
- Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ (2007). Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport. *Nat Rev Cancer* **7**: 519-530.
- Montell C, Rubin GM (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**: 1313-1323.

- Montell C (2003). Mg²⁺ homeostasis: the Mg²⁺-sensitive TRPM channels. *Curr Biol* **13**: R799-801.
- Montell C (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**: re3.
- Mor M, Rivara S, Lodola A, Plazzi PV, Tarzia G, Duranti A *et al* (2004). Cyclohexylcarbamic acid 3'- or 4'-substituted biphenyl-3-yl esters as fatty acid amide hydrolase inhibitors: synthesis, quantitative structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J Med Chem* **47**: 4998-5008.
- Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Garcia-Sanz N, Ferrer-Montiel A (2004). Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem* **279**: 25665-25672.
- Morimoto M, Hagbjork AL, Wan YJ, Fu PC, Clot P, Albano E *et al* (1995). Modulation of experimental alcohol-induced liver disease by cytochrome P450 2E1 inhibitors. *Hepatology* **21**: 1610-1617.
- Mukhopadhyay I, Gomes P, Aranake S, Shetty M, Karnik P, Damle M *et al* (2011). Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J Recept Signal Transduct Res* **31**: 350-358.
- Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Munaron L, Antoniotti S, Fiorio Pla A, Lovisolo D (2004). Blocking Ca²⁺ entry: a way to control cell proliferation. *Curr Med Chem* **11**: 1533-1543.
- Murata M, Yamashita N, Inoue S, Kawanishi S (2000). Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate. *Free Radic Biol Med* **28**: 797-805.
- Nadarajah D, Han JH, Holley RA (2005). Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. *Int J Food Microbiol* **99**: 269-279.
- Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J (2005). Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* **25**: 4052-4061.
- Nagy I, Santha P, Jancso G, Urban L (2004). The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol* **500**: 351-369.
- Nakamura Y, Miyoshi N (2010). Electrophiles in foods: the current status of isothiocyanates and their chemical biology. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**: 242-255.
- Nasman J, Bart G, Larsson K, Louhivuori L, Peltonen H, Akerman KE (2006). The orexin OX1 receptor regulates Ca²⁺ entry via diacylglycerol-activated channels in differentiated neuroblastoma cells. *J Neurosci* **26**: 10658-10666.
- Nassenstein C, Kwong K, Taylor-Clark T, Kollarik M, Macglashan DM, Braun A *et al* (2008). Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. *J Physiol* **586**: 1595-1604.
- National Toxicology P (1982). Carcinogenesis Bioassay of Allyl Isothiocyanate (CAS No. 57-06-7) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Study). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* **234**: 1-142.
- Neuzillet C, Hammel P, Tijeras-Raballand A, Couvelard A, Raymond E (2012). Targeting the Ras-ERK pathway in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Metastasis Rev*.
- Nian H, Delage B, Ho E, Dashwood RH (2009). Modulation of histone deacetylase activity by dietary isothiocyanates and allyl sulfides: studies with sulforaphane and garlic organosulfur compounds. *Environ Mol Mutagen* **50**: 213-221.

