

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

**Schädigung des Lungenepithels durch Zink- und
Kadmiumchlorid – Eine Analyse am in-vitro-Modell der
alveolar-kapillären Barriere**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dipl.-Biochem. Mirko Papritz

aus Zwickau

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Kai Kehe

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Oliver Peschel
Professor Dr. med. Jürgen Behr

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2015

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern

Hans-Jürgen und Sabine Papritz

Klarstellung zum Thema Eigenplagiat

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse im Zusammenhang mit Kadmiumchlorid wurden bereits in der Fachzeitschrift „*Toxicology and Applied Pharmacology*“ veröffentlicht [1].

Eidesstattliche Versicherung

Papritz, Mirko

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Schädigung des Lungenepithels durch Zink- und Kadmiumchlorid – Eine Analyse am in-vitro-Modell der alveolar-kapillären Barriere

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.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Seite

| | |
|---|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | IV |
| 1 EINLEITUNG | 8 |
| 1.1 WIRKUNGEN VON ZINK- UND KADMIUMCHLORID | 9 |
| 1.1.1 Wirkungen von Zinkchlorid | 9 |
| 1.1.2 Wirkungen von Kadmiumpulid | 10 |
| 1.2 DIE ALVEOLAR-KAPILLÄRE BARRIERE DER LUNGE (BLUT-LUFT-SCHRANKE) | 11 |
| 1.3 DAS <i>IN VITRO</i> -ALVEOLARMODELL | 16 |
| 1.4 ZIELSETZUNG DER DISSERTATION | 22 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 23 |
| 2.1 MATERIAL | 23 |
| 2.1.1 Chemikalien..... | 23 |
| 2.1.2 Enzyme zur Zelldissoziation | 24 |
| 2.1.3 Medien und Supplemente | 24 |
| 2.1.4 Antikörper für immunhistologische Färbungen | 25 |
| 2.1.5 Antikörper für <i>Western Blot</i> | 26 |
| 2.1.6 <i>Western Blot</i> -Materialien und -Reagenzien | 26 |
| 2.1.7 Proteinleitern für <i>Western Blot</i> | 27 |
| 2.1.8 Chromogene, Fluorochrome und fluorochromgekoppelte Endotoxine | 27 |
| 2.1.9 Assays zur Bestimmung der Zellvitalität, der Proteinkonzentration, der Ausschüttung proinflammatorischer Marker und der Quantifizierung apoptotischer Markerproteine | 27 |
| 2.1.10 Sonstige Materialien | 28 |
| 2.1.11 Geräte | 28 |
| 2.2 ZELLKULTIVIERUNG UND KO-KULTIVIERUNG | 29 |
| 2.2.1 Ablösung der Zellen mit Trypsin..... | 29 |
| 2.2.2 Aussaat der Ko-Kultur-Modelle..... | 29 |
| 2.2.3 Kultivierung der Ko-Kultur-Modelle | 31 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2.4 | Behandlung der Ko-Kultur-Modelle mit Zinkchlorid bzw. Kadmiumchlorid | 31 |
| 2.3 | TER-MESSUNG | 32 |
| 2.4 | PARAZELLULÄRER TRANSPORT VON NATRIUMFLUORESZEIN | 33 |
| 2.5 | IMMUNHISTOCHEMISCHE UND HISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG | 34 |
| 2.5.1 | Fixieren der Ko-Kultur-Modelle..... | 34 |
| 2.5.2 | Immunhistochemische Färbung mittels Fluorophore..... | 35 |
| 2.5.3 | Histochemische Färbung von Mikrometerquerschnitten | 35 |
| 2.6 | MTS-VITALITÄTS-ASSAY | 37 |
| 2.6.1 | EC ₅₀ -Bestimmung an den Monokulturen | 37 |
| 2.6.2 | Vitalitätsbestimmung im Ko-Kultur-Modell | 38 |
| 2.7 | IL-6- UND IL-8-ELISA..... | 38 |
| 2.8 | WESTERN BLOT | 39 |
| 2.8.1 | Gewinnung der Zelllysate..... | 39 |
| 2.8.2 | Proteinbestimmung | 40 |
| 2.8.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 40 |
| 2.8.4 | Blotten..... | 41 |
| 2.8.5 | Immunologische Detektion der Zielbanden..... | 42 |
| 2.9 | APOPTOSIS ARRAY..... | 43 |
| 2.9.1 | Gewinnung der Zelllysate..... | 43 |
| 2.9.2 | Proteinbestimmung | 44 |
| 2.9.3 | Färbung und Analyse der Apoptosis Array Membranen | 44 |
| 2.10 | STATISTIK | 45 |
| 3 | ERGEBNISSE..... | 46 |
| 3.1 | VERSUCHE MIT ZINKCHLORID..... | 46 |
| 3.1.1 | Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration von ZnCl ₂ an Monokulturen von NCI H441 und Iso-Has-1..... | 46 |
| 3.1.2 | Beeinflussung des TERs durch die Behandlung mit ZnCl ₂ | 46 |
| 3.1.3 | Effekte von Zinkchlorid auf den parazellulären Transport..... | 48 |
| 3.1.4 | Schädigung der zellulären Barriere durch Zinkchlorid | 49 |
| 3.1.5 | Zytotoxizitätsstudien mit Zinkchlorid an Ko-Kultur-Modellen | 50 |
| 3.1.6 | Einfluss von Zinkchlorid auf die Ausschüttung von proinflammatorischen Faktoren | 51 |
| 3.1.7 | Untersuchung von Zinkchlorid-verursachten Effekten auf Apoptosemarker | 53 |
| 3.1.8 | Expression von AJ-, TJ- und Strukturproteinen nach Langzeitbehandlung mit Zinkchlorid ... | 55 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.1.9 | Anzeichen einer Beteiligung des <i>epithelial growth factor</i> -Rezeptors an den Effekten einer apikalen Zinkchlorid-Exposition | 57 |
| 3.2 | VERSUCHE MIT KADMIUM..... | 58 |
| 3.2.1 | Effekte von Kadmiunchlorid auf die Integrität der alveolaren Barriere..... | 58 |
| 3.2.2 | Zerstörung der <i>Adherens junctions</i> durch Kadmiunchlorid | 59 |
| 3.2.3 | Effekte von Kadmiunchlorid auf die Zellvitalität | 62 |
| 3.2.4 | Die Ausschüttung von proinflammatorischen Faktoren nach einer CdCl ₂ -Vergiftung..... | 64 |
| 3.2.5 | Kompensation der durch Kadmiunchlorid verursachten Effekte mittels Zugabe von CaCl ₂ . 66 | |
| 4 | DISKUSSION | 68 |
| 4.1 | VERSUCHE MIT ZINKCHLORID | 68 |
| 4.1.1 | Analyse der TER-Werte | 69 |
| 4.1.2 | Analyse der Ergebnisse des Transportversuchs | 70 |
| 4.1.3 | Analyse der Immunfluoreszenzmikroskopie-Daten der TJ und AJ | 72 |
| 4.1.4 | Analyse der Zellvitalität der Epithel- und Endothelzellschicht..... | 73 |
| 4.1.5 | Analyse der Sekretion von IL-6 und IL-8..... | 74 |
| 4.1.6 | Auswirkungen einer Zinkchloridbehandlung auf die Expression von Apoptosemarkern | 75 |
| 4.1.7 | Analyse der Expression ausgewählter TJ- und AJ- und Zytoskelettproteine..... | 80 |
| 4.1.8 | Hypothese: Zinkchlorid moduliert über die EGFR-Rac1-MLCK/ROCK-Signalkaskade die Epithelbarriere..... | 83 |
| 4.2 | VERSUCHE MIT KADMIUMCHLORID | 87 |
| 4.2.1 | Analyse der TER-Werte | 87 |
| 4.2.2 | Analyse der Immunfluoreszenzmikroskopie-Daten der TJ und AJ | 89 |
| 4.2.3 | Analyse der Zellvitalität der Epithel- und Endothelzellschicht..... | 90 |
| 4.2.4 | Analyse der Sekretion von IL-6 und IL-8..... | 91 |
| 4.2.5 | Proziales Hypothese: Kadmiunchlorid verändert die Konformation der extrazellulären Domäne von E-Cadherin durch Verdrängung der Kalziumionen | 92 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK | 94 |
| 5.1 | ZUSAMMENFASSUNG DER EXPERIMENTE MIT ZINKCHLORID | 94 |
| 5.2 | ZUSAMMENFASSUNG DER EXPERIMENTE MIT KADMIUMCHLORID | 95 |
| 5.3 | AUSBLICK | 96 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 98 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| A | Ampere |
| Ag | Silber |
| AgCl | Silberchlorid |
| AJ | <i>Adherens junction</i> |
| ANOVA | <i>analysis of variance</i> |
| ARDS | <i>adult respiratory distress syndrom</i> |
| ATI | Alveolarzellen des Typs I |
| ATII | Alveolarzellen des Typs II |
| BD | Becton, Dickinson and Company |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> |
| c- | Centi- |
| ca. | <i>circa</i> |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CD31 | <i>cluster of differentiation 31</i> |
| CdCl ₂ | Kadmiumchlorid |
| cIAP-1 | <i>cellular inhibitor of apoptosis 1</i> |
| Cy3 | <i>Cyanine 3</i> |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| °C | Grad Celsius |
| Da | Dalton |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DTT | DL-Dithiothreitol |
| EC ₅₀ | mittlere effektive Konzentration |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |

| | |
|---------------|--|
| EGF | <i>epithelial growth factor</i> |
| EGFR | <i>epithelial growth factor receptor</i> |
| EGFRp845 | <i>epithelial growth factor receptor</i> (phosphoryliert am Tyrosin 845) |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| <i>et al.</i> | <i>et alterae</i> (und andere) |
| FKS | Fötales Kälberserum |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| × g | fache Schwerkraft |
| GAPDH | Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase |
| h | Stunde |
| HCl | Salzsäure |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HIF-1 | <i>hypoxia inducible factor-1</i> |
| HTS | <i>high throughput</i> |
| Hz | Hertz |
| IAP | <i>inhibitor of apoptosis</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IL-8 | Interleukin-8 |
| IR | Infrarot |
| Iso-Has-1 | Subtyp einer Zelllinie aus menschlichen Angiosarkomkarzinom |
| KOH | Kaliumhydroxid |
| m | Meter |
| M | Molar |

| | |
|------------------------|--|
| m ² | Quadratmeter |
| μ- | Mikro- |
| m- | Milli- |
| MAK | maximale Arbeitsplatzkonzentration |
| MEM | <i>minimum essential medium</i> |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute |
| MTS | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium |
| n- | Nano- |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAD(P)H | Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NCI | <i>National Cancer Institute</i> |
| NCI H441 | Zelllinie aus menschlichen Adenokarzinom der Lunge |
| O ₂ | Sauerstoff |
| P _{app} | scheinbarer Permeabilitätskoeffizient |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | <i>potentia hydrogenii</i> |
| PIPES | Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) |
| RPMI 1604 Medium | „Roswell Park Memorial Institute“-Medium 1604 |
| s | Sekunde |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SP-A, SP-B, SP-C, SP-D | Surfactant-Protein A, B, C und D |
| s.u. | siehe unten |

| | |
|-------------------|---|
| TER | <i>transbilayer electrical resistance</i> |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TNF R | Tumornekrosefaktor-Rezeptor |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TRITC | Tetra(methyl)-rhodaminisothiocyanat |
| TJ | <i>Tight junction</i> |
| UK | <i>United Kingdom</i> |
| USA | <i>United States of America</i> |
| V | Volt |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZnCl ₂ | Zinkchlorid |
| ZO-1, ZO-2, ZO-3 | <i>zonula occludens-1, -2 und -3</i> |
| Ω | Ohm |

1 Einleitung

Die Verschmutzung der Luft mit Schadstoffen, insbesondere mit Schwermetallen, ist ein Problem, welches schon seit der frühen Kupfersteinzeit von Menschen verursacht wird. Schon vor 6000 Jahren als die ersten Menschen die Metallverarbeitung entdeckten, setzten sie bei der Verhüttung blei-, kadmium- und zinkhaltige Verbindungen an die Umwelt frei. Doch erst mit dem Zeitalter der Industrialisierung und dem vermehrten Einsatz von fossilen Brennstoffen und der Massenproduktion im industriellen Maßstab erlebte die Luftverschmutzung ein neues Ausmaß. So wurde Anfang des 20. Jahrhunderts erstmalig das Portmanteau-Wort Smog, aus dem englischen Wörtern *smoke* und *fog* geprägt. Doch derzeitig ist Smog trotz des gestiegenen Bewusstseins der Bevölkerung in Bezug auf die Luftverschmutzung nach wie vor ein großes Gesundheitsproblem, mit dem insbesondere große Metropolen, wie Mexiko-Stadt, Peking, Schanghai oder Kuala Lumpur, zu kämpfen haben.

Neben der allgemeinen Verschmutzung der Luft, welche toxikologisch gesehen eine chronische Exposition darstellt, gibt es in verschiedenen Bereichen der Industrie Gefahrenbereiche, in denen es bei unzureichendem Arbeitsschutz zu akuten Vergiftungen über die Atemluft kommen kann. Akute Vergiftungen durch Inhalation von Schwermetaldämpfen mit Zink und Kadmium kann bei der Verhüttung von Zinkerzen, bei der Kunstdüngerherstellung, bei der Fertigung von Batterien sowie bei der Müllverbrennung auftreten. Neben der Schädigung der Lungen sind andere innere Organe, wie Leber und Niere, mitbetroffen.

Die Therapie der Inhalationstraumata ist limitiert. Meist werden hauptsächlich symptomlindernde Maßnahmen, wie künstliche Beatmung mit einem positiven endexpiratorischen Druck, die Verabreichung von Steroiden und Antibiotika, ergriffen [2]. Häufig werden auch Chelatoren verabreicht, um die Schwermetallionen zu binden und aus dem Körper zu schleusen [3]. Zur Verbesserung der therapeutischen Optionen ist die Analyse der Pathophysiologie dieser Substanzen entscheidend.

Im Folgenden wird die spezifische Wirkung von Zink- und Kadmiumsalzen auf das menschliche Lungengewebe analysiert, sowie die Physiologie der Lunge und der Aufbau

der alveolar-kapillären Barriere beschrieben. Abschließend wird der Nachbau dieser Barriere mit Hilfe eines in-vitro-Modells geschildert.

1.1 Wirkungen von Zink- und Kadmiumchlorid

Im Verlauf seines Tages atmet ein Mensch durchschnittlich 10.000 Liter Luft ein, dabei gelangen auch Schadstoffe in den menschlichen Körper [4]. Über die Lungenoberfläche können inhalative Noxen lokal schädigende Wirkungen entfalten oder über das Blut systemische, toxische Effekte hervorrufen. Daneben kann die Lunge auch durch systemisch antransportierte Gifte geschädigt werden. In dieser Arbeit wurden speziell die schädigenden Effekte von Zinkchlorid und Kadmiumchlorid auf in-vitro-Modelle der Lunge untersucht.

1.1.1 Wirkungen von Zinkchlorid

Zinkchlorid wird in Rauchgranaten und Rauchbomben zur künstlichen Erzeugung eines dichten Rauches eingesetzt. Feuerwehrleute können beispielsweise im Rahmen von Übungen oder bei der Beseitigung von militärischen Altlasten mit Zinkchlorid in Kontakt kommen. Rauchgranaten oder Rauchbomben setzen nach der Zündung große Mengen Zinkchlorid in kleinen Partikeln (durchschnittliche Größe: 0,1 μm [5]) frei. Seit 1945 wurden über 60 Menschen durch Unfälle mit Rauchgranaten in geschlossenen Räumen verletzt, wobei 20 Fälle davon tödlich verliefen [6-9]. Der letzte, bekannte Todesfall ereignete sich 2007 bei einer Brandschutzübung an einer amerikanischen Schule. Für diese Brandschutzübung wurden Rauchbomben eingesetzt, die auch vom Militär in Übungen und militärischen Einsätzen verwendet werden. Ein 21-jähriger Schüler wurde dabei dieser Brandschutzübung Zinkchlorid-haltigen Rauch ausgesetzt und verstarb trotz intensiv-medizinischer Maßnahmen 9 Tage nach der Exposition [6]. Analog zu diesem Fall entwickelten im überwiegenden Teil aller publizierten Fallbeispiele die Patienten nach der Inhalation des Rauches Symptome eines schweren *adult respiratory distress syndroms* (ARDS). Dabei traten die Symptome erst nach einer mehrtägigen Verzögerungszeit auf. Die symptomarme Latenzzeit bis zum Auftreten erster

quantifizierbarer Lungenschäden scheint dabei abhängig von der inhalierten Dosis zu sein [7,8,10]. Die pathologischen Veränderungen schlossen pulmonale Ödeme, Pneumonitis, Alveolitis obliterans, eine diffuse Schädigung der Alveolen und pulmonale Fibrose ein [7,8,11,12]. Nur wenig ist bisher über die genaue Pathophysiologie einer pulmonalen Zinkchloridvergiftung bekannt. In Tierversuchen an Kaninchen und Ratten konnten ähnliche pathologische Veränderungen wie beim Menschen nachgewiesen werden [13,14]. Erste Experimente an Zellkulturen lassen auf eine Wechselwirkung von Zinkchlorid mit dem Glutathionmetabolismus schließen [15,16]. So führte eine Exposition von Lungenzellen mit $ZnCl_2$ zu einem Absinken des reduzierten, intrazellulären Glutathions, während der Gehalt an oxidiertem Glutathion anstieg [16]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Supplementierung mit N-Acetylcystein (eine Vorstufe des Glutathions) eine Reduzierung der durch Zinkchlorid verursachten Zytotoxizität bewirkt [17].

Detaillierte Studien bezüglich der Wirkung von $ZnCl_2$ auf die humane alveolar-kapilläre Barriere der Lunge wurden bisher nicht durchgeführt. Eine genaue Analyse dieser Barriere könnte die Ursachen für die Latenzzeit und die nachfolgenden pathologischen Veränderungen nach einer $ZnCl_2$ -Exposition aufdecken.

1.1.2 Wirkungen von Kadmiumchlorid

Ähnliche pathologische Befunde wie beim Zinkchlorid können nach einer pulmonalen Vergiftung mit Kadmiumchlorid beobachtet werden. Interstitiale Pneumonitis, pulmonale Fibrose, eine diffuse Schädigung der Alveolen und pulmonale Ödeme wurden in wissenschaftlichen Arbeiten an Mensch und Tier beschrieben [18-20]. Im Unterschied zu den pathologischen Effekten einer $ZnCl_2$ -Vergiftung konnten die Bildung von Adenokarzinomen, eine transiente Nierenschädigung und sogenanntes Metallrauchfieber diagnostiziert werden [21-23], wohingegen das Auftreten von ARDS noch nie im Zusammenhang mit einer akuten, pulmonalen Kadmiumchloridvergiftung beschrieben wurde. Bei Metallrauchfieber handelt es sich um eine kurzzeitige Erkrankung, welche Grippe-ähnliche Symptome, wie eine Entzündung des Atemtrakts, Fieber und Schüttelfrost, hervorruft. Das Auftreten des Metallrauchfiebers wurde auch bei

Zinkrauchvergiftungen beobachtet, doch dabei handelte es sich um Fälle nach einer Zinkoxid-Exposition [24,25]. Im Gegensatz zur molekularen Pathologie von $ZnCl_2$ wurden die molekularen Effekte einer $CdCl_2$ -Vergiftung bereits in einigen Studien untersucht. Dabei konnten in Tierversuchen die Zell-Zell-Kontakte der alveolaren Barriere als ein wichtiges Ziel der pulmonalen Toxikologie des Kadmiumchlorids identifiziert werden [26]. In Versuchen an der epithelialen Barriere von Nierentubuluszellen konnte gezeigt werden, dass eine Exposition mit Kadmiumchlorid zum Zusammenbruch dieser Barriere führt, wobei der Expositionsweg eine wichtige Rolle spielte [27,28]. Erfolgte die Vergiftung von der Blutseite der Blut-Harn-Schranke, führte dies zu einer schnelleren Zerstörung der Barriere, als eine Exposition mit der gleichen $CdCl_2$ -Konzentration von der apikalen Seite (Harnseite) [27,28]. Ob dieser pathologische Mechanismus, wie er von Prozialeck *et al.* an der Epithelbarriere der Niere beschrieben wurde, auch an der Alveolarbarriere der Lunge wiederzufinden ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden. Dabei wurden Experimente durchgeführt, in denen ein etabliertes Ko-Kultur-Modell der alveolar-kapillären Barriere verwendet wurde [29]. Das *in-vitro*-Modell soll dabei die Blut-Luft-Schranke in den Alveolen nachbilden.

1.2 Die alveolar-kapilläre Barriere der Lunge (Blut-Luft-Schranke)

Die humane Lunge besteht aus dem rechten und dem linken Lungenflügel, beide Lungenflügel sind wiederum in Lungenlappen aufgeteilt, die durch Spalten (Fissuren) voneinander getrennt sind. Diese Fissuren dienen als Verschiebe- und Gleitspalten. Der rechte Lungenflügel setzt sich im Menschen aus 3 Lungenlappen, der linke aus 2 Lungenlappen zusammen [30].

Im Inneren der Lunge befindet sich der Bronchialbaum. Dieser besteht aus der Luftröhre, die sich in zwei Hauptbronchien und weiter in Lappen- und Segmentbronchien verzweigt. Danach folgen die Bronchiolen, die sich weiter zu den terminalen Bronchiolen mit einem Durchmesser von etwa 2 mm verästeln. Bronchien und Bronchiolen besitzen neben ihrer primären Zuleitungsfunktion wichtige Aufgaben wie Erwärmung, Anfeuchtung und Reinigung der Atemluft. Die Reinigung, das heißt die Befreiung der Luft

von Schwebstoffen sowie der Abtransport von versehentlich in die Lunge gelangten Fremdstoffen, erfolgt über das schleimbedeckte Flimmerepithel. Das Zusammenspiel von zilienträgenden Flimmerepithel und mukösen Drüsen sorgt für eine zusammenhängende Schicht viskösen Schleims, die vom raschen Zilienschlag des Flimmerepithels oralwärts getrieben wird. Dabei werden am Epithel anhaftende Partikel proximal zum Pharynx befördert (mukoziliärer Transport), wo sie dann mit dem Schleim abgehustet und verschluckt werden können [31].

Nach den Bronchien und Bronchiolen folgen peripher die *Bronchioli respiratorii* und die Alveolen als terminale respiratorische Einheiten, in denen der Gasaustausch stattfindet, was sie zu einem kritischen Bereich des menschlichen Körpers bezüglich einer Vergiftung macht. Im menschlichen Körper gibt es ungefähr 130.000 terminale respiratorische Einheiten mit jeweils 2000 Alveolen [32]. Da der mittlere Durchmesser einer Alveole 250 – 290 μm beträgt, errechnet sich daher eine innere Lungenoberfläche von ca. 140 m^2 , was über 70 % der Größe eines Tennisfeldes entspricht [33].

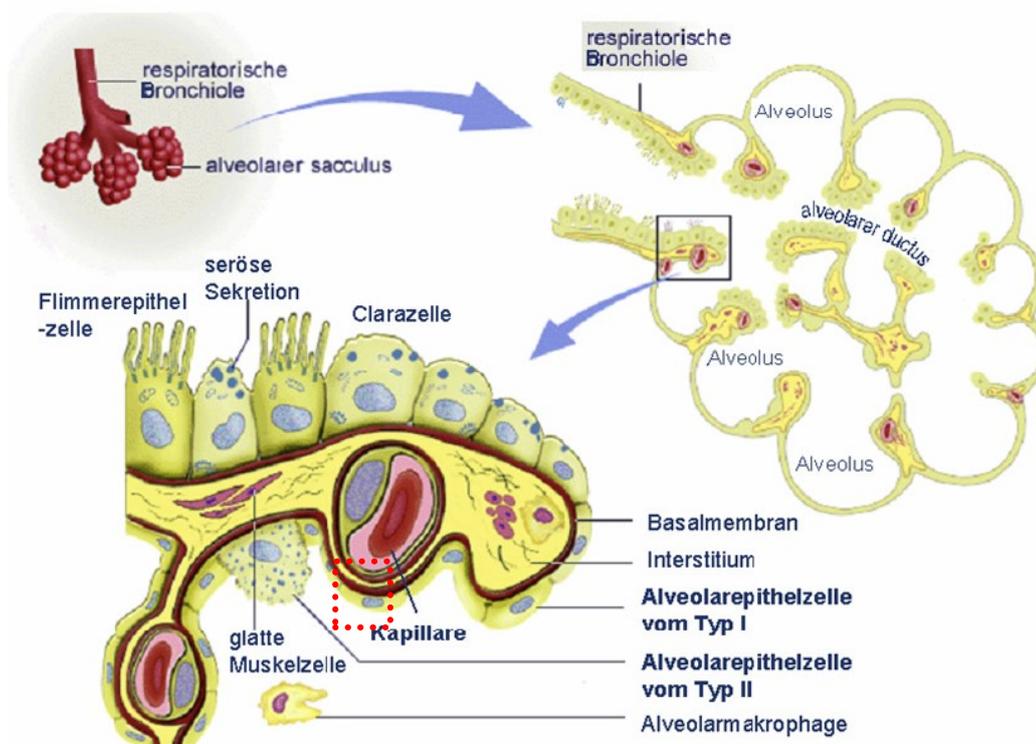


Abbildung 1-1: Verschiedene Vergrößerungsstufen der terminalen respiratorischen Einheit: **oben links** – Respiratorische Bronchiole mit Alveolarem Sacculus, **oben rechts** – terminale respiratorische Einheit, **unten links** – Naheaufnahme des Übergangs respiratorische Bronchiole-Alveolus (verändert nach McGill Molson Medical Informatics Project, Dr. M. McKee Lecture 26. Histology of Respiratory System 3. Respiratory Bronchiole)

Das Lungengewebe setzt sich aus insgesamt mehr als 40 unterschiedlichen Zelltypen zusammen [34]. Dabei ist der Übergang vom Epithel der respiratorischen Bronchiolen, mit Flimmerepithelzellen und nicht-zilientragenden Clara-Zellen, zum Epithel der Alveolen fließend (Abbildung 1-1). Dünne und flache Alveolarepithelzellen vom Typ I (ATI-Zellen) und kuboidale Alveolarepithelzellen vom Typ II (ATII-Zellen) kleiden das Innere der Alveolen aus. Im alveolaren Lumen selbst sind häufig Alveolarmakrophagen anzutreffen. Die Funktion dieser beweglichen Immunzellen ist die Phagozytose von Partikeln und Erregern, die mit der Luft eingeatmet wurden [35]. Die Alveolarwand ist von einem Netz aus Kapillaren durchzogen, um den Gasaustausch zwischen Blut und Luft zu ermöglichen. Diese Kapillaren befinden sich im Interstitium (ein Bindegewebsgeflecht aus Kollagen mit Makrophagen, Perizyten, Myofibroblasten, Mastzellen und einer Basalmembran). Der Gasaustausch findet an der sogenannten Blut-Luft-Schranke, eine dünne Trennschicht zwischen Blutkreislauf und Luftlumen, statt (Abbildung 1-1; rote, gestrichelte Markierung). An den dünnsten Stellen weist diese Barriere eine Dicke von nur 0,2 μm auf. Der Sauerstoff- und Kohlendioxidtransport wird durch diese geringe Dicke und durch die große Fläche begünstigt. Treibende Kräfte für die passive Diffusion über die Strecke vom Alveolarraum zum Erythrozyt sind die Partialdruckdifferenzen für O_2 und CO_2 [31]. Die Diffusionstrecke der Blut-Luft-Schranke spielt eine entscheidende Rolle für den Gasaustausch. Kommt es durch austretendes Plasma in den Alveolarraum zu einer Verlängerung der Diffusionstrecke (Lungenödem), wird die Aufnahme von Sauerstoff bzw. die Abgabe von Kohlendioxid erschwert oder sogar verhindert.

Bei einer genauen Betrachtung der inneren Auskleidung der Alveolen ist eine mosaikartige Verteilung der großen Typ I Zellen und der kleineren Typ II Zellen zu beobachten (Abbildung 1-2). So besteht diese Zellschicht zu 60 % aus ATII-Zellen, während diese nur 5 % der Fläche einnehmen [36]. Die ATI-Zellen besitzen in den Alveolen Abgrenzungsfunktionen und fördern durch ihre spezielle, flache Morphologie den Gasaustausch. Die ATII-Zellen fungieren zum einen als Surfactant-Produzenten und zum anderen als Reparaturzellen mit Stammzeleigenschaften, da sie sich bei Schäden in der alveolaren Epithelzellschicht durch Proliferation und Differenzierung in ATI-Zellen umwandeln und dadurch verletzte Gewebereiche regenerieren können [37]. Letztlich

ist diese dichte Schicht aus Alveolarepithelzellen vom Typ I und II die erste zelluläre Barriere gegen externe Stoffe in den Lungenbläschen.

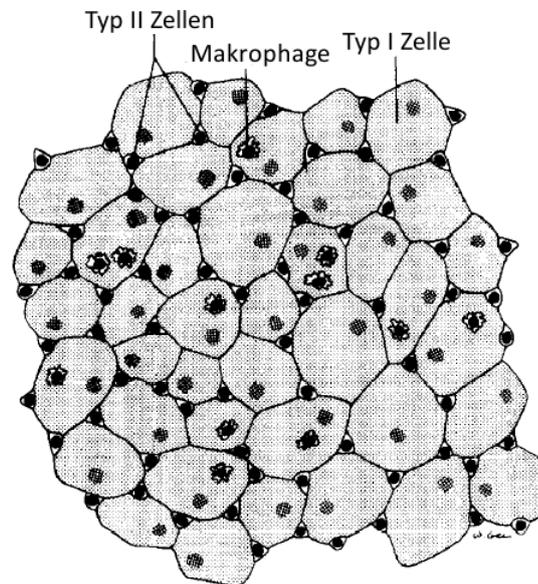


Abbildung 1-2: Zellanordnung aus Alveolarepithelzellen Typ I und II einer flach ausgebreiteten Alveole (verändert nach [38])

Gasförmige Substanzen oder luftgetragene Partikel, welche die Blut-Luft-Schranke zwischen Luftlumen der Alveole und Blutgefäß der Kapillare durchdringen wollen, müssen fünf Schichten überwinden (Abbildung 1-3).

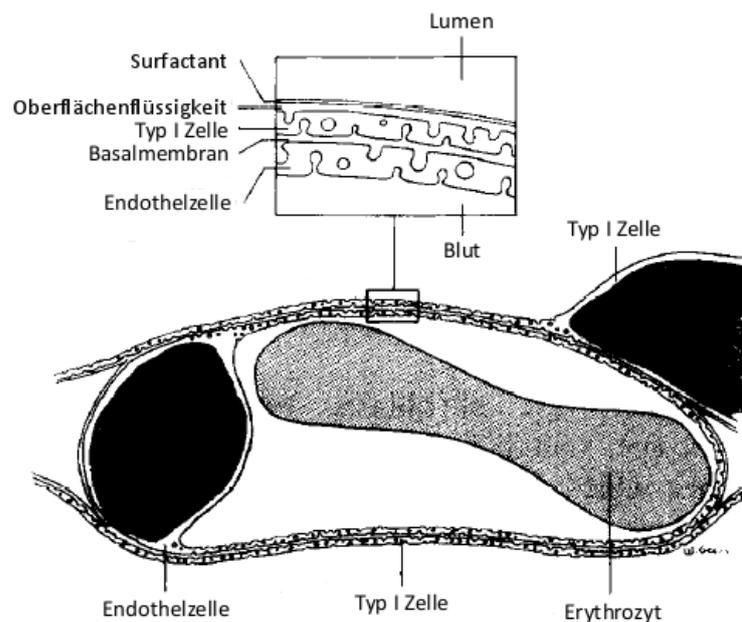


Abbildung 1-3: Alveolenwand mit eingebetteter Kapillare (verändert nach [38])

(1) Surfactant-Schicht

Alveolare Pneumozyten des Typs II sezernieren neben einem Großteil (90 %) an Phospholipiden (hauptsächlich Dipalmitoylphosphatidylcholin (65 %)) auch 4 Arten an Surfactant-Proteinen (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D), die zusammen die Surfactant-Schicht bilden [39]. Ihre primäre Aufgabe ist die Regulierung der Oberflächenspannung der Alveolen. Diese Veränderung der Oberflächenspannung spielt eine Schlüsselrolle für die Stabilität der Lungenbläschen sowie für eine effiziente Belüftung [40]. Eine weitere Funktion der Surfactant-Schicht ist die Aggregation von Makromolekülen. Diese sogenannte Opsonisierung der Makromoleküle begünstigt eine Aufnahme der Fremdstoffe durch Alveolarmakrophagen [41,42].

(2) Oberflächenflüssigkeit

Die alveolare Oberflächenflüssigkeit enthält einen hoch variablen Anteil an Serumproteinen (50 - 90 %) und dient als Reservoir für Surfactantproteine und Phospholipide [39]. Im Gegensatz zur Oberflächenflüssigkeit der Bronchien und Bronchiolen ist diese Schicht frei von Mukus-Proteinen.

(3) Epithel

Diese Zellschicht besteht aus Alveolarepithelzellen des Typs I und II. Dabei wird eine dichte Barriere durch die Ausbildung spezifischer Zell-Zell-Kontakt-Proteine sichergestellt. Diese Proteine bilden die 4 wichtigsten Zell-Zell-Kontakte: die *Tight junctions*, *Adherens junctions*, Desmosomen und *Gap junctions* (weitere Details am Ende des Abschnittes 1.3).

(4) Basalmembran

Die Basalmembran besteht aus Kollagenmolekülen des Typs IV, Laminin und verschiedenen Proteoglykanen. Sie ist im klassischen Sinne keine Membran, so wie die Lipidmembran von Zellen, vielmehr ist sie eine extrazelluläre Matrix aus Kollagenfasern und anderen Proteinen. Eine Aufgabe der Basalmembran ist die Stabilisierung der Zellschichten, die diese Membran zur Verankerung nutzen. Weiterhin beeinflusst sie die Zellpolarität, Zelldifferenzierung und den Zellmetabolismus [43].

(5) Endothel

Die letzte Barriere und gleichzeitig aber auch die durchlässigste, das Endothel, grenzt das Blut von der Umgebung ab. Studien belegen eine über 1000-fach höhere Durchlässigkeit gegenüber der Epithelzellschicht [44]. Daher scheint die endotheliale Barriere nur eine untergeordnete Rolle im Schutz gegen eindringende Fremdstoffe zu spielen.

1.3 Das *in vitro*-Alveolarmodell

In dieser Arbeit wurde ein Zellkulturmodell der alveolar-kapillären Barriere verwendet, welches von einer Arbeitsgruppe aus Mainz etabliert wurde. Dieses *in-vitro*-Modell wurde erstmalig 2004 von Hermanns *et al.* [29] entwickelt und beschrieben. Hierbei werden alveolare Epithelzellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Endothelzellen auf einer kollagen-beschichteten Trägermembran in einer Transwell-Platte ausgebracht. Zellen der Adenokarzinoma-Zelllinie NCI H441 wurden als Epithelzellen benutzt. Diese Zellen weisen Merkmale von alveolaren Epithelzellen des Typs II (ATII) auf. So produzieren sie alle 4 Surfactant-Proteine, zeigen eine ähnliche Morphologie und ähnliche Wachstumseigenschaften wie ATII-Zellen [29,45,46]. NCI H441 Zellen besitzen Eigenschaften von ATII- und Clarazellen (nicht-zilientragende Epithelzellen der respiratorischen Bronchiolen) [45,46]. Sie wurden in diesen Versuchen den in der Literatur bereits gut charakterisierten A549 Zellen vorgezogen [47,48], da in A549 Zellen wichtige Bestandteile zur Etablierung einer festen Zell-Zell-Verbindung nur unzureichend ausgebildet sind (*Adherens junctions* und Desmosomen) oder ganz fehlen (funktionelle *Tight junctions*) [49,50]. Die Trägermembran besteht aus Polycarbonat und wird mit Kollagen beschichtet, um ähnlich der Basalmembran den Zellen einen festen Halt zu gewährleisten. Während auf der einen Seite dieser Trägermembran die Epithelzellen kultiviert wurden, wird die andere Seite von Endothelzellen besiedelt. Hierfür wurden Zellen der Angiosarkoma-Zelllinie Iso-Has-1 verwendet. Die von Masuzawa *et al.* [51] etablierte Iso-Has-Zelllinie besitzt Merkmale von Endothelzellen.

In Bezug auf Morphologie, Wachstumsverhalten und Expression des endothel-spezifischen Oberflächenmarkers CD31 besitzen Iso-Has-Zellen starke Übereinstimmungen mit primär isolierten alveolaren Endothelzellen [52]. Für das *in-vitro*-Modell wurden qualitätskontrolliert ausgewählte Zellen verwendet, d.h. es wurde ein bestimmter Anteil an Iso-Has-Zellen isoliert, der ein hohes Maß an CD31-Oberflächenproteinen aufwies. Dieser formte den speziellen Subtyp Iso-Has-1 [53].

Für die Erstellung des Modells wurden NCI H441 Epithelzellen durch Ko-Kultivierung mit Iso-Has-1 Endothelzellen und durch Supplementierung mit Dexamethason so stimuliert, dass sie auf einer Trägermembran aus Polycarbonat eine dichte, epitheliale Zellschicht formen.

Für die Ko-Kultur-Modelle wurden ausschließlich Zellen aus Tumorzelllinien verwendet, da der Einsatz primärer Kulturen von Epithel- und Endothelzellen eng an deren Verfügbarkeit geknüpft ist. So sind primäre Lungenzellen kommerziell nur in begrenztem Maße erhältlich, teuer in der Anschaffung und zudem weniger standardisiert als etablierte Zelllinien.

Das als Medium-Supplement hinzugefügte Glucocorticoid Dexamethason spielt eine Rolle bei der parakrinen Kontrolle der zellulären Differenzierung von Lungenepithelzellen. Die Aktivität eines Differenzierungsmarkers von ATII Zellen, die endogene, alkalische Phosphatase, konnte durch Dexamethason-Behandlung bei A549 Zellen vermehrt exprimiert werden [54]. Außerdem fördert serumfreies Medium mit Dexamethason und cAMP die Erhaltung des ATII Phänotyps bei humanen fötalen ATII Zellen [55] und aus Ratten isolierten ATII Zellen [56]. Ferner ist bekannt, dass Dexamethason das Wachstum von Lungenepithelzellen reguliert [57,58] und die Ausschüttung von Surfactantproteinen erhöht [59,60]. Letztlich ist eine Supplementierung der NCI H441 Zellen mit Dexamethason notwendig für die Ausbildung einer dichten, epithelialen Barriere [29], wie es schon in ähnlicher Form bei Mamma-Epithelzellen beschrieben wurde [61,62]. Neben den Effekten auf die Epithelzellen besitzt das Glucocorticoid eine weitere für das Modell förderliche Wirkung, die Ausschüttung des Wachstumsfaktors VEGF [63,64]. Dies führt dazu, dass die endothelialen Iso-Has-1 Zellen auf der Rückseite der Membran als gleichmäßig verteilte

Einzelzellschicht erhalten bleiben, ohne, stimuliert durch VEGF, sich zu tubulären Strukturen zusammenzulagern. So wird sichergestellt, dass das durch die Endothelzellen erzeugte Mikromilieu sich über die gesamte Fläche der Membran erstreckt, um die Differenzierung aller Epithelzellen zu unterstützen. Dieses Mikromilieu, welches durch die Ausschüttung parakriner Faktoren erschaffen wird, ist wichtig für die Differenzierung und im Speziellen für die Ausbildung einer dichten Barriere [65-68].

Alle wichtigen Schichten (Surfactantschicht, Epithelschicht, Basalmembran und Endothelschicht) einer funktionalen alveolärethelialen Barriere sind vorhanden (Abbildung 1-4, die Surfactantschicht ist bei dieser geringen Vergrößerung nicht sichtbar).

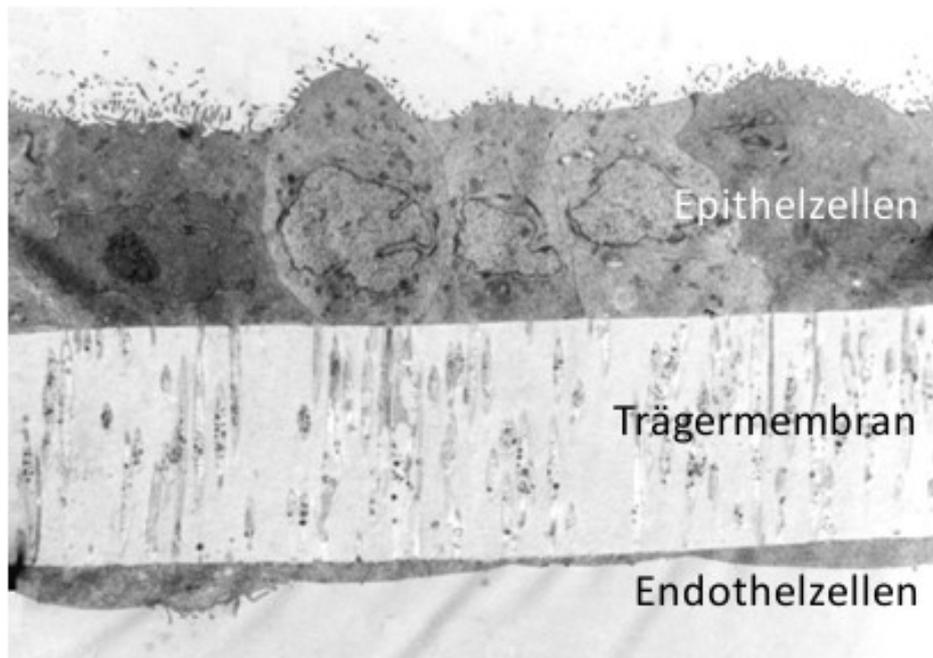


Abbildung 1-4: Querschnitt des alveolären Ko-Kultur-Modell

Neben der *in-vivo*-nahen Morphologie der Epithelbarriere muss die physiologische Funktionalität sichergestellt sein. Zur Überprüfung der Integrität und Dichtigkeit der Barriere wird der sogenannte TER (*transbilayer electrical resistance*) herangezogen. Zur Bestimmung des TERs wird jeweils eine Elektrode in das Mediumreservoir der apikalen sowie der basolateralen Seite der Membran eingetaucht. Nach Anlegen einer geringen Spannung kann der elektrische Widerstand der Barriere ermittelt werden. Der TER kann so als Indikator zur Detektion von Schäden in der Zellbarriere dienen. Eine

konfluente Schicht aus gut differenzierten Epithelzellen mit intakten Zell-Zell-Kontakten kann zur Ausbildung eines hohen TER-Wertes ($> 500 \Omega \cdot \text{cm}^2$) führen. In der Literatur sind *in vitro* ermittelte TER-Werte für Ratten AII Zellen mit $762 \pm 91 \Omega \cdot \text{cm}^2$ [69] oder $> 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ für primär isolierte, zu ATI Zellen transdifferenzierte, humane AII Zellen [70,71] beschrieben.

Zur Untersuchung der Integrität der Barriere ist ein besonderes Augenmerk auf die Brückenproteine der Zell-Zell-Kontakte zu legen. So gibt es in dieser parazellulären Grenzschicht vier Regionen von Zell-Zell-Verbindungen (Abbildung 1-5):

(1) *Tight junctions* (TJ) mit den Brückenproteinen Occludin und der Claudin-Familie bzw. dem Ankerproteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3

(2) *Adherens junctions* (AJ) mit dem Brückenprotein E-Cadherin und den Ankerproteinen α/β -Catenin

(3) Desmosomen mit den Brückenproteinen der desmosomalen Cadherine (Desmoglein und Desmocollin), sowie den Ankerproteinen Desmoplakin, Plakoglobin und Plakophilin

(4) *Gap junctions* mit den Brückenproteinen der Connexin-Familie

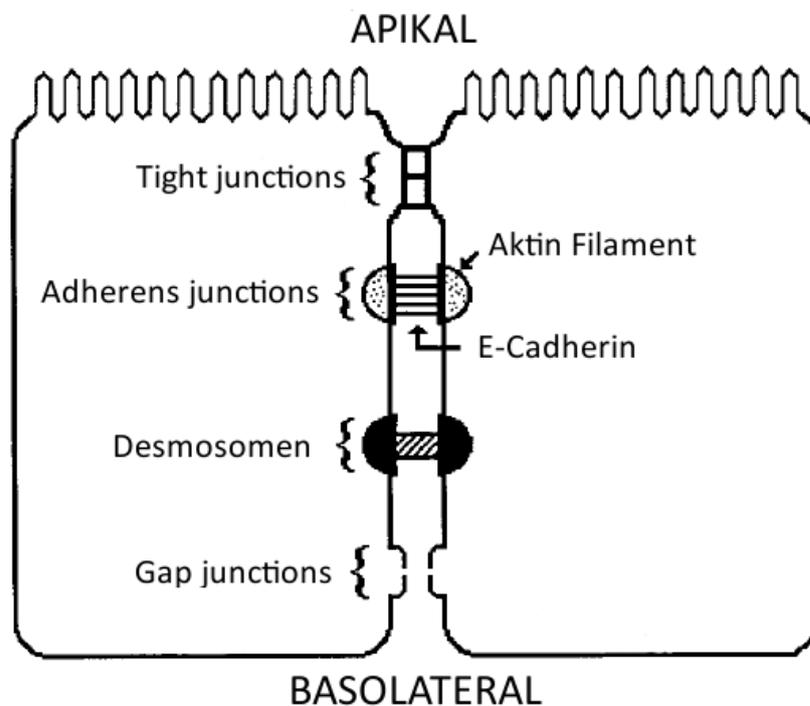


Abbildung 1-5: Zell-Zell-Verbindungen von Epithelzellen (verändert nach [72])

Bei den *Gap junctions* handelt es sich um Zell-Zell-Verbindungen, die zum Signalaustausch zwischen benachbarten Zellen dienen. Dabei werden die Zellen über Kanäle aus Connexin-Molekülen verbunden, durch die Ionen und kleine Moleküle ausgetauscht werden können [73]. *Adherens junctions* und Desmosomen bilden über ihre Brückenproteine (hauptsächlich Vertreter der Cadherin-Familie) feste Verbindungen zwischen den Zellen aus. Die Anordnung der meist Ca^{2+} -abhängigen Verbindungen ist bei den *Adherens junctions* in Form einer zusammenhängenden Gürtelzone (*Zonula adhaerens*) organisiert, während die desmosomalen Verbindungen punktuell strukturiert sind [74,75]. Die *Tight junctions* sind am apikalen Ende der Zell-Zell-Grenzfläche gelegen. Sie regulieren durch ihre Zusammenlagerung ein Eindringen von allen wasserlöslichen Stoffen in den parazellulären Raum. Diese Versiegelung des parazellulären Raums besteht aus festen und verzweigten Zell-Zell-Verbindungen, die sich aus fibrillenartig verbundenen Claudinen und Occludin zusammensetzen. Die 24 Isoformen der Claudin-Familie kommen gewebsspezifisch in epi- und endothelialen Geweben vor, dabei regulieren sie die parazelluläre Permeabilität für Ionen [76]. Beispielsweise sind Claudin-16 und -19 in *Tight junctions* der Niere lokalisiert, was diese Barriere zur Förderung der Ionenresorption durchlässig für Na^+ und andere Kationen macht [77]. Im Epithelverband der Alveolen sind die Isoformen Claudin-1, -3, -4, -5, -7, -8 und -18 zu finden [78]. Die Expression dieser Claudine kann durch äußere Effekte beeinflusst werden. So führe Sarkoidose und interstitielle Pneumonie zu pathologischen Veränderungen in der Claudin-Expression [79].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die *Tight junctions* maßgeblich den Stofftransport in den parazellulären Raum regulieren und somit die Dichtigkeit der Barriere sicherstellen. Die *Adherens junctions* und Desmosomen haben die Aufgabe, die Zellen untereinander fest zu verbinden und regulieren dadurch die Breite des parazellulären Spalts. Die *Gap junctions* besitzen im Gegensatz zu den anderen Zell-Zell-Verbindungen keine primär strukturelle, sondern eine wichtige Funktion im Bereich der Zellkommunikation. Alle Zellkontakte werden im Ko-Kultur-Modell korrekt ausgebildet (siehe Abbildung 1-6, *Gap junctions* nicht im Bild).

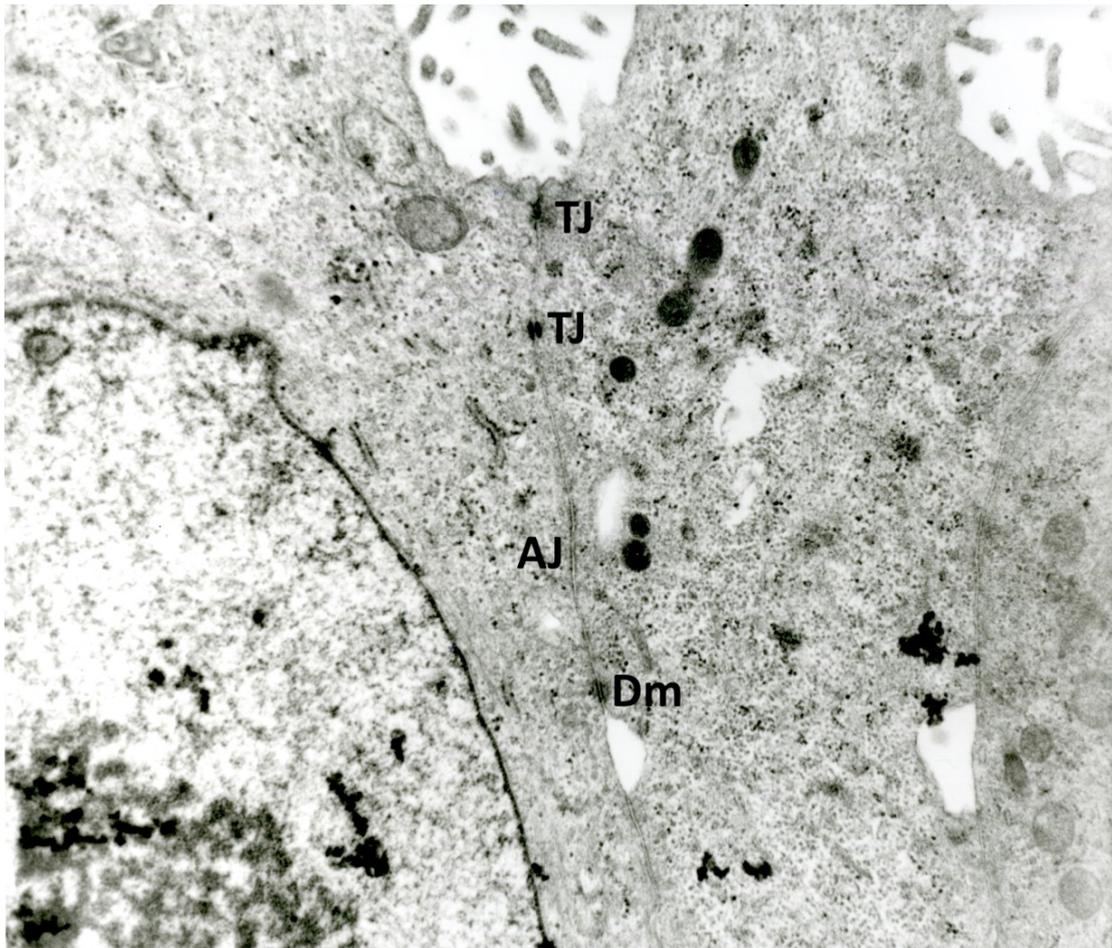


Abbildung 1-6: Zell-Zell-Verbindungen zwischen NCI H441 Zellen (Ausschnitt aus der Epithelschicht eines Ko-Kultur-Modells): **TJ** – *Tight junctions*, **AJ** – *Adherens junctions*, **Dm** - Desmosomen

1.4 Zielsetzung der Dissertation

Ziel der Arbeit war es die Pathophysiologie von Zink- und Kadmiumchlorid auf die epitheliale Barriere der Alveolen zu untersuchen. Da die Exposition mit Zink- und Kadmiumchlorid zu ähnlichen pathologischen Veränderungen führt, sollten in den durchgeführten Experimenten Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Wirkmechanismus identifiziert werden. Ebenso sollte geklärt werden, ob die verschiedenen Arten der Exposition zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. So wurde sowohl die Aufnahme über die Atemwege (apikale Exposition im Zellkulturmodell) als auch die Wirkung über die Blutbahn (basolaterale Exposition im Zellkulturmodell) simuliert. Als Versuchsmodell diente dabei ein etabliertes Ko-Kultur-Modell der alveolar-kapillären Barriere.

Das geplante Versuchsdesign wurde auf folgende Weise strukturiert:

- (1) In ersten Versuchen sollte die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) der im Ko-Kultur-Modell verwendeten Tumorzelllinien in Monokultur bestimmt werden.
- (2) Basierend auf der in Punkt (1) gewonnenen Daten und der in der Literatur zu findenden Daten wurden für $ZnCl_2$ und $CdCl_2$ physiologisch sinnvolle Konzentrationsbereiche festgelegt. Anschließend wurden Ko-Kultur-Modelle mit Zink- bzw. Kadmiumchlorid behandelt und folgende Endpunktparameter bestimmt:
 - a. die funktionelle Integrität der Barriere (transdoppelschichtiger elektrischer Widerstand)
 - b. die morphologischen Veränderungen (Immunhistologische Mikroskopieaufnahmen)
 - c. die Zellvitalität (Zellproliferationstest (MTS-Test))
 - d. die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (IL-6 und IL-8)
- (3) In weiterführenden Experimenten sollten in Transportversuchen die TER-Daten verifiziert und die Expression von Zell-Zell-Kontakt-Proteinen mittels *Western-Blot* analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

| | |
|---|----------------------------|
| <i>Bovine serum albumin (BSA)</i> | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Bromphenolblau | BioRad, München |
| Kadmiumchlorid | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| <i>complete</i> , Mini – Protease-Inhibitor | Roche, Penzberg |
| Dako Cytomation Protein Block-Lösung | Dako, Hamburg |
| Dako Antibody Diluent-Lösung | Dako, Hamburg |
| DL-Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| EDTA | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| EGF | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| EGTA | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Entellan | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Fluoreszein-Natrium | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Glycerol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Glycin | GE Healthcare, München |
| HEPES | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kaliumhydroxid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kollagen aus Rattenschwanz | BD Bioscience, Heidelberg |
| Magnesiumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Methanol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

| | |
|---|---|
| Natriumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | BioRad, München |
| Nonidet P-40 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Parafin – Roti®-Plast | Carl Roth, Karlsruhe |
| Paraformaldehyd | Carl Roth, Karlsruhe |
| PBS (flüssige Lösung, steril) | GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, USA |
| PBS-Tabletten (zum Ansetzen der Lösung) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| PIPES | Carl Roth, Karlsruhe |
| Polyethylenglycol 8000 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure | Merck, Darmstadt |
| Schwefelsäure | Merck, Darmstadt |
| Streptavidin IRDye 800CW | LI-COR, Lincoln, USA |
| Tris | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| TritonX-100 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Tween® 20 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Xylol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Zinkchlorid | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

2.1.2 Enzyme zur Zelldissoziation

| | |
|---------------------|---|
| Trypsin/EDTA-Lösung | GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Kollagenase Typ I | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

2.1.3 Medien und Supplemente

| | |
|---------------------------------|---|
| RPMI 1640 | GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, USA |
| MEM | GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, USA |
| L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax™) | GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, USA |

| | |
|--------------------------------|---|
| Penicillin/Streptomycin-Lösung | GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, USA |
| L-Glutamin | GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Fötale Kälberserum (FKS) | GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Dexamethason | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

Für die Kultivierung der NCI H441 Zellen und der Iso-Has-1 Zellen wurde RPMI 1640 Vollmedium verwendet, dass mit 10 % FKS, 1 % Glutamax™ und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt wurde. Während der Ko-Kultivierung wurde der FKS-Anteil im Zellkulturmedium auf 5% reduziert. Für die Expositionsversuche mit CdCl₂ wurde das Kadmiumsalz in MEM-Medium mit 1 % L-Glutamin gelöst.

Alle Gewebekulturmateriale wurden von NUNC oder Greiner Bio-One bezogen. Die HTS 24-Transwell® Filterplatten (Artikel-Nummer: 3413) stammen von Corning.

2.1.4 Antikörper für immunhistologische Färbungen

Die verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 2-1 aufgeführt, während die sekundären Antikörper in Tabelle 2-2 zu finden sind.

Tabelle 2-1: Primäre Antikörper für immunhistologische Färbungen

| Antigen | Ig-Klasse/ Ursprungsspezies | Verdünnung | Klon | Hersteller |
|-------------------|--------------------------------|------------|------------|----------------|
| β-Catenin | IgG ₁ , Maus | 1:100 | polyklonal | BD Biosciences |
| ZO-1 | IgG ₁ , Kaninchen | 1:100 | polyklonal | Zymed |
| E-Cadherin | IgG ₁ , Maus | 1:100 | 5H9 | Monosan |

Tabelle 2-2: Sekundäre Antikörper für immunhistologische Färbungen

| Antigen | Ursprungsspezies | Verdünnung | Fluorophor | Hersteller |
|------------------|------------------|------------|------------|------------|
| Maus | Kaninchen | 1:30 | FITC | Dako |
| Maus | Ziege | 1:30 | FITC | Dako |
| Kaninchen | Ziege | 1:500 | Cy3 | Amersham |

2.1.5 Antikörper für *Western Blot*

Die verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 2-3 aufgeführt, während die sekundären Antikörper in Tabelle 2-4 zu finden sind.

Tabelle 2-3: Primäre Antikörper für *Western Blot*

| Antigen | Ig-Klasse/ Ursprungsspezies | Verdünnung | Klon | Hersteller |
|-------------------|--------------------------------|------------|------------|----------------|
| Actin | IgG ₁ , Maus | 1:2000 | C-2 | Santa Cruz |
| E-Cadherin | IgG ₁ , Maus | 1:500 | 5H9 | Monosan |
| EGFRp845 | IgG, Kaninchen | 1:1000 | polyklonal | Millipore |
| β-Catenin | IgG ₁ , Maus | 1:250 | polyklonal | BD Biosciences |
| Claudin-3 | IgG, Kaninchen | 1:250 | polyklonal | Invitrogen |
| Claudin-7 | IgG _{2a-κ} , Maus | 1:500 | 5D10F3 | Invitrogen |
| Claudin-18 | IgG, Kaninchen | 1:250 | polyklonal | Invitrogen |
| Occludin | IgG _{1κ} , Maus | 1:100 | OC 3F10 | Zymed |
| β-Tubulin | IgG ₁ , Maus | 1:400 | ONS.1A6 | Sigma-Aldrich |
| ZO-1 | IgG _{1κ} , Maus | 1:500 | ZO1-1A12 | Invitrogen |

Tabelle 2-4: Sekundäre Antikörper für *Western Blot*

| Antigen | Ursprungsspezies | Verdünnung | Fluorophor | Hersteller |
|------------------|------------------|------------|--------------|------------|
| Maus | Ziege | 1:5000 | IRDye® 800CW | LI-COR |
| Kaninchen | Ziege | 1:5000 | IRDye® 680CW | LI-COR |
| Kaninchen | Ziege | 1:5000 | IRDye® 800CW | LI-COR |

2.1.6 *Western Blot*-Materialien und -Reagenzien

NuPage® 4-12 % Bis-Tris Gel Life Technologies, Carlsbad, USA

NuPage® MES SDS-Running Buffer Life Technologies, Carlsbad, USA

| | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| Nitrozellulosemembran | Life Technologies, Carlsbad, USA |
| NuPage® <i>Transfer Buffer</i> | Life Technologies, Carlsbad, USA |
| NuPage® Antioxidant | Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Odyssey® <i>Blocking Buffer</i> | LI-COR, Lincoln, USA |

2.1.7 Proteinleitern für *Western Blot*

| | |
|------------------------------------|------------------------------------|
| Full Range Rainbow™ Protein Marker | GE Healthcare (Amersham), Freiburg |
| MagicMark™ XP Western Standard | Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Spectra™ Multicolor Broad Range | Fermentas, St. Leon-Rot |

2.1.8 Chromogene, Fluorochrome und fluorochromgekoppelte Endotoxine

| | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| Hämalaun | Carl Roth, Karlsruhe |
| Eosin (2 %, in wässriger Lösung) | Chroma, Münster |
| DAPI | Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Fluoreszein, Natriumsalz | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Phalloidin-TRITC | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

2.1.9 Assays zur Bestimmung der Zellvitalität, der Proteinkonzentration, der Ausschüttung proinflammatorischer Marker und der Quantifizierung apoptotischer Markerproteine

| | |
|--|---|
| <i>CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay</i> | Promega, Mannheim |
| <i>BC Assay: protein quantitation kit</i> | Uptima-interchim, Montluçon, Frankreich |
| <i>Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go!</i> | eBioscience, San Diego, USA |
| <i>Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!</i> | eBioscience, San Diego, USA |
| <i>Proteome Profiler™ Human Apoptosis Array</i> | R&D Systems, Wiesbaden |

2.1.10 Sonstige Materialien

| | |
|---------------------------------|--|
| Einbettkassetten | MEDITE, Burgdorf |
| Filterpads für Einbettkassetten | MEDITE, Burgdorf |
| Objektträger – Superfrost® Plus | Gerhard Menzel, Braunschweig |
| Parafilm | Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA |
| Maxisorp® 96-Wellplatte | NUNC, Roskilde, Dänemark |

2.1.11 Geräte

| | |
|---|---|
| Brutschrank – Hera cell 150 | Heraeus-Thermo-Fisher, Hanau |
| CASY Zellmessgerät | Roche, Penzberg |
| Labortischzentrifuge mit Rotoreinsatz für 50-ml-Polypropylengefäße | Hettich, Tuttlingen |
| Waage | Satorius, Göttingen |
| EVOMX Volt-Ohm-Meter mit STX-100C (Ag/AgCl)-Elektrode | World Precision Instruments, Berlin |
| Orbitalschüttler mit Temperiereinheit | Heidolph, Schwabach |
| Plattenlesegerät – Sapphire ² | TECAN, Grödig bei Salzburg, Österreich |
| Plattenlesegerät – Victor ³ | Perkin Elmer, Waltham, USA |
| pH-Meter mit InLab-Science-Elektrode | Mettler-Toledo, Urdorf, Schweiz |
| Fluoreszenzmikroskop Axioplan | Zeiss, Oberkochen |
| Einbettautomat – Citadel 1000 | Shandon, Cambridge, UK |
| Einbettstation – Histocentre2 | Shandon, Cambridge, UK |
| Kühlplatte – PF100 | Bio-Optica, Mailand, Italien |
| Rotationsmikrotom – RM2145 mit Einmalklingen Feather® Typ S35 | Leica, Wetzlar Feather, Osaka, Japan |
| Heizblock - <i>Bioblock Scientific</i> | Thermolyne, Dubuque, USA |
| XCell SureLock™ Elektrophoresekammer | Life Technologies, Carlsbad, USA |

| | |
|--------------------------|----------------------|
| Netzteil - POWER PAC 300 | BioRad, München |
| Mini Trans-Blot® Kammer | BioRad, München |
| Odyssey® IR-Laserscanner | LI-COR, Lincoln, USA |

2.2 Zellkultivierung und Ko-Kultivierung

2.2.1 Ablösung der Zellen mit Trypsin

Um die adhärent wachsenden Iso-Has-1-Endothelzellen oder NCI H441-Epithelzellen abzulösen, wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 % Trypsin/ 0,25 % EDTA in PBS) für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch Klopfen gegen die Kulturflasche wurden die Zellen abgelöst und die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von serumhaltigem Vollmedium gestoppt. Nach der Resuspension der Zellen konnte die Zellkonzentration mit Hilfe des CASY-Zellmessgeräts bestimmt werden. Die Iso-Has-1-Zellsuspension konnte nun zur Aussaat von Ko-Kultur-Modellen oder zur Passagierung der Zellen verwendet werden, während die NCI H441-Zellsuspension nur zur Passagierung der Zellen verwendet wurde. Für die Ablösung von NCI H441 Zellen zur Ko-Kultivierung wurden die Zellen mit einer Mischung (1:1, v:v) aus Kollagenase (0,1 % in HEPES-Puffer pH 7,55) und 0,01 % EDTA/ 0,1 % BSA – Lösung inkubiert. Nach einer 10-minütigen Einwirkzeit wurden die abgelösten Zellen in PBS mit 0,1 % BSA resuspendiert und im Anschluss 5 min lang bei 440 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in frischem Vollmedium aufgenommen. Nach Zellzählung und Einstellung der gewünschten Aussaatkonzentration (s.u.) wurden die NCI H441 für die Aussaat von Ko-Kultur-Modellen verwendet.

2.2.2 Aussaat der Ko-Kultur-Modelle

Für die Aussaat wurden HTS 24-Transwell® Filterplatten (6,5 mm Transwell® mit einer Polycarbonat Membran mit 0,4 µm Poren) verwendet. Beide Seiten der Transwell-Membranen wurden zuvor mit 12,12 µg/cm² Kollagen beschichtet. Es wurden jeweils 40

μl einer Kollagenlösung (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in essigsauer Lösung (0,1 M)) als Tropfen auf Ober- und Unterseite der Membranen gegeben. Die Adsorption des Kollagen Typ 1 fand dabei während der Verdunstung der Essigsäure statt.

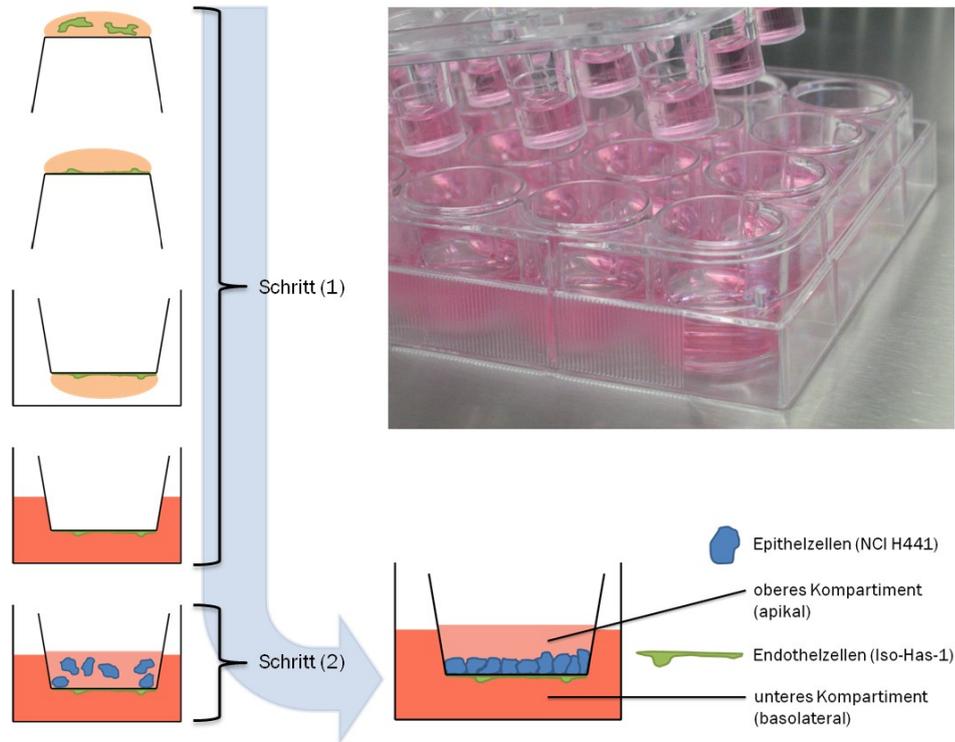


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Aussaat eines Ko-Kultur-Modells (oben rechts: Foto einer Mediumgefüllten Transwell-Platte)

Die Aussaat der Zellen erfolgte in zwei Schritten (siehe Abbildung 2-1):

- (1) Zunächst wurde die Transwell-Platte in umgekehrter Position in den Deckel der zugehörigen Gewebekulturplatte gesetzt und eine Endothelzellsuspension (erhalten durch Trypsinierung) mit einer Zellzahl von $3,3 \times 10^5$ Zellen/ml in einer Volumenmenge von 50 μl auf die Unterseite des Filters gegeben (resultierend 5×10^4 Zellen/cm²). Anschließend wurde die Transwell-Platte in dieser umgekehrten Position in eine sterile Instrumentenbox gestellt und für mindestens 2 h im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchte) inkubiert. Während dieser Zeit sanken die Endothelzellen im Tropfen zu Boden und adhärten an die Filtermembran. Im Anschluss wurde die Transwell-Platte mit der zuvor bei Seite gelegten Gewebekulturplatte abgedeckt, vorsichtig

umgedreht, d. h. in die richtige Position gebracht, und pro Well in die untere Kammer langsam je 1 ml Vollmedium zugegeben.

- (2) Im zweiten Schritt wurden die NCI H441 Epithelzellen mit Kollagenase Typ I / EDTA abgelöst, eine Zellkonzentration von $5,5 \times 10^4$ Zellen/ml wurde eingestellt und davon 200 μl in jedes obere Well der Transwell-Platte pipettiert (resultierend $3,33 \times 10^4$ Zellen/ cm^2).

2.2.3 Kultivierung der Ko-Kultur-Modelle

Vier Tage nach der Aussaat wurden in beiden Kompartimenten der Transwell-Platte das Medium gewechselt. Dabei wurde dem Epithelzellmedium für das obere Kompartiment Dexamethason (Endkonzentration: 1 μM) zugesetzt. Dieser Mediumwechsel wurde an Tag 7, 10 und gegebenenfalls Tag 12 wiederholt. Nach 10 - 12 Tagen in Kultur entwickeln die Ko-Kulturen einen dichten epithelialen Gewebsverband mit TER-Werten von $500 \pm 150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und konnten für Versuche verwendet werden.

2.2.4 Behandlung der Ko-Kultur-Modelle mit Zinkchlorid bzw. Kadmiumchlorid

Nachdem die Ausbildung einer intakten Barriere mittels TER-Messung (siehe Abschnitt 2.3) detektiert wurde, wurden die Modelle mit unterschiedlichen Konzentrationen an Zinkchlorid (50, 100, 200, 500, 1000 und 2000 μM) bzw. Kadmiumchlorid (50, 100, 200 μM) exponiert. Dies erfolgte über einen Mediumwechsel, bei dem in bestimmten Wells der HTS 24-Transwell® Filterplatte das Medium mit der entsprechenden Konzentration an ZnCl_2 bzw. CdCl_2 versetzt wurde. So wurde für eine apikale Exposition dem oberen Kompartiment und für eine basolaterale Exposition dem unteren Kompartiment Zink- bzw. Kadmiumchlorid zugesetzt. Die Lösungen verblieben je nach Versuch 24, 48, 72 oder 96 h in den Transwell-Platten. Bei Inkubationszeiten von 72 und 96 h erfolgte ein Mediumwechsel nach 48 h, wobei die Supplementierung mit ZnCl_2 bzw. CdCl_2 fortgesetzt wurde. Das heißt, dass nach 48 h ein Mediumwechsel erfolgte, bei dem, wie schon beim Zeitpunkt null erläutert, die Medien entsprechend des Expositionsschemas mit ZnCl_2 bzw. CdCl_2 versetzt wurden.

Bei einem speziellen Versuch (Ergebnisse siehe Abschnitt 3.1.9) wurden 6 Wells mit EGF behandelt. Das EGF in einer wässrigen Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde in einem ersten Schritt im Verhältnis 1:1000 mit Ko-Kultur-Medium zwischenverdünnt, so dass eine Konzentration von 1 µg/ml vorlag. Mit Hilfe dieser Zwischenverdünnung wurde im zweiten Schritt eine Arbeitsverdünnung von 25 ng/ml eingestellt und anschließend wurden die Proben apikal mit EGF exponiert.

Im Gegensatz zur Exposition mit ZnCl₂ wurde CdCl₂ in serumfreien Medium gelöst und auf die Zellen gegeben. Das Medium setzte sich aus MEM supplementiert mit 1 % L-Glutamin zusammen. Um einen Medium-spezifischen Nebeneffekt auszuschließen, erfolgte der Mediumwechsel bei den Kontrollproben (ohne CdCl₂) ebenfalls apikal bzw. basolateral mit dem serumfreien Medium. Diese Modifikation der Behandlung mit Kadmiumchlorid war nötig, da das Salz in serumhaltigem Vollmedium Präzipitate erzeugte.

2.3 TER-Messung

Der transepitheliale elektrische Widerstand (*transbilayer electrical resistance*, TER) ist ein Maß für die Dichtigkeit einer epithelialen Barriere. Der TER wurde mit Hilfe eines kombinierten Volt-Ohm-Meters (EVOMX) über Ag/AgCl-Elektroden gemessen. Dafür wurden nach einem Mediumwechsel mit anschließender Relaxationszeit von mindestens 2 h Elektroden in das obere und untere Kompartiment eines Transwells platziert (siehe Abbildung 2-2). Nach Anlegen einer schwach oszillierenden Spannung (50 Hz) fließen die Anionen und Kationen jeweils zur Anode bzw. Kathode. Dadurch wird der Stromkreis geschlossen. Die Ionen können jedoch nicht ungehindert zu ihrem Ziel gelangen – sie müssen die alveolar-kapilläre Barriere überwinden. Der Widerstand, der durch diese Barriere erzeugt wird, wird vom Ohm-Meter gemessen und angezeigt.

Ein leeres Kontrollwell diente als Blank-Wert und besaß im Mittel einen TER von $45 \pm 2 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der TER-Wert wurde auf eine Fläche von $0,33 \text{ cm}^2$ bezogen und in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben. Somit wurde zur Berechnung des TER-Wertes für die Membran einer HTS 24-Transwell® Filter Platte der gemessene Widerstandswert mit $0,33 \text{ cm}^2$ multipliziert.

Zur Normalisierung der Messdaten wurden alle Ergebnisse auf die Grundlinie bezogen. Die Grundlinie stellt die Ausgangswerte des TERs vor der Exposition dar. Alle Veränderungen der TER-Werte im Versuchsablauf bezogen sich Well-spezifisch auf die jeweiligen Grundlinienwerte.