- Nie YC, Wu H, Li PB, Xie LM, Luo YL, Shen JG *et al* (2012). Naringin attenuates EGF-induced MUC5AC secretion in A549 cells by suppressing the cooperative activities of MAPKs-AP-1 and IKKs-IkappaB-NF-kappaB signaling pathways. *Eur J Pharmacol* **690**: 207-213.
- Nielsen PV, Rios R (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int J Food Microbiol* **60**: 219-229.
- Niforatos W, Zhang XF, Lake MR, Walter KA, Neelands T, Holzman TF *et al* (2007). Activation of TRPA1 channels by the fatty acid amide hydrolase inhibitor 3'-carbamoylbiphenyl-3-yl cyclohexylcarbamate (URB597). *Mol Pharmacol* **71**: 1209-1216.
- Nilius B (2007). TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 805-812.
- Nilsson R (2011). The molecular basis for induction of human cancers by tobacco specific nitrosamines. *Regul Toxicol Pharmacol* **60**: 268-280.
- Nishikawa A, Furukawa F, Lee IS, Tanaka T, Hirose M (2004). Potent chemopreventive agents against pancreatic cancer. *Curr Cancer Drug Targets* **4**: 373-384.
- Nitsche C, Simon P, Weiss FU, Fluhr G, Weber E, Gartner S *et al* (2011). Environmental risk factors for chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis* **29**: 235-242.
- Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S *et al* (2009). TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 3408-3413.
- Numazawa S, Takase M, Ahiko T, Ishii M, Shimizu S, Yoshida T (2012). Possible involvement of transient receptor potential channels in electrophile-induced insulin secretion from RINm5F cells. *Biol Pharm Bull* **35**: 346-354.
- O'Kelly I, Peers C, Kemp PJ (2000). O₂-sensing by model airway chemoreceptors. Hypoxic inhibition of K⁺ channels in H146 cells. *Adv Exp Med Biol* **475**: 611-622.
- O'Kelly I, Peers C, Kemp PJ (2001). NADPH oxidase does not account fully for O₂-sensing in model airway chemoreceptor cells. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 1131-1134.
- Oehler B, Scholze A, Schaefer M, Hill K (2012). TRPA1 is functionally expressed in melanoma cells but is not critical for impaired proliferation caused by allyl isothiocyanate or cinnamaldehyde. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **385**: 555-563.
- Ohkubo T, Yamazaki J (2012). T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Oncol* **41**: 267-275.
- Okazaki K, Umemura T, Imazawa T, Nishikawa A, Masegi T, Hirose M (2003). Enhancement of urinary bladder carcinogenesis by combined treatment with benzyl isothiocyanate and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats after initiation. *Cancer Sci* **94**: 948-952.
- Oliva JL, Caino MC, Senderowicz AM, Kazanietz MG (2008). S-Phase-specific activation of PKC alpha induces senescence in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* **283**: 5466-5476.
- Pandol SJ, Apte MV, Wilson JS, Gukovskaya AS, Edderkaoui M (2012). The burning question: why is smoking a risk factor for pancreatic cancer? *Pancreatology* **12**: 344-349.
- Pang X, Lewis AC (2011). Carbonyl compounds in gas and particle phases of mainstream cigarette smoke. *Sci Total Environ* **409**: 5000-5009.

- Paravicini TM, Chubanov V, Gudermann T (2012). TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* **44**: 1381-1384.
- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS (2001). Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* **37 Suppl 8**: S4-66.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74-108.
- Parkin DM, Ferlay J, Curado MP, Bray F, Edwards B, Shin HR *et al* (2010). Fifty years of cancer incidence: CI5 I-IX. *Int J Cancer* **127**: 2918-2927.
- Parodi S, Malacarne D, Taningher M (1992). Non-genotoxic factors in the carcinogenetic process: problems of detection and hazard evaluation. *Toxicol Lett* **64-65 Spec No**: 621-630.
- Pawlik A, Szczepanski MA, Klimaszewska A, Gackowska L, Zuryn A, Grzanka A (2012). Phenethyl isothiocyanate-induced cytoskeletal changes and cell death in lung cancer cells. *Food Chem Toxicol* **50**: 3577-3594.
- Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium* **38**: 233-252.
- Peers C, Wyatt CN, Evans AM (2010). Mechanisms for acute oxygen sensing in the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* **174**: 292-298.
- Peng Z, Arendshorst WJ (2008). Activation of phospholipase C gamma 1 protects renal arteriolar VSMCs from H2O2-induced cell death. *Kidney Blood Press Res* **31**: 1-9.
- Perraud AL, Schmitz C, Scharenberg AM (2003). TRPM2 Ca²⁺ permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium* **33**: 519-531.
- Pertovaara A, Koivisto A (2011). TRPA1 ion channel in the spinal dorsal horn as a therapeutic target in central pain hypersensitivity and cutaneous neurogenic inflammation. *Eur J Pharmacol* **666**: 1-4.
- Peterlin Z, Chesler A, Firestein S (2007). A painful trp can be a bonding experience. *Neuron* **53**: 635-638.
- Peterson LA (2010). Formation, repair, and genotoxic properties of bulky DNA adducts formed from tobacco-specific nitrosamines. *J Nucleic Acids* **2010**.
- Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N *et al* (2007). A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain* **3**: 40.
- Pintao AM, Pais MS, Coley H, Kelland LR, Judson IR (1995). In vitro and in vivo antitumor activity of benzyl isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*. *Planta Med* **61**: 233-236.
- Plant TD, Strotmann R (2007). Trpv4. *Handb Exp Pharmacol*: 189-205.
- Por ED, Bierbower SM, Berg KA, Gomez R, Akopian AN, Wetsel WC *et al* (2012). beta-Arrestin-2 desensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel. *J Biol Chem* **287**: 37552-37563.
- Powolny AA, Singh SV (2010). Differential response of normal (PrEC) and cancerous human prostate cells (PC-3) to phenethyl isothiocyanate-mediated changes in expression of antioxidant defense genes. *Pharm Res* **27**: 2766-2775.
- Pratesi G, Cervi S, Balsari A, Bondiolotti G, Vicentini LM (1996). Effect of serotonin and nicotine on the growth of a human small cell lung cancer xenograft. *Anticancer Res* **16**: 3615-3619.
- Prendergast FG (2000). Bioluminescence illuminated. *Nature* **405**: 291-293.