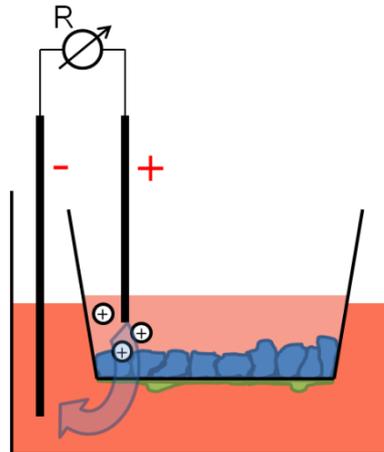


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der TER-Messung im Ko-Kultur-Well (R = Ohm-Meter, Pfeil = Flussrichtung der Kationen)

2.4 Parazellulärer Transport von Natriumfluoreszein

Nach der Ausbildung stabiler TER-Werte von über $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ an Tag 10 - 12 wurden Ko-Kultur-Modelle für Transport-Studien eingesetzt. Der parazelluläre Fluss (der Transport entlang der Zell-Zell-Kontakte pro Zeiteinheit) von Natrium-Fluoreszein ($M = 376,3 \text{ Da}$) wurde bei 37°C in apikal-basolateraler Richtung gemessen.

Nach einem Mediumwechsel mit Vollmedium im unteren Kompartiment, wurden die Transportversuche gestartet, indem das Medium im oberen Kompartiment durch je $200 \mu\text{l}$ Vollmedium mit Natrium-Fluoreszein (Donor-Lösung; Endkonzentration: $10 \mu\text{g/ml}$) ausgetauscht wurde. Im Anschluss erfolgte eine leicht schüttelnde Inkubation der Modelle bei 37°C . Während des Versuchs wurden alle 30 min Proben von $50 \mu\text{l}$ aus dem unteren Kompartiment (basolaterale Seite) entnommen und jeweils durch ein gleiches Volumen an Vollmedium ersetzt. Die Proben wurden in eine 96-Wellplatte überführt, im Verhältnis 1:5 mit 1 mM KOH verdünnt und unter Lichtausschluss aufbewahrt. Diese alkalische Verdünnung stabilisiert die Fluoreszenz von Natrium-Fluoreszein und macht

sie unabhängig von pH-Wert-Änderungen. Nach 180 min Inkubation wurden die letzten Proben entnommen. Danach wurden die Fluoreszenzintensitäten der verdünnten Proben im Plattenlesegerät bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen.

Zur Auswertung wurde die kumulative Menge an Natrium-Fluoreszein im unteren Kompartiment als eine Funktion der Zeit graphisch aufgetragen. Der scheinbare (*apparent*) Permeabilitätskoeffizient P_{app} , der sich direkt aus dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz ableitet, wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{(A \cdot C_0)}$$

dQ/dt = Menge an Natrium-Fluoreszein, die pro s durch den zellulären Layer transportiert wurde (parazellulärer Fluss)

A = Membranoberfläche (0,33 cm²)

C_0 = Anfangskonzentration von Natrium-Fluoreszein in der Donor-Lösung (10 µg/ml)

Die Umrechnung der Fluoreszenz-Intensität in die Menge an Natrium-Fluoreszein wurde in Eichkurven-Experimenten mit definierten Konzentrationsreihen bestimmt. P_{app} wird in der Einheit cm/s angegeben.

2.5 Immunhistochemische und Histochemische Charakterisierung

2.5.1 Fixieren der Ko-Kultur-Modelle

Zur Fixierung der Modelle wurde 3,7%iges Paraformaldehyd (PFA) gelöst in PBS oder PIPES-Puffer (PIPES 0,1 M; EGTA 1 mM; 4 % Polyethylenglycol 8000; NaOH 0,1 M) verwendet. Die Überstände wurden aus beiden Kompartimenten entfernt und mit 37°C-warmer PFA-Lösung gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur erfolgte ein dreimaliger Spülvorgang mit PBS. Die Proben wurden anschließend bis zur Weiterverarbeitung (siehe Abschnitt 2.5.2 und 2.5.3) maximal eine Woche lang bei 4°C gelagert.

2.5.2 Immunhistochemische Färbung mittels Fluorophore

Die fixierten Ko-Kultur-Modellmembranen wurden mit Hilfe einer PBS-Lösung mit 2 % TritonX-100 20 min lang bei Raumtemperatur permeabilisiert, um die Antigene auf und in den Zellen besser zugänglich zu machen. Nach einem dreimaligen Wachsritt mit PBS wurden die Proben zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit *Dako Cytomation Protein Block-Lösung* 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern, die in *Dako Antibody Diluent-Lösung* verdünnt werden (siehe Tabelle 2-1). Am nächsten Tag wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit den sekundären Antikörpern 1 h lang bei 37°C inkubiert. Wie bei schon den primären Antikörpern erfolgte die Verdünnung mit *Dako Antibody Diluent-Lösung*. Im Unterschied zu den anzufärbenden TJ- und AJ-Proteinen wurde Aktin über ein spezifisches Endotoxin (Phalloidin), welches mit dem Fluorophor TRITC gekoppelt ist, angefärbt. Phalloidin wurde zusammen mit den sekundären Antikörpern in der gleichen Lösung angesetzt. Nach diesem Schritt erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS. Zur Detektion der Zellkerne wurden die Proben 20 min lang bei Raumtemperatur mit DAPI inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit PBS und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach dem Ausschneiden der Membranen aus der Transwell-Platte wurden die Proben zwischen 2 Deckgläschen eingedeckt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.5.3 Histochemische Färbung von Mikrometerquerschnitten

Als Probenmaterial dienten die fixierten Transwellmembranen (siehe Abschnitt 2.5.1). Die Membranen wurden aus der Trägerplatte ausgeschnitten und in Einbettkassetten zwischen zwei Filterpads gelegt. Zur Entwässerung der Proben wurde folgende Alkoholreihe angewandt:

- (1) Destilliertes Wasser – 1 min
- (2) 70 % Isopropanol – 20 min
- (3) 70 % Isopropanol – 20 min
- (4) 80 % Isopropanol – 20 min

- (5) 96 % Isopropanol – 20 min
- (6) 100 % Isopropanol – 20 min
- (7) 100 % Isopropanol – 20 min
- (8) Xylol – 15 min
- (9) Xylol – 15 min
- (10) Xylol – 15 min

Danach erfolgte die Paraffinierung der Proben über Nacht im Einbettautomat bei 56 - 60°C in flüssigem Paraffin. Anschließend wurden die Filter aus den Einbettkassetten entnommen und quer zur späteren Schnittfläche in kleine Paraffinblöcke mit Hilfe der Einbettstation eingegossen. Die Aushärtung der Blöcke erfolgte danach für 2 h bei -30°C in der Kühlplatte. Am Rotationsmikrotom wurden daraufhin 7 µm starke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37°C getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Proben rehydriert mit einer abnehmenden Alkoholreihe:

- (1) Xylol – 2x 2 min
- (2) 100 % Ethanol – 2x 2 min
- (3) 96 % Ethanol – 2x 2 min
- (4) 80 % Ethanol – 2x 2 min
- (5) 70 % Ethanol – 2x 2 min
- (6) Destilliertes Wasser – 2x 2 min

Zur Färbung der Zellkerne wurden die Proben 6 min in Hämalaun-Lösung (1:4 Verdünnung in dH₂O) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Bläuung des Chromophors mit Leitungswasser für 10 min. Im Anschluss wurden die Zellen mit Eosin (0,1%ige, wässrige Lösung) gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Proben ausgewaschen mit destilliertem Wasser (5 min) und anschließend zum Eindecken entwässert:

- (1) 70 % Ethanol – 2x 1 min
- (2) 100 % Ethanol – 2x 2 min
- (3) Xylol – 5 min

Das Eindecken der Proben erfolgte mit Entellan als Eindeckmittel. Zum Schluss wurden die Proben mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet.

2.6 MTS-Vitalitäts-Assay

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde ein MTS-Assay der Firma Promega (*CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*) verwendet. Während des Tests wird das MTS-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium) von metabolisch aktiven Zellen in ein farbiges Formazan-Salz umgewandelt (siehe Abbildung 2-3). Die Reaktion wird von NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktase-Enzymen im Zytosol der Zellen katalysiert [80].

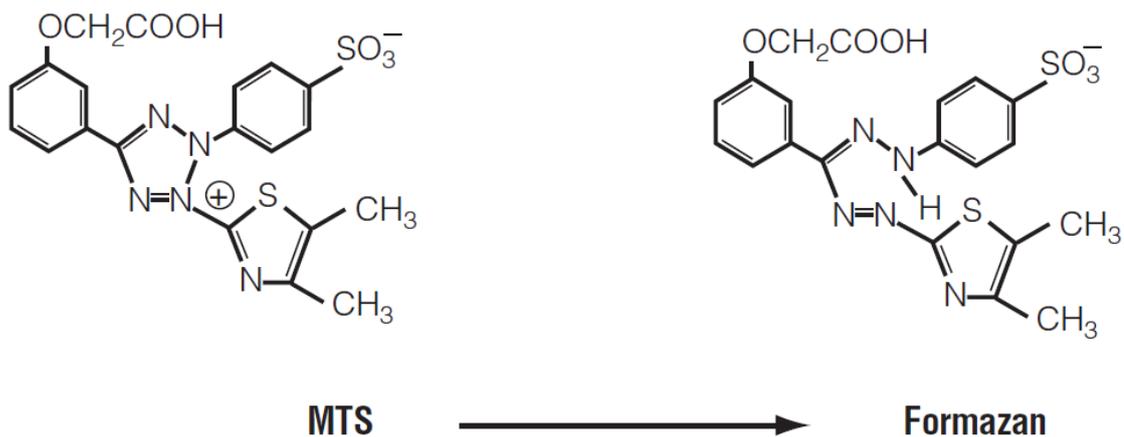


Abbildung 2-3: Reaktion von MTS in Formazan katalysiert durch die metabolische Aktivität lebendiger Zellen (entnommen aus der Kit-Anleitung)

2.6.1 EC₅₀-Bestimmung an den Monokulturen

Nach der Aussaat von je 20.000 (Iso-Has-1) bzw. 50.000 (NCI H441) Zellen pro Well in 96-Wellplatten wuchsen die Zellen in 24 Stunden zu einer konfluenten Monokultur. Zinkchlorid bzw. Kadmiumchlorid wurde in einer Konzentrationsreihe von 1 µM bis 10 mM in Vollmedium angesetzt und in die Wells überführt. Die Vergiftung der Proben erfolgte über 24 Stunden und wurde anschließend mit Hilfe des MTS-Vitalitäts-Assays analysiert. Die Anwendung des Assays lief dabei wie folgt ab:

- (1) Absaugen der Überstände

- (2) Waschen der Wells mit PBS
- (3) Verdünnen des MTS-Reagenz mit Vollmedium im Verhältnis: 5 Teile Medium + 1 Teil Reagenz
- (4) Überführung des verdünnten MTS-Reagenz in die Wells
- (5) Inkubation für 30 min bei 37°C
- (6) Messung der Absorption bei 490 nm

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte über eine sigmoidale Kurvenanpassung mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Die Daten wurden dabei aus 3 unabhängigen Versuchen gepoolt und berechnet.

2.6.2 Vitalitätsbestimmung im Ko-Kultur-Modell

Die Vitalitätsbestimmung mit Hilfe des MTS-Vitalitäts-Assays (*CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* von Promega) im Ko-Kultur-Modell verlief ähnlich wie bei den Monokulturen. Alle Schritte des Assays wurden wie schon in Abschnitt 2.6.1 (Schritte (1) bis (6)) beschrieben durchgeführt. Nur wurde in Schritt (4) das verdünnte Reagenz in beide Kompartimente des Ko-Kultur-Modells pipettiert. Die Reaktion des MTS-Reagenz in ein farbiges Formazansalz fand dabei an der epithelialen und endothelialen Seite des Modells statt.

2.7 IL-6- und IL-8-ELISA

Nach der Behandlung der Ko-Kultur-Modelle mit Zink- bzw. Kadmiumchlorid mit einer Inkubationszeit von 24 h (CdCl₂) bzw. 48 h (ZnCl₂) wurden die Überstände aus beiden Kompartimenten entnommen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Für die Bestimmung des IL-6- und IL-8-Gehalts in den Mediumüberständen wurden die *Ready-SET-Go!*-Kits der Firma eBioscience benutzt. Die Versuche wurden gemäß der Gebrauchsanweisung durchgeführt. Beim Prinzip des *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) wird die Konzentration der Zytokine in einer Probe ermittelt. Bei dieser Art des Sandwich ELISA werden 96-Well-Platten mit einem für IL-6 bzw. IL-8 spezifischen

Antikörper beschichtet. Anschließend erfolgt die Sättigung der freien Bindungsstellen mit einer Protein-Lösung (im Kit enthalten). Während der Inkubation mit den Mediumüberständen können die im Medium enthaltenen IL-6 bzw. IL-8-Moleküle an die Antikörper binden. Für den Test wurden die Mediumproben unterschiedlich stark verdünnt (siehe Tabelle 2-5).

Tabelle 2-5: Verdünnungsfaktoren der Proben für IL-6- und IL-8-ELISA

| Probe | Verdünnungsfaktor |
|---|-------------------|
| apikaler Überstand für IL-6-Bestimmung | 5 |
| basolateraler Überstand für IL-6-Bestimmung | 1 |
| apikaler Überstand für IL-8-Bestimmung | 15 |
| basolateraler Überstand für IL-8-Bestimmung | 5 |

In einer weiteren Inkubationsphase werden für IL-6- bzw. IL-8 spezifische biotinylierte Antikörper an die IL-6- bzw. IL-8-Moleküle gekoppelt. Die Zytokine sind nun von zwei Seiten an spezifische Antikörper gebunden (Sandwich). In der nächsten Phase binden peroxidase-gekoppelte Avidinmoleküle an das biotinylierte Ende des zweiten spezifischen Antikörpers mit hoher Affinität. Als Chromogen für die Peroxidase-Reaktion wird Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Die Absorption dieses Farbstoffs wird nach Abstoppen der Reaktion mit 1 M H₂SO₄-Lösung und Umwandlung zu einem gelben Reaktionsprodukt bei 450 nm spektralphotometrisch bestimmt. Durch die lineare Gegenüberstellung der Standardreihendaten mit den eingesetzten Konzentrationen ließ sich ein Umrechnungsfaktor errechnen. Dieser diente dazu, die Absorptionsdaten der Proben in Interleukin-Konzentrationen umzurechnen.

2.8 *Western Blot*

2.8.1 Gewinnung der Zelllysate

Zur Gewinnung der Zelllysate nach einer Zinkchloridbehandlung (Inkubationszeit: 96 h) wurden die Ko-Kultur-Modelle zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die

Endothelzellschicht auf der einen Seite der Membran mit Hilfe eines Baumwollgewebes durch vorsichtiges Reiben abgetragen. Dann wurden die Wellunterseiten mit Parafilm versiegelt. Die Lyse der Epithelzellen erfolgte durch apikale Zugabe von je 50 µl Lyse-Puffer und anschließender schüttelnder Inkubation für 2 h bei 4°C. Der Lyse-Puffer setzte sich dabei wie folgt zusammen:

- 100 mM Glycin-Puffer pH 9,6
- 100 mM NaCl
- 1 mM MgCl₂
- 1 % Nonidet P-40
- 1 Tablette *complete* Protease-Inhibitor

Die Lysate wurden nach der Lyse bis zur Benutzung bei -20°C gelagert.

2.8.2 Proteinbestimmung

Um sicherzustellen, dass alle Proben mit der gleicher Gesamtproteinmenge (16 µg) auf das Gel (siehe Abschnitt 2.8.3) aufgetragen werden, wurde zuvor die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Dies erfolgte mit Hilfe des *BC Assay*-Kits, welches auf der Proteinquantifizierungsmethode mittels Bicinchoninsäure beruht [81]. Zur Vorbereitung wurden die Proben 1:4 mit Lyse-Puffer verdünnt und in eine 96-Well-Platte überführt. Zusätzlich zu den verdünnten Lysaten wurde ebenfalls eine zuvor hergestellte Konzentrationsreihe (25 - 750 µg/ml) eines Standardproteins (im *BC Assay* -Proteinbestimmungs-Kit enthalten) auf die Platte aufgetragen. Alle Proben (Lysate und Standards) wurden in technischen Triplikaten in die Platte pipettiert. Im nächsten Schritt wurden *Reagent A* und *Reagent B* gemäß Kit-Anleitung 50 + 1 vermischt und auf die Platte überführt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Absorption der Proben bei 562 nm vermessen. Die Proteinkonzentrationen der Lysate ließen sich dann mit Hilfe des Steigungsfaktors der Standardgerade berechnen.

2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung der Proteine im Zelllysate nach ihrer Molekülgröße. Dieser Vorgang geschieht in einem Polyacrylamid-Gel, dessen Porengröße bei der Herstellung des Gels durch Verdünnung

der Ausgangssubstanzen Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (zur Ausbildung von Quervernetzungen) festgelegt werden kann. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden vorgefertigte Gele der Firma Life Technologies verwendet. Diese zeichneten sich durch einen gradierten Konzentrationsverlauf (4 % - 12 %) aus. So mussten die Proteine bei Ihrer Wanderung zur Anode immer kleinere Poren passieren, was ihre Auftrennung nach ihrer Molekülgröße fördert.

Um die gleichmäßige Wanderung der Proteine zu gewährleisten, wurde das Lysat vor dem Beladen auf das Gel mit Probenpuffer versetzt und anschließend 5 min bei 96°C inkubiert. Der Probenpuffer wurde wie folgt hergestellt (6-fache Konzentration):

- 2,4 ml 1 M Tris-HCl-Lösung mit pH 6,8
- 960 mg SDS
- 4,8 ml Glycerol
- 740 mg DTT
- 4,8 mg Bromphenolblau

Durch die Inhaltsstoffe des Probenpuffers wurden die Proteine zum einen mit dem negativ geladenen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen, was zu einer stark negativen Gesamtnettoladung der Proteinmoleküle führte, und zum anderen wurden die Disulfidbrücken innerhalb und unter den Proteinmolekülen mit Hilfe des Reduktionsmittels DL-Dithiothreitol (DTT) gespalten, so dass letztlich alle Proteinmoleküle als gestreckte Polypeptidketten vorlagen. Die beschriebenen Reaktionen wurden durch die Erhitzung des Gemisches im Heizblock beschleunigt.

Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte in einer XCell SureLock™ Kammer mit einer angelegten konstanten Spannung von 120 V für 90 min. Als Laufpuffer wurde der zugehörige, vorgefertigte *SDS-Running Buffer* verwendet.

2.8.4 Blotten

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die nach wie vor durch SDS negativ geladenen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, die zwischen Gel und Anode gelegt wurde, transferiert. Die Membran ist durchlöchert mit feinen Poren (0,2 µm), um einen Stromfluss zu gewährleisten. Die Proteine wurden durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membranoberfläche fest gebunden.

Dieser Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte in einer Mini Trans-Blot® Kammer mittels eines Stromflusses mit einer konstanten Stromstärke von 110 mA für 120 min. Als Transferpuffer wurde der zugehörige, vorgefertigte NuPage® *Transfer Buffer* mit Methanol und NuPage® Antioxidant verwendet.

2.8.5 Immunologische Detektion der Zielbanden

Nach dem *Blotten* wurde die Membran zwei Mal in PBS gewaschen und anschließend 1 Stunde in *Odyssey Blocking Buffer* schüttelnd inkubiert. Während dieses Blockierungsschrittes wurden ungesättigte Bindungsstellen auf der Membran mit Proteinen aus der Blockierungslösung abgedeckt, so dass die im nachfolgenden Schritt eingesetzten Antikörper nicht unspezifisch an der Membran binden konnten.

Die Primärantikörper, welche spezifisch an ein bestimmtes Zielprotein binden, wurden in *Odyssey Blocking Buffer* entsprechend der Tabelle verdünnt (siehe Tabelle 2-3). Die Inkubation der Membranen mit den Primärantikörpern fand schüttelnd über Nacht bei 4°C statt. Danach wurden die Membranen drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit den Sekundärantikörpern inkubiert (schüttelnd bei Raumtemperatur für 2 h).

Die Detektion der Banden erfolgte über Fluorophore, welche an die Sekundärantikörper gekoppelt sind. Mit Hilfe eines speziellen Infrarotscanners (Odyssey) konnten diese Fluorophore per Laser angeregt werden und anschließend gescannt werden.

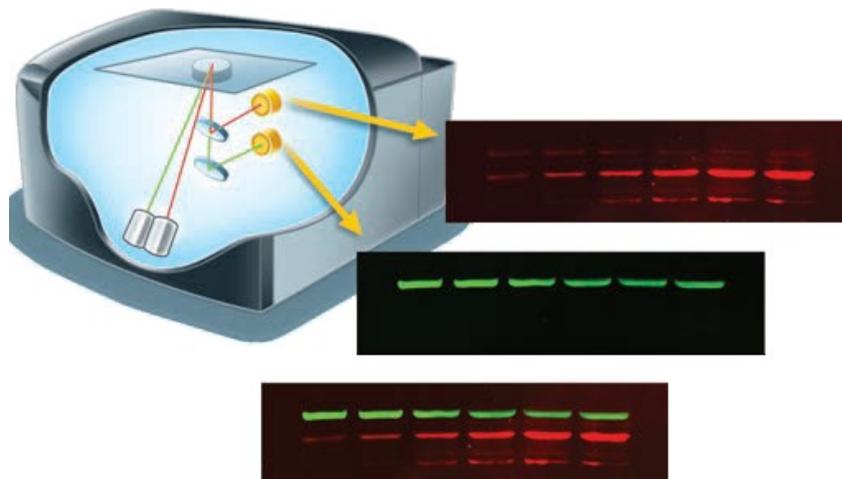


Abbildung 2-4: Detektion zweier unterschiedlicher Infrarot-Fluorophore mit Hilfe des Odyssey-Scanners (Abbildung entnommen aus *Odyssey® Family of Imaging Systems* Broschüre [82])

Dabei ist es möglich unterschiedliche Fluorophore (IRDye® 680CW und IRDye® 800CW) auf einer Membran zu detektieren (siehe Abbildung 2-4).

2.9 Apoptosis Array

Die Analyse der Proben mit Hilfe des *Proteome Profiler™ Human Apoptosis Arrays* erfolgte grundsätzlich gemäß der Herstellerangaben. Jedoch erfolgte die Detektierung der Proteinspots mit Hilfe des Infrarotscanners (Odyssey). Dies bedingte eine Änderung des Protokolls der Gebrauchsanweisung.

Die Kits enthalten folgende Komponenten:

- *Lysis Buffer 15* (gebrauchsfertig nach Zugabe von 1 Tablette *complete* Protease-Inhibitor auf 10 ml)
- *Array Buffer 1* (gebrauchsfertig)
- *Array Buffer 2* (Herstellung von *Array Buffer 2/3* durch Mischen von 2 ml *Array Buffer 2* mit 8 ml *Array Buffer 3*)
- *Array Buffer 3* (siehe *Array Buffer 2*)
- *Detection Antibody Cocktail* (in 100 µl destilliertem Wasser rekonstituieren)
- *Wash Buffer Concentrate* (Verdünnung von 40 ml *Wash Buffer Concentrate* in 960 ml destilliertem Wasser)
- 4-Kammer-Platten
- Nitrozellulosemembranen mit Proteinspots

2.9.1 Gewinnung der Zelllysate

Zur Gewinnung der Zelllysate nach einer Zinkchloridbehandlung (Inkubationszeit: 72 h) wurden die Ko-Kultur-Modelle zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Endothelzellschicht auf der einen Seite der Membran mit Hilfe eines Baumwollgewebes durch vorsichtiges Reiben abgetragen. Dann wurden die Wellunterseiten mit Parafilm versiegelt. Die Lyse der Epithelzellen erfolgte durch apikale Zugabe von je 50 µl Lyse-

Puffer und anschließender schüttelnder Inkubation für 2 h bei 4°C. Der Lyse-Puffer setzte sich dabei wie folgt zusammen:

- 10 ml *Lysis Buffer 15* (im Apoptosis Array Kit enthalten)
- 1 Tablette *complete* Protease-Inhibitor

Die Lysate wurden nach der Lyse gepoolt (Kontrollproben n = 14, ZnCl₂-behandelte Proben (500 µM und 1000 µM) jeweils n = 8) und bis zur Benutzung bei -20°C gelagert.

2.9.2 Proteinbestimmung

Um sicherzustellen, dass alle Proben mit der gleichen Gesamtproteinmenge (200 µg) auf die Array Membranen aufgetragen werden, wurde zuvor die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Dies erfolgte mit Hilfe des *BC Assay*-Kits, wie schon im Abschnitt 2.8.2 beschrieben wurde.

2.9.3 Färbung und Analyse der Apoptosis Array Membranen

Im ersten Schritt erfolgte die Blockierung der Membranstreifen mit *Array Buffer 1* in der 4-Kammer-Platte schüttelnd (50 rpm) für eine Stunde. Anschließend wurden die Proben mit *Lysis Buffer 15* verdünnt. Dabei wurden die Proben mit Hilfe der durch die Proteinbestimmung errechneten Werte auf 200 mg in 250 µl verdünnt und mit 1,25 ml *Array Buffer 1* aufgefüllt. Nach dem Abschütten der Blockierungslösung wurden die Membranstreifen mit den verdünnten Proben in der 4-Kammer-Platte schüttelnd (50 rpm) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine dreimalige Waschung der Membranen mit *Wash Buffer*. Im nächsten Schritt wurden die Membranen mit verdünntem *Detection Antibody Cocktail* (15 µl *Detection Antibody Cocktail* ad 1,5 ml *Array Buffer 2/3*) in der 4-Kammer-Platte schüttelnd (50 rpm) für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine dreimalige Waschung der Membranen mit *Wash Buffer*. Anschließend wurden die Membranen mit verdünntem Streptavidin IRDye 800CW (3,75 µl Streptavidin IRDye 800CW ad 15 ml *Array Buffer 2/3*) in der 4-Kammer-Platte schüttelnd (50 rpm) für eine halbe Stunde unter Lichtausschluss inkubiert. Danach erfolgte eine letzte dreimalige Waschung der Membranen mit *Wash*

Buffer. Das Scannen der Membranen wurde mit Hilfe des Infrarotscanners Odyssey durchgeführt.

Die Analyse der eingescannten Membranen erfolgte mit Hilfe der Software *Array Pro Analyzer 4.5* von Media Cybernetics (Rockville, USA).

2.10 Statistik

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden aus allen Messdaten, die in unabhängigen Experimentwiederholungen ermittelt wurden, die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichungen bestimmt. Unter Zuhilfenahme von drei Normalitätstests (Kolmogorow-Smirnow-Test, D'Agostino-Pearson-Omnibus-Test, Shapiro-Wilk-Test) wurde bestimmt, ob die Messdaten eine Gauß-Verteilung aufwiesen. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde für die Ergebnisse, die eine Gauß-Normalverteilung zeigten, eine einfaktorische ANOVA (*analysis of variance*) und für Ergebnisse, die nicht normalverteilt waren, ein Kruskal-Wallis-Test angewandt. Als Post-Hoc-Tests wurden der Bonferroni-Post-Hoc-Test für Resultate einer einfaktorischen ANOVA und der Dunn-Post-Hoc-Test für die Resultate eines Kruskal-Wallis-Tests verwendet. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

Die Analyse der TER-Werte, ermittelt in Kadmiunchlorid-Experimenten mit und ohne Kalziumchlorid-Supplementierung (siehe Abschnitt 3.2.5), erfolgte mittels einer zweifaktoriellen ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Post-Hoc-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Versuche mit Zinkchlorid

3.1.1 Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration von ZnCl₂ an Monokulturen von NCI H441 und Iso-Has-1

Es konnte eine mittlere effektive Konzentration von ZnCl₂ (Inkubationszeit von 24 h) an NCI H441 von rund 476 µM und an Iso-Has-1 von rund 444 µM mittels eines Vitalitätstests (MTS-Test) ermittelt werden (siehe Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: EC₅₀-Werte von Zink behandelten NCI H441- und Iso-Has-1-Zellen in Monokultur (jeweils n=20)

| Zelllinie | EC ₅₀ -Wert [µM] |
|-----------|-----------------------------|
| NCI H441 | 476,1 ± 7,3 |
| Iso-Has-1 | 443,9 ± 13,6 |

3.1.2 Beeinflussung des TERs durch die Behandlung mit ZnCl₂

Bei einer apikalen Applikation von ZnCl₂ (50 - 2000 µM) über 24 Stunden konnte eine signifikante Zunahme des TERs detektiert werden (siehe Abbildung 3-1 A). So wurden TER-Werte von bis zu 155 % der Grundlinie bei einer Zinkkonzentration von 200 µM erreicht. Bei steigender Zinkkonzentration stagniert dieser Effekt, so dass bei sehr hohen Zinkkonzentrationen von 2000 µM ein signifikant geringerer TER-Wert von 106 % der Grundlinie in Bezug zu den Kontrollen (127 % der Grundlinie) detektiert werden konnte. Nach insgesamt 48 Stunden Inkubation konnte eine verstärkte Zunahme des TERs bei mittleren Zinkkonzentrationen beobachtet werden (siehe Abbildung 3-1 B). Hier erreichten die vergifteten Proben Werte von bis zu 146 % der Grundlinie, während die Kontrolle nur einen Widerstandswert von 75 % der Grundlinie aufwies. Im Gegensatz zu den 24-Stunden-Werten blieb der Wert der 2000 µM-Probe auf Niveau der Kontrolle (74 % der Grundlinie).

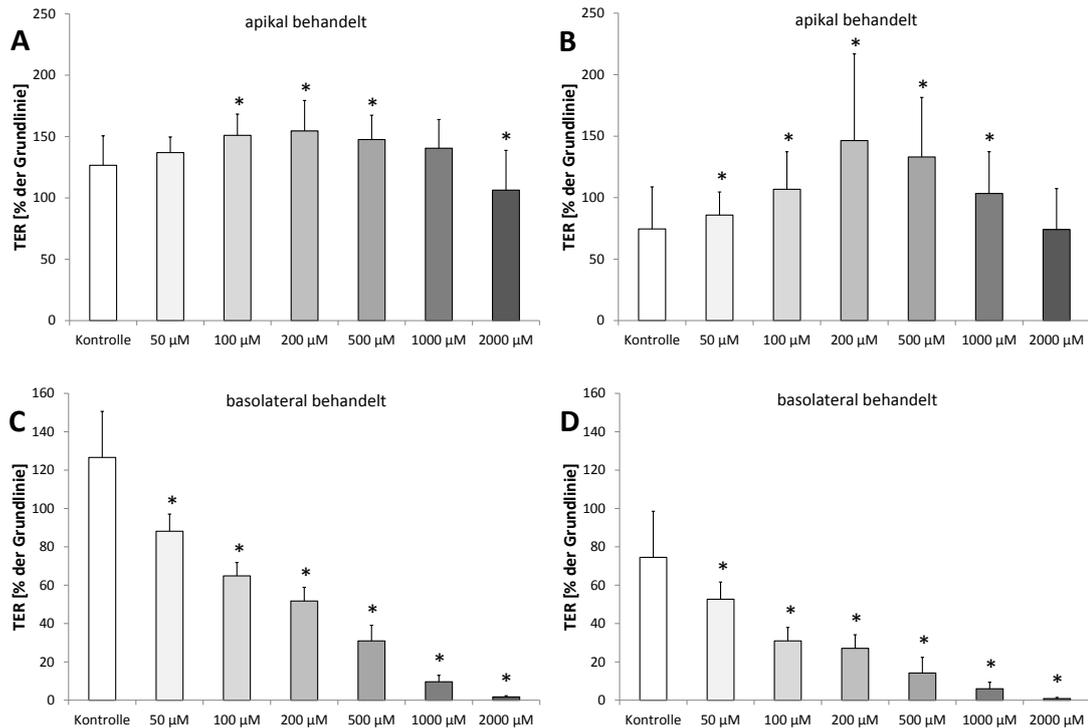


Abbildung 3-1: TER-Entwicklung unter Zinkchlorid-Einfluss nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 h: Die Werte entsprechen % der Grundlinie, dabei wurden die Widerstandswerte zu den entsprechenden Messzeitpunkten mit den Ausgangswerten vor der Vergiftung ins Verhältnis gesetzt. **A** – 24-stündige apikale Vergiftung, **B** – 48-stündige apikale Vergiftung, **C** – 24-stündige basolaterale Vergiftung, **D** – 48-stündige basolaterale Vergiftung. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n \geq 25$. * – signifikant verschieden ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Bei einer basolateralen Vergiftung mit unterschiedlichen Konzentrationen an $ZnCl_2$ (50 - 2000 μM) konnte sowohl nach 24 Stunden (siehe Abbildung 3-1 C) als auch nach 48 Stunden (siehe Abbildung 3-1 D) eine konzentrationsabhängige, signifikante Abnahme des TERs verzeichnet werden. Dabei fiel der TER auf $\leq 2\%$ der Grundlinie bei einer $ZnCl_2$ -Konzentration von 2000 μM .

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die unterschiedlichen Expositionsarten erhebliche Unterschiede in der Entwicklung des TERs verursachten. Dabei bewirkte die apikale Vergiftung eine Erhöhung und die basolaterale Vergiftung ein Absenken des Barrierewiderstandes im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.3 Effekte von Zinkchlorid auf den parazellularen Transport

Der TER wird ausschließlich durch den Transport von Ionen durch die zelluläre Barriere beeinflusst. Zur Erfassung von Transportdaten von Makromolekülen und zur Verifizierung der TER-Daten, wurde die parazelluläre Diffusionsrate von Natriumfluoreszein von der apikalen zur basolateralen Seite bestimmt. Mit Hilfe dieser Daten konnte der scheinbare (*apparent*) Permeabilitätskoeffizient P_{app} berechnet werden. Diese Werte sollten bei einer erfolgreichen Verifizierung der TER-Daten in einem umgekehrten Verhältnis zu jenen stehen.

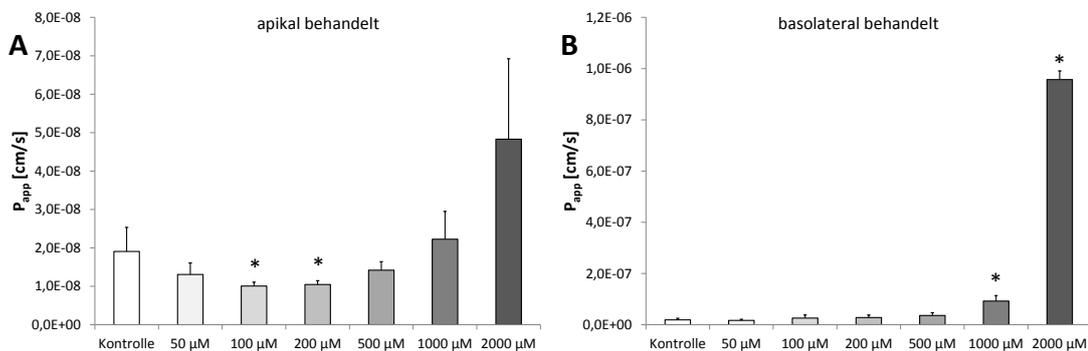


Abbildung 3-2: Auswirkungen von Zinkchlorid auf den parazellularen Transport von Natriumfluoreszein durch die Ko-Kultur-Barriere nach einer Inkubation von 48 h: Die Werte entsprechen dem scheinbaren (*apparent*) Permeabilitätskoeffizienten P_{app} . **A** – apikale Vergiftung, **B** – basolaterale Vergiftung. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n \geq 7$. * – signifikant verschieden ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Im Allgemeinen zeigten die Permeabilitätskoeffizient-Daten (siehe Abbildung 3-2) einen annähernd umgekehrt-proportionalen Verlauf zu den gesammelten TER-Daten (siehe Abbildung 3-1). Dabei wiesen die Permeabilitätskoeffizient-Daten bei Zinkkonzentrationen von 100 und 200 μM (apikal) eine signifikante Abnahme auf (siehe Abbildung 3-1A). Im Gegensatz dazu nehmen die P_{app} -Werte nach einer 48-stündigen basolateralen Vergiftung mit hohen ZnCl_2 -Konzentrationen ($\geq 1000 \mu\text{M}$) sehr stark zu (siehe Abbildung 3-2 B). So stiegen die Permeabilitätskoeffizienten signifikant auf das 4-fache (1000 μM) bis 50-fache (2000 μM) in Bezug zur Kontrolle an.

3.1.4 Schädigung der zellulären Barriere durch Zinkchlorid

Mit Hilfe immunhistologischer Färbungen wurde der Einfluss von Zinkionen auf die *Adherens* und *Tight junctions* näher untersucht.