- Prescott LF, Critchley JA (1983). The treatment of acetaminophen poisoning. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **23**: 87-101.
- 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.
- Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G (2007b). TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 937-946.
- Promega Calpain-Glo™ Protease Assay (2011). *Technical Bulletin*, Literature # **TB344**, Abb. 1: Seite 2.
- Pullar JM, Thomson SJ, King MJ, Turnbull CI, Midwinter RG, Hampton MB (2004). The chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate sensitizes cells to Fas-mediated apoptosis. *Carcinogenesis* **25**: 765-772.
- Qin F (2007). Regulation of TRP ion channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Handb Exp Pharmacol*: 509-525.
- Quik M, Chan J, Patrick J (1994). alpha-Bungarotoxin blocks the nicotinic receptor mediated increase in cell number in a neuroendocrine cell line. *Brain Res* **655**: 161-167.
- 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.
- Ramer R, Merkord J, Rohde H, Hinz B (2010). Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochem Pharmacol* **79**: 955-966.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**: 619-647.
- Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH, Pugh CW (1998). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol* **201**: 1153-1162.
- Reid G (2005). ThermoTRP channels and cold sensing: what are they really up to? *Pflugers Arch* **451**: 250-263.
- Renart J, Reiser J, Stark GR (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzylmethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 3116-3120.
- Reszka E, Wasowicz W, Gromadzinska J (2006). Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. *Br J Nutr* **96**: 609-619.
- Rich PR, Mischis LA, Purton S, Wiskich JT (2001). The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS Microbiol Lett* **202**: 181-187.
- Roda A, Pasini P, Guardigli M, Baraldini M, Musiani M, Mirasoli M (2000). Bio- and chemiluminescence in bioanalysis. *Fresenius J Anal Chem* **366**: 752-759.
- Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* **142**: 257-265.
- Roelle S, Grosse R, Buech T, Chubanov V, Gudermann T (2008). Essential role of Pyk2 and Src kinase activation in neuropeptide-induced proliferation of small cell lung cancer cells. *Oncogene* **27**: 1737-1748.
- Rohacs T (2007). Regulation of TRP channels by PIP(2). *Pflugers Arch* **453**: 753-762.