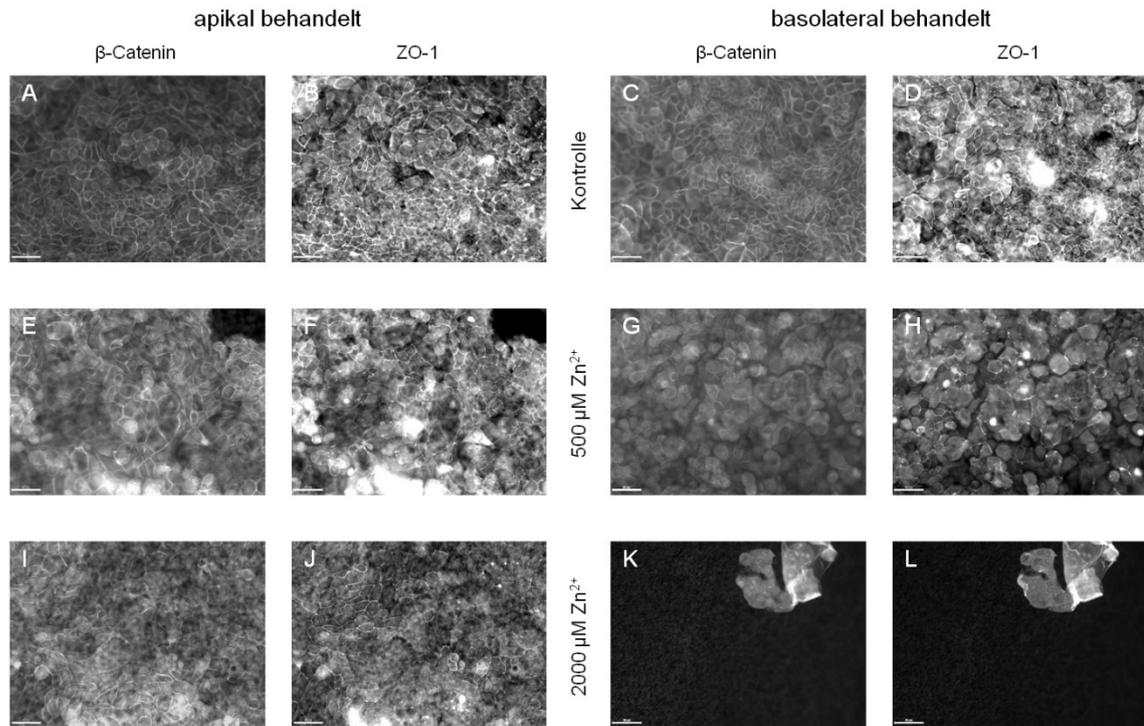


Abbildung 3-3: Immunfluoreszenzfärbungen der apikalen Seite (Epithel) von ZnCl_2 -behandelten Ko-Kultur-Modellen (Inkubationszeit 48 h): 1. und 3. Spalte – Markierung des *Adherens junction*-Proteins β -Catenin, 2. und 4. Spalte – Markierung des *Tight junction*-Proteins ZO-1. **A-D** – unbehandelte NCI H441-Zellen (Kontrollen), **E-H** – mit $500 \mu\text{M}$ ZnCl_2 behandelte NCI-H441-Zellen, **I-L** – mit $2000 \mu\text{M}$ ZnCl_2 behandelte NCI H441-Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht $50 \mu\text{m}$.

Im Mikroskop zeigte sich bei den Kontrollen eine netzartige Verteilung der markierten Zell-Zell-Kontaktproteine (siehe Abbildung 3-3 A-D). Die apikal mit ZnCl_2 behandelten Proben zeigten durchweg eine konfluente, intakte Zellschicht (siehe Abbildung 3-3 E+F und I+J). Ganz andere Ergebnisse konnten für die basolateral vergifteten Proben gewonnen werden. Hier zeigten schon moderate Zinkkonzentrationen ($500 \mu\text{M}$) eine beginnende Schädigung der Epithelzellschicht (siehe Abbildung 3-3 G+H). In beiden Färbungen zeigten sich Lücken zwischen den Zellen (dunkle Stellen zwischen den Zellen). Die Zerstörung der Barriere und der kompletten Zellschicht konnte vor allem bei den Proben nachgewiesen werden, die mit $2000 \mu\text{M}$ ZnCl_2 über 48 Stunden basolateral behandelt wurden (siehe Abbildung 3-3 K+L). Auf diesen Filtermembranen waren nur noch vereinzelt Zellen aufzufinden. Nahezu alle Zellen wurden durch die

Zinkbehandlung zerstört oder löst sich aus dem Zellverband und von der Filtermembran ab.

3.1.5 Zytotoxizitätsstudien mit Zinkchlorid an Ko-Kultur-Modellen

Zur Analyse der zytotoxischen Effekten von Zinkchlorid wurde die Zellvitalität per MTS-Test nach einer Behandlung mit ZnCl_2 über beide Expositionswegen bestimmt.

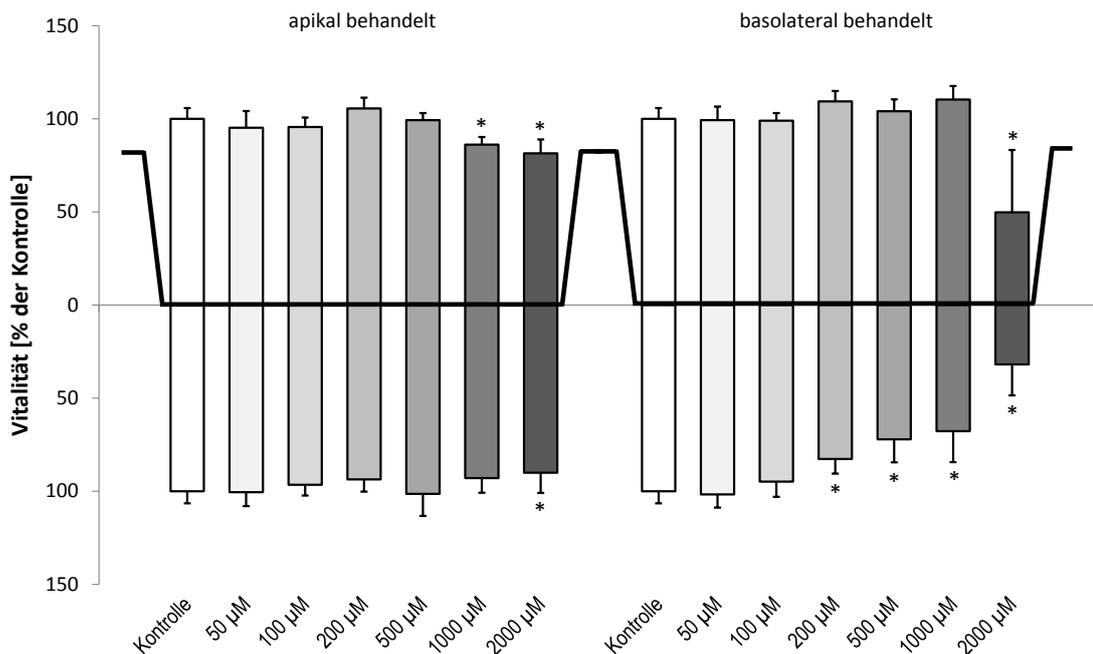


Abbildung 3-4: Zellvitalität der Epithelzellen (NCI H441, oberhalb der x-Achse im schematischen Well) und Endothelzellen (Iso-Has-1, unterhalb der x-Achse) des Ko-Kultur-Modelles nach einer Vergiftung mit unterschiedlichen ZnCl_2 -Konzentrationen mit einer Inkubationszeit von 48 h. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n \geq 8$. * – signifikant verschieden ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Die Vitalitätswerte der apikal vergifteten Proben zeigen eine geringe, wenn auch signifikante Änderung der Vitalität (siehe Abbildung 3-4 links). So sinkt die Vitalität der Epithelzellen unter Einfluss von 1000 und 2000 μM ZnCl_2 auf 86 % bzw. 81,5 % des Kontrollwertes ab. Die Endothelzellen verlieren bei 2000 μM apikalem Zinkchlorid um rund 17 % an Vitalität in Vergleich zur Kontrolle.

Nach einer Zinkchloridvergiftung über die basolaterale Seite kommt es zu Abnahmen der Zellvitalität (siehe Abbildung 3-4 rechts). Während eine zytotoxische Wirkung von Zinkchlorid an den Epithelzellen nur bei einer basolateralen Konzentration von 2000 μM

(50 % Vitalität der Kontrolle) zu sehen ist, verringert sich die Vitalität der Endothelzellen ab einer Konzentration von 200 μM signifikant und konzentrationsabhängig bis zu einer Restvitalität von 31,9 % im Bezug zur Kontrolle (2000 μM ZnCl_2).

3.1.6 Einfluss von Zinkchlorid auf die Ausschüttung von proinflammatorischen Faktoren

In den folgenden Analysen wurde untersucht, ob Zinkchlorid die Ausschüttung von proinflammatorischen Markerproteinen an der alveolaren Barriere auslösen kann. Dazu wurde die Ausschüttung der Interleukine-6 und -8 im oberen und unteren Kompartiment einer Ko-Kultur quantitativ erfasst, nachdem die Proben zuvor 48 Stunden lang mit unterschiedlichen Zinkchloridkonzentrationen behandelt wurden. Insgesamt konnte bei beiden Expositionsarten, trotz einer Tendenz nach basolateraler Behandlung, keine signifikante Änderung der IL-6-Konzentration im unteren Kompartiment beobachtet werden (siehe Abbildung 3-5).

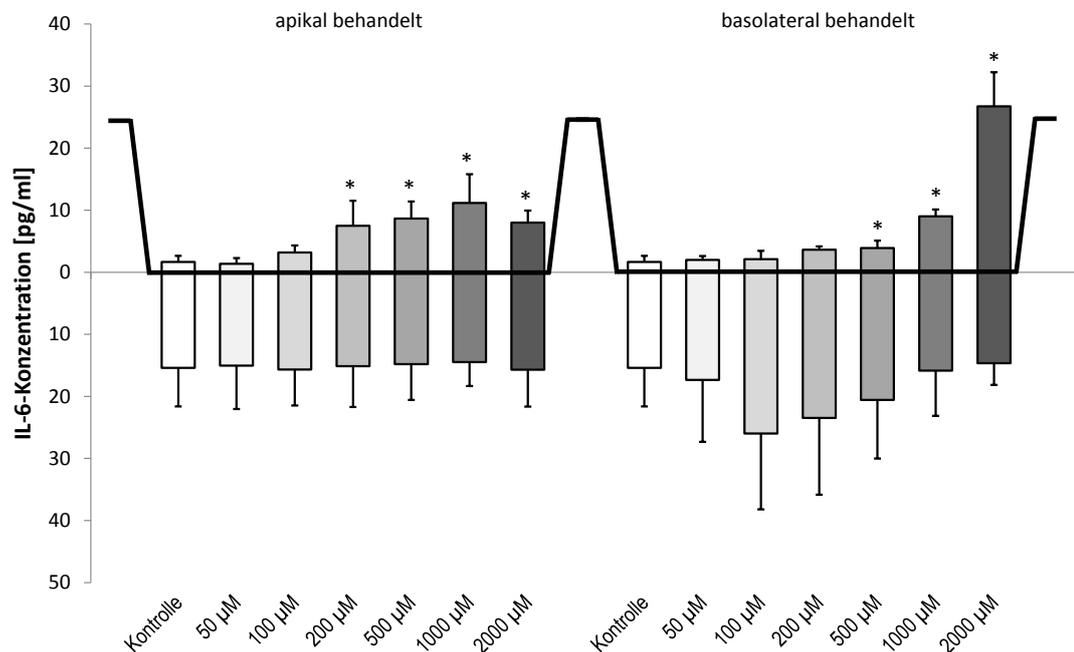


Abbildung 3-5: Ausschüttung von Interleukin-6 seitens der Epithelzellen (NCI H441, oberhalb der x-Achse im schematischen Well) und seitens der Endothelzellen (Iso-Has-1, unterhalb der x-Achse) nach einer 48-stündigen Vergiftung des Ko-Kultur-Modelles mit unterschiedlichen ZnCl_2 -Konzentrationen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n \geq 6$. * – signifikant verschieden ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Im oberen Kompartiment der Epithelzellen wurde jedoch nach einer apikalen Behandlung mit Zinkchlorid eine signifikante Erhöhung des IL-6-Gehaltes gemessen. So stieg die ausgeschüttete Menge an IL-6 ab einer ZnCl_2 -Konzentration von $200 \mu\text{M}$ konzentrationsabhängig an. Die höchste Ausschüttung von IL-6 wurde bei $1000 \mu\text{M}$ (ZnCl_2) mit einem Wert von $11,16 \text{ pg/ml}$ (IL-6) erreicht. Eine weitere Erhöhung der Zinkchloridkonzentration auf $2000 \mu\text{M}$ führte jedoch wieder zu einer Abnahme des IL-6-Gehaltes im Mediumüberstand (siehe Abbildung 3-5 links).

Basolateral vergiftete Proben zeigten dagegen erst ab $500 \mu\text{M}$ ZnCl_2 eine signifikante Erhöhung der IL-6-Konzentration, die konzentrationsabhängig bis zum 16-fachen ($26,75 \text{ pg/ml}$) des Kontrollwertes anstieg (siehe Abbildung 3-5 rechts).

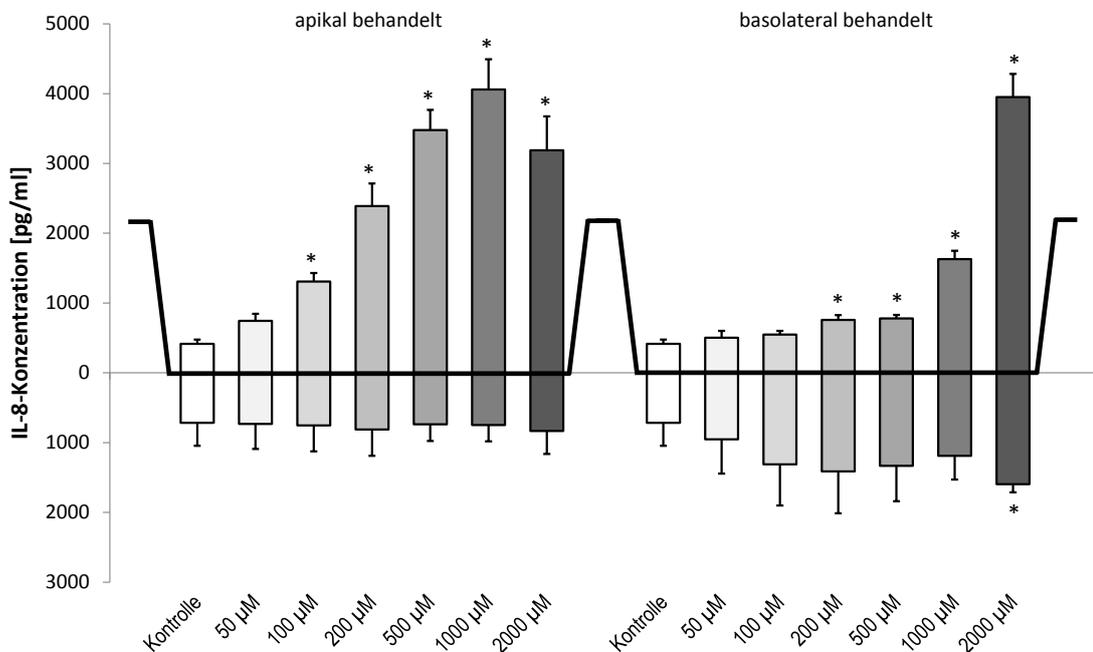


Abbildung 3-6: Ausschüttung von Interleukin-8 seitens der Epithelzellen (NCI H441, oberhalb der x-Achse im schematischen Well) und seitens der Endothelzellen (Iso-Has-1, unterhalb der x-Achse) nach einer 48-stündigen Vergiftung des Ko-Kultur-Modelles mit unterschiedlichen ZnCl_2 -Konzentrationen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n \geq 6$. * – signifikant verschieden ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Die Ergebnisse der IL-8-Tests zeigen ein ähnliches Muster. Hier konnten nach einer apikalen Behandlung mit ZnCl_2 keine signifikanten Unterschiede im unteren Kompartiment gemessen werden. Nur eine basolaterale Zinkchloridkonzentration von

2000 μM bewirkte einen signifikanten Anstieg des IL-8-Gehaltes auf über das Doppelte (1595 pg/ml) des Kontrollwertes (siehe Abbildung 3-6 links).

Apikale und basolaterale Behandlungen mit Zinkchlorid bewirkten über beide Expositionswege eine konzentrationsabhängige Zunahme der IL-8-Ausschüttung der Epithelzellen (siehe Abbildung 3-6). So konnte bei einer apikalen Vergiftung ab 100 μM ZnCl_2 eine signifikante Zunahme verzeichnet werden, die mit bei 1000 μM ZnCl_2 ein Maximum von 4060 pg/ml IL-8 erreichte (siehe Abbildung 3-6 links). Eine basolaterale Applikation von Zinkionen bewirkte erst ab einer Konzentration von 200 μM eine konzentrationsabhängige und signifikante Erhöhung der IL-8-Konzentration bis zu einem Maximum von 3952 pg/ml IL-8 bei 2000 μM ZnCl_2 (siehe Abbildung 3-6 rechts).

3.1.7 Untersuchung von Zinkchlorid-verursachten Effekten auf Apoptosemarker

Um den zytotoxischen Effekten einer Zinkchlorid-Exposition auf den Grund zu gehen, wurden die Lysate von ZnCl_2 -behandelten Ko-Kultur-Modellen mit Hilfe des *Proteome Profiler™ Human Apoptosis Arrays* analysiert.

Sechs der 35 getesteten Apoptosemarker zeigten einen konzentrationsabhängigen Effekt, der ebenso von der Art der Behandlung (apikal oder basolateral) beeinflusst wurde (siehe Abbildung 3-7). Alle anderen getesteten Apoptosemarker zeigten ein unregelmäßiges Expressionsmuster, welches keine signifikanten Unterschiede zwischen apikal und basolateral behandelten Proben aufwies (Daten nicht gezeigt).

Nach Betrachtung der Expression der Apoptose-assoziierten Proteine Bax, cIAP-1, Caspin, HIF-1 alpha, Survivin und TNF RI / TNFRSF1A stieg diese nach einer basolateralen Zinkchlorid-Behandlung (1000 μM ZnCl_2) um 22 bis 55 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an. Bei einer geringeren ZnCl_2 -Konzentration (500 μM) war der Effekt weniger ausgeprägt. Bei Survivin konnte ein leichter Rückgang um 2 % zur Kontrolle beobachtet werden, während cIAP-1 und TNF RI / TNFRSF1A einen leichten Anstieg von 4 bzw. 7 % zur Kontrolle zeigten. Der Gehalt von Bax, Caspin und HIF-1 alpha im Lysat stieg dagegen um 16 bis 25 % gegenüber der Kontrolle an (siehe Abbildung 3-7).

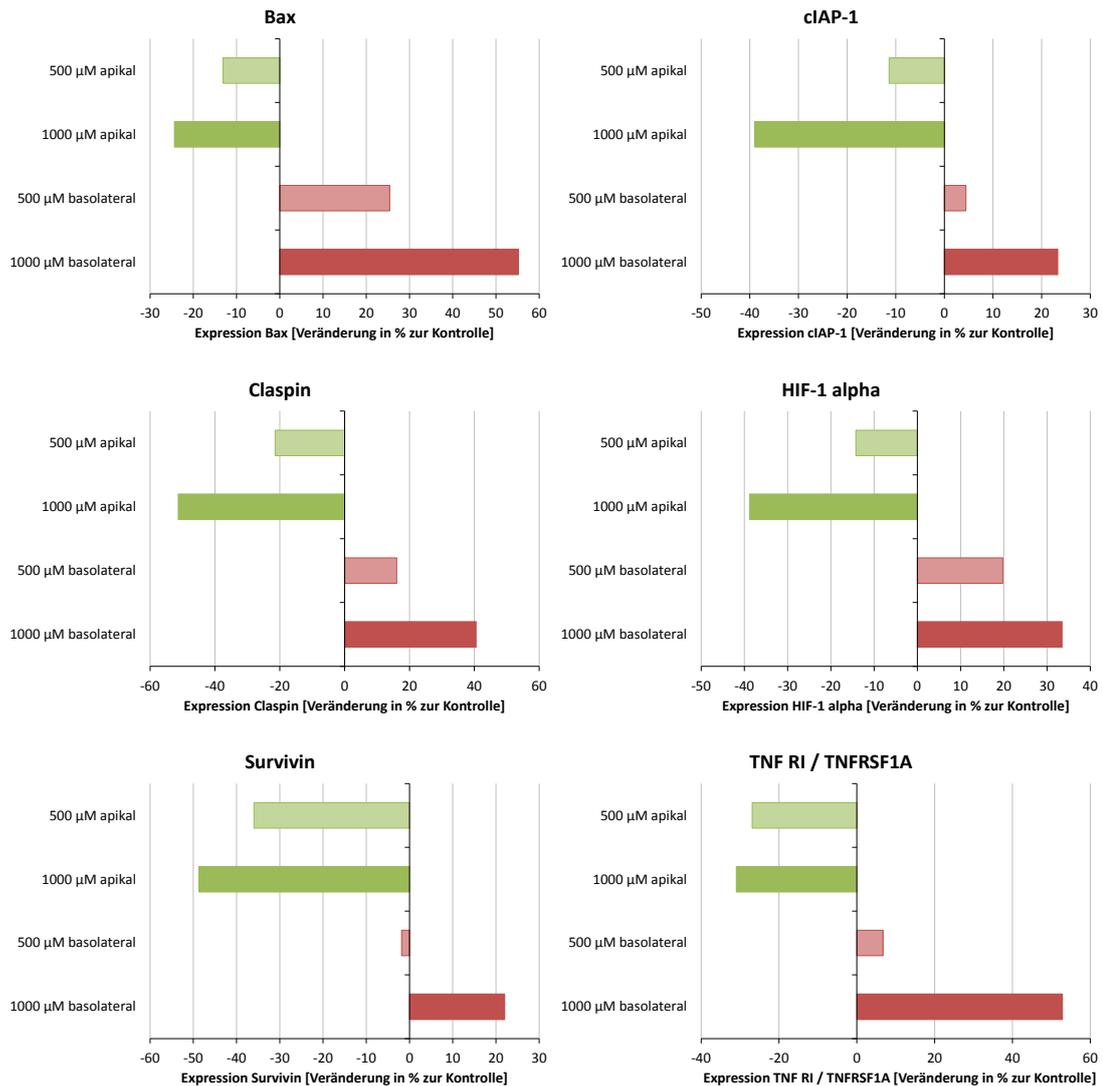


Abbildung 3-7: Ausgewählte Zielproteine des *Proteome Profiler™ Human Apoptosis Arrays*. Expression der Apoptoseproteine Bax, cIAP-1, Claspin, HIF-1 alpha, Survivin und TNF RI / TNFRSF1A in Zinkchlorid-behandelten Ko-Kultur-Modellen (Inkubationszeit: 72 h). Die gezeigten Daten sind auf eine array-interne Positiv-Kontrolle normalisierte Werte (gepoolte Proben aus $n \geq 8$ Proben).

Ein gegenteiliger Effekt konnte bei den apikal vergifteten Proben beobachtet werden. So sank die Expression der Apoptosemarker um bis zu 51 % (Claspin, 1000 µM). Wie auch bei den basolateral behandelten Proben spielt die Konzentration an Zinkchlorid eine entscheidende Rolle auf die Ausprägung des Effekts. Bei 500 µM ZnCl₂ zeigten die untersuchten Proben ein Absinken der Apoptosemarker um 11 bis 36 %. Nach einer apikalen Vergiftung mit 1000 µM reduzierte sich der Gehalt der Apoptoseproteine noch stärker im Vergleich zu Kontrolle (24 bis 51 %).

3.1.8 Expression von AJ-, TJ- und Strukturproteinen nach Langzeitbehandlung mit Zinkchlorid

Zur weiterführenden Analyse der Ursache der Integritätserhöhung (TER-Entwicklung, siehe Abschnitt 3.1.2) bzw. der Permeabilitätsabnahme (Transport-Daten, siehe Abschnitt 3.1.3) nach einer apikalen Behandlung mit Zinkchlorid (Inkubationszeit von 96 h) wurde die Expression von AJ-, TJ- und Strukturproteinen untersucht.

Wie auf Abbildung 3-8 zu sehen ist, zeigen die Expressionsdaten der AJ-Proteine E-Cadherin und β -Catenin unterschiedliche Ergebnisse. Während der Gehalt von E-Cadherin im Zelllysate bei einer Zinkchloridbehandlung von 500 und 1000 μM auf ungefähr 60 % der Kontrolle abfällt, steigt der Gehalt von β -Catenin im Zelllysate nach der Behandlung mit Zinkchlorid um über 30% (1000 μM ZnCl_2) im Vergleich zur Kontrolle an. Ein Anstieg der Expression konnte für die TJ-Proteine Claudin-3, Claudin-7 und ZO-1 nachgewiesen werden, wohingegen die TJ-Proteine Occludin und Claudin-18 eine Abnahme aufwiesen (siehe Abbildung 3-8). Claudin-3 und Claudin-7 zeigten einen leichten Anstieg auf bis zu 115 % (1000 μM ZnCl_2 ; Claudin-3) und 134 % (1000 μM ZnCl_2 ; Claudin-7) im Vergleich zur Kontrolle. Um ein Vielfaches stärker stieg der Gehalt von ZO-1 im Zelllysate an (auf bis zu 233 % (500 μM ZnCl_2) der Kontrolle). In Bezug dazu zeigten die Ergebnisse bei einer Vergiftung mit einer höheren Zinkchloridkonzentration (1000 μM) jedoch einen reduzierten Anstieg des ZO-1-Gehaltes in Bezug zur Kontrolle (149 % der Kontrolle). Bei Occludin konnte nur bei 200 und 500 μM ZnCl_2 ein leichtes Absinken (auf rund 85 % der Kontrolle) des Proteingehaltes beobachtet werden.

Die Expression des Zytoskelettstrukturproteins β -Tubulin wies nach der Vergiftung der Ko-Kultur-Modelle mit Zinkchlorid konstante Werte in Bezug zur Kontrolle auf.

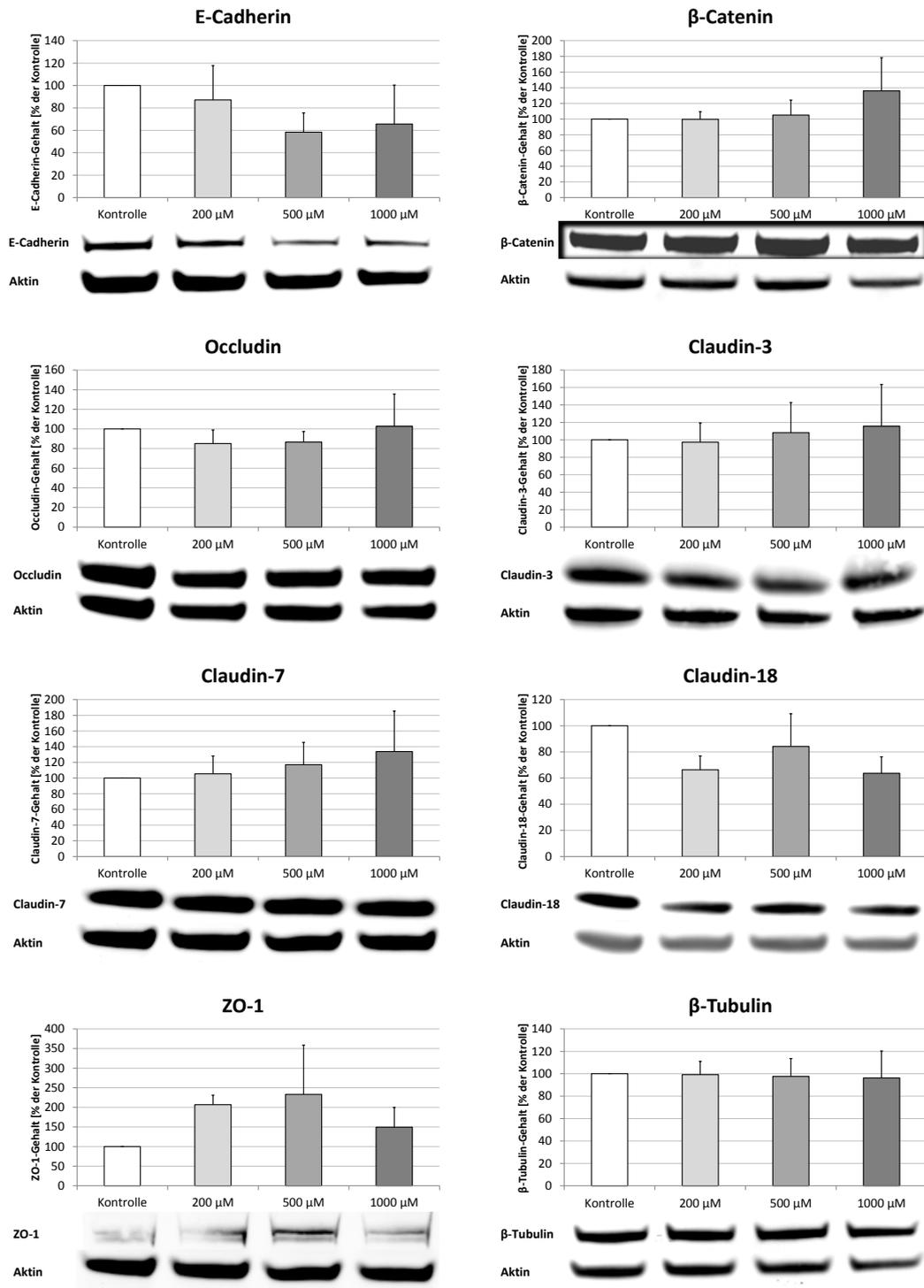


Abbildung 3-8: Expression des Strukturproteins β -Tubulin, der *Adherens junction*-Proteine E-Cadherin, β -Catenin, sowie der *Tight junction*-Proteine Occludin, Claudin-3, Claudin-7, Claudin-18 und ZO-1 in Zinkchlorid-behandelten Ko-Kultur-Modellen (Inkubationszeit: 96 h). Diagramme: Grafische Gliederung der densitometrischen Daten; die gezeigten Daten sind auf Aktin normalisierte Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n \geq 3$. Banden-Abbildung: Exemplarische Darstellung der Protein-Banden aus einem Experiment.

3.1.9 Anzeichen einer Beteiligung des *epithelial growth factor*-Rezeptors an den Effekten einer apikalen Zinkchlorid-Exposition

Wissenschaftliche Veröffentlichungen von Singh *et al.* beschreiben einen Einfluss von des Wachstumsfaktorrezeptors EGFR auf den TER einer epithelialen Barriere [83,84]. Zur Klärung, ob Zinkionen den EGFR-Rezeptor aktivieren können, wurde ein erster Versuch durchgeführt.

So wurden Ko-Kultur-Modelle apikal mit ZnCl_2 (200 μM und 2000 μM) und EGF (25 ng/ml) für 24 h exponiert. Danach erfolgte die Lyse der Proben mit einer anschließenden Analyse mittels *Western Blot*. In Abbildung 3-9 ist zu sehen, dass der Gehalt an phosphoryliertem (aktiviertem) EGF-Rezeptors nach Exposition mit 200 μM ZnCl_2 um 40 % im Vergleich zur Kontrolle ansteigt. Nach einer Exposition mit 2000 μM ZnCl_2 sinkt der Gehalt an EGFRp845 auf 57 % des Kontrollwertes ab. Die Proben, welche mit EGF (25 ng/ml) behandelt wurden, zeigen eine leichte Erhöhung des EGFRp845-Gehaltes auf 111 % der Kontrolle.

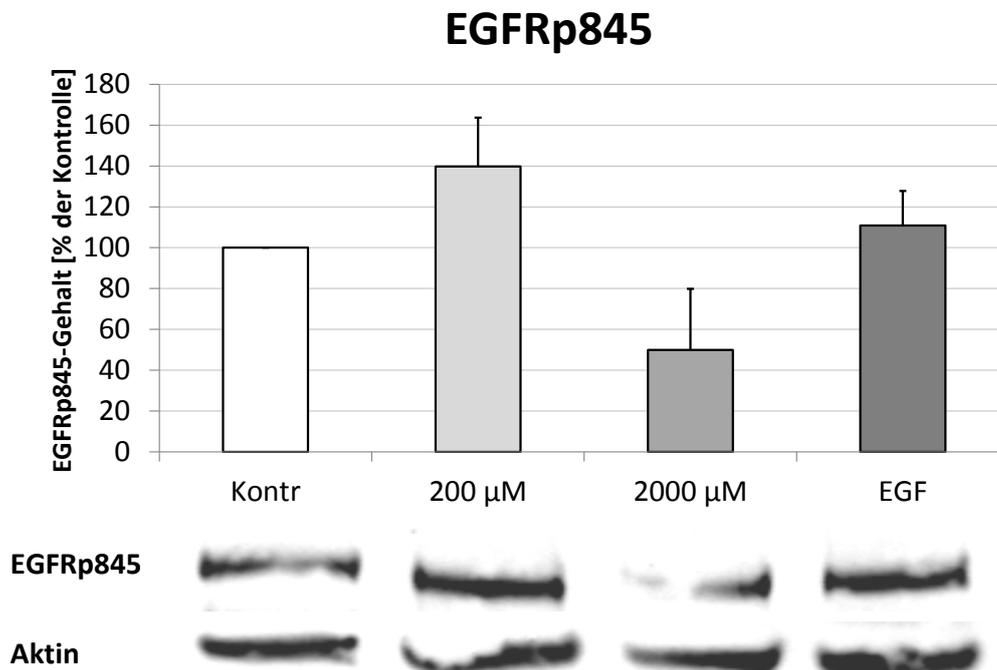


Abbildung 3-9: Expression des am Tyrosin 845 phosphorylierten EGF-Rezeptors in Zinkchlorid- bzw. EGF-behandelten Ko-Kultur-Modellen (EGF-Konzentration: 25 ng/ml, Inkubationszeit: 24 h). Diagramm: Grafische Gliederung der densitometrischen Daten; die gezeigten Daten sind auf Aktin normalisierte Werte (gepoolte Proben aus $n \geq 5$ Proben). Banden-Abbildung: Exemplarische Darstellung der Protein-Banden aus einem Experiment.

3.2 Versuche mit Kadmium

3.2.1 Effekte von Kadmiumchlorid auf die Integrität der alveolaren Barriere

Für die Versuche wurde die eine Hälfte der Modelle apikal und die andere Hälfte basolateral mit Kadmium in unterschiedlichen Konzentrationen vergiftet. Während der gesamten Inkubation von 48 Stunden wurde nach 8 h, 24 und 48 h der TER-Wert gemessen (siehe Abbildung 3-10).

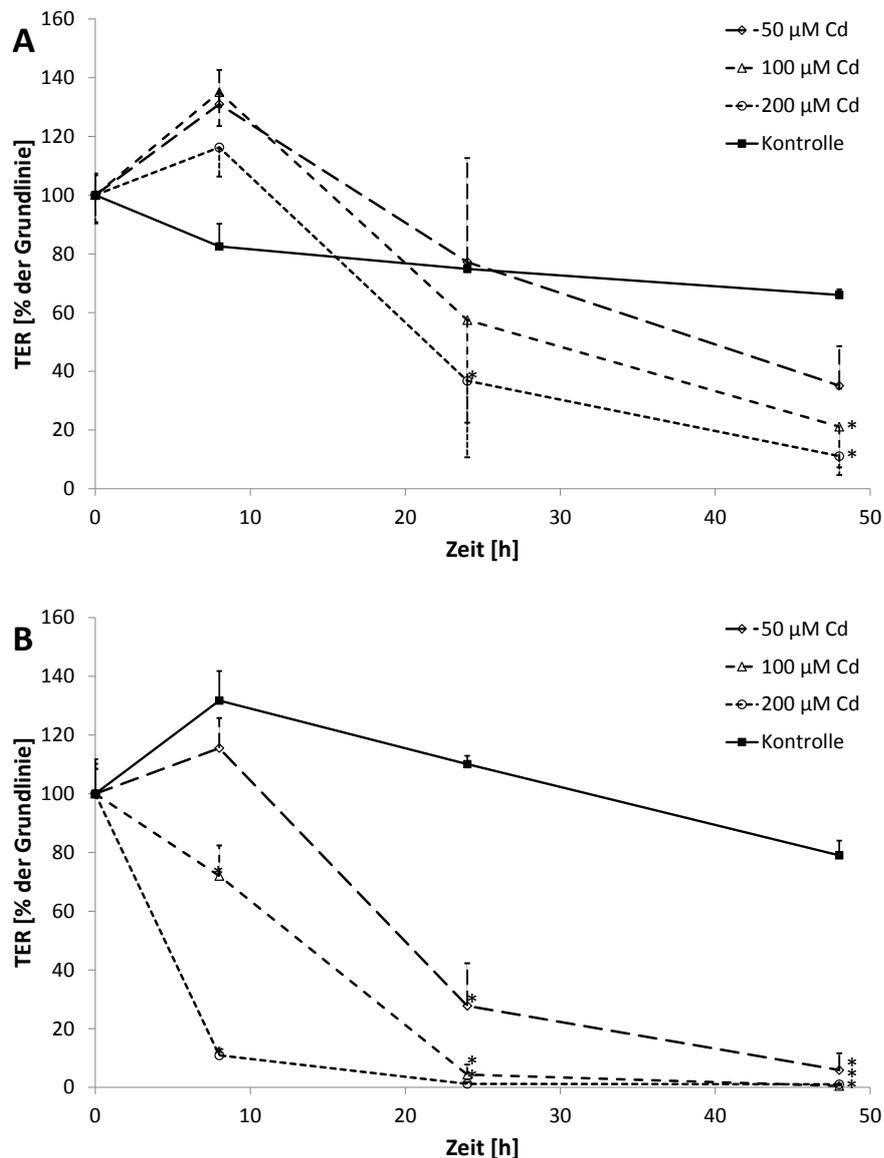


Abbildung 3-10: TER-Entwicklung unter Kadmiumchlorid-Einfluss über einen Inkubationszeitraum von 48 h: Die Werte entsprechen % der Grundlinie, dabei wurden die Widerstandswerte zu den entsprechenden Messzeitpunkten mit den Ausgangswerten vor der Vergiftung ins Verhältnis gesetzt. **A** – apikale Vergiftung, **B** – basolaterale Vergiftung. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n \geq 6$. * – signifikant verschieden ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Während die unbehandelten Kontrollen über 48 h relativ stabil blieben, mit finalen Werten von 66 % (apikale Kontrolle) bzw. 79 % der Grundlinie (basolaterale Kontrolle), sank der TER der CdCl₂-behandelten Proben konzentrationsabhängig. Die Abnahme differierte sehr deutlich zwischen den unterschiedlichen Expositionswegen. Nach 24 Stunden apikaler CdCl₂-Inkubation (50 µM, 100 µM und 200 µM) fielen die TER-Werte auf 77 %, 57 % und 36 % der Grundlinie und erreichten 35 %, 21 % und 11 % der Grundlinie nach 48 Stunden (siehe Abbildung 3-10 A). Die Barriere wurde bei geringeren Konzentrationen nach einer basolateralen Vergiftung im Unterschied zum apikalen Weg geschädigt (siehe Abbildung 3-10 B). Schon nach 8 Stunden fielen die TER-Werte signifikant auf 72 % (100 µM) und 11 % (200 µM) der Grundlinie ab.