- Rosado-de-Christenson ML, Templeton PA, Moran CA (1994). Bronchogenic carcinoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* **14**: 429-446; quiz 447-428.
- Rose MC, Voynow JA (2006). Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* **86**: 245-278.
- Safran M, Kaelin WG, Jr. (2003). HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest* **111**: 779-783.
- Sambrook J, Gething MJ (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**: 224-225.
- Sarosdy MF, Von Hoff DD (1983). Prediction of response to cancer chemotherapy. *Drugs* **26**: 454-459.
- Sayre LM, Lin D, Yuan Q, Zhu X, Tang X (2006). Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. *Drug Metab Rev* **38**: 651-675.
- Schafer EAM, Stohr S, Kalwa H, Breit A, Buch TRH, Gudermann T (2009). Cellular responses of small cell lung cancer cells upon allyl isothiocyanate stimulation. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **379**: 33-33.
- Schima W, Ba-Ssalamah A, Kolblinger C, Kulinna-Cosentini C, Puespoek A, Gotzinger P (2007). Pancreatic adenocarcinoma. *Eur Radiol* **17**: 638-649.
- Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, Gudermann T (2007). TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 813-821.
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 343-354.
- Schönherr R (2005). Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *J Membr Biol* **205**: 175-184.
- Schuller HM (2002). Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Rev Cancer* **2**: 455-463.
- Schuller HM, Plummer HK, 3rd, Jull BA (2003). Receptor-mediated effects of nicotine and its nitrosated derivative NNK on pulmonary neuroendocrine cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **270**: 51-58.
- Schuller HM, Al-Wadei HA (2010). Neurotransmitter receptors as central regulators of pancreatic cancer. *Future Oncol* **6**: 221-228.
- Schwartz ES, Christianson JA, Chen X, La JH, Davis BM, Albers KM *et al* (2011). Synergistic role of TRPV1 and TRPA1 in pancreatic pain and inflammation. *Gastroenterology* **140**: 1283-1291 e1281-1282.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH *et al* (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* **48**: 4827-4833.
- Seufferlein T, Adler G (2009). [The S3 guideline exocrine pancreatic cancer]. *Med Klin (Munich)* **104**: 869-874.
- Shan Y, Wu K, Wang W, Wang S, Lin N, Zhao R *et al* (2009). Sulforaphane down-regulates COX-2 expression by activating p38 and inhibiting NF-kappaB-DNA-binding activity in human bladder T24 cells. *Int J Oncol* **34**: 1129-1134.

- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2011). beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* **32**: 521-533.
- Shi S, Yao W, Xu J, Long J, Liu C, Yu X (2012). Combinational therapy: new hope for pancreatic cancer? *Cancer Lett* **317**: 127-135.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-239.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1963). Further Data on the Bioluminescent Protein, Aequorin. *J Cell Physiol* **62**: 1-8.
- Shukla AK, Kim J, Ahn S, Xiao K, Shenoy SK, Liedtke W *et al* (2010). Arresting a transient receptor potential (TRP) channel: beta-arrestin 1 mediates ubiquitination and functional down-regulation of TRPV4. *J Biol Chem* **285**: 30115-30125.
- Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ (2011). Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci* **36**: 457-469.
- Simon SA, Liedtke W (2008). How irritating: the role of TRPA1 in sensing cigarette smoke and aerogenic oxidants in the airways. *J Clin Invest* **118**: 2383-2386.
- Smith TJ, Guo ZY, Thomas PE, Chung FL, Morse MA, Elkind K *et al* (1990). Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes and its inhibition by isothiocyanates. *Cancer Res* **50**: 6817-6822.
- Song JS, Cho KS, Yoon HK, Moon HS, Park SH (2005). Neutrophil elastase causes MUC5AC mucin synthesis via EGF receptor, ERK and NF-kB pathways in A549 cells. *Korean J Intern Med* **20**: 275-283.
- Song JS, Kang CM, Yoo MB, Kim SJ, Yoon HK, Kim YK *et al* (2007). Nitric oxide induces MUC5AC mucin in respiratory epithelial cells through PKC and ERK dependent pathways. *Respir Res* **8**: 28.
- Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Sparnins VL, Wattenberg LW (1981). Enhancement of glutathione S-transferase activity of the mouse forestomach by inhibitors of Benzo[a]pyrene-induced neoplasia of the forestomach. *J Natl Cancer Inst* **66**: 769-771.
- Stoewsand GS (1995). Bioactive organosulfur phytochemicals in Brassica oleracea vegetables--a review. *Food Chem Toxicol* **33**: 537-543.
- Stokes A, Wakano C, Koblan-Huberson M, Adra CN, Fleig A, Turner H (2006). TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD. *Cell Signal* **18**: 1584-1594.
- Stoner GD, Siglin JC, Morse MA, Desai DH, Amin SG, Kresty LA *et al* (1995). Enhancement of esophageal carcinogenesis in male F344 rats by dietary phenylhexyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* **16**: 2473-2476.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR *et al* (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**: 819-829.
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I (1983). Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**: 67-69.

Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, Andersson DA, Jordt SE, Bevan S *et al* (2008). Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *Eur Urol* **53**: 391-399.

Sugimura T, Nagao M (1981). Carcinogenic, Mutagenic, and Comutagenic Aromatic Amines in Human Foods. *Natl Cancer Inst Monogr*: 27-33.

Svehlikova V, Wang S, Jakubikova J, Williamson G, Mithen R, Bao Y (2004). Interactions between sulforaphane and apigenin in the induction of UGT1A1 and GSTA1 in CaCo-2 cells. *Carcinogenesis* **25**: 1629-1637.

Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP (2012). Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev* **92**: 367-520.

Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M (2011). Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* **16**: 123-140.

Takahashi N, Mizuno Y, Kozai D, Yamamoto S, Kiyonaka S, Shibata T *et al* (2008). Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)* **2**: 287-298.

Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y *et al* (2011). TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂. *Nat Chem Biol* **7**: 701-711.

Takahashi N, Kozai D, Mori Y (2012). TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Front Physiol* **3**: 324.

Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y *et al* (2005). Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* **438**: 1022-1025.

Tang L, Zhang Y (2004). Isothiocyanates in the chemoprevention of bladder cancer. *Curr Drug Metab* **5**: 193-201.

Tang L, Zhang Y (2005). Mitochondria are the primary target in isothiocyanate-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* **4**: 1250-1259.

Tang NY, Huang YT, Yu CS, Ko YC, Wu SH, Ji BC *et al* (2011). Phenethyl isothiocyanate (PEITC) promotes G2/M phase arrest via p53 expression and induces apoptosis through caspase- and mitochondria-dependent signaling pathways in human prostate cancer DU 145 cells. *Anticancer Res* **31**: 1691-1702.

Taoufik E, Probert L (2008). Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des* **14**: 3565-3573.

Taylor-Clark TE, McAlexander MA, Nassenstein C, Sheardown SA, Wilson S, Thornton J *et al* (2008). Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal. *J Physiol* **586**: 3447-3459.

Taylor-Clark TE, Udem BJ (2010). Ozone activates airway nerves via the selective stimulation of TRPA1 ion channels. *J Physiol* **588**: 423-433.

Thebault S, Lemonnier L, Bidaux G, Flourakis M, Bavencoffe A, Gordienko D *et al* (2005). Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* **280**: 39423-39435.

Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK (2011). Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc)* **76**: 407-422.

Tominaga M, Caterina MJ (2004). Thermosensation and pain. *J Neurobiol* **61**: 3-12.

- Tominaga M (2007). The Role of TRP Channels in Thermosensation. In: Liedtke WB, Heller S (eds). *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*: Boca Raton (FL).
- Tornqvist M, Kautiainen A (1993). Adducted proteins for identification of endogenous electrophiles. *Environ Health Perspect* **99**: 39-44.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H *et al* (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* **10**: 241-252.
- Travis WD (2002). Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* **23**: 65-81, viii.
- Trials EGPWGoAF (2008). Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. *Food Chem Toxicol* **46 Suppl 1**: S2-70.
- Trosko JE, Chang CC (1978). Environmental carcinogenesis: an integrative model. *Q Rev Biol* **53**: 115-141.
- Tsao R, Yu Q, Potter J, Chiba M (2002). Direct and simultaneous analysis of sinigrin and allyl isothiocyanate in mustard samples by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* **50**: 4749-4753.
- Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* **61**: 3760-3769.
- Tsien RY, Rink TJ, Poenie M (1985). Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* **6**: 145-157.
- Uchida K, Miura Y, Nagai M, Tominaga M (2012). Isothiocyanates from *Wasabia japonica* activate transient receptor potential ankyrin 1 channel. *Chem Senses* **37**: 809-818.
- U.S. Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics: 1999-2009 Incidence and Mortality, *Web-based Report*. www.cdc.gov/uscs.
- Valasek MA, Repa JJ (2005). The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* **29**: 151-159.
- van der Eerden BC, Weissgerber P, Fratzl-Zelman N, Olausson J, Hoenderop JG, Schreuders-Koedam M *et al* (2012). The transient receptor potential channel TRPV6 is dynamically expressed in bone cells but is not crucial for bone mineralization in mice. *J Cell Physiol* **227**: 1951-1959.
- Van Haute C, De Ridder D, Nilius B (2010). TRP channels in human prostate. *ScientificWorldJournal* **10**: 1597-1611.
- Vanden Abeele F, Shuba Y, Roudbaraki M, Lemonnier L, Vanoverberghe K, Mariot P *et al* (2003). Store-operated Ca²⁺ channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium* **33**: 357-373.
- 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.
- Venkatachalam K, Montell C (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**: 387-417.
- Vennekens R, Owsianik G, Nilius B (2008). Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. *Curr Pharm Des* **14**: 18-31.