Diese Abnahme setzte sich fort und führte zu TER-Werten von unter 6 % der Grundlinie bei hohen Kadmiumchloridkonzentrationen (100 und 200 µM) nach 24 Stunden Inkubation. Nach 48 Stunden wurde die epitheliale Barriere von allen vergifteten Proben zerstört, da alle Proben TER-Werte unter 11 % der Grundlinie aufwiesen (siehe Abbildung 3-10 B).

3.2.2 Zerstörung der *Adherens junctions* durch Kadmiumchlorid

Die Ausbildung von *Adherens junctions* ist eine grundsätzliche Voraussetzung für eine dichte epitheliale Gewebsschicht [29]. Deshalb wurden die Ko-Kultur-Modelle mittels einer Immunfluoreszenzfärbung auf die Expression von AJ-Strukturproteinen untersucht. Dabei wurde die Verteilung des AJ-Brückenproteins E-Cadherin und des Zytoskelettproteins Aktin analysiert (siehe Abbildung 3-11).

So zeigte sich, eine gleichmäßige, netzartige Verteilung dieser Proteine in den Kontrollproben (siehe Abbildung 3-11 A-D). Da E-Cadherin vorrangig in den AJs zu finden ist und da Aktin zur Stabilisierung der Zellmorphologie an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist, zeigte die Zell-Zell-Kontakte ein spezifisches Immunfluoreszenzsignal.

Nach einer Kadmiumchloridexposition über 24 h zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen den Expositionsarten. So konnte der Erhalt einer konfluenten Epithelzellschicht bei den apikal vergifteten Proben (siehe Abbildung 3-11 E+F und I+J) nachgewiesen werden. Jedoch zeigten sich bei hohen CdCl₂-Konzentrationen (200 µM)

erste Anzeichen einer Zellschädigung ausgedrückt durch eine schwächere Färbung und durch eine diffusere Verteilung der Strukturproteine (siehe Abbildung 3-11 I+J).

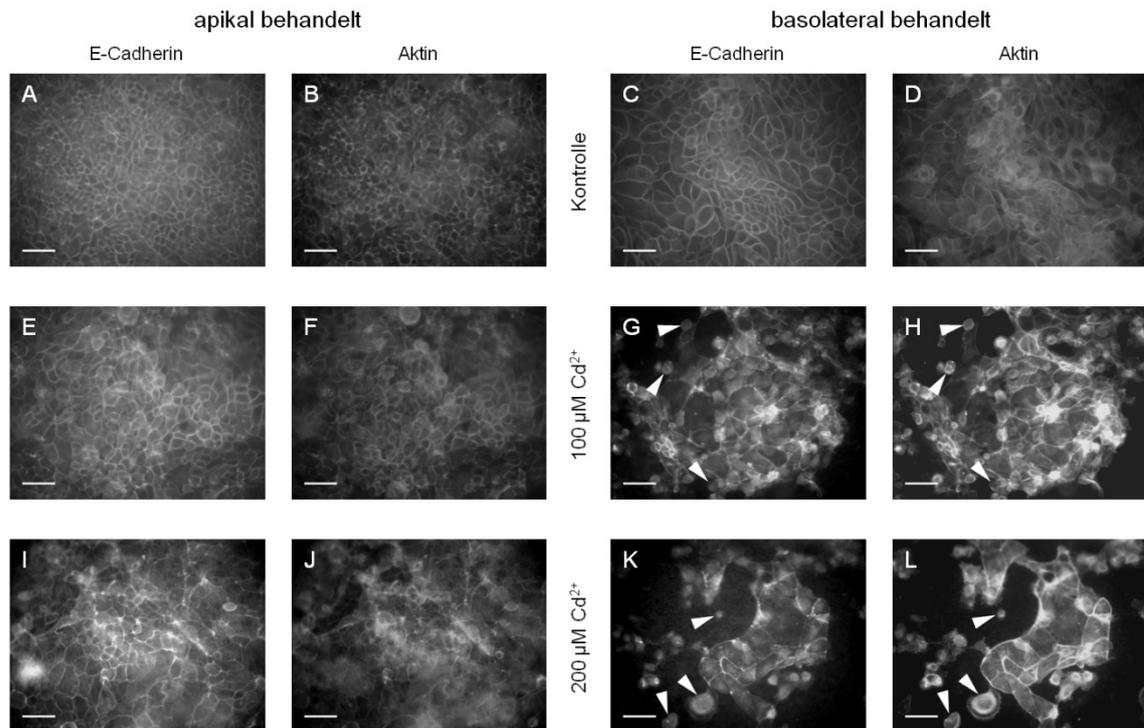


Abbildung 3-11: Immunfluoreszenzfärbungen der apikalen Seite (Epithel) von CdCl_2 -behandelten Ko-Kultur-Modellen: 1. und 3. Spalte – Markierung des *Adherens junction*-Proteins E-Cadherin, 2. und 4. Spalte – Markierung des Zytoskelettproteins Aktin. **A-D** – unbehandelte NCI H441-Zellen (Kontrollen), **E-H** – mit $100 \mu\text{M}$ CdCl_2 behandelte NCI-H441-Zellen, **I-L** – mit $200 \mu\text{M}$ CdCl_2 behandelte NCI H441-Zellen. Die Pfeile markieren abgerundete Zellen, die den Zellverband verlassen haben. Der Maßstabsbalken entspricht $50 \mu\text{m}$.

Im Gegensatz dazu verursachte die Applikation von Kadmium über die basolaterale Seite eine deutlich toxischere Wirkung. So führte eine Exposition von 100 und $200 \mu\text{M}$ CdCl_2 basolateral zu einer Fragmentierung der gesamten Zellschicht. Nach der 24-stündigen Inkubation mit Kadmium lagen die Epithelzellen nur noch in Form kleiner Inseln aus Epithelzellen vor (siehe Abbildung 3-11 G+H und K+L), wobei die Anzahl dieser Inseln bei einer Konzentration von $200 \mu\text{M}$ CdCl_2 stark reduziert wurde. Auf den mikroskopischen Aufnahmen sind auch viele Zellen zu beobachten, die sich aus dem Zellverband herausgelöst haben, und dadurch eine kugelige Morphologie angenommen haben (siehe Abbildung 3-11 G+H und K+L, Pfeile). Eine Verlängerung der Inkubation auf 48 Stunden bewirkte weiterhin das nahezu vollständige Ablösen der Zellen von der Filtermembran (Daten nicht gezeigt, da kein Fluoreszenzsignal auf der Membran detektiert werden konnte).

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Mikroskopieaufnahmen, welche ausschließlich eine Aufsicht auf die Epithelschicht ermöglichen, wurden histologische Schnitte von behandelten und unbehandelten Filtermembranen angefertigt. Diese 7 µm dicken Querschnitte ermöglichen eine genauere Betrachtung der Zell-Zell-Verbindungen in einer seitlichen Ansicht (siehe Abbildung 3-12).

Nach einer apikalen Inkubation mit verschiedenen CdCl₂-Konzentrationen für 24 Stunden blieb die Barriere intakt und dicht. Es zeigten sich keine deutlich sichtbaren Effekte (siehe Abbildung 3-12 A-C). Wie die immunhistochemischen Aufnahmen belegen, zeigte sich nach einer basolateralen Vergiftung ein komplett anderes Bild. Durch eine Behandlung mit 100 und 200 µM CdCl₂ von basolateraler Seite wurden zahlreiche Zell-Zell-Verbindungen zerstört (siehe Abbildung 3-12 E+F). Diese Aufnahmen deuten auf eine spezielle Schädigung der *Adherens junctions* hin. In einigen Fällen schienen die *Tight junctions* intakt, obwohl eine Zerstörung der AJs eine Aufweitung des interzellularen Raumes bewirkte (siehe Abbildung 3-12 E+F, Pfeile).

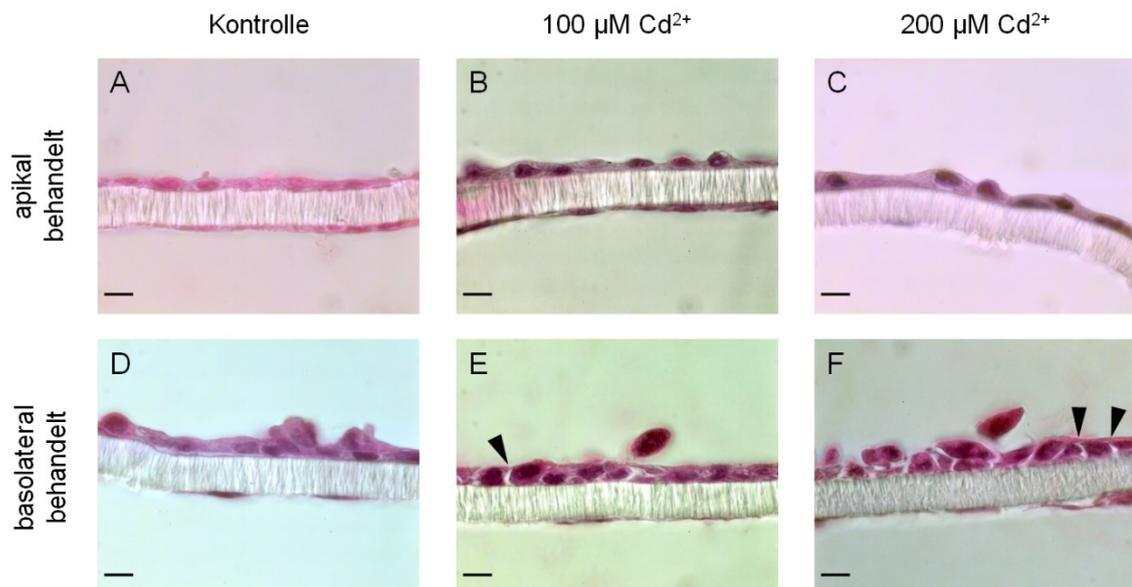


Abbildung 3-12: Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Querschnitte von Ko-Kultur-Modellen (Epithelzellen (NCI H441) oberhalb der Filtermembran und Endothelzellen (Iso-Has-1) unterhalb der Filtermembran): **A-C** – apikal mit CdCl₂ vergiftete Proben, **D-F** – basolateral mit CdCl₂ vergiftete Proben. Die Pfeile zeigen intakte *Tight junctions*. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die apikal vergifteten Proben nur wenige sichtbare Effekte zeigten, während wiederum die basolateral vergifteten Proben häufig

eine Zerstörung der epithelialen Barriere aufwiesen. Erste Hinweise deuten dabei auf eine gezielte Schädigung der AJs hin.

3.2.3 Effekte von Kadmiumchlorid auf die Zellvitalität

Es ist bekannt, dass hohe Konzentrationen an Kadmium, wie sie im Falle einer akuten Vergiftung auftreten, sowohl Apoptosen also auch Nekrosen induzieren [85].

Nach einer Kadmiumchloridinkubation von 24 Stunden blieben die Vitalitätswerte der apikal vergifteten Proben stabil, wohingegen bei den basolateral vergifteten Proben eine konzentrationsabhängige, signifikante Abnahme der Vitalität im unteren Kompartiment verzeichnet werden konnte (siehe Abbildung 3-13 A). In diesem Fall sank die Vitalität der Endothelzellen auf 48 % der Kontrolle nach einer Vergiftung mit 200 μM CdCl_2 .

Nach einer 48-stündigen apikalen Vergiftung mit 100 und 200 μM CdCl_2 blieben die Endothelzellen vital, während auf der epithelialen Seite eine Abnahme der Vitalität detektiert werden konnte (siehe Abbildung 3-13 B). Die Vitalität sank dabei auf 89,35 % (100 μM CdCl_2) und 80,14 % (200 μM CdCl_2) der Kontrolle. Nach einer basolateralen Kadmiumchloridbehandlung für 48 Stunden konnten diesmal auch auf der epithelialen Seite der Filtermembran signifikante zytotoxische Effekte beobachtet werden. So sank die Vitalität auf 19,43 % der Kontrolle nach einer Vergiftung mit 200 μM . Die endothelialen Zellen wurden ebenfalls durch die basolaterale Vergiftung stark geschädigt. Hierbei sank die Vitalität konzentrationsabhängig, signifikant auf 63,24 % (50 μM CdCl_2), 43,39 % (100 μM CdCl_2) und 12,34 % (200 μM CdCl_2) der Kontrolle nach einer 48-stündigen Inkubation mit CdCl_2 .

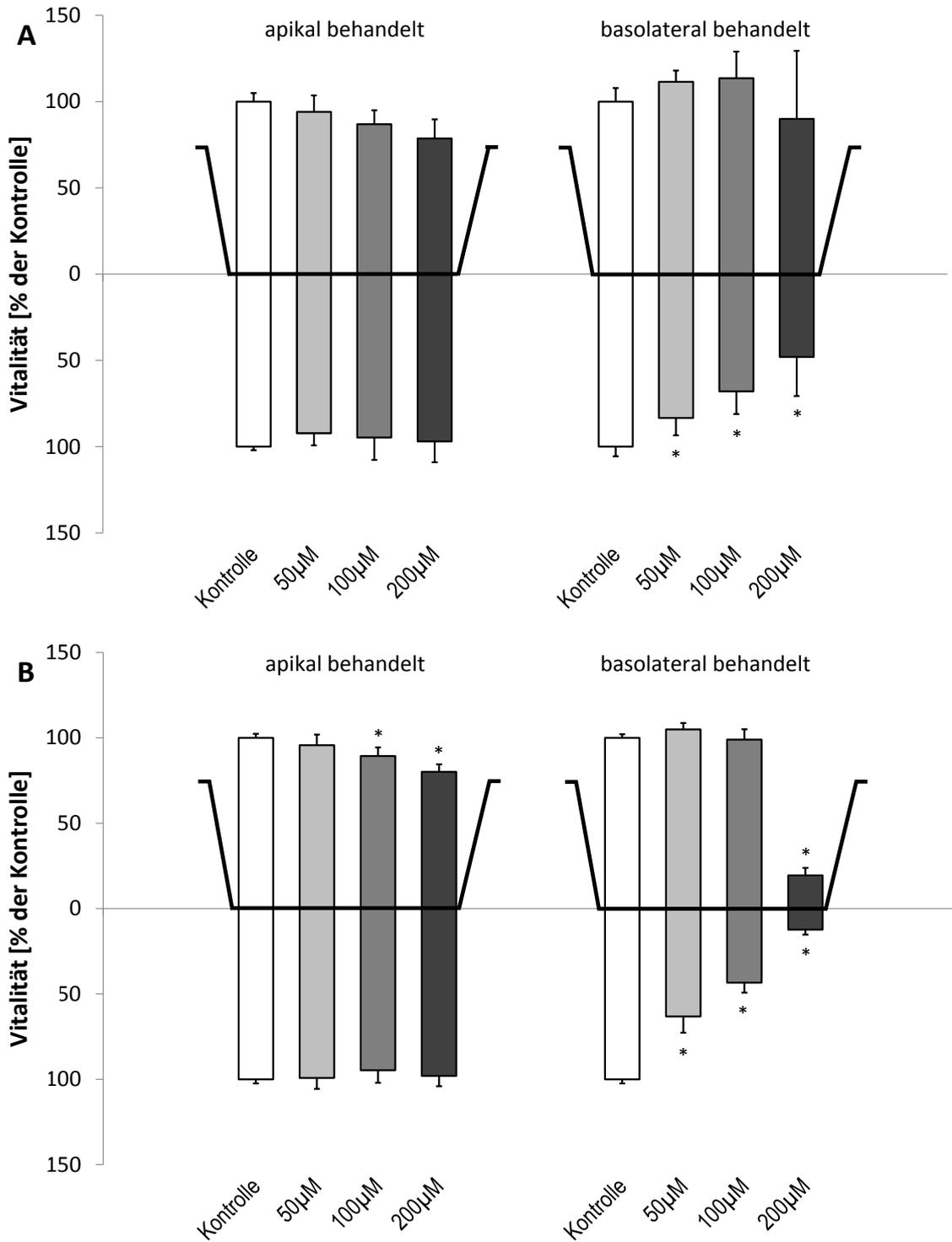


Abbildung 3-13: Zellvitalität der Epithelzellen (NCI H441, oberhalb der x-Achse im schematischen Well) und Endothelzellen (Iso-Has-1, unterhalb der x-Achse) des Ko-Kultur-Modelles nach einer Vergiftung mit unterschiedlichen CdCl_2 -Konzentrationen mit einer Inkubationszeit von: **A** – 24 h, **B** – 48 h. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n \geq 8$. * – signifikant verschieden ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

3.2.4 Die Ausschüttung von proinflammatorischen Faktoren nach einer CdCl₂-Vergiftung

Neben der nachgewiesenen Zytotoxizität von Kadmiumionen auf das Lungengewebe spielen auch Entzündungsreaktionen eine große Rolle. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurde die Ausschüttung zweier proinflammatorischer Markerproteine, Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8), quantitativ erfasst.

Die Ausschüttung von IL-6 in das Kulturmedium der apikal behandelten Proben stieg erst ab CdCl₂-Konzentrationen von über 50 µM signifikant an, wobei diese Erhöhung nur auf der endothelialen, der Vergiftung abgewandten, Seite beobachtet werden konnte. Hierbei erreichten die IL-6-Konzentrationen Werte von 34,5 pg/ml (100 µM CdCl₂) und 52,1 pg/ml (200 µM CdCl₂), was eine Erhöhung von 170 % bzw. 270 % im Bezug zur Kontrolle darstellt (siehe Abbildung 3-14 A, links). Auf der apikalen, epithelialen Vergiftungsseite konnte keine signifikante Veränderung im IL-6-Gehalt des Mediums festgestellt werden. Im Gegensatz zu den apikal behandelten Proben induzierte basolateral appliziertes CdCl₂ einen Anstieg der IL-6-Konzentration auf beiden Seiten der Filtermembran (siehe Abbildung 3-14 A, rechts). Selbst geringere Konzentrationen von 50 µM CdCl₂ erhöhten den IL-6-Gehalt auf 57,2 pg/ml (oberes Kompartiment) und 100,3 pg/ml (unteres Kompartiment), was einem Anstieg auf 700 % bzw. 850 % im Bezug zur Kontrolle entspricht. Dieser starke Anstieg, der auf beiden Seiten der Filtermembran gemessen wurde, verringerte sich jedoch konzentrationsabhängig mit steigendem Kadmiumchloridgehalt.

Die Ausschüttung von IL-8 erhöht sich signifikant nach apikaler Kadmiumchloridbehandlung im oberen Kompartiment auf Konzentrationen von bis zu 420 pg/ml (340 % der Kontrolle). Auch im unteren Kompartiment konnte ein tendenzieller Anstieg verzeichnet werden, doch dieser ist statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 3-14 B, links).

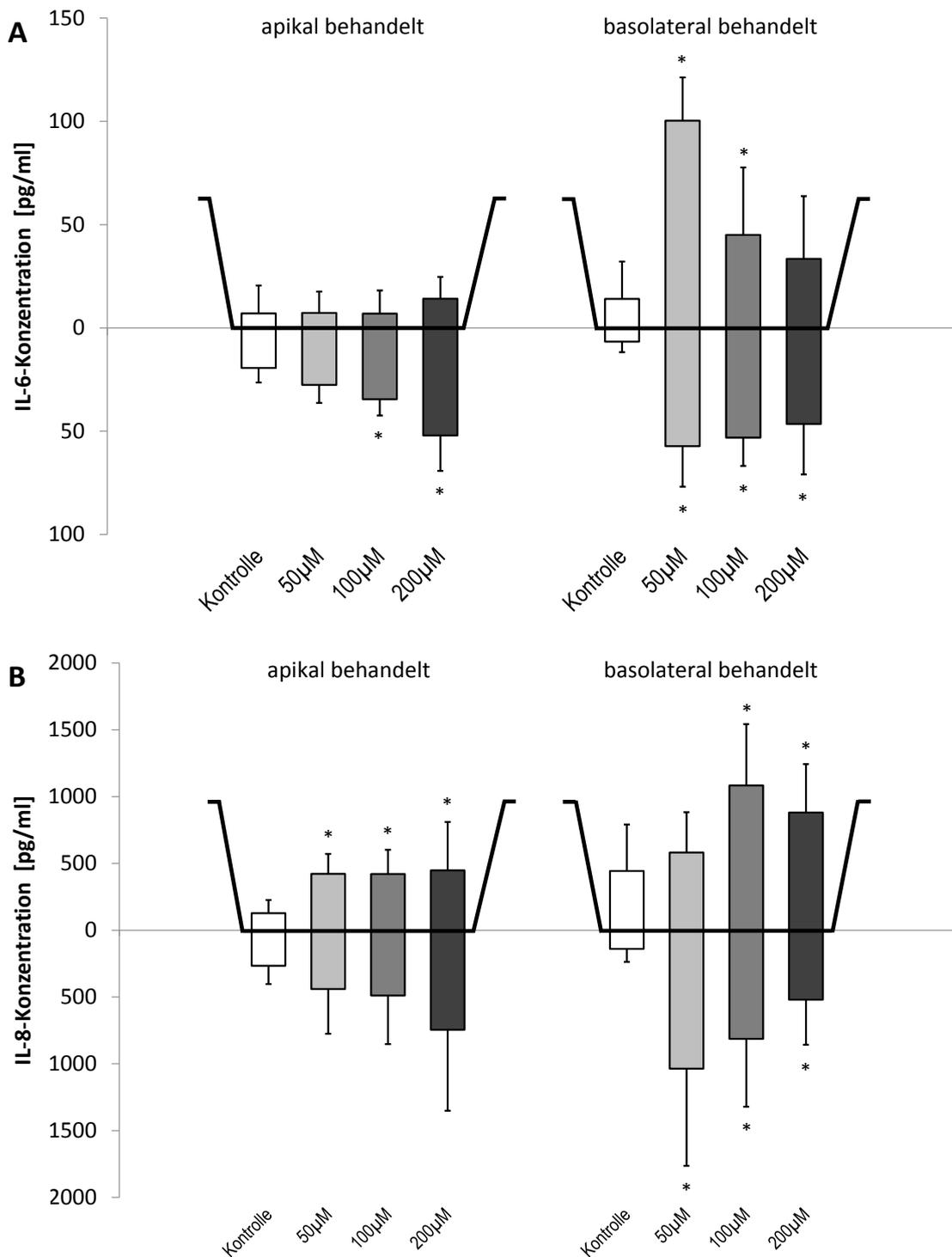


Abbildung 3-14: Ausschüttung proinflammatorischer Markerproteine seitens der Epithelzellen (NCI H441, oberhalb der x-Achse im schematischen Well) und seitens der Endothelzellen (Iso-Has-1, unterhalb der x-Achse) nach einer 24-stündigen Vergiftung des Ko-Kultur-Modelles mit unterschiedlichen CdCl_2 -Konzentrationen. **A** – Interleukin-6, **B** – Interleukin-8. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n \geq 10$. * – signifikant verschieden ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Wie schon bei der IL-6-Analyse beobachtet werden konnte, führte eine basolaterale Behandlung der Ko-Kulturen mit CdCl_2 zu einer enormen Erhöhung der IL-8-

Ausschüttung. Mediumproben aus dem oberen Kompartiment zeigten nach einer Vergiftung mit hohen CdCl_2 -Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) einen Anstieg von 200 % (880,1 pg/ml) und 240 % (1083 pg/ml) in Bezug auf die Kontrolle (siehe Abbildung 3-14 B, rechts). Mediumproben aus dem unteren Kompartiment zeigten schon nach einer Vergiftung mit $50 \mu\text{M}$ CdCl_2 eine Erhöhung der IL-8-Konzentration auf 740 % (1037 pg/ml) in Bezug zur Kontrolle. Wie auch schon bei dem IL-6-Ergebnissen zu beobachten war, sinkt der Gehalt an IL-8 konzentrationsabhängig mit steigenden CdCl_2 -Konzentrationen.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass eine Vergiftung mit Kadmiunchlorid über beide Expositionswege zu einer erhöhten Ausschüttung der Interleukine 6 und 8 führt. Dabei konnte beobachtet werden, dass eine basolaterale Behandlung im Vergleich einen weitaus größeren Effekt hervorruft.

3.2.5 Kompensation der durch Kadmiunchlorid verursachten Effekte mittels Zugabe von CaCl_2

Prozialeck *et al.* [86] stellte die Hypothese auf, dass Ca^{+2} -Ionen, die eine essentielle Rolle für die Brückenbindung von E-Cadherin-Molekülen spielen, durch Cd^{+2} -Ionen, welche einen ähnlichen Ionenradius besitzen [87], verdrängt werden.

So wurden Ko-Kultur-Modelle mit basolateral $200 \mu\text{M}$ CdCl_2 vergiftet. Um Prozialecks Hypothese zu untersuchen wurde bei der einen Hälfte dieser Modelle zusätzlich zur Kadmiunchloridbehandlung Kalziumchlorid zugesetzt, so dass eine finale Kalziumkonzentration von 10 mM im Medium vorlag. Schon nach 4 Stunden Inkubation mit Cd^{2+} ohne Ca^{2+} -Zusatz konnte ein signifikanter Einbruch der TER-Werte beobachtet werden (siehe Abbildung 3-15 A). Nach insgesamt 8 Stunden Inkubation fiel der TER auf 10,9 % der Grundlinie, während die Kontrollproben einen TER von 132 % der Grundlinie aufwiesen. Die Ergebnisse der Proben, denen Ca^{2+} zugesetzt wurde, zeigten ein komplett anderes Bild. Über 8 Stunden Inkubation mit basolateral appliziertem $200 \mu\text{M}$ Cd^{2+} blieben die TER-Werte der Proben auf einem stabilen, hohen Niveau zwischen 133 % und 148 % der Grundlinie (siehe Abbildung 3-15 B). Es konnte keine signifikante Abnahme des TERs gemessen werden.

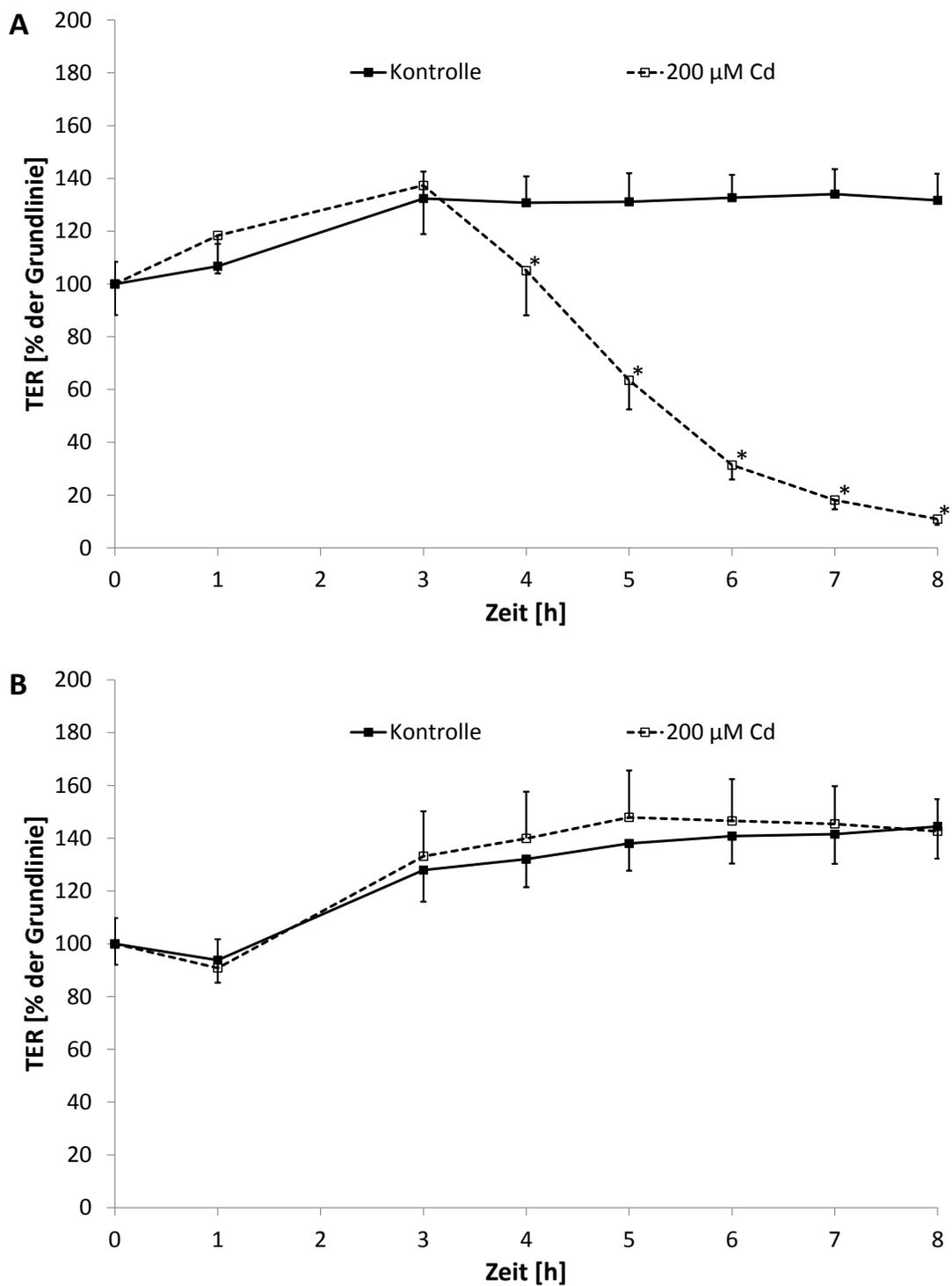


Abbildung 3-15: TER-Entwicklung unter basolateralem Kadmium-Einfluss über einen Inkubationszeitraum von 8 h ohne Zusatz von Ca^{2+} (**A**) und mit Zusatz von Ca^{2+} (**B**): Die Werte entsprechen % der Grundlinie, dabei wurden die Widerstandswerte zu den entsprechenden Messzeitpunkten mit den Ausgangswerten vor der Vergiftung ins Verhältnis gesetzt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n \geq 7$. * – signifikant verschieden ($p < 0,05$) gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Effekte von Zink- und Kadmiumchlorid auf die alveolar-kapilläre Barriere zu untersuchen. Im Einzelnen wurden die Effekte auf die Barrierenintegrität, die Gewebemorphologie, die Zellvitalität, die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, die Expression von Apoptosemarkern, die Expression von *Tight junction*-, *Adherens junction*- und Strukturproteinen nach einer Langzeitbehandlung, EGF-Rezeptor-abhängige Signalkaskade, sowie auf die Kalziumabhängigen AJ-Proteine analysiert und werden in den nachfolgenden Abschnitten ausführlich diskutiert.

Insgesamt gesehen konnte Folgendes beobachtet werden:

Es konnte gezeigt werden, dass Zinkchlorid, apikal behandelt, eine barrierenstärkende Wirkung aufwies. Weiterführende Untersuchungen lassen auf ein Zusammenwirken zwischen Zinkchlorid und dem EGF-Rezeptor schließen.

Die Ergebnisse der Versuche mit Kadmiumchlorid zeigten eine barrierenzerstörende Wirkung, die bei einer basolateralen Behandlung stärker ausgeprägt ist, als bei einer apikalen Behandlung. Nähere Analysen zeigten eine protektive Wirkung von Kalziumionen, was daraufhin deutet, dass Kadmiumionen mit dem Kalziumabhängigen AJ-Proteinen interagieren.

4.1 Versuche mit Zinkchlorid

Vergiftungen durch Zinkchlorid werden beim Einsatz von sog. Rauchbomben und Rauchgranaten im militärischen Bereich sowie im zivilen Bereich bei Übungen beobachtet. Zinkoxid, Aluminium und Hexachlorethan sind die Hauptinhaltsstoffe einer ungezündeten Rauchbombe. Meist sind weitere Zusatzstoffe wie Kalziumchlorid, Kalziumsilizid, Magnesium und/oder Ammoniumchlorid enthalten. Nach Zündung der Bombe reagiert das Hexachlorethan mit Zinkoxid unter Bildung von Zinkchlorid, Kohlenstoffdioxid und Wasser [10,88,89]. Dabei entsteht Rauch, der zu 88 % aus

Zinkchlorid besteht und neben Aluminiumchlorid, auch Aluminiumoxid und Zinkoxid enthält [5]. In sehr geringen Mengen konnten ebenso Phosgen, Kohlenstoffmonoxid und polyaromatische Kohlenwasserstoffe im Rauch nachgewiesen werden [10]. Versuche zeigten jedoch, dass diese Nebenprodukte keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei einer Rauchvergiftung durch eine Rauchbombe spielen [90]. Deshalb wurde zur Simulation dieser Art von Vergiftung ausschließlich der Hauptbestandteil, Zinkchlorid, eingesetzt.

Die Inhalation von wasserlöslichen Zinksalzen ist medizinisch relevant. Der MAK-Wert für Zink und seine anorganischen Verbindungen liegt bei $0,1 \text{ mg/m}^3$ für die alveolengängige Fraktion und bei 2 mg/m^3 für die einatembare Fraktion [91].

Für die Exposition der Ko-Kultur-Modelle mit Zinkchlorid wurde ein Konzentrationsbereich von $50 \text{ }\mu\text{M}$ bis $2000 \text{ }\mu\text{M}$ gewählt. Dieser deckte sich mit den in der Literatur zu findenden Konzentrationen zur Simulation einer akuten Vergiftung ($300 \text{ }\mu\text{M}$ bis $500 \text{ }\mu\text{M}$) [92,93], und schloss gleichfalls die Ergebnisse der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) für die Monokulturen aus NCI H441 Zellen und Iso-Has-1 Zellen (siehe Tabelle 3-1) ein. Die Konzentrationen von $1000 \text{ }\mu\text{M}$ und $2000 \text{ }\mu\text{M}$ wurden in die Analysen mit eingeschlossen, um den Einfluss von Nanopartikeln zu simulieren, welche durch ihre sehr geringe Größe (1-100 nm Durchmesser) bis in die tiefsten Bereich der Lunge vordringen können und lokal auf der Oberfläche der Alveolarzellen derart hohe Konzentrationen hervorrufen können.

4.1.1 Analyse der TER-Werte

In der Literatur wird der initiale Krankheitsverlauf einer Rauchvergiftung, verursacht durch eine Rauchbombe, durch das Auftreten von ARDS beschrieben [6-10,88,89,94]. Dies führt bei den Patienten zu pathologischen Veränderungen, welche z.B. pulmonale Ödeme, Alveolitis obliterans und eine diffuse Schädigung der Alveolen einschließt [7,8,11,12]. Diese pathologischen Befunde lassen auf eine direkte Schädigung der alveolar-kapillären Barriere schließen. Aus diesem Grund wurde die Integrität der Barriere nach einer Vergiftung mit Zinkchlorid untersucht.

Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Zinkchlorid, basolateral appliziert, Schäden an der alveolar-kapillären Barriere verursacht. Dies steht in Einklang mit den Vitalitätsdaten (EC_{50}), die in epithelialen und endothelialen Monokulturen gemessen wurden, und kann somit auf die zytotoxische Wirkung von Zinkchlorid zurückgeführt werden.

Im Gegensatz dazu lässt sich festhalten, dass eine apikale Exposition von Zinkchlorid zu einer Verstärkung der alveolar-kapillären Barriere führt. Ein ähnliches Phänomen wurde auch für MDCKII Zellen (Nierentubuluszellen) beschrieben [95]. Carr *et al.* konnte 2010 einen rund 19fachen Anstieg des TERs nach einer zweistündigen, apikalen Exposition von MDCKII-Zellen mit 10 mM $ZnCl_2$ beobachten. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gesammelten Daten zeigten die MDCKII-Zellen eine 4fache Erhöhung des TERs nach basolateraler Exposition über 2 h, dies lässt auf gewebsspezifische Unterschiede zwischen Nieren- und Lungengewebe schließen. TER-Daten nach einer Exposition über 24 h wurden nicht veröffentlicht. Carr *et al.* stellte eine Hypothese auf, nach der Zn^{2+} -Ionen mit den extrazellulären Domänen, einer konservativen Proteinsequenz aller Claudin-Isoformen, eine sogenannte Koordinierungsstelle bilden. In dieser Koordinierungsstelle bindet Zn^{2+} über ionische Wechselwirkungen und blockiert somit den Ionentransport in der parazellulären Pore [95]. Um zu überprüfen, ob ausschließlich der Ionentransport im parazellulären Raum durch die Einwirkung von Zinkchlorid behindert wird, wurden Transportstudien mit Fluoreszein durchgeführt.

4.1.2 Analyse der Ergebnisse des Transportversuchs

Zur Verifizierung der TER-Daten und zur Klärung der Frage, ob ausschließlich der Ionentransport durch den parazellulären Raum durch $ZnCl_2$ beeinflusst wird, wurden Transportversuche mit Fluoreszein durchgeführt.

Die präsentierten Daten zeigten, dass eine apikale Zinkchloridvergiftung mit Konzentrationen zwischen 100 und 200 μM eine Behinderung des parazellulären Stofftransports verursacht, der sich sowohl auf Ionen als auch auf Makromoleküle auswirkt. Somit verstärkt $ZnCl_2$ die alveolar-kapilläre Barriere, wenn es apikal appliziert wird.

Shen *et al.* beschrieb 2011 in einem *Review*, *Tight junctions* als eine hoch dynamische molekulare Zellstruktur [96]. Auf Grund neuester Erkenntnisse kann darauf geschlossen werden, dass ein parazellulärer Transport über unterschiedliche Wege (*pathways*) erfolgen kann. Dabei lassen sich 2 verschiedene Wege definieren: den *Pore pathway* und den *Leak pathway* (siehe Abbildung 4-1). Der *Pore pathway* ist für Moleküle mit einem maximalen Radius von rund 4 Å durchlässig, während der *Leak pathway* eine Permeabilität für größere, ungeladene Moleküle aufweist [97,98].

So würde nach der Hypothese von Carr *et al.* (siehe Abschnitt 4.1.1) nur der *Pore pathway* durch Zn^{2+} -Ionen beeinflusst werden (Behinderung des Ionenflusses). Doch die durch die Transportexperimente gewonnenen Daten lassen auch auf eine Beeinträchtigung des Makromolekularen Flusses (*Leak pathway*) schließen, was dieser Hypothese widerspricht oder vielmehr auf die Beeinflussung der *Tight junctions* der Barriere durch andere regulatorische Effekte hindeutet.

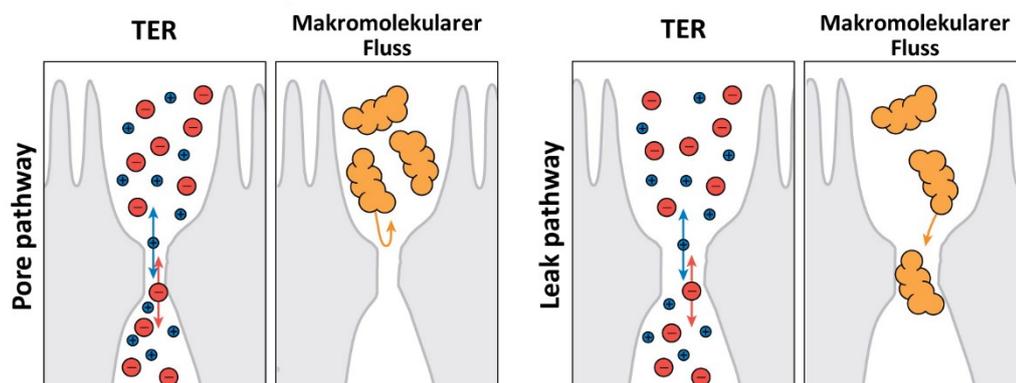


Abbildung 4-1: Pore und Leak pathway einer Tight junction nach Chen *et al.* (verändert nach [96])

Abgesehen von der apikalen Wirkung von $ZnCl_2$ wurden auch die basolateralen Effekte analysiert. So wurden Proben basolateral mit Zinkchlorid exponiert, was zu einer signifikanten Erhöhung der P_{app} -Werte ab 1000 μM $ZnCl_2$ führte. Diese Ergebnisse bestätigen die Aussagen, die auf Grund der TER-Daten getroffen wurden (siehe Abschnitt 4.1.1). So bewirkt eine basolaterale Vergiftung der Proben mit Zinkchlorid eine Schädigung der Barriere. Zur Beantwortung der Frage, ob diese Schädigung auf zytotoxische Effekte des basolateral applizierten Zinkchlorids zurückzuführen ist oder ob regulatorische Effekte auf die TJ und AJ eine Rolle spielen, wurden in nachfolgenden Versuchen das Verteilungsmuster von TJ- und AJ-Proteinen (siehe Abschnitt 3.1.4),

sowie die Zellvitalität der Epithel- bzw. Endothelzellen des Ko-Kultur-Modell analysiert (siehe Abschnitt 3.1.5).

4.1.3 Analyse der Immunfluoreszenzmikroskopie-Daten der TJ und AJ

Das Verteilungsmuster des *Adherens junction*-Proteins β -Catenin und des *Tight junction*-Proteins ZO-1 wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

Die Ergebnisse nach einer apikalen Exposition weisen keine Unterschiede im Verteilungsmuster auf, die eine Stärkung der alveolar-kapillären Barriere erklären könnten. Bisher wurden ähnliche Versuche nur an Nierenzellen durchgeführt, deren Ergebnisse ebenfalls ein stabiles Verteilungsmuster von ZO-1 nach einer Zinkchlorid-vergiftung zeigen [95]. Dies deutet darauf hin, dass eine apikale Behandlung mit $ZnCl_2$ zu keinen strukturellen Veränderungen der TJ oder AJ führt. In der Literatur sind keine weiteren Ergebnisse dokumentiert, die Veränderungen am Verteilungsmuster von AJ und TJ nach einer Zinkionen-Behandlung aufzeigen. Einige Arbeiten analysierten Veränderungen am Verteilungsmuster von AJ und TJ nach einer Zink-Depletion mit Hilfe des Zink-spezifischen Chelators N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamin (TPEN) [99-101]. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten eine Schädigung der AJ und TJ durch eine Zink-Depletion, welche mittels einer Supplementierung mit Zink verhindert werden konnte. Das lässt daraus schließen, dass das Zinkionen-Gleichgewicht eine wichtige Rolle in der Regulation der parazellulären Barrieren spielt.

Die Bilder des epithelialen Zellgewebsverbands nach einer basolateralen Vergiftung mit $ZnCl_2$ zeigen eine deutliche Schädigung der Barriere. Einzelne Epithelzellen lösen sich nach einer Vergiftung mit 500 μM $ZnCl_2$ aus dem Zellverband, was zu Lücken in der epithelialen Barriere führt. Die Mehrheit der Zellen weist eine geschrumpfte, kugelige Morphologie auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass apoptotische Effekte diese morphologischen Veränderungen ausgelöst haben könnten. Ebenso wäre denkbar, dass Zinkchlorid für Veränderungen im Zytoskelett der Zellen verantwortlich ist. So konnte an Darmzellen eine Verklumpung der α -Tubulin-Fasern in Immunfluoreszenz-Aufnahmen beobachtet werden [102]. Letztlich erklärt diese Auflösung des dichten

Gewebsverbandes die erhöhte Permeabilität (niedrige TER-Werte, hoher P_{app}) des Modells nach einer basolateralen Zinkchloridvergiftung.

4.1.4 Analyse der Zellvitalität der Epithel- und Endothelzellschicht

In wieweit eine Zinkchlorid-Exposition sich zytotoxisch auf Epithel- bzw. Endothelzellen auswirkt, wurde in dieser Arbeit in Experimenten an Monokulturen untersucht. Die Frage, ob diese Erkenntnisse übertragbar sind auf Zellen, die in einem dichten Gewebsverband kultiviert wurden, sollte mittels Vitalitätsmessungen an vergifteten Ko-Kultur-Modellen geklärt werden.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse aus den Monokulturen und den Ko-Kultur-Modellen lässt sich festhalten, dass ein dichter Gewebsverband aus Epithelzellen vor den zytotoxischen Effekten von apikal appliziertem Zinkchlorid schützen kann. Ein Langzeitexperiment zeigt eine Aufrechterhaltung der Barriere selbst nach 192 h bei einem regelmäßigen Mediumwechsel und einer repetitiven Vergiftung mit Zinkchlorid alle 48 h (Daten nicht gezeigt). Weiterführende Experimente zeigen ebenfalls eine Stagnation der Vitalitätsabnahme bei $ZnCl_2$ -Konzentrationen von $\geq 1000 \mu M$ auf 75 % der Kontrolle nach 96 h (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass regenerative Effekte der Zytotoxizität einer apikalen Zinkvergiftung entgegenwirken.

Im Gegensatz dazu zeigt eine basolaterale Vergiftung mit Zinkchlorid eine deutliche Schädigung der Endothelzellschicht. Diese Schädigung kann auf apoptotische Effekte zurückzuführen sein, wie sie schon bei glatten Muskelzellen, Nervenzellen, Prostataepithelzellen, dendritischen Zellen und Chang-Leberzellen beschrieben wurden [103-108]. In weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte extrazelluläre Zinkkonzentrationen ($> 150 \mu M$) zu einem Zusammenbruch des regulierenden Zink-Transportsystems führt [109,110]. Dieser Zusammenbruch hat zur Folge, dass die intrazelluläre Zinkionen-Konzentration ansteigt und in Folge dessen apoptotische Effekte ausgelöst werden [111]. Die genaue molekulare zytotoxische Wirkung von Zinkionen wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Erste Experimente lassen auf ein Auslösen der Apoptose-Kaskade durch die Freisetzung von Cytochrom C schließen [111]. Doch die genaue Interpretation der Ergebnisse wird

dadurch erschwert, da Zinkionen regulierend auf viele verschiedene Enzyme wirken, die während der Apoptose eine Rolle spielen, wie z.B. Zyklische-Nukleotid-Phosphodiesterasen [112], Proteinkinase C [113] und anderen Proteinphosphatasen [114,115].

Die beobachteten zytotoxischen Effekte seitens der Epithelzellen nach einer basolateralen Vergiftung könnten auf folgende Weise erklärt werden: Die Apoptose der Endothelzellen kann zur Ausschüttung parakriner Faktoren führen. Diese Faktoren wiederum können die Apoptose der Epithelzellen über den extrinsischen Weg induzieren [116]. Dies würde den Zusammenbruch der alveolar-kapillären Barriere und die Beobachtung von geschrumpften, kugeligen Epithelzellen nach einer basolateralen Vergiftung erklären. Um die Ausschüttung parakriner Faktoren, insbesondere die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, näher zu untersuchen, wurden in Folgeexperimenten die Ausschüttung von Interleukin-6 und Interleukin-8 bestimmt.

4.1.5 Analyse der Sekretion von IL-6 und IL-8

Die Versuchsergebnisse zur Bestimmung der IL-6- und IL-8-Konzentration im Medium zeigen hauptsächlich signifikant erhöhte Werte auf der epithelialen Seite. Eine apikale Exposition mit Zinkchlorid bewirkt einen signifikanten, konzentrationsabhängigen Anstieg der untersuchten Zytokin-Konzentrationen mit einem leichten Rückgang bei einer ZnCl_2 -Konzentration von 2000 μM , der durch den zytotoxischen Effekt des ZnCl_2 bedingt sein kann. Auch die basolateral vergifteten Proben zeigen einen signifikanten Anstieg. Dieser ist jedoch nur bei hohen Zinkchlorid-Konzentrationen zu beobachten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zinkionen zum Erreichen der Epithelzellen erst die Endothelzellschicht und die Membran mittels Diffusion passieren müssen. Insgesamt zeigen die Daten, dass die Epithelzellen sensitiver auf eine Zinkchlorid-Behandlung reagieren als die Endothelzellen, da schon Konzentrationen ab 100 μM von ZnCl_2 eine signifikant erhöhte Ausschüttung von Interleukinen beobachtet werden kann.

Nach einer Nahrungssupplementierung mit Zink konnten im Blut älterer Menschen erhöhte IL-6-Konzentrationen gemessen werden [117]. Experimente an Kardiomyozyten

[118], Lympo- und Monozyten [119,120], die mit Zink behandelt wurden, zeigten ebenfalls eine erhöhte IL-6-Ausschüttung. Auch eine erhöhte IL-8-Expression konnte nach einer Zink-Exposition an Epithelzellen nachgewiesen werden [93,121]. Somit bestätigen die gewonnenen Daten die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen.

IL-6 als auch IL-8 sind an der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen am Entzündungsherd beteiligt [121,122]. Ferner fördert IL-6 die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen [123]. So deutet die Ausschüttung dieser Interleukine drauf hin, dass die Epithelzellen auf eine Zinkvergiftung mit einer verstärkten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen reagieren. Untermauert wird diese Vermutung durch die pathologischen Befunde an Ratten und Menschen, die eine Aggregation von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im Alveolarraum nach einer ZnCl_2 - bzw. Rauchbombenexposition zeigten [6,8,13]. Diese verstärkte Infiltration der Immunzellen in das alveolare Lumen wird ebenfalls in den Frühstadien eines ARDS beobachtet [124].

Auffällig hohe Zytokin-Konzentrationen wurden bei einer basolateralen Vergiftung mit $2000 \mu\text{M ZnCl}_2$ gemessen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus den Transportversuchen (10-fach höherer P_{app} als $1000 \mu\text{M ZnCl}_2$ basolateral; siehe Abbildung 3-2) und der mikroskopischen Betrachtung der Epithelzellschicht (Abnahme der Zellkonfluenz von 80 % bei $1000 \mu\text{M ZnCl}_2$ basolateral zu > 1 % bei $2000 \mu\text{M}$; Daten nicht gezeigt). Bei all diesen Versuchen zeigte eine basolaterale Vergiftung mit $2000 \mu\text{M ZnCl}_2$ den größten zellschädigenden Effekt. Dieser Effekt geht somit einher mit einer vielfach erhöhten Interleukin-Ausschüttung.

4.1.6 Auswirkungen einer Zinkchloridbehandlung auf die Expression von Apoptosemarkern

Die Rolle von Zink in apoptotischen Effekten ist eng verknüpft mit seiner Wirkung für die Entstehung und den Metabolismus von Tumorzellen. Viele Reviews verschiedener Forschungsgruppen befassten sich mit dem Einfluss von Zink auf Apoptose und Onkogenese [125-129]. Doch die Wirkung von Zink ist äußerst komplex und unterscheidet sich deutlich unter den verschiedenen Tumorzellarten. Seine oft

beschriebene Eigenschaft als Zytoprotektant mit antiapoptotischen Effekten [130-132] durch Stabilisierung der DNA, Schutz vor oxidativem Stress und Inhibition wichtiger Caspasen steht im Gegensatz zu den durch Zink ausgelösten apoptotischen Effekten [106,107,133].

Zur Analyse der pro- bzw. antiapoptotischen Effekte auf Zinkchlorid-behandelte Ko-Kultur-Modelle wurde die Expression von 35 Apoptosemarker gemessen. Die Mehrheit (29 von 35 Markern) der untersuchten Marker zeigten keine auffälligen Unterschiede unter den untersuchten Proben. Im Bezug zur Kontrolle konnten bei 22 der 29 analysierten Apoptosemarker eine geringere Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Alle Beobachtungen beschreiben jedoch nur Tendenzen, da auf Grund einer hohen Streuung der Ergebnisse keine Signifikanzen ermittelt werden konnten.

Aus den Gesamtdaten wurden sechs Marker identifiziert, die einen gegenteiligen Effekt zwischen apikaler und basolateraler Behandlung zeigten. Grundsätzlich konnte im Vergleich zur Kontrolle eine konzentrationsabhängige Zunahme der Expression nach basolateraler Behandlung und eine konzentrationsabhängige Abnahme der Expression nach apikaler Behandlung beobachtet werden. Vier der untersuchten Marker (HIF-1 α , Survivin, cIAP-1 und Claspin) werden in der Literatur mit antiapoptotischen Eigenschaften beschrieben, während Bax proapoptotische Effekte hervorruft. TNF-Rezeptor 1 (TNF RI) kann sowohl pro- als auch antiapoptotische Signalkaskaden auslösen.

(1) HIF-1 α

Hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) ist eine Untereinheit von HIF-1. Unter normalen Sauerstoffbedingungen wird HIF-1 α nach Hydroxylierung proteosomal abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen wird der Abbau von HIF-1 α gestoppt, so dass HIF-1 α mit HIF-1 β den aktiven Transkriptionsfaktor HIF-1 formen kann, der eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung spielt [134]. Auf Grund dieser Eigenschaften liegt der zelluläre Gehalt von HIF-1 α in vielen Tumorzellen erhöht vor [134]. HIF-1 α fördert die Resistenz von Tumorzellen gegen apoptotische Effekte, in dem es der p53-vermittelten Apoptose entgegenwirkt [135,136]. Es wurde beschrieben, dass die Expression einer speziellen Splicevariante von HIF-1 α durch Zink-Einfluss gefördert wurde [137]. Auch in

Prostatazellen konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von Zink zu einem erhöhten HIF-1 α -Gehalt in den Zellen führt [138]. Eine andere Arbeit zeigt einen gegenteiligen Effekt. So konnte eine Erhöhung des proteosomalen Abbaus von HIF-1 α durch Zinkbehandlung nachgewiesen werden [139]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HIF-1 α antiapoptotisch wirkt und dass sowohl positive als auch negative Effekte auf den HIF-1 α -Gehalt nach einer Zinkbehandlung beschrieben wurden. Diese gegensätzlichen Effekte sind auch in den in dieser Arbeit ermittelten Daten wiederzufinden. Die Ergebnisse könnten durch unterschiedlich hohe Zinkkonzentrationen verursacht worden sein. So behandelten die Forschungsgruppen, die eine Erhöhung des HIF-1 α -Gehaltes gemessen haben, die Zellen mit 150 μ M - 500 μ M ZnCl₂ [137,138]. Während die Gruppe um Nardinocchi *et al.* [139] nach einer Behandlung mit 100 μ M ZnCl₂ einen proteosomalen Abbau von HIF-1 α beschrieb.

(2) Survivin

Survivin gehört zur Proteinfamilie der inhibitor of apoptosis (IAP). Es besitzt antiapoptotische Eigenschaften, da Survivin Caspase 3 und 7 inhibieren kann und ebenso an der Hemmung von Smac/Diablo beteiligt ist [140,141]. Die Kontrolle des Zellteilungszykluses und der Proliferation sind weitere Funktionen von Survivin [142]. In Tumorzellen wurde eine erhöhte Expression von Survivin nachgewiesen [143]. In Prostatazellen spielt Survivin eine wichtige Rolle beim Schutz gegen hohe Zinkkonzentrationen. So führt die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Zink in Prostatazellen zur Erhöhung des HIF-1 α -Gehaltes, welcher wiederum eine Erhöhung der Survivinkonzentration zu Folge hat [138]. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen einer basolateralen Behandlung in dieser Arbeit. Wie bei HIF-1 α könnte Zink eine regulierende Rolle auf die Survivin-Expression spielen. So führen geringe Zinkkonzentrationen zu einem reduzierten und hohe Zinkkonzentrationen zu einem erhöhtem intrazellulären Survivin-Gehalt.

(3) cIAP-1

Wie Survivin gehört auch cIAP-1 zur Proteinfamilie der IAPs. Die antiapoptotischen Funktionen von cIAP-1 sind die Inhibition von Caspase 3, 7 und 9 [144], sowie die Interaktion mit TNF α -Rezeptor 2 innerhalb der NF- κ B-aktivierenden Signalkaskade

[145]. In vielen Tumorzelllinien und primären Tumorbiopsaten konnte ein erhöhter cIAP-1-Gehalt nachgewiesen werden [146-150]. Einen Zusammenhang von Zink und cIAP-1 wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Doch die Nähe von cIAP-1 zu Survivin lässt darauf schließen, dass die Regulation dieses IAPs ebenfalls von Zink moduliert wird. Die Ergebnisse in dieser Arbeit unterstützen diese Theorie.

(4) Caspin

Caspin ist ein Protein, welches an der Überwachung der DNA-Replikation beteiligt ist [151]. Es gilt als Markerprotein für ungezügelter Zellwachstum und ist deshalb in vielen Tumorzellarten hochreguliert [152]. Caspin besitzt antiapoptotische Eigenschaften, da es von Caspasen abgebaut wird und in Folge dessen die Apoptosereaktion verstärkt wird [153]. Eine Interaktion von Zinkionen auf die Expression von Caspin konnte in der Literatur bisher nicht aufgezeigt werden. Wie bei den anderen untersuchten Apoptosemarkern lassen die Ergebnisse in dieser Arbeit auf eine Regulation der Caspin-Expression durch $ZnCl_2$ schließen. Auch hier könnte die Zinkkonzentration ein entscheidender Faktor für die Art des ausgelösten Effektes sein.

(5) Bax

Bax ist ein porenbildendes Protein, welches an den ersten Phasen einer Apoptose eine wichtige Rolle spielt. Unter apoptotischen Bedingungen transloziert Bax aus dem Zytoplasma in die Membran der Mitochondrien und oligomerisiert zu einer Membranpore, die zum Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol führt [154]. Das freigesetzte Cytochrom C induziert weitere Apoptosekaskaden. Der zelluläre Bax-Gehalt in Prostatakarzinomen wird durch den Einfluss von Zink erhöht [155]. Ganju und Eastman [156] beschrieben dagegen eine Hemmung der Bax-Aktivität durch Zink, wenn Apoptosen durch chemische Substanzen ausgelöst wurden. Auch hier spielt die genaue Konzentration an $ZnCl_2$ eine entscheidende Rolle. Die Zinkionen können sowohl fördernd als auch hemmend auf die Bax-Aktivität einwirken. Dies würde auch die ermittelten Daten aus den hier beschriebenen Versuchen erklären. Je nach Behandlungsart (apikal oder basolateral) sind die Epithelzellen unterschiedlich hohen $ZnCl_2$ -Konzentrationen ausgesetzt, was die Modulation der Bax-Aktivität entscheidend beeinflusst.

(6) TNF RI

Der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNF RI) ist an vielen Signaltransduktionswegen beteiligt. Es ist zum einen ein proapoptotischer Pfad beschrieben, der die Apoptose Proteine TRADD und FADD einschließt [157]. Zum anderen ist TNF RI in einen antiapoptotischen Signalweg involviert, der über die Interaktion mit TRAF2 zur Aktivierung von NF- κ B führt [158]. In der Literatur ist die Beeinflussung von TNF RI durch Zink bisher nicht beschrieben. Wie schon bei den anderen Apoptosemarkern erläutert, spielt auch hier Zink eine wichtige Rolle bei der Modulation der Apoptosereaktion.

Die unterschiedlichen Effekte auf die Expression der Apoptosemarker in Zinkchlorid-behandelten Ko-Kultur-Modellen lassen sich durch den Unterschied der effektiven Zinkkonzentration erklären. Apikal behandelte Proben besitzen durch den dichten Zellverband nur eine geringe Kontaktfläche zum ZnCl₂-haltigem Medium. Wenn davon ausgegangen wird, dass die Endothelzellschicht keine ausreichende Barriere für die Zinkionen darstellt, haben basolateral behandelte Proben, bei einer abstrahiert gedachten kubischen Zellform, 5 Kontaktseiten zum ZnCl₂-haltigen Medium. Daraus kann geschlossen werden, dass eine apikale Behandlung niedrigere intrazelluläre Zinkkonzentrationen verursacht als eine basolaterale Behandlung. In der Literatur wurden gegenteilige Effekte durch Zink, bedingt durch einen Konzentrationsunterschied, beschrieben. So zeigten hohe Konzentrationen an Zink einen Schutzeffekt gegen durch Dexamethason oder serumfreies Medium ausgelöste Apoptosen an Thymozyten, wohingegen niedrige Konzentrationen an Zink Apoptosen auslösten oder die Apoptose durch serumfreies Medium verstärkten [159].

Bei der Interpretation der Daten muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass die untersuchten Lysatproben von NCI H441-Zellen, das heißt von Tumorzellen, stammen. Wie oben beschrieben sind die meisten der untersuchten Apoptosemarker in Tumorzellen in Gegensatz zu normalen, gesunden Zellen hochreguliert [146-150,152]. So sichert die Expression antiapoptotischer Proteine, das Überleben und das weitere Wachstum der Tumorzelllinie, während die Expression der proapoptotischen Proteine ein aktivierter Schutzmechanismus darstellt. Dieser Mechanismus richtet sich gegen das unkontrollierbare Wachstum der entarteten Tumorzelle, wurde jedoch zum Teil durch

genetische Veränderungen während der Onkogenese ausgeschaltet. Der apikale Effekt von Zink, das heißt die reduzierte Expression der antiapoptotischen und proapoptotischen Proteine, spiegelt eine ähnliche Wirkung wie die Dexamethason-Behandlung wider. Der Effekt moduliert wie Dexamethason das Wachstumsverhalten der NCI H441-Zellen. Diese Hypothese wird gestützt durch Ergebnisse einer Langzeitstudie über 192 Stunden (Daten nicht gezeigt, bereits im Abschnitt 4.2.3 erwähnt). Bei diesem Langzeitversuch behielten die apikal mit Zink-behandelten Proben (200 μM - 1000 μM) ihren TER-Wert über den gesamten Zeitraum konstant über 100% zur Grundlinie, während die Kontrollproben bereits nach 96 h TER-Werte unter 100% zur Grundlinie aufwiesen.

Die basolateralen Effekte auf die Apoptosemarker können damit erklärt werden, dass die oben erwähnte hohe effektive Konzentration sowie die Ausschüttung parakriner Faktoren seitens der Endothelzellen zu einer verstärkten Auslösung apoptotischer Effekte in den NCI H441-Zellen geführt haben. Die Intensivierung der Schutzmechanismen gegen diese apoptotischen Effekte in den Tumorzellen führte dabei zur Erhöhung des Gehalts an antiapoptotischen Proteinen.

4.1.7 Analyse der Expression ausgewählter TJ- und AJ- und Zytoskelettproteine

Um der barrierestärkenden Wirkung von apikal appliziertem Zinkchlorid auf den Grund zu gehen, wurde der Gehalt verschiedener TJ-, AJ- und Zytoskelettproteine im Zelllysat der Epithelzellen bestimmt. Die *Western Blots* wurden densitometrisch analysiert und über das Strukturprotein Aktin normalisiert.

Der Gehalt des TJ-Proteins Occludin nach einer Behandlung der Ko-Kultur-Modelle mit Zinkchlorid sinkt bei mittleren Konzentrationen (200 und 500 μM ZnCl_2) leicht unter den Wert der Kontrolle (13 bis 15 % unter dem Kontrollwert). Nach einer Applikation von 1000 μM ZnCl_2 bleibt der Gehalt an Occludin auf Kontrollniveau. Frühe Arbeiten mit Occludin beschreiben eine Erhöhung des TERs nach Überexpression von Occludin [160]. Aus Versuchen mit Ferkeln geht hervor, dass eine Supplementierung von Zink zu einer erhöhten Occludinexpression und einer Verstärkung der epithelialen Barriere im Darm

führt [161]. Neuste Erkenntnisse, gewonnen bei Untersuchungen an einer Darmzelllinie, zeigen zwar einen Anstieg des TERs nach Zinkapplikation, doch einen Einfluss auf die Occludinexpression konnte nicht nachgewiesen werden [162]. Somit ist der Einfluss von Zink auf die Occludinkonzentration in den Zellen noch ungeklärt und bedarf weiterführender Tests.

Die vergleichende Quantifizierung des Claudin-3-Gehaltes nach einer $ZnCl_2$ -Behandlung zeigte einen leichten, konzentrationsabhängigen Anstieg an Claudin-3 (um 8 bis 16 % über den Kontrollwerten). Einen Zusammenhang zwischen dem Claudin-3-Gehalt und der Permeabilität der epithelialen Barriere wurde in vielen Publikationen beschrieben. Überexpressionsversuche in bronchialen Zellen als auch in einer Nierenzelllinie zeigten einen Anstieg des TER und eine Reduktion der Permeabilität [163,164]. Eine ähnliche Studie beobachtete jedoch einen gegenteiligen Effekt bei der Untersuchung von Claudin-3-überexprimierenden Alveolarzellen [165]. Claudin-3 führte dabei zur Reduktion des TER-Wertes.

Die Untersuchung des TJ-Proteins Claudin-18 zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine verringerte Expression. Unter den verschiedenen $ZnCl_2$ -Konzentrationen ist die Expression schwankend, was eine Konzentrationsabhängigkeit von $ZnCl_2$ ausschließt. Bisher ist nur wenig über die Funktion von Claudin-18 bekannt. Erste Studien zeigten eine Reduktion des Claudin-18-Gehaltes in alveolaren Epithelzellen nach einer Sepsis [166,167].

Die Konzentration von Claudin-7 nach einer Zinkexposition liegt im Gegensatz zur Kontrolle erhöht vor. Dabei kann eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden. In der Literatur wird Claudin-7 mit barriestabilisierenden Funktionen beschrieben. So nimmt der Anteil an Claudin-7 in der Membran nach einer Alkoholexposition ab, was in Folge dessen zu einer erhöhten Permeabilität führt [168]. Ebenso ist beschrieben, dass Glukokortikoide und Mineralokortikoide die Barriere in Kiemenepithelzellen verstärken und dabei eine signifikant erhöhte Claudin-7-Expression gemessen wird [169]. Eine intakte Expression von Claudin-7 führt in Lungenkrebszellen zu einer Verringerung der Migrationsfähigkeit und somit zu einer Stabilisierung der TJ [170].

Die Expression des TJ-Ankerprotein ZO-1 wird nachweislich von der Exposition der Ko-Kulturmodelle mit Zinkchlorid beeinflusst. So steigt der ZO-1-Gehalt ab einer Konzentration von 200 μM ZnCl_2 über den Kontrollwert an. Bei hohen Zinkchlorid-Konzentrationen (1000 μM) sinkt die Expression von ZO-1 leicht ab. Dieser Kurvenverlauf entspricht in ähnlicher Form der Entwicklung der TER-Werte nach einer apikalen ZnCl_2 -Exposition. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Barrierenintegrität und der ZO-1-Expression besteht. In der Literatur sind Fälle beschrieben, in denen eine erhöhte ZO-1-Expression im Zusammenspiel mit einer erhöhten Barrierenfunktion der TJ beschrieben wurde [171,172]. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass eine Zinksupplementierung bei Ferkeln zu einer reduzierten Darmpermeabilität führt, die im Zusammenhang mit einer Erhöhung der ZO-1 Expression in den Darmepithelzellen beschrieben wurde [161].

Bei der Analyse der AJ-Proteine β -Catenin und E-Cadherin wurden unterschiedliche Expressionsverläufe gemessen. Während die Konzentration an β -Catenin nach einer ZnCl_2 -Exposition bei niedrigen Konzentrationen von Zinkchlorid (200 und 500 μM) konstant bleibt, steigt der Gehalt von β -Catenin bei 1000 μM ZnCl_2 auf über 130 % der Kontrolle. Es ist bekannt, dass Zinkmangel zur Erhöhung der epithelialen Permeabilität führt und eine drauf folgende Zinksupplementierung die Permeabilität auf Kontrollniveau zurück bringt [99,100]. Ähnlich ist es auch mit der β -Catenin Expression. Der β -Catenin-Gehalt sinkt bei Zinkmangel und wird durch Zugabe von Zink wieder erhöht. Eine erhöhte β -Catenin-Konzentration in Zusammenhang mit einer erhöhten Barrierepermeabilität wurde bei Darmepithelzellen unter Einfluss verschiedener Darmbakterien beobachtet [173].

Nach einer Zinkchlorid-Behandlung kann eine konzentrationsabhängige Abnahme des E-Cadherin-Gehaltes beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den anderen gesammelten Daten, da gewöhnlich eine erhöhte E-Cadherin-Expression in Zusammenhang mit einer Verstärkung der epithelialen Barriere beschrieben wird [174] und eine sinkende E-Cadherin-Expression mit einer Zunahme der Barrierepermeabilität einher geht [175]. Doch in der Literatur werden auch Ergebnisse

beschrieben, welche die Beobachtungen in dieser Arbeit bestätigen. 2008 beobachtete Rudolf *et al.* ähnliche Effekte bei Untersuchungen an Darmtumorzellen [102]. So führte eine Behandlung von SW480-Zellen mit 100 μM Zinksulfat zu einer Abnahme des Gehalts von E-Cadherin. Mikroskopische Analysen zeigten eine Umstrukturierung der Zytoskelettproteine, was in Folge eine Reduktion der Motilität und Invasivität bewirkte. Zwar zeigen die Expressionsanalysen des Zytoskelettproteins β -Tubulin nach einer ZnCl_2 -Behandlung einen konstanten Gehalt im Vergleich zur Kontrolle, dennoch können Umstrukturierungsprozesse stattfinden, die die Konzentration von β -Tubulin in den Zellen nicht beeinflusst. Andere Studien beschreiben einen anti-proliferativen Effekt an unterschiedlichen Tumorzellen nach einer Zink-Behandlung [176-178]. Weiterführende Experimente offenbarten einen direkten Einfluss von Zink auf das Zytoskelett als Ursache für diese anti-proliferative Wirkung [179].

Dabei spielt, neben den bereits genannten Zytoskelettproteinen, das an das Aktinfilament gekoppelte Myosin-II-Strukturprotein eine bedeutende Rolle. Studien an Darmepithelzellen belegen, dass eine gewisse Grundaktivierung (Phosphorylierung) der regulatorischen, leichten Kette des Myosin-II (*myosin light chain*, MLC-II) notwendig ist, um die generelle Integrität der TJ und AJ zu gewährleisten [180,181]. Diese wichtige, regulatorische Funktion des Myosin-II wurde in unterschiedlichen Epithelbarrieren beschrieben [182-185], und dient als Endpunkt folgender Hypothese (siehe Abschnitt 4.1.8) über die barriestärkende Wirkung von Zinkchlorid auf die alveolar-kapilläre Barriere der Lunge.

4.1.8 Hypothese: Zinkchlorid moduliert über die EGFR-Rac1-MLCK/ROCK-Signalkaskade die Epithelbarriere

Es ist bekannt, dass extrazelluläre Zinkionen den Rezeptor des epithelialen Wachstumsfaktors (*epithelial growth factor receptor*, EGFR) aktivieren können. Dies konnte in humanen Epidermoidzellen (A431), murinen Lungenfibroblasten (B82L) und primären, humanen Alveolarepithelzellen nachgewiesen werden [186-188]. Ein erster Versuch an Ko-Kultur-Modellen zeigt einen ähnlichen Effekt. Wie in Abschnitt 3.1.9 gezeigt wurde, kann eine apikale Behandlung mit 200 μM ZnCl_2 zu einer Aktivierung des

EGF-Rezeptors durch Phosphorylierung am Tyrosin 845 führen. Eine sehr hohe Konzentration von ZnCl_2 (2000 μM) bewirkt dagegen einen gegenteiligen Effekt, was darauf hindeutet, dass hohe Konzentrationen an Zinkchlorid Effekte auslösen können, die wiederum zu einer Verminderung der EGFR-Aktivierung führen. Eine genaue Erklärung dieses Phänomens lässt sich aus der aktuellen Datenlage und dem Stand der Literatur nicht finden. Der geringe Aktivierungseffekt durch die Supplementierung des Mediums mit EGF (25 ng/ml) kann darauf zurückzuführen sein, dass das Kultivierungsmedium mit 5 % FKS bereits einen hohen Anteil an EGF (als Serumkomponente im FKS) aufweist oder dass das Medium über auto- und parakrine Sekretionsprozesse mit EGF oder anderen Liganden des EGFR angereichert wurde.

Wissenschaftliche Publikationen beschreiben einen Anstieg des TER, d.h. eine Stärkung der epithelialen Barriere, nach externer Zugabe von EGF in Nierenepithelzellen [83,84]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Zinkionen, ähnlich wie EGF, über die Aktivierung des EGFR eine Verstärkung der Barrierefunktion bewirken können.

Weiterführende Versuche von Terakado *et al.* zeigen, dass Rac1, ein Vertreter einer kleinen Familie an G-Proteinen, eine wichtige regulatorische Rolle bei der barrierestärkenden Wirkung von EGF spielt [189]. Rac1 wird dabei ausgehend vom EGFR über Vav2 aktiviert [190]. Die Regulation von Rac1 führt über verschiedene Signalketten letztlich zur Modulation der MLC-II-Phosphorylierung (siehe Abbildung 4-2). So konnte gezeigt werden, dass Rac1:

- (1) die Wirkung der Rho-Kinase (*Rho-associated kinase*, ROCK) auf indirekte Weise hemmt [191]. Die Inhibierung der RhoA-Aktivität durch Rac1 wurde dabei als Ursache identifiziert [192-194]. Aktivierte ROCK ist in der Lage MLC-II zu phosphorylieren [195] und besitzt zusätzlich eine hemmende Wirkung auf die Phosphatase der MLC-II (MLCP), welche deren Dephosphorylierung katalysiert [196]. So führt die Hemmung dieses Signalweges zu einer Reduktion der MLC-II-Phosphorylierung durch ROCK und eine Förderung der Dephosphorylierung durch MLCP (siehe Abbildung 4-2, violetter Signalweg).