- Verkhratsky A (2007). Calcium and cell death. *Subcell Biochem* **45**: 465-480.
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2011). Pancreatic cancer. *Lancet* **378**: 607-620.
- Voets T, Nilius B (2007). Modulation of TRPs by PIPs. *J Physiol* **582**: 939-944.
- Volpi G, Facchinetti F, Moretto N, Civelli M, Patacchini R (2011). Cigarette smoke and alpha,beta-unsaturated aldehydes elicit VEGF release through the p38 MAPK pathway in human airway smooth muscle cells and lung fibroblasts. *Br J Pharmacol* **163**: 649-661.
- Wahbah M, Boroumand N, Castro C, El-Zeky F, Eltorky 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.
- Wang S, Bruzzi J, Rodriguez-Garza VP, Komaki RR (2006). Lambert-eaton myasthenic syndrome in a patient with small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* **7**: 282-284.
- Weisburger JH (1990). The mechanism of lung carcinogenesis and smoking cessation. *Epidemiology* **1**: 314-317.
- Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R *et al* (2006). Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19093-19098.
- Weissmann N, Sydykov A, Kalwa H, Storch U, Fuchs B, Mederos y Schnitzler M *et al* (2012). Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice. *Nat Commun* **3**: 649.
- Wetsel WC (2011). Sensing hot and cold with TRP channels. *Int J Hyperthermia* **27**: 388-398.
- Wiczak A, Hofman D, Konopa G, Herman-Antosiewicz A (2012). Sulforaphane, a cruciferous vegetable-derived isothiocyanate, inhibits protein synthesis in human prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 1295-1305.
- Williams CL (1997). Basic science of small cell lung cancer. *Chest Surg Clin N Am* **7**: 1-19.
- 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.
- Wissenbach U, Niemeyer BA (2007). Trpv6. *Handb Exp Pharmacol*: 221-234.
- Wistuba, II, Gazdar AF, Minna JD (2001). Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol* **28**: 3-13.
- Wittau N, Grosse R, Kalkbrenner F, Gohla A, Schultz G, Gudermann T (2000). The galanin receptor type 2 initiates multiple signaling pathways in small cell lung cancer cells by coupling to G(q), G(i) and G(12) proteins. *Oncogene* **19**: 4199-4209.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* **14**: 473-486.
- Xu C, Shen G, Yuan X, Kim JH, Gopalkrishnan A, Keum YS *et al* (2006). ERK and JNK signaling pathways are involved in the regulation of activator protein 1 and cell death elicited by three isothiocyanates in human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis* **27**: 437-445.

- Xu H, Blair NT, Clapham DE (2005). Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci* **25**: 8924-8937.
- Yan H, Zhu Y, Liu B, Wu H, Li Y, Wu X *et al* (2011). Mitogen-activated protein kinase mediates the apoptosis of highly metastatic human non-small cell lung cancer cells induced by isothiocyanates. *Br J Nutr* **106**: 1779-1791.
- Yanamandra N, Buzzeo RW, Gabriel M, Hazlehurst LA, Mari Y, Beaupre DM *et al* (2011). Tipifarnib-induced apoptosis in acute myeloid leukemia and multiple myeloma cells depends on Ca²⁺ influx through plasma membrane Ca²⁺ channels. *J Pharmacol Exp Ther* **337**: 636-643.
- Yang XR, Lin MJ, McIntosh LS, Sham JS (2006). Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**: L1267-1276.
- Yin P, Kawamura T, He M, Vanaja DK, Young CY (2009). Phenethyl isothiocyanate induces cell cycle arrest and reduction of alpha- and beta-tubulin isotypes in human prostate cancer cells. *Cell Biol Int* **33**: 57-64.
- Yoxall V, Kentish P, Coldham N, Kuhnert N, Sauer MJ, Ioannides C (2005). Modulation of hepatic cytochromes P450 and phase II enzymes by dietary doses of sulforaphane in rats: Implications for its chemopreventive activity. *Int J Cancer* **117**: 356-362.
- Yu X, Kensler T (2005). Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat Res* **591**: 93-102.
- Yuan-Chen Wu D, Wu R, Reddy SP, Lee YC, Chang MM (2007). Distinctive epidermal growth factor receptor/extracellular regulated kinase-independent and -dependent signaling pathways in the induction of airway mucin 5B and mucin 5AC expression by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Am J Pathol* **170**: 20-32.
- Zanotto KL, Merrill AW, Carstens MI, Carstens E (2007). Neurons in superficial trigeminal subnucleus caudalis responsive to oral cooling, menthol, and other irritant stimuli. *J Neurophysiol* **97**: 966-978.
- Zavoral M, Minarikova P, Zavada F, Salek C, Minarik M (2011). Molecular biology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* **17**: 2897-2908.
- Zeng H, Trujillo ON, Moyer MP, Botnen JH (2011). Prolonged sulforaphane treatment activates survival signaling in nontumorigenic NCM460 colon cells but apoptotic signaling in tumorigenic HCT116 colon cells. *Nutr Cancer* **63**: 248-255.
- Zhang L, Barritt GJ (2004). Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**: 8365-8373.
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2399-2403.
- Zhang Y (2010). Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. *Mol Nutr Food Res* **54**: 127-135.
- Zimmermann FK, Roberts JJ (1971). Genetic aspects of carcinogenesis. *Biochem Pharmacol* **20**: 985-995 passim.
- Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA (2007). Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci* **10**: 277-279.

7.3 Eidesstattliche Versicherung

Schäfer, Eva Anna Maria

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

"Non-neuronale Expression und Funktion des sensorischen Kationenkanals TRPA1 in Tumorzellen"

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

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

Leipzig, den 23.08. 2013

Eva Anna Maria Schäfer

7.4 Eigene Publikationen

7.4.1 Diplomarbeit

Eva Schäfer (2007). Molekulare Regulatoren der Calcium-Signaltransduktion in kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zellen. *Philipps-Universität Marburg*.

7.4.2 Original-Arbeiten

1. König A, Linhart T, Schlegemann K, Reutlinger K, Wegele J, Adler G, Singh G, Hofmann L, Kunsch S, Büch T, **Schäfer E**, Gress TM, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V (2010). NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* **138**: 1189-1199.
2. **Schaefer EAM**, Stohr S, John G, Meister M, Aigner A, Gudermann T, Buech TRH (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.
3. Baeck CM, Stohr S, **Schaefer EAM**, Nowak NM, Biebermann H, Boekhoff I, Breit A, Gudermann T, Büch TRH (2013). Thyrotropin (TSH) induces metallothionein 1 in thyrocytes via Gq/11- and PKCdependent signaling. *J Mol Endocrinol* **51**: 79-90.
4. Buech TRH*, **Schaefer EAM***, Demmel MT, Thiermann H, Gudermann T, Steinritz D, Schmidt A (2013). Functional expression of TRPA1, a sensor of toxic lung inhalants, in pulmonary epithelial cells. Angenommen bei *Chem Biol Interact*.
*geteilte Erstautorenschaft
5. Berr C*, **Schaefer EAM***, Gudermann T, Dietrich A, Buech TRH. (in Vorbereitung). TRPA1 mediates guanylyl cyclase-independent effects of nitric oxide in lung epithelial cells. In Vorbereitung.
*geteilte Erstautorenschaft

7.4.3 Übersichtsartikel

Büch TRH, **Schäfer E**, Steinritz D, Boekhoff I, Dietrich A, Gudermann T (2013). Chemosensory receptors and channels in the respiratory tract: Role in toxic lung injury and potential as "sweet spots" for targeted therapies. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* Mar 27.