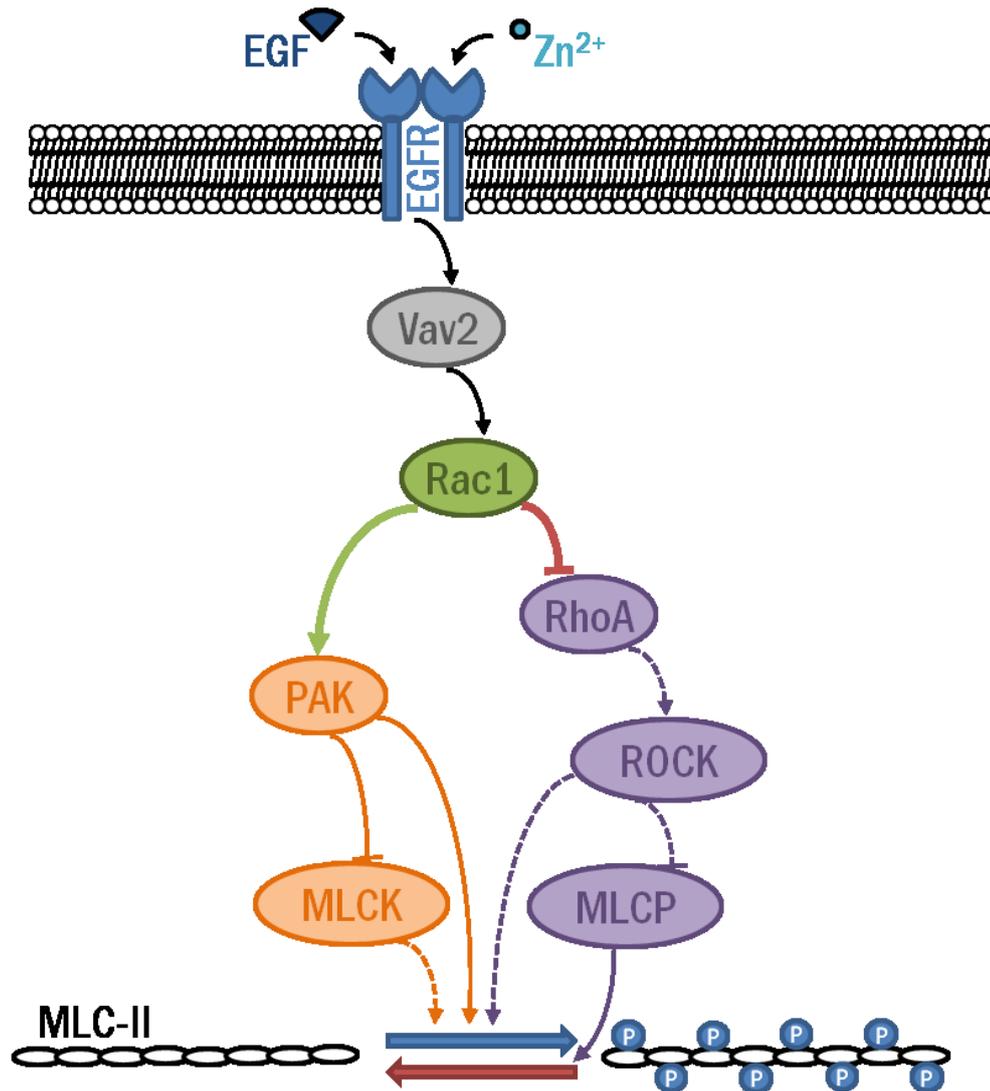


Abbildung 4-2: Hypothetischer Signalweg nach einer Behandlung mit EGF bzw. Zn²⁺ (Gestrichelte Linien zeigen inhibierte Signalwege durch Rac1)

- (1) über die Aktivierung der P21-aktivierten Kinase (PAK) die Phosphorylierung von MLC-II durch die *myosin light chain kinase* (MLCK) inhibiert [191]. Die PAK besitzt zusätzlich die Fähigkeit MLC-II zu phosphorylieren [197] (siehe Abbildung 4-2, oranger Signalweg).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Rac1 die Phosphorylierung von MLC-II durch MLCK und ROCK verhindert und gleichzeitig deren Dephosphorylierung durch MLCP fördert, wobei eine Grundaktivierung von MLC-II über die Aktivität der PAK sichergestellt wird. So unterstützt Rac1 die Stabilisierung des Actomyosin-Skeletts der Epithelzellen, da eine Hyperphosphorylierung von MLC-II im Zusammenhang mit der

Zerstörung der epithelialen Barriere in verschiedenen Arbeiten beschrieben wurde [198-202] (siehe Abbildung 4-3).

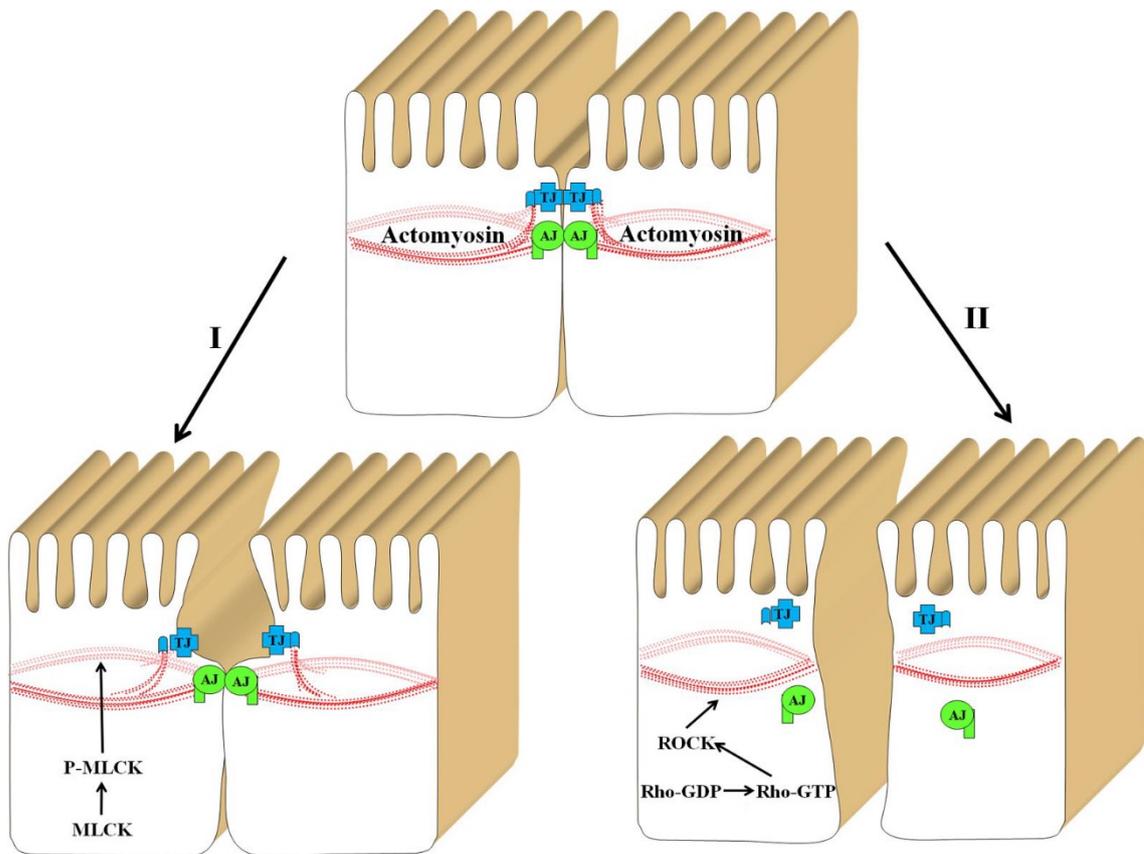


Abbildung 4-3: Zerstörung der epithelialen Barriere durch MLCK(I) bzw. ROCK(II) (verändert nach [203]).

Neben der hier beschriebenen Hypothese ist es ebenso möglich, dass Zinkchlorid auf das Filament *treadmilling*, das Fließgleichgewicht der Aktin-Polymerisation und des Aktin-Abbau, eingreift. Hierzu gibt es bislang nur wenige Studien. Doch erste Versuche zeigen eine mögliche Abmilderung barrierezerstörender Effekte durch Stabilisierung des F-Aktins [181]. Auch die Aktin-Bündelung durch verschiedene Proteine, wie α -Aktinin, spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der TJ und AJ [204,205] und könnte in den barrierestärkenden Effekt durch Zinkchlorid involviert sein.

Letztlich könnte der Effekt von Zinkchlorid auf die alveolar-kapilläre Barriere der Lunge die Verzögerungszeit von mehreren Tagen zwischen Exposition und den ersten Anzeichen einer Lungenschädigung von Rauchbomben-Unfallopfern erklären. So bewirkt Zinkchlorid zum einen die Steigerung der Barrierefunktion des alveolaren Epithelgewebes, fördert aber zum anderen die Infiltration von Makrophagen und

neutrophilen Granulozyten, was eine Entzündungsreaktion auslöst, welche die Ausbildung von ARDS bedingen könnte.

4.2 Versuche mit Kadmiumchlorid

Kadmiumstäube bestehen für gewöhnlich aus Kadmiumoxid oder Kadmiumchlorid [85]. Kadmiumoxid ist wasserunlöslich und wird *in vivo* durch den mukoziliären Transport aus den Atemwegen entfernt, auf ähnliche Weise geschieht dies auch bei CdS [206]. Einige Studien berichten jedoch über einen anderen Weg, wie wasserunlösliche Partikel, wie beispielsweise Kadmiumoxid, in Zellen und den Blutkreislauf in ionischer Form gelangen können. Dabei dienen Phagolysosomen von alveolaren Makrophagen als Lösemittel und Transporter [207,208]. Da das Ko-Kultur-Modell nicht über alveoläre Makrophagen verfügt, wurde ausschließlich das wasserlösliche CdCl₂ in den Versuchen benutzt.

Die Inhalation von Kadmiumsalzen ist insofern medizinisch relevant, da Kadmium und seine Verbindungen von der MAK-Kommission als „beim Menschen krebserzeugend“ eingestuft werden [91]. Der MAK-Wert für Kadmium und seine Verbindungen liegt bei 0,03 mg/m³ für Arbeiter in der Batterieherstellung, bei der thermischen Zink-, Blei- und Kupfergewinnung und beim Schweißen cadmiumhaltiger Legierungen und für alle übrigen Personen gilt ein MAK-Wert von 0,015 mg/m³ [91].

In allen Versuchen wurden die Ko-Kultur-Modelle mit Kadmiumchlorid-Konzentrationen von 50, 100 und 200 µM behandelt. Diese Wahl der Konzentrationen beruht zum einen auf dem Ergebnis der mittleren effektiven Konzentration (EC₅₀) für die Monokulturen aus NCI H441 Zellen und Iso-Has-1 Zellen (NCI H441: 119,8 ± 13,9 µM und Iso-Has-1: 95,4 ± 12,3 µM) [209] und zum anderen aus der in der Literatur bekannten *in vivo*-Konzentrationen bei akuten, hochgradigen Kadmiumvergiftungen (100 - 150 µM) [210].

4.2.1 Analyse der TER-Werte

Die Ko-Kultur-Modelle wurden einerseits von der apikalen Seite mit CdCl₂ exponiert, um eine akute Vergiftung durch Inhalation von Kadmiumstaub zu simulieren. Hier nimmt

der TER nach einer kurzen Phase der Stimulation, bedingt durch den Mediumwechsel, konzentrationsabhängig ab. Dies könnte auf die zytotoxischen Eigenschaften von Kadmiumchlorid zurückzuführen sein, wie die Daten der EC_{50} -Bestimmung an den Epithelzellen vermuten lassen [209]. Zum Vergleich der apikalen Exposition und zur Simulation einer akuten Vergiftung über den pulmonalen Blutkreislauf wurden Ko-Kultur-Modelle auch von basolateraler Seite mit $CdCl_2$ behandelt.

Die unterschiedlichen Verläufe der Kontrollkurven wurden durch die verschiedenen Mediumbedingungen verursacht. So enthielten die Kontrollen der apikalen Behandlung im oberen Kompartiment serumfreies MEM und im unteren FKS-haltiges RPMI-Ko-Kultur-Medium. Bei den Kontrollen der basolateralen Behandlung waren die Epithelzellen mit FKS-haltiges RPMI-Ko-Kultur-Medium bedeckt, während die Endothelzellen durch serumfreies MEM mit Nährstoffen versorgt wurden. Auf Grund dieser Begebenheiten und der Tatsache, dass die Endothelschicht für Nährstoffe gut durchlässig ist, begünstigt eine basolaterale Versorgung des Ko-Kultur-Modells mit 1 ml FKS-haltigem RPMI-Ko-Kultur-Medium pro *Well* die Vitalität der Zellen im Gegensatz zu einer apikalen Versorgung mit 200 μ l des gleichen Mediums.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der apikal behandelten Proben nahm der TER der basolateral vergifteten Proben schneller ab. Schon nach 8 Stunden Inkubation mit Kadmiumchlorid (basolateral) kann ein signifikanter Abfall des TERs beobachtet werden, während bei apikaler Exposition eine signifikante Abnahme erst nach 24 Stunden und nur unter Einfluss von 200 μ M $CdCl_2$ registriert werden kann. Dieser Zusammenbruch der epithelialen Barriere steht im starken Kontrast zu den EC_{50} -Werten der Zellen, denn diese sind für beide Zellarten nahezu auf gleichem Niveau. So lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass die gut differenzierte epitheliale Barriere sensibler auf Kadmiumchlorid reagiert, wenn jenes von basolateraler Seite appliziert wird. Dieser Effekt konnte auch in Monokulturen von Nierenepithelzellen aus Schwein [27] und Hund [28] gezeigt werden. Weitere Studien der Arbeitsgruppe um Prozialeck beschreiben, dass Cd^{2+} auf das AJ-Protein E-Cadherin schädigend einwirkt, was zur Zerstörung der AJ und letztlich zum Zusammenbrechen der gesamten Barriere führt [72]. So lässt sich daraus schließen, dass Kadmiumionen, die den parazellulären Raum von der

basolateralen Seite erreichen, die AJ stärker schädigen. Dies wiederum führt zu der Vermutung, dass intakte und gut ausgeprägte TJ das Eindringen von Cd^{2+} -Ionen in den parazellularen Raum verhindern können. So ist bekannt, dass Claudine eine wichtige Rolle an der ladungsspezifischen Regulation des Ionentransports im parazellularen Raum spielen [211] und hier in diesem Fall das Eindringen der Kadmiumionen verhindert haben könnten.

4.2.2 Analyse der Immunfluoreszenzmikroskopie-Daten der TJ und AJ

Zur Aufdeckung von morphologischen Änderungen der NCI H441 Epithelzellen nach einer Kadmiumchlorid-Vergiftung der Ko-Kultur wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dafür wurden die Verteilungsmuster von E-Cadherin und Aktin in der Epithelgewebsschicht analysiert. Apikal behandelte Proben zeigen dabei keine signifikanten Änderungen, wohingegen die basolateral behandelten Proben deutliche Schädigungen aufweisen. So kann eine Zerstörung der Epithelschicht nach einer 24-stündigen Kadmiumvergiftung ab einer Konzentration von 100 μM nachgewiesen werden. Dabei zeigen die Proben nur noch Inseln aus konfluenten Zellen. Ferner können Zellen identifiziert werden, die sich aus dem Gewebsverband abschnüren und somit ihre kugelige Einzelzell-Morphologie wiedererlangen. Ähnliche Beobachtungen machte auch die Forschergruppe um Prozialeck *et al.* bei Nierenzellen [27,28]. In diesen Arbeiten wurde ebenfalls das Erscheinen von rundlichen Zellen beschrieben.

Zusätzlich zu den Aufsichtsaufnahmen, die nur die epitheliale Seite abbilden, wurden zusätzlich Querschnitte von kadmiumvergifteten Proben angefertigt. Diese Proben wurden anschließend an die Fixierung mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt, um sie mittels Durchlichtmikroskopie analysieren zu können. Wie auch bei den immunfluoreszenzgefärbten Proben zeigen die apikal behandelten Proben keine Veränderungen. Bei einer Vergiftung mit 100 und 200 μM CdCl_2 von der basolateralen Seite aus können Lücken und eine Aufweitung der interzellularen Räume beobachtet werden. Bei genauer Betrachtung scheinen an manchen Stellen die TJ weiterhin intakt zu sein, obwohl die AJ derselben Zell-Zell-Verbindung zerstört vorliegen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die AJs zeitlich gesehen vor den TJs zerstört wurden.

Vorangegangene Studien an Nierenzellen unterstützen diese Beobachtung [27,28]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte hauptsächlich bei basolateral vergifteten Proben stattfand. Dies unterstützt die Hypothese, dass die TJs eine wichtige, schützende Funktion bei einer CdCl₂-Vergiftung besitzen.

4.2.3 Analyse der Zellvitalität der Epithel- und Endothelzellschicht

Neben den Barriere-zerstörenden Effekten von Kadmiumionen wurde auch die Zytotoxizität im Ko-Kultur-Modell untersucht. Hierbei wurden die Modelle über beide Expositionswege vergiftet. Dabei zeigen die meisten, der über 24 Stunden vergifteten Proben, keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Nur bei den Überständen der Endothelzellen kann eine signifikante, konzentrationsabhängige Abnahme der Vitalität verzeichnet werden. Dabei kann die basolaterale Expositionsart als Hauptgrund ausgemacht werden, da die Endothelzellen den Kadmiumionen im unteren Kompartiment unmittelbar ausgesetzt waren. Nach einer 48-stündigen Inkubation mit Kadmium zeigen beide Zellschichten, welche in direktem Kontakt mit dem CdCl₂-haltigen Medium standen, eine signifikante, konzentrationsabhängige Abnahme der Vitalität. Die apikal vergifteten Proben scheinen dabei eine höhere Resistenz gegenüber den zytotoxischen Effekten des Kadmiums zu besitzen, da sie noch eine Vitalität von 80,14 % im Vergleich zur Kontrolle nach 48-stündiger Inkubation mit 200 µM Cd²⁺ aufwiesen. Dagegen sinkt die Vitalität der Endothelzellen auf 12,24 % im Vergleich zur Kontrolle bei gleicher Konzentration von Cd²⁺. Ebenso kann eine signifikante Abnahme der Vitalität auf 19,43 % im Vergleich zur Kontrolle bei Proben von Epithelseite gemessen werden, die 48 Stunden lang basolateral mit 200 µM CdCl₂ inkubiert wurden. Dies steht im Gegensatz zu dem Vitalitätswert von 80,14 % im Vergleich zur Kontrolle, welcher nach der gleichen jedoch apikalen Vergiftung gemessen wurde. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass CdCl₂, welches über die Endothelschicht durch die Filtermembran zu den Epithelzellen gelangt, mehr Schäden verursacht als CdCl₂, welches direkt auf der gleichen Seite wie die Epithelzellen ausgebracht wurde. Dies stärkt die Hypothese einer Schutzfunktion der TJ gegen

Kadmiumionen. Im Vergleich zu den TER-Daten aus Abschnitt 3.2.1 führen äquivalente Konzentrationen an CdCl₂ zur Zerstörung der AJ und TJ bevor ein Einfluss auf die Vitalität zu beobachten ist, besonders bei Inkubationszeiten von 24 Stunden und weniger. Dies wird auch in anderen Studien bestätigt, welche die Zellvitalität mit der TJ-Barriereintegrität unter dem Einfluss von Metallen wie Kadmium vergleichen [212-214].

4.2.4 Analyse der Sekretion von IL-6 und IL-8

Als ein Faktor, der bei Vergiftungen oder Erkrankungen recht früh detektierbar ist, wurde die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen nach einer Kadmiumvergiftung analysiert. So ist bekannt, dass CdCl₂ die Ausschüttung dieser Zytokine (IL-6 und IL-8) induzieren kann [215-217]. Für diese Untersuchungen wurden Ko-Kultur-Modelle mit verschiedenen CdCl₂-Konzentrationen über beide Expositionswege behandelt und Proben der Überstände aus beiden Kompartimenten wurden auf ihren IL-6- und IL-8-Gehalt getestet. Dabei zeigen die apikal vergifteten Proben einen signifikanten Anstieg von IL-6 nur bei hohen CdCl₂-Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{M}$), während bei den basolateral behandelten Proben eine Erhöhung der IL-6-Konzentration schon bei $50 \mu\text{M}$ CdCl₂ zu beobachten ist. Ähnliche Ergebnisse können auch mit der IL-8-Analyse beobachtet werden. Der hohe Anstieg der Interleukine bei den basolateral vergifteten Ko-Kultur-Modellen kann durch den direkten Effekt der Endothelzellen erklärt werden. So standen die Endothelzellen bei basolateralen Vergiftungen im unteren Kompartiment in direktem Kontakt mit CdCl₂. Dieser Umstand und der Tatsache, dass die endotheliale Barriere durchlässig für Cd²⁺ ist, führen zu einer erhöhten Ausschüttung der Interleukine. Aus diesen Ergebnissen lässt sich auch schließen, dass die epitheliale Barriere die Endothelzellen vor dem Kontakt mit apikal appliziertem Kadmium schützt und die Kontaktfläche zwischen Kadmiumlösung und Epithelzellen minimiert. Jedoch kann ein signifikanter Anstieg der IL-6-Ausschüttung der Endothelzellen nach einer apikalen Behandlung detektiert werden, was daraufhin deutet, dass der para- und interzelluläre Transport von Kadmium nicht komplett durch die Epithelbarriere geblockt wird oder dass eine unbekannte Art der Kommunikation zwischen Epithel- und Endothelzellen, beispielsweise über extrinsische Faktoren, zu

diesen Ergebnissen führte. Insgesamt gesehen wird die Immunantwort durch die intakte und dichte Epithelbarriere erheblich reduziert, was besonders *in vivo* wichtig ist, da die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen im Zusammenhang mit der Veränderung der Barrierenpermeabilität und Barrierenfehlfunktion steht [218,219].

4.2.5 Prozialecks Hypothese: Kadmiumchlorid verändert die Konformation der extrazellulären Domäne von E-Cadherin durch Verdrängung der Kalziumionen

Im Jahr 2000 publizierte Prozialeck die Hypothese, dass während des frühen Stadiums einer Kadmiumvergiftung die Kadmiumionen vorrangig mit dem Ca^{2+} -abhängigen AJ-Protein E-Cadherin interagieren und dabei die Ca^{2+} -Ionen verdrängt und ersetzt werden [72]. So konnte in experimentellen Studien nachgewiesen werden, dass E-Cadherin-analoge Proteine nach einem Austausch der Ca^{2+} mit Cd^{2+} molekulare Veränderungen in der Konformation aufweisen (siehe Abbildung 4-4) [86,220,221]. Eine andere Forschungsgruppe zeigte jedoch, dass E-Cadherin durch Presenilin I, eine γ -Sekretase, gespalten werden kann [222]. So beschreibt Park *et al.* [222] einen γ -Sekretase-katalysierten Abbau von E-Cadherin, welcher durch oxidativen Stress und erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt, verursacht durch Cd^{2+} , induziert wurde.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit (siehe Abschnitt 3.2.5) lassen eher auf eine kompetitive Rolle von Cd^{2+} im Zusammenhang mit dem Austausch mit Ca^{2+} in E-Cadherinmolekülen schließen. So wurden Ko-Kultur-Modelle mit 200 μM CdCl_2 basolateral vergiftet. Eine Hälfte der Ko-Kulturen wurde dabei zusätzlich mit Ca^{2+} versetzt (Endkonzentration: 10 mM). Die Zugabe von Ca^{2+} verhinderte dabei die Zerstörung der Barriere während der Vergiftung über 8 Stunden, während die Proben ohne zusätzliches Kalzium ein signifikantes Absinken der TER-Werte schon nach 4 Stunden Inkubation zeigten. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien mit Nierenzellen, in denen ebenfalls ein Cd^{2+} -verursachtes Einbrechen der TER-Werte durch die Zugabe erhöhter Ca^{2+} -Konzentrationen unterbunden wurde [223].

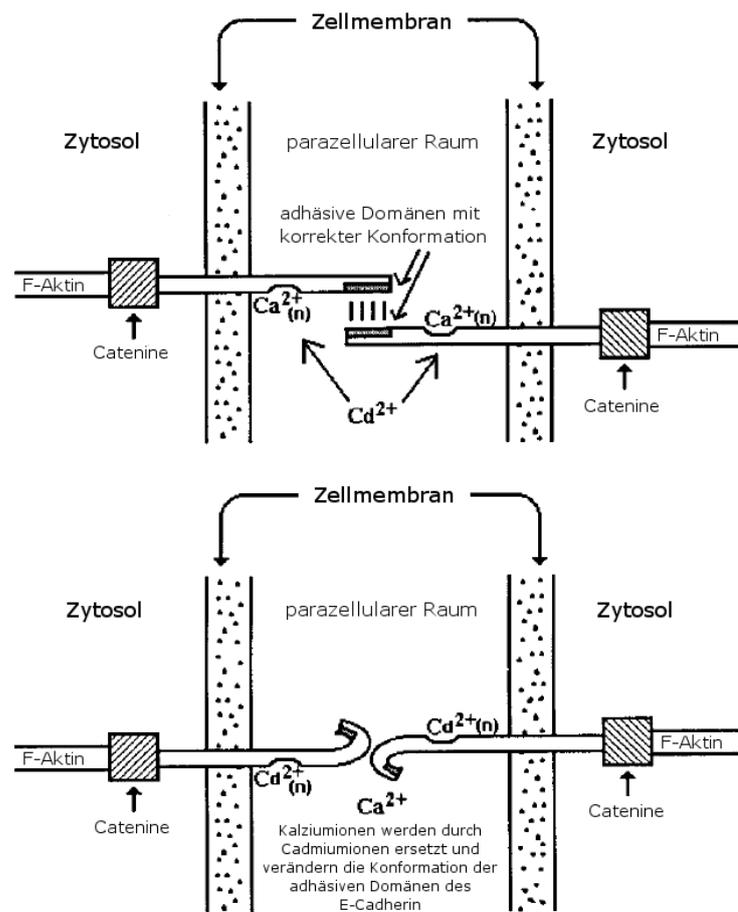


Abbildung 4-4: Molekulare Veränderungen der E-Cadherinmoleküle im parazellulären Raum nach einer Kadmiumvergiftung (verändert nach [72])

Obwohl diese Kalziumkonzentration von 10 mM nicht für therapeutische Zwecke eingesetzt werden kann, ohne schädigende Nebenwirkungen auszulösen, deuten die Forschungsergebnisse auf einen kompetitiven, antagonistischen Effekt der Ca^{2+} -Ionen hin. Die vorliegenden Ergebnisse stärken die Hypothese von Prozialeck *et al.* [72], so dass es zu einer Konkurrenz-Situation zwischen Ca^{2+} und Cd^{2+} um die Bindung an E-Cadherin kommt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung der Experimente mit Zinkchlorid

Apikale Behandlung

- Stärkung der alveolar-kapillären Barriere
- keine mikroskopisch detektierbare Veränderungen am Zytoskelett und an den Zell-Zell-Verbindungen
- leichtes Absenken der Zellvitalität auf max. 81,5 % im Vergleich zur Kontrolle
- konzentrationsabhängig erhöhte Ausschüttung von IL-6 und IL-8
- reduzierte Ausschüttung von Apoptosemarkern (pro- und anti-apoptotisch)
- Beeinflussung der Expression der TJ-Proteine ZO-1, Claudin-3, -7 und -18 und der AJ-Proteine E-Cadherin und β -Catenin
- Erhöhte Phosphorylierung (Aktivierung) des EGF-Rezeptors bei mittleren ZnCl_2 -Konzentrationen

Basolaterale Behandlung

- Schwächung der alveolar-kapillären Barriere
- mikroskopisch detektierbare Loslösung der Zell-Zell-Kontakte und Auflösung des Gewebsverbands
- starkes Absenken der Zellvitalität auf max. 31,9 % im Vergleich zur Kontrolle
- signifikant erhöhte Ausschüttung von IL-6 und IL-8 nur bei sehr hohen ZnCl_2 -Konzentrationen (2000 μM)
- erhöhte Ausschüttung von Apoptosemarkern (pro- und anti-apoptotisch)

5.2 Zusammenfassung der Experimente mit Kadmiumchlorid

Apikale Behandlung

- Schwächung der alveolar-kapillären Barriere (verzögert im Vergleich zur basolateralen Behandlung)
- keine bis wenige mikroskopisch detektierbare Veränderungen am Zytoskelett und an den Zell-Zell-Verbindungen
- leichtes Absenken der Zellvitalität auf max. 80,14 % im Vergleich zur Kontrolle
- konzentrationsabhängig erhöhte Ausschüttung von IL-6 auf endothelialer Seite und starke Ausschüttung von IL-8 auf epithelialer Seite (bis zu 340 % der Kontrolle)

Basolaterale Behandlung

- Schwächung der alveolar-kapillären Barriere
- mikroskopisch deutlich detektierbare Loslösung der Zell-Zell-Kontakte und Auflösung des Gewebsverbands
- starkes Absenken der Zellvitalität auf max. 12,34 % im Vergleich zur Kontrolle
- sehr stark erhöhte Ausschüttung von IL-6 und IL-8 auf das 7- bis 8-fache der Kontrolle
- Verhinderung des barrierezerstörenden Effekts des CdCl₂ durch Zusatz von Kalziumionen

5.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse über den Einfluss von Zink- und Kadmiumchlorid auf die alveolar-kapilläre Barriere der Lunge, insbesondere auf molekularer Ebene. Die Verstärkung der Barriere durch Zinkchlorid und die vorrangige Zerstörung der AJ-Verbindungen durch Kadmiumchlorid konnte in unabhängigen Versuchen am Ko-Kultur-Modell reproduzierbar nachgewiesen werden. Weiterführende Experimente an primären Zellen könnten diese Ergebnisse verifizieren und Tumorzelllinien-spezifische Effekte, so fern existent, aufdecken. So existiert ein etabliertes Ko-Kultur-Modell mit primären Zellen, welches benutzt werden kann, um diese Versuche durchzuführen [224].

Neue Fluorophore, welche spezifisch Zn^{2+} bzw. Cd^{2+} anfärben [225-227], könnten dazu benutzt werden, den Weg der Ionen durch die Barriere detailliert nach zu verfolgen. Dies würde insbesondere dabei helfen, Effektunterschiede bedingt durch die gewählten Expositionswege (apikal bzw. basolateral) zu erklären.

Die Signalweg-Hypothese (siehe Abschnitt 4.1.8), welche eine Wirkung von Zinkchlorid über eine EGFR-Rac1-Myosin-Kaskade beschreibt, könnte mit Hilfe weiterführender Experimente bestätigt oder widerlegt werden. So kann mit spezifischen Inhibitoren gegen einzelne Faktoren des Signalwegs eine Verbindung zum durch $ZnCl_2$ -verursachten Effekt hergestellt werden. *Western Blot*-Analysen können ebenfalls aufdecken, ob die in der Hypothese beschriebenen Faktoren involviert sind.

Makrophagen spielen im Krankheitsverlauf nach einer Zinkchloridexposition eine wichtige Rolle, da diese vermehrt im Alveolarraum von Rauchbombenopfern gefunden werden konnten [6,8,13]. So könnten in Versuchen mit sogenannten Triple-Kultur-Modellen [228], welche neben Epithel- und Endothelzellen auch aus Makrophagen aufgebaut sind, neue Erkenntnisse im Zusammenspiel zwischen Epithelzellen und Makrophagen gewonnen werden.

Die Aufklärung der erhöhten Sensibilität des Ko-Kultur-Modells gegenüber einer basolateralen Kadmiumchloridexposition (im Vergleich zur apikalen Exposition) könnte über eine genaue Analyse der Kadmium-Transporter und -Kanäle erfolgen. So könnten

diese Transporter bzw. Kanäle ungleichmäßig über die polaren Zellen im Gewebeverband verteilt sein.

Ferner wäre es interessant, die Signalwege zu identifizieren, welche bei einer CdCl₂-Vergiftung aktiviert werden. Dies könnte mit Hilfe spezieller *Screening-Array*-Tests erfolgen, mit denen die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionsfaktoren untersucht werden kann.

All diese weiterführenden Experimente würden dazu beitragen, die molekularen Effekte von Zink- und Kadmiumchlorid auf Lungenepithelzellen weiter zu entschlüsseln. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse wiederum können dazu benutzt werden, neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Papritz M, Pohl C, Wubbeke C, Moisch M, Hofmann H, Hermanns MI, et al. **Side-specific effects by cadmium exposure: apical and basolateral treatment in a coculture model of the blood-air barrier.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;245(3):361-369.
- (2) Barceloux DG. **Zinc.** *J Toxicol Clin Toxicol* 1999;37(2):279-292.
- (3) Sears ME. **Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification-- a review.** *ScientificWorldJournal* 2013;2013:219840.
- (4) Scotton CJ. **A breath of fresh air for tissue engineering?** *Mat Today* 2011;14(5):212-216.
- (5) Johnson FA, Stonehill RB. **Chemical pneumonitis from inhalation of zinc chloride.** *Dis Chest* 1961;40:619-624.
- (6) Gil F, Pla A, Hernandez AF, Mercado JM, Mendez F. **A fatal case following exposure to zinc chloride and hexachloroethane from a smoke bomb in a fire simulation at a school.** *Clin Toxicol (Phila)* 2008;46(6):563-565.
- (7) Hjortso E, Qvist J, Bud MI, Thomsen JL, Andersen JB, Wiberg-Jorgensen F, et al. **ARDS after accidental inhalation of zinc chloride smoke.** *Intensive Care Med* 1988;14(1):17-24.
- (8) Homma S, Jones R, Qvist J, Zapol WM, Reid L. **Pulmonary vascular lesions in the adult respiratory distress syndrome caused by inhalation of zinc chloride smoke: a morphometric study.** *Hum Pathol* 1992;23(1):45-50.
- (9) Pettila V, Takkunen O, Tukiainen P. **Zinc chloride smoke inhalation: a rare cause of severe acute respiratory distress syndrome.** *Intensive Care Med* 2000;26(2):215-217.
- (10) Zerahn B, Kofoed-Enevoldsen A, Jensen BV, Molvig J, Ebbehøj N, Johansen JS, et al. **Pulmonary damage after modest exposure to zinc chloride smoke.** *Respir Med* 1999;93(12):885-890.
- (11) Evans EH. **Casualties following exposure to zinc chloride smoke.** *The Lancet* 1945;246(6369):368-370.
- (12) Milliken JA, Waugh D, Kadish ME. **Acute Interstitial Pulmonary Fibrosis Caused by a Smoke Bomb.** *Can Med Assoc J* 1963;88(1):36-39.

- (13) Brown RF, Marrs TC, Rice P, Masek LC. **The histopathology of rat lung following exposure to zinc oxide/hexachloroethane smoke or installation with zinc chloride followed by treatment with 70% oxygen.** *Environ Health Perspect* 1990;85:81-87.
- (14) Marrs TC, Clifford WE, Colgrave HF. **Pathological changes produced by exposure of rabbits and rats to smokes from mixtures of hexachloroethane and zinc oxide.** *Toxicol Lett* 1983;19(3):247-252.
- (15) Walther UI, Wilhelm B, Walther SC, Muckter H, Forth W. **Effect of zinc chloride on GSH synthesis rates in various lung cell lines.** *In Vitro Mol Toxicol* 2000;13(2):145-152.
- (16) Wilhelm B, Walther UI, Fichtl B. **Effects of zinc chloride on glutathione and glutathione synthesis rates in various lung cell lines.** *Arch Toxicol* 2001;75(7):388-394.
- (17) Walther UI, Walther SC, Muckter H, Fichtl B. **Enhancing glutathione synthesis can decrease zinc-mediated toxicity.** *Biol Trace Elem Res* 2008;122(3):216-228.
- (18) Bus JS, Vinegar A, Brooks SM. **Biochemical and physiologic changes in lungs of rats exposed to a cadmium chloride aerosol.** *Am Rev Respir Dis* 1978;118(3):573-580.
- (19) Inoue S, Suzumura Y, Takahashi K. **[A case of interstitial pneumonitis caused by inhalation of cadmium fumes].** *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1994;32(9):861-866.
- (20) Yamamoto K, Ueda M, Kikuchi H, Hattori H, Hiraoka Y. **An acute fatal occupational cadmium poisoning by inhalation.** *Z Rechtsmed* 1983;91(2):139-143.
- (21) Ando Y, Shibata E, Tsuchiyama F, Sakai S. **Elevated urinary cadmium concentrations in a patient with acute cadmium pneumonitis.** *Scand J Work Environ Health* 1996;22(2):150-153.
- (22) Glaser U, Hochrainer D, Otto FJ, Oldiges H. **Carcinogenicity and toxicity of four cadmium compounds inhaled by rats.** *Toxicological and Environmental Chemistry* 1990;27(1/3):153-162.
- (23) Takenaka S, Oldiges H, König H, Hochrainer D, Oberdorster G. **Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in W rats.** *J Natl Cancer Inst* 1983;70(2):367-373.
- (24) Vogelmeier C, König G, Bencze K, Fruhmant G. **Pulmonary involvement in zinc fume fever.** *Chest* 1987;92(5):946-948.
- (25) Cain JR, Fletcher RM. **Diagnosing metal fume fever--an integrated approach.** *Occup Med (Lond)* 2010;60(5):398-400.