7.4.4 Buchbeitrag

Buech TRH, **Schaefer EAM**, Duffus JH, Gudermann T (Zur Publikation angenommen) Single substances versus combined effects: Problems in mixture toxicology. In: *Reichl FX (Hrsg), Regulatory Toxicology*.

7.4.5 Publierte Kongressbeiträge

1. **Schäfer EAM**, Stohr S, Kalwa H, Breit A, Buch TRH, Gudermann T (2009). Cellular responses of small cell lung cancer cells upon allyl isothiocyanate stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **379**: 33-33.
2. Stohr S, **Schäfer EAM**, Gudermann T, Büch TRH (2010). NFAT-dependent TSH signaling in thyroid carcinoma cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **381**: 33-34.
3. **Schäfer EAM**, Stohr S, Sytik L, Gudermann T, Büch TRH (2010). Isothiocyanate-promoted signaling in small cell lung cancer cells: Delineation of calcium-dependent and -independent effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **381**: 33.
4. TRH, **Schäfer EAM**, Grzelinski M, Stohr S, Pinkenburg O, Gudermann T, Aigner A (2010). Growth regulation in small cell lung cancer cells through G proteins: Analysis of Gq/11 and G12/13-dependent pathways. *AACR, 101st Annual Meeting LB-244*.
5. Stohr S, **Schäfer EAM**, Büch TRH, Gudermann T (2011). Thyrotropin (TSH)-promoted induction of Dscr1 in thyroid carcinoma cells via calcineurin and NFAT signaling. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **383**: 68.
6. **Schäfer EAM**, Büch TRH, Hauswald M, Stohr S, Gudermann T, Aigner A (2012). Growth regulation in small cell lung cancer via G(q/11)- and G(12/13)-dependent signaling. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **385**: 79.
7. Berr C, **Schaefer EAM**, Gudermann T, Buech TRH. (2013). Guanylyl cyclase independent signaling of nitric oxide via TRPA1. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **386**: 9.
8. **Schaefer EAM**, Meister M, Aigner A, Gudermann T, Buech TRH. (2013). Functional expression of the chemosensory cation channel TRPA1 in small cell lung cancer cells and possible implications for tumor-promoting effects of tobacco smoke. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **386**: 70.

7.5 Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alexander Dietrich, meinem Doktorvater, der diese Arbeit mit großer Begeisterungsfähigkeit verfolgte, bei allen Problemen ein offenes Ohr für mich hatte und zu guter Letzt die Begutachtung meiner Dissertation übernommen hat.

Auch meinen Zweitgutachtern möchte ich für ihre Mühe bei der Begutachtung danken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann, Vorstand des Walther-Straub-Instituts, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut anzufertigen und für zahlreiche anregende wissenschaftliche Diskussionen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Thomas Büch für die Zeit und Mühe bedanken, die er als Betreuer dieser Arbeit gewidmet hat. Mit ständiger Diskussionsbereitschaft und vielseitigen Denkanstößen hat er entscheidend zum Gelingen beigetragen. In der ganzen Zeit hat er alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit aus allernächster Nähe miterlebt.

Ein großes Dankeschön geht an PD Dr. Harald Mückter, der ein ständiger Ansprechpartner und Problemlöser bei allen Schwierigkeiten im Arbeitsalltag war, Computerprobleme kurierte und Hilfe in der Not beim Ausdrucken der DGPT-Poster war. Gleichfalls gilt ein großer Dank Frau Prof. Dr. Ingrid Boekhoff für ihren ansteckenden Enthusiasmus und ihre stete Ermutigung in allen wissenschaftlichen und außerwissenschaftlichen Fragen. Auch Herrn Dr. Andreas Breit danke ich ganz herzlich für unermüdliche wissenschaftliche Diskussionen im "BBB-Seminar" und im Pausenraum. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Achim Aigner, der vor allem in der Entstehungsphase meiner Publikationen mit zahlreichen guten Ideen zu deren Gelingen beigetragen hat.

Allen meinen Kollegen aus dem Walther-Straub-Institut danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie danke ich für die vielen Jahre, in denen sie mich immer unterstützt hat.