- (26) Pearson CA, Lamar PC, Prozialeck WC. **Effects of cadmium on E-cadherin and VE-cadherin in mouse lung.** *Life Sci* 2003;72(11):1303-1320.
- (27) Prozialeck WC, Niewenhuis RJ. **Cadmium (Cd²⁺) disrupts intercellular junctions and actin filaments in LLC-PK1 cells.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;107(1):81-97.
- (28) Prozialeck WC, Lamar PC. **Cadmium (Cd²⁺) disrupts E-cadherin-dependent cell-cell junctions in MDCK cells.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997;33(7):516-526.
- (29) Hermanns MI, Unger RE, Kehe K, Peters K, Kirkpatrick CJ. **Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro.** *Lab Invest* 2004;84(6):736-752.
- (30) Moll KJ, Moll M. **Anatomie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog.** 15 ed. Lübeck; Stuttgart; Jena; Ulm: G. Fischer; 1997.
- (31) Scheid P. **Atmung.** In: **Lehrbuch der Physiologie.** Klinker R, Silbernagl S (editors). Stuttgart: Thieme; 1996. pp. 213-268.
- (32) Haselton PE. **Anatomy of the lung. Spencers Pathology of the lung.** 5 ed. New York: McGraw-Hill Professional; 1996.
- (33) Simionescu M. **Alveolar capillary endothelium, functional morphology.** *Curr Probl Clin Biochem* 1983;13:74-81.
- (34) Jeffery PK, Reid L. **New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study.** *J Anat* 1975;120(Pt 2):295-320.
- (35) Barrett EG, Johnston C, Oberdorster G, Finkelstein JN. **Silica binds serum proteins resulting in a shift of the dose-response for silica-induced chemokine expression in an alveolar type II cell line.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;161(2):111-122.
- (36) Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. **Cell number and cell characteristics of the normal human lung.** *Am Rev Respir Dis* 1982;126(2):332-337.
- (37) Fehrenbach H. **Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited.** *Respir Res* 2001;2(1):33-46.
- (38) Patton JS. **Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996;19(1):3-36.
- (39) Griese M. **Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art.** *Eur Respir J* 1999;13(6):1455-1476.

- (40) Hills BA. **An alternative view of the role(s) of surfactant and the alveolar model.** *J Appl Physiol* 1999;87(5):1567-1583.
- (41) Crouch EC. **Surfactant protein-D and pulmonary host defense.** *Respir Res* 2000;1(2):93-108.
- (42) Pison U, Max M, Neuendank A, Weissbach S, Pietschmann S. **Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system.** *Eur J Clin Invest* 1994;24(9):586-599.
- (43) Paulsson M. **Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992;27(1-2):93-127.
- (44) Gorin AB, Stewart PA. **Differential permeability of endothelial and epithelial barriers to albumin flux.** *J Appl Physiol* 1979;47(6):1315-1324.
- (45) Chess PR, Ryan RM, Finkelstein JN. **H441 pulmonary epithelial cell mitogenic effects and signaling pathways in response to HGF and TGF-alpha.** *Exp Lung Res* 1998;24(1):27-39.
- (46) Pryhuber GS, O'Reilly MA, Clark JC, Hull WM, Fink I, Whitsett JA. **Phorbol ester inhibits surfactant protein SP-A and SP-B expression.** *J Biol Chem* 1990;265(34):20822-20828.
- (47) Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. **Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism.** *Exp Cell Res* 1998;243(2):359-366.
- (48) Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. **A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.** *Int J Cancer* 1976;17(1):62-70.
- (49) Forbes B, Ehrhardt C. **Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications.** *Eur J Pharm Biopharm* 2005;60(2):193-205.
- (50) Winton HL, Wan H, Cannell MB, Gruenert DC, Thompson PJ, Garrod DR, et al. **Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability.** *Clin Exp Allergy* 1998;28(10):1273-1285.
- (51) Masuzawa M, Fujimura T, Hamada Y, Fujita Y, Hara H, Nishiyama S, et al. **Establishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS).** *Int J Cancer* 1999;81(2):305-308.
- (52) Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. **Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.** *J Clin Invest* 1973;52(11):2745-2756.

- (53) Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ. **In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R.** *Microvasc Res* 2002;64(3):384-397.
- (54) Yevdokimova N, Freshney RI. **Activation of paracrine growth factors by heparan sulphate induced by glucocorticoid in A549 lung carcinoma cells.** *Br J Cancer* 1997;76(3):281-289.
- (55) Gonzales LW, Guttentag SH, Wade KC, Postle AD, Ballard PL. **Differentiation of human pulmonary type II cells in vitro by glucocorticoid plus cAMP.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(5):L940-L951.
- (56) Bates SR, Gonzales LW, Tao JQ, Rueckert P, Ballard PL, Fisher AB. **Recovery of rat type II cell surfactant components during primary cell culture.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282(2):L267-L276.
- (57) Corroyer S, Nabeyrat E, Clement A. **Involvement of the cell cycle inhibitor CIP1/WAF1 in lung alveolar epithelial cell growth arrest induced by glucocorticoids.** *Endocrinology* 1997;138(9):3677-3685.
- (58) Greenberg AK, Hu J, Basu S, Hay J, Reibman J, Yie TA, et al. **Glucocorticoids inhibit lung cancer cell growth through both the extracellular signal-related kinase pathway and cell cycle regulators.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27(3):320-328.
- (59) Boggaram V, Smith ME, Mendelson CR. **Regulation of expression of the gene encoding the major surfactant protein (SP-A) in human fetal lung in vitro. Disparate effects of glucocorticoids on transcription and on mRNA stability.** *J Biol Chem* 1989;264(19):11421-11427.
- (60) Venkatesh VC, Iannuzzi DM, Ertsey R, Ballard PL. **Differential glucocorticoid regulation of the pulmonary hydrophobic surfactant proteins SP-B and SP-C.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8(2):222-228.
- (61) Buse P, Woo PL, Alexander DB, Reza A, Firestone GL. **Glucocorticoid-induced functional polarity of growth factor responsiveness regulates tight junction dynamics in transformed mammary epithelial tumor cells.** *J Biol Chem* 1995;270(47):28223-28227.
- (62) Zettl KS, Sjaastad MD, Riskin PM, Parry G, Machen TE, Firestone GL. **Glucocorticoid-induced formation of tight junctions in mouse mammary epithelial cells in vitro.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(19):9069-9073.
- (63) Iwai A, Fujii Y, Kawakami S, Takazawa R, Kageyama Y, Yoshida MA, et al. **Down-regulation of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma cells by glucocorticoids.** *Mol Cell Endocrinol* 2004;226(1-2):11-17.

- (64) Nauck M, Karakiulakis G, Perruchoud AP, Papakonstantinou E, Roth M. **Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells.** *Eur J Pharmacol* 1998;341(2-3):309-315.
- (65) Kurzen H, Manns S, Dandekar G, Schmidt T, Pratzel S, Kraling BM. **Tightening of endothelial cell contacts: a physiologic response to cocultures with smooth-muscle-like 10T1/2 cells.** *J Invest Dermatol* 2002;119(1):143-153.
- (66) Shannon JM, Pan T, Nielsen LD, Edeen KE, Mason RJ. **Lung fibroblasts improve differentiation of rat type II cells in primary culture.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24(3):235-244.
- (67) Bingle L, Bull TB, Fox B, Guz A, Richards RJ, Tetley TD. **Type II pneumocytes in mixed cell culture of human lung: a light and electron microscopic study.** *Environ Health Perspect* 1990;85:71-80.
- (68) Speirs V, Ray KP, Freshney RI. **Paracrine control of differentiation in the alveolar carcinoma, A549, by human foetal lung fibroblasts.** *Br J Cancer* 1991;64(4):693-699.
- (69) Dagenais A, Frechette R, Yamagata Y, Yamagata T, Carmel JF, Clermont ME, et al. **Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286(2):L301-L311.
- (70) Elbert KJ, Schafer UF, Schafers HJ, Kim KJ, Lee VH, Lehr CM. **Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies.** *Pharm Res* 1999;16(5):601-608.
- (71) Fuchs S, Hollins AJ, Laue M, Schaefer UF, Roemer K, Gumbleton M, et al. **Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C.** *Cell Tissue Res* 2003;311(1):31-45.
- (72) Prozialeck WC. **Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;164(3):231-249.
- (73) Goodenough DA, Paul DL. **Gap junctions.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1(1):1-19.
- (74) Meng W, Takeichi M. **Adherens junction: molecular architecture and regulation.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1(6):1-13.
- (75) Thomason HA, Scothern A, McHarg S, Garrod DR. **Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease.** *Biochem J* 2010;429(3):419-433.
- (76) Tang VW, Goodenough DA. **Paracellular ion channel at the tight junction.** *Biophys J* 2003;84(3):1660-1673.

- (77) Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, et al. **Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex.** *J Clin Invest* 2008;118(2):619-628.
- (78) Daugherty BL, Mateescu M, Patel AS, Wade K, Kimura S, Gonzales LW, et al. **Developmental regulation of claudin localization by fetal alveolar epithelial cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(6):L1266-L1273.
- (79) Kaarteenaho-Wiik R, Soini Y. **Claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 in usual interstitial pneumonia and sarcoidosis.** *J Histochem Cytochem* 2009;57(3):187-195.
- (80) Berridge MV, Herst PM, Tan AS. **Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction.** *Biotechnol Annu Rev* 2005;11:127-152.
- (81) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985;150(1):76-85.
- (82) LI-COR Biosciences. **Odyssey Family of Imaging Systems Brochure - Dec 2013.** abgerufen von <http://biosupport.licor.com/docs/OdysseyFamilyBrochure.pdf> ;(2-7-2014).
- (83) Singh AB, Sugimoto K, Dhawan P, Harris RC. **Juxtacrine activation of EGFR regulates claudin expression and increases transepithelial resistance.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293(5):C1660-C1668.
- (84) Singh AB, Sugimoto K, Harris RC. **Juxtacrine activation of epidermal growth factor (EGF) receptor by membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor protects epithelial cells from anoikis while maintaining an epithelial phenotype.** *J Biol Chem* 2007;282(45):32890-32901.
- (85) Martelli A, Rousselet E, Dycke C, Bouron A, Moulis JM. **Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals.** *Biochimie* 2006;88(11):1807-1814.
- (86) Prozialeck WC, Lamar PC, Ikura M. **Binding of cadmium (Cd²⁺) to E-CAD1, a calcium-binding polypeptide analog of E-cadherin.** *Life Sci* 1996;58(20):L325-L330.
- (87) Chao SH, Suzuki Y, Zysk JR, Cheung WY. **Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius.** *Mol Pharmacol* 1984;26(1):75-82.
- (88) Hsu HH, Tzao C, Chang WC, Wu CP, Tung HJ, Chen CY, et al. **Zinc chloride (smoke bomb) inhalation lung injury: clinical presentations, high-resolution CT findings, and pulmonary function test results.** *Chest* 2005;127(6):2064-2071.

- (89) Chian CF, Wu CP, Chen CW, Su WL, Yeh CB, Perng WC. **Acute respiratory distress syndrome after zinc chloride inhalation: survival after extracorporeal life support and corticosteroid treatment.** *Am J Crit Care* 2010;19(1):86-90.
- (90) Karlsson N. **Poisoning from smoke grenades is not due to phosgene.** *Eur Respir J* 1988;1(6):575.
- (91) Vohr HWH. **Toxikologie - Band 2: Toxikologie der Stoffe.** Weinheim: WILEY-VCH Verlag; 2010.
- (92) Riley MR, Boesewetter DE, Kim AM, Sirvent FP. **Effects of metals Cu, Fe, Ni, V, and Zn on rat lung epithelial cells.** *Toxicology* 2003;190(3):171-184.
- (93) Samet JM, Graves LM, Quay J, Dailey LA, Devlin RB, Ghio AJ, et al. **Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals.** *Am J Physiol* 1998;275(3 Pt 1):L551-L558.
- (94) Freitag A, Caduff B. **[ARDS caused by military zinc fumes exposure].** *Schweiz Med Wochenschr* 1996;126(23):1006-1010.
- (95) Carr G, Wright JA, Simmons NL. **Epithelial barrier resistance is increased by the divalent cation zinc in cultured MDCKII epithelial monolayers.** *J Membr Biol* 2010;237(2-3):115-123.
- (96) Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. **Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo.** *Annu Rev Physiol* 2011;73:283-309.
- (97) Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Gookin JL, Coccaro MR, Proctor W, et al. **The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2.** *J Cell Sci* 2008;121(Pt 3):298-305.
- (98) Watson CJ, Hoare CJ, Garrod DR, Carlson GL, Warhurst G. **Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores.** *J Cell Sci* 2005;118(Pt 22):5221-5230.
- (99) Bao S, Knoell DL. **Zinc modulates cytokine-induced lung epithelial cell barrier permeability.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291(6):L1132-L1141.
- (100) Finamore A, Massimi M, Conti DL, Mengheri E. **Zinc deficiency induces membrane barrier damage and increases neutrophil transmigration in Caco-2 cells.** *J Nutr* 2008;138(9):1664-1670.
- (101) Zhong W, McClain CJ, Cave M, Kang YJ, Zhou Z. **The role of zinc deficiency in alcohol-induced intestinal barrier dysfunction.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298(5):G625-G633.

- (102) Rudolf E, Klvacova L, John S, Cervinka M. **Zinc alters cytoskeletal integrity and migration in colon cancer cells.** *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2008;51(1):51-57.
- (103) Chiou YL. **The supplementation of zinc increased the apoptosis of airway smooth muscle cells by increasing p38 phosphorylation.** *Environ Toxicol Pharmacol* 2012;33(1):70-77.
- (104) Paramanantham R, Sit KH, Bay BH. **Adding Zn²⁺ induces DNA fragmentation and cell condensation in cultured human Chang liver cells.** *Biol Trace Elem Res* 1997;58(1-2):135-147.
- (105) Shumilina E, Xuan NT, Schmid E, Bhavsar SK, Szteyn K, Gu S, et al. **Zinc induced apoptotic death of mouse dendritic cells.** *Apoptosis* 2010;15(10):1177-1186.
- (106) Sensi SL, Yin HZ, Carriedo SG, Rao SS, Weiss JH. **Preferential Zn²⁺ influx through Ca²⁺-permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(5):2414-2419.
- (107) Untergasser G, Rumpold H, Plas E, Witkowski M, Pfister G, Berger P. **High levels of zinc ions induce loss of mitochondrial potential and degradation of antiapoptotic Bcl-2 protein in in vitro cultivated human prostate epithelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279(2):607-614.
- (108) Bozym RA, Chimienti F, Giblin LJ, Gross GW, Korichneva I, Li Y, et al. **Free zinc ions outside a narrow concentration range are toxic to a variety of cells in vitro.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2010;235(6):741-750.
- (109) Haase H, Watjen W, Beyersmann D. **Zinc induces apoptosis that can be suppressed by lanthanum in C6 rat glioma cells.** *Biol Chem* 2001;382(8):1227-1234.
- (110) Haase H, Beyersmann D. **Uptake and intracellular distribution of labile and total Zn(II) in C6 rat glioma cells investigated with fluorescent probes and atomic absorption.** *Biometals* 1999;12(3):247-254.
- (111) Watjen W, Haase H, Biagioli M, Beyersmann D. **Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc.** *Environ Health Perspect* 2002;110 Suppl 5:865-867.
- (112) Watjen W, Benters J, Haase H, Schwede F, Jastorff B, Beyersmann D. **Zn²⁺ and Cd²⁺ increase the cyclic GMP level in PC12 cells by inhibition of the cyclic nucleotide phosphodiesterase.** *Toxicology* 2001;157(3):167-175.
- (113) Iryo Y, Matsuoka M, Wispriyono B, Sugiura T, Igisu H. **Involvement of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway in the induction**

- of apoptosis by cadmium chloride in CCRF-CEM cells.** *Biochem Pharmacol* 2000;60(12):1875-1882.
- (114) Samet JM, Silbajoris R, Wu W, Graves LM. **Tyrosine phosphatases as targets in metal-induced signaling in human airway epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21(3):357-364.
- (115) Maret W, Jacob C, Vallee BL, Fischer EH. **Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(5):1936-1940.
- (116) Kulikov AV, Shilov ES, Mufazalov IA, Gogvadze V, Nedospasov SA, Zhivotovsky B. **Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis.** *Cell Mol Life Sci* 2012;69(11):1787-1797.
- (117) Mariani E, Neri S, Cattini L, Mocchegiani E, Malavolta M, Dedoussis GV, et al. **Effect of zinc supplementation on plasma IL-6 and MCP-1 production and NK cell function in healthy elderly: interactive influence of +647 MT1a and -174 IL-6 polymorphic alleles.** *Exp Gerontol* 2008;43(5):462-471.
- (118) Ansteinsson V, Refsnes M, Skomedal T, Osnes JB, Schiander I, Lag M. **Zinc- and copper-induced interleukin-6 release in primary cell cultures from rat heart.** *Cardiovasc Toxicol* 2009;9(2):86-94.
- (119) Ibs KH, Rink L. **Zinc-altered immune function.** *J Nutr* 2003;133(5 Suppl 1):1452S-1456S.
- (120) Rink L, Kirchner H. **Zinc-altered immune function and cytokine production.** *J Nutr* 2000;130(5S Suppl):1407S-1411S.
- (121) Kim YM, Reed W, Wu W, Bromberg PA, Graves LM, Samet JM. **Zn²⁺-induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290(5):L1028-L1035.
- (122) Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. **IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses.** *J Clin Invest* 1998;101(2):311-320.
- (123) Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. **IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages.** *Nat Immunol* 2000;1(6):510-514.
- (124) Fudala R, Krupa A, Matthay MA, Allen TC, Kurdowska AK. **Anti-IL-8 autoantibody:IL-8 immune complexes suppress spontaneous apoptosis of neutrophils.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293(2):L364-L374.
- (125) Franklin RB, Costello LC. **The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers.** *J Cell Biochem* 2009;106(5):750-757.

- (126) Murakami M, Hirano T. **Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling.** *Cancer Sci* 2008;99(8):1515-1522.
- (127) Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, Zalewski PD. **The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death.** *Biometals* 2001;14(3-4):315-330.
- (128) Sunderman FW, Jr. **The influence of zinc on apoptosis.** *Ann Clin Lab Sci* 1995;25(2):134-142.
- (129) John E, Laskow TC, Buchser WJ, Pitt BR, Basse PH, Butterfield LH, et al. **Zinc in innate and adaptive tumor immunity.** *J Transl Med* 2010;8:118.
- (130) Besecker B, Bao S, Bohacova B, Papp A, Sadee W, Knoell DL. **The human zinc transporter SLC39A8 (Zip8) is critical in zinc-mediated cytoprotection in lung epithelia.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294(6):L1127-L1136.
- (131) Zalewski PD, Truong-Tran AQ, Grosser D, Jayaram L, Murgia C, Ruffin RE. **Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic mechanisms and clinical targets. A review.** *Pharmacol Ther* 2005;105(2):127-149.
- (132) Chai F, Truong-Tran AQ, Ho LH, Zalewski PD. **Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: A review.** *Immunol Cell Biol* 1999;77(3):272-278.
- (133) Hamatake M, Iguchi K, Hirano K, Ishida R. **Zinc induces mixed types of cell death, necrosis, and apoptosis, in molt-4 cells.** *J Biochem* 2000;128(6):933-939.
- (134) Semenza GL. **Targeting HIF-1 for cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2003;3(10):721-732.
- (135) Nardinocchi L, Puca R, D'Orazi G. **HIF-1alpha antagonizes p53-mediated apoptosis by triggering HIPK2 degradation.** *Aging (Albany NY)* 2011;3(1):33-43.
- (136) Sendoel A, Kohler I, Fellmann C, Lowe SW, Hengartner MO. **HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase.** *Nature* 2010;465(7298):577-583.
- (137) Chun YS, Choi E, Yeo EJ, Lee JH, Kim MS, Park JW. **A new HIF-1 alpha variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses.** *J Cell Sci* 2001;114(Pt 22):4051-4061.
- (138) Yun YJ, Li SH, Cho YS, Park JW, Chun YS. **Survivin mediates prostate cell protection by HIF-1alpha against zinc toxicity.** *Prostate* 2010;70(11):1179-1188.

- (139) Nardinocchi L, Pantisano V, Puca R, Porru M, Aiello A, Grasselli A, et al. **Zinc downregulates HIF-1alpha and inhibits its activity in tumor cells in vitro and in vivo.** *PLoS One* 2010;5(12):e15048.
- (140) Song Z, Yao X, Wu M. **Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis.** *J Biol Chem* 2003;278(25):23130-23140.
- (141) Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, et al. **An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7.** *Biochemistry* 2001;40(4):1117-1123.
- (142) Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. **Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin.** *Nature* 1998;396(6711):580-584.
- (143) Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. **A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.** *Nat Med* 1997;3(8):917-921.
- (144) Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. **The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases.** *EMBO J* 1997;16(23):6914-6925.
- (145) Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. **The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins.** *Cell* 1995;83(7):1243-1252.
- (146) Dai Z, Zhu WG, Morrison CD, Brena RM, Smiraglia DJ, Raval A, et al. **A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes.** *Hum Mol Genet* 2003;12(7):791-801.
- (147) Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H, Yamori T, et al. **Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide.** *Cancer Res* 2003;63(4):831-837.
- (148) Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, Miura M, Sakamoto M, Hirohashi S, et al. **Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy.** *Cancer Res* 2002;62(17):4860-4866.
- (149) Imoto I, Yang ZQ, Pimkhaokham A, Tsuda H, Shimada Y, Imamura M, et al. **Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas.** *Cancer Res* 2001;61(18):6629-6634.

- (150) LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. **The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.** *Oncogene* 1998;17(25):3247-3259.
- (151) Lee J, Kumagai A, Dunphy WG. **Claspín, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17.** *Mol Cell* 2003;11(2):329-340.
- (152) Tsimaratou K, Kletsas D, Kastrinakis NG, Tsantoulis PK, Evangelou K, Sideridou M, et al. **Evaluation of claspín as a proliferation marker in human cancer and normal tissues.** *J Pathol* 2007;211(3):331-339.
- (153) Semple JI, Smits VA, Fernaú JR, Mamely I, Freire R. **Cleavage and degradation of Claspín during apoptosis by caspases and the proteasome.** *Cell Death Differ* 2007;14(8):1433-1442.
- (154) Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. **Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization.** *Cell* 2000;103(4):645-654.
- (155) Feng P, Li T, Guan Z, Franklin RB, Costello LC. **The involvement of Bax in zinc-induced mitochondrial apoptogenesis in malignant prostate cells.** *Mol Cancer* 2008;7:25.
- (156) Ganju N, Eastman A. **Zinc inhibits Bax and Bak activation and cytochrome c release induced by chemical inducers of apoptosis but not by death-receptor-initiated pathways.** *Cell Death Differ* 2003;10(6):652-661.
- (157) Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. **Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks.** *Nat Immunol* 2009;10(4):348-355.
- (158) Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. **MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1.** *Nature* 1997;385(6616):540-544.
- (159) Provinciali M, Di SG, Fabris N. **Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes.** *Int J Immunopharmacol* 1995;17(9):735-744.
- (160) Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, Matter K. **Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein.** *J Cell Biol* 1996;134(4):1031-1049.
- (161) Zhang B, Guo Y. **Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets.** *Br J Nutr* 2009;102(5):687-693.

- (162) Wang X, Valenzano MC, Mercado JM, Zurbach EP, Mullin JM. **Zinc Supplementation Modifies Tight Junctions and Alters Barrier Function of CACO-2 Human Intestinal Epithelial Layers.** *Dig Dis Sci* 2012.
- (163) Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. **Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(5):L1166-L1178.
- (164) Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Gunzel D, Muller D, Schulzke JD, et al. **Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes.** *Biochim Biophys Acta* 2010;1798(11):2048-2057.
- (165) Mitchell LA, Overgaard CE, Ward C, Margulies SS, Koval M. **Differential effects of claudin-3 and claudin-4 on alveolar epithelial barrier function.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;301(1):L40-L49.
- (166) Cohen TS, Gray LG, Margulies SS. **Cultured alveolar epithelial cells from septic rats mimic in vivo septic lung.** *PLoS One* 2010;5(6):e11322.
- (167) Ohta H, Chiba S, Ebina M, Furuse M, Nukiwa T. **Altered expression of tight junction molecules in alveolar septa in lung injury and fibrosis.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302(2):L193-L205.
- (168) Simet SM, Wyatt TA, DeVasure J, Yanov D, Allen-Gipson D, Sisson JH. **Alcohol increases the permeability of airway epithelial tight junctions in Beas-2B and NHBE cells.** *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36(3):432-442.
- (169) Kelly SP, Chasiotis H. **Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors regulate paracellular permeability in a primary cultured gill epithelium.** *J Exp Biol* 2011;214(Pt 14):2308-2318.
- (170) Lu Z, Ding L, Hong H, Hoggard J, Lu Q, Chen YH. **Claudin-7 inhibits human lung cancer cell migration and invasion through ERK/MAPK signaling pathway.** *Exp Cell Res* 2011;317(13):1935-1946.
- (171) Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse CL, et al. **Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285(5):G1028-G1036.
- (172) Ghassemifar R, Lai CM, Rakoczy PE. **VEGF differentially regulates transcription and translation of ZO-1alpha+ and ZO-1alpha- and mediates trans-epithelial resistance in cultured endothelial and epithelial cells.** *Cell Tissue Res* 2006;323(1):117-125.
- (173) Hummel S, Veltman K, Cichon C, Sonnenborn U, Schmidt MA. **Differential targeting of the E-Cadherin/beta-Catenin complex by gram-positive probiotic**

- lactobacilli improves epithelial barrier function.** *Appl Environ Microbiol* 2012;78(4):1140-1147.
- (174) Greenspon J, Li R, Xiao L, Rao JN, Sun R, Strauch ED, et al. **Sphingosine-1-phosphate regulates the expression of adherens junction protein E-cadherin and enhances intestinal epithelial cell barrier function.** *Dig Dis Sci* 2011;56(5):1342-1353.
- (175) Guo X, Rao JN, Liu L, Zou TT, Turner DJ, Bass BL, et al. **Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: a novel function for polyamines.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285(5):C1174-C1187.
- (176) Iitaka M, Kakinuma S, Fujimaki S, Oosuga I, Fujita T, Yamanaka K, et al. **Induction of apoptosis and necrosis by zinc in human thyroid cancer cell lines.** *J Endocrinol* 2001;169(2):417-424.
- (177) Klein C, Creach K, Irintcheva V, Hughes KJ, Blackwell PL, Corbett JA, et al. **Zinc induces ERK-dependent cell death through a specific Ras isoform.** *Apoptosis* 2006;11(11):1933-1944.
- (178) Park KS, Jeon SH, Oh JW, Choi KY. **p21Cip/WAF1 activation is an important factor for the ERK pathway dependent anti-proliferation of colorectal cancer cells.** *Exp Mol Med* 2004;36(6):557-562.
- (179) Jaiswal AS, Narayan S. **Zinc stabilizes adenomatous polyposis coli (APC) protein levels and induces cell cycle arrest in colon cancer cells.** *J Cell Biochem* 2004;93(2):345-357.
- (180) Ivanov AI, Bachar M, Babbin BA, Adelstein RS, Nusrat A, Parkos CA. **A unique role for nonmuscle myosin heavy chain IIA in regulation of epithelial apical junctions.** *PLoS One* 2007;2(7):e658.
- (181) Ivanov AI, McCall IC, Parkos CA, Nusrat A. **Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex.** *Mol Biol Cell* 2004;15(6):2639-2651.
- (182) Turner JR, Rill BK, Carlson SL, Carnes D, Kerner R, Mrsny RJ, et al. **Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation.** *Am J Physiol* 1997;273(4 Pt 1):C1378-C1385.
- (183) Berglund JJ, Riegler M, Zolotarevsky Y, Wenzl E, Turner JR. **Regulation of human jejunal transmucosal resistance and MLC phosphorylation by Na(+)-glucose cotransport.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281(6):G1487-G1493.
- (184) Clayburgh DR, Barrett TA, Tang Y, Meddings JB, Van Eldik LJ, Watterson DM, et al. **Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction**

- mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo. *J Clin Invest* 2005;115(10):2702-2715.
- (185) Dudek SM, Jacobson JR, Chiang ET, Birukov KG, Wang P, Zhan X, et al. **Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate: roles for cortactin and myosin light chain kinase.** *J Biol Chem* 2004;279(23):24692-24700.
- (186) Wu W, Graves LM, Gill GN, Parsons SJ, Samet JM. **Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation.** *J Biol Chem* 2002;277(27):24252-24257.
- (187) Samet JM, Dewar BJ, Wu W, Graves LM. **Mechanisms of Zn(2+)-induced signal initiation through the epidermal growth factor receptor.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;191(1):86-93.
- (188) Wu W, Graves LM, Jaspers I, Devlin RB, Reed W, Samet JM. **Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals.** *Am J Physiol* 1999;277(5 Pt 1):L924-L931.
- (189) Terakado M, Gon Y, Sekiyama A, Takeshita I, Kozu Y, Matsumoto K, et al. **The Rac1/JNK pathway is critical for EGFR-dependent barrier formation in human airway epithelial cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;300(1):L56-L63.
- (190) Patel V, Rosenfeldt HM, Lyons R, Servitja JM, Bustelo XR, Siroff M, et al. **Persistent activation of Rac1 in squamous carcinomas of the head and neck: evidence for an EGFR/Vav2 signaling axis involved in cell invasion.** *Carcinogenesis* 2007;28(6):1145-1152.
- (191) Li T, Yang G, Xu J, Zhu Y, Liu L. **Regulatory effect of Rac1 on vascular reactivity after hemorrhagic shock in rats.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;57(6):656-665.
- (192) Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, et al. **p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho.** *Cell* 2006;127(5):1027-1039.
- (193) Birukova AA, Burdette D, Moldobaeva N, Xing J, Fu P, Birukov KG. **Rac GTPase is a hub for protein kinase A and Epac signaling in endothelial barrier protection by cAMP.** *Microvasc Res* 2010;79(2):128-138.
- (194) Qiao J, Huang F, Lum H. **PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284(6):L972-L980.
- (195) Sandquist JC, Swenson KI, Demali KA, Burrridge K, Means AR. **Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A**

- and B during cell rounding and migration. *J Biol Chem* 2006;281(47):35873-35883.
- (196) Wang Y, Zheng XR, Riddick N, Bryden M, Baur W, Zhang X, et al. **ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells.** *Circ Res* 2009;104(4):531-540.
- (197) Szczepanowska J, Korn ED, Brzeska H. **Activation of myosin in HeLa cells causes redistribution of focal adhesions and F-actin from cell center to cell periphery.** *Cell Motil Cytoskeleton* 2006;63(6):356-374.
- (198) Clayburgh DR, Rosen S, Witkowski ED, Wang F, Blair S, Dudek S, et al. **A differentiation-dependent splice variant of myosin light chain kinase, MLCK1, regulates epithelial tight junction permeability.** *J Biol Chem* 2004;279(53):55506-55513.
- (199) Eutamene H, Theodorou V, Schmidlin F, Tondereau V, Garcia-Villar R, Salvador-Cartier C, et al. **LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK.** *Eur Respir J* 2005;25(5):789-796.
- (200) O'Hara JR, Buret AG. **Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection.** *Front Biosci* 2008;13:7008-7021.
- (201) Kakiashvili E, Speight P, Waheed F, Seth R, Lodyga M, Tanimura S, et al. **GEF-H1 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced Rho activation and myosin phosphorylation: role in the regulation of tubular paracellular permeability.** *J Biol Chem* 2009;284(17):11454-11466.
- (202) Ivanov AI, Samarin SN, Bachar M, Parkos CA, Nusrat A. **Protein kinase C activation disrupts epithelial apical junctions via ROCK-II dependent stimulation of actomyosin contractility.** *BMC Cell Biol* 2009;10:36.
- (203) Ivanov AI, Parkos CA, Nusrat A. **Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation.** *Am J Pathol* 2010;177(2):512-524.
- (204) Schultheiss T, Choi J, Lin ZX, DiLullo C, Cohen-Gould L, Fischman D, et al. **A sarcomeric alpha-actinin truncated at the carboxyl end induces the breakdown of stress fibers in PtK2 cells and the formation of nemaline-like bodies and breakdown of myofibrils in myotubes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(19):9282-9286.
- (205) Nakatsuji H, Nishimura N, Yamamura R, Kanayama HO, Sasaki T. **Involvement of actinin-4 in the recruitment of JRB/MICAL-L2 to cell-cell junctions and the formation of functional tight junctions.** *Mol Cell Biol* 2008;28(10):3324-3335.

- (206) Klimisch HJ. **Lung deposition, lung clearance and renal accumulation of inhaled cadmium chloride and cadmium sulphide in rats.** *Toxicology* 1993;84(1-3):103-124.
- (207) Oberdorster G. **Airborne cadmium and carcinogenesis of the respiratory tract.** *Scand J Work Environ Health* 1986;12(6):523-537.
- (208) Kreyling WG. **Intracellular particle dissolution in alveolar macrophages.** *Environ Health Perspect* 1992;97:121-126.
- (209) Hofmann H. **Doktorarbeit: Zytotoxische Untersuchungen mit ausgewählten Noxen an verschiedenen Zelltypen der Lunge.** Mainz: Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2011.
- (210) Nordberg GF, Kjellstroem T, Nordberg M. Kinetics and Metabolism. **In: Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal.** Friberg L, Elinder CG, Kjellstroem T, Nordberg GF (editors). Boca Raton: CRC Press; 1986. pp. 103-178.
- (211) Van Itallie CM, Anderson JM. **The role of claudins in determining paracellular charge selectivity.** *Proc Am Thorac Soc* 2004;1(1):38-41.
- (212) Calabro AR, Konsoula R, Barile FA. **Evaluation of in vitro cytotoxicity and paracellular permeability of intact monolayers with mouse embryonic stem cells.** *Toxicol In Vitro* 2008;22(5):1273-1284.
- (213) Duizer E, Gilde AJ, Versantvoort CH, Groten JP. **Effects of cadmium chloride on the paracellular barrier function of intestinal epithelial cell lines.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;155(2):117-126.
- (214) Konsoula R, Barile FA. **Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells.** *Toxicol In Vitro* 2005;19(5):675-684.
- (215) Hyun JS, Satsu H, Shimizu M. **Cadmium induces interleukin-8 production via NF-kappaB activation in the human intestinal epithelial cell, Caco-2.** *Cytokine* 2007;37(1):26-34.
- (216) Kataranovski M, Kataranovski D, Savic D, Jovic G, Bogdanovic Z, Jovanovic T. **Granulocyte and plasma cytokine activity in acute cadmium intoxication in rats.** *Physiol Res* 1998;47(6):453-461.
- (217) Marth E, Barth S, Jelovcan S. **Influence of cadmium on the immune system. Description of stimulating reactions.** *Cent Eur J Public Health* 2000;8(1):40-44.
- (218) Ahdieh M, Vandenbos T, Youakim A. **Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281(6):C2029-C2038.

- (219) Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. **A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease.** *Lab Invest* 2004;84(3):282-291.
- (220) Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J. **Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding.** *Eur J Biochem* 1994;223(3):1019-1026.
- (221) Prozialeck WC, Lamar PC. **Interaction of cadmium (Cd²⁺) with a 13-residue polypeptide analog of a putative calcium-binding motif of E-cadherin.** *Biochim Biophys Acta* 1999;1451(1):93-100.
- (222) Park CS, Kim OS, Yun SM, Jo SA, Jo I, Koh YH. **Presenilin 1/gamma-secretase is associated with cadmium-induced E-cadherin cleavage and COX-2 gene expression in T47D breast cancer cells.** *Toxicol Sci* 2008;106(2):413-422.
- (223) Prozialeck WC, Niewenhuis RJ. **Cadmium (Cd²⁺) disrupts Ca²⁺-dependent cell-cell junctions and alters the pattern of E-cadherin immunofluorescence in LLC-PK1 cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181(3):1118-1124.
- (224) Hermanns MI, Fuchs S, Bock M, Wenzel K, Mayer E, Kehe K, et al. **Primary human coculture model of alveolo-capillary unit to study mechanisms of injury to peripheral lung.** *Cell Tissue Res* 2009;336(1):91-105.
- (225) Liu Y, Dong X, Sun J, Zhong C, Li B, You X, et al. **Two-photon fluorescent probe for cadmium imaging in cells.** *Analyst* 2012;137(8):1837-1845.
- (226) Kwon JE, Lee S, You Y, Baek KH, Ohkubo K, Cho J, et al. **Fluorescent Zinc Sensor with Minimized Proton-Induced Interferences: Photophysical Mechanism for Fluorescence Turn-On Response and Detection of Endogenous Free Zinc Ions.** *Inorg Chem* 2012.
- (227) Meng X, Wang S, Li Y, Zhu M, Guo Q. **6-Substituted quinoline-based ratiometric two-photon fluorescent probes for biological Zn²⁺ detection.** *Chem Commun (Camb)* 2012;48(35):4196-4198.
- (228) Scheele N, Schmidt A, Pohl C, Kirkpatrick CJ, Thiermann H, Steinritz D. **A human in vitro alveolar-capillary triple-culture mode with an inflammatory component: Development of a pulmonary cell culture system.** [Abstract]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2012;385(Supplement 1):S80.