

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

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Der TRPA1 Kanal als Zielstruktur bei der
Zinkchlorid-Exposition in vitro**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Franziska Zehfuß

aus

München

2018

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Harald Mückter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dennis Nowak
Priv. Doz. Dr. rer. nat. Hans Zischka

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Dirk Steinritz

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2018

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ZUSAMMENFASSUNG	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 TRP-KANÄLE	2
1.2 DER TRPA1-KANAL.....	3
1.2.1 Strukturelle Aspekte des TRPA1.....	3
1.2.2 Der TRPA1-Kanal als Chemosensor	5
1.2.3 TRPA1-Aktivierung durch Zink	6
1.2.4 Expression des TRPA1.....	7
1.3 ZINK IM MENSCHLICHEN ORGANISMUS.....	8
1.3.1 Zink als essentielles Spurenelement	8
1.3.2 Vergiftungen mit Zink.....	9
1.3.3 Pathophysiologie von Zinkchlorid in der Lunge	12
1.3.4 Lungentoxisches Potential verschiedener Zinksalze	13
1.4 FRAGESTELLUNG UND ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT	15
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 GERÄTE	17
2.2 VERBRAUCHSMATERIAL.....	18
2.3 CHEMIKALIEN.....	18
2.4 KITS, ENZYME, MARKER.....	19
2.5 OLIGONUKLEOTIDE UND ANTIKÖRPER	20
2.6 ZELLINIEN	21
2.7 KULTURMEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR	22
2.8 PUFFER UND LÖSUNGEN	22
2.9 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	24
2.9.1 Subkultivierung von Zellen („splitting“).....	24
2.9.2 Zellzahlbestimmung	24
2.10 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
2.10.1 RT-PCR	25
2.10.2 qPCR.....	26
2.10.3 DNA-Elektrophorese	28
2.11 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	28
2.11.1 Gewinnung von Proteinlysaten.....	29

2.11.2	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	29
2.11.3	<i>Proteintransfer und Nachweis mittels Antikörper</i>	30
2.12	ÄQUORIN-ASSAY	30
2.12.1	<i>Transfektion mit Äquorin Plasmid</i>	32
2.12.2	<i>Messung der intrazellulären Kalzium-Konzentration</i>	32
2.13	WST-ASSAY	34
2.13.1	<i>LC₅₀ -Bestimmungen</i>	34
2.13.2	<i>Versuchsaufbau mit spezifischen TRPA1-Inhibitor A967079</i>	35
2.13.3	<i>Statistische Methoden</i>	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	EXPRESSION DES TRPA1 KANALS IN DEN VERSCHIEDENEN ZELLSYSTEMEN	37
3.1.1	<i>Qualitativer Nachweis der TRPA1 Expression auf mRNA-Ebene</i>	37
3.1.2	<i>Quantitativer Nachweis der TRPA1 Expression auf mRNA-Ebene</i>	38
3.1.3	<i>TRPA1 Expression auf Protein-Ebene</i>	39
3.1.4	<i>Fazit</i>	39
3.2	TRPA1 AKTIVIERUNG: BETRACHTUNG DER DURCH ZINK-IONEN VERMITTELTEN ÄNDERUNG DER INTRAZELLULÄREN KALZIUMKONZENTRATION	40
3.2.1	<i>Prüfung der Versuchsbedingungen</i>	40
3.2.2	<i>Änderung des Kalziumspiegels durch Zink-Ionen in HEK 293 TRPA1 Zellen mit induzierter TRPA1-Expression</i>	43
3.2.3	<i>Änderung des Kalziumspiegels durch Zink-Ionen in A549</i>	51
3.2.4	<i>Fazit zur Betrachtung der TRPA1-Aktivierung durch funktionelle Kalziummessungen</i>	57
3.3	BETRACHTUNG DER ZELLVITALITÄT NACH EXPOSITION MIT ZINKCHLORID	58
3.3.1	<i>LC₅₀-Bestimmungen</i>	58
3.3.2	<i>Zinkchlorid-Toxizität bei TRPA1 Inhibition mit A967079</i>	61
3.3.3	<i>Vergleichende Betrachtung organischer Zinksalze</i>	64
3.3.4	<i>Fazit Zink-Toxizität</i>	70
4	DISKUSSION	71
4.1	TRPA1-AKTIVIERUNG DURCH ZINK IN ZELLEN MIT INDUZIERTER TRPA1-EXPRESSION	71
4.2	TRPA1-AKTIVIERUNG DURCH ZINK IN ZELLEN MIT SPONTANER TRPA1-EXPRESSION	75
4.3	TRPA1 AKTIVIERUNG DURCH WEITERE ORGANISCHER ZINKSALZE	76
4.4	VITALITÄT DER ZELLLINIEN NACH ZINKCHLORID-EXPOSITION	76
4.5	KEIN PROTEKTIVER EFFEKT DURCH TRPA1-INHIBITION	77
4.6	VERGLEICHENDE BETRACHTUNG DER VITALITÄT NACH EXPOSITION MIT ORGANISCHEN ZINKSALZEN	77
5	FAZIT	80
	ANHANG	82

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	82
TABELLENVERZEICHNIS	84
LITERATURVERZEICHNIS	85
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	VI
DANKSAGUNG.....	VII

Abkürzungsverzeichnis

AITC	Allylthiocyanat
ARDS	„acute respiratory distress syndrome“ Akutes Atemnotsyndrom
bp	Basenpaare
CI	Konfidenzintervall
Cp	crossing point
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	„fetal calf serum“, fötales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEK 293	Human embryonic kidney Cells Type 293
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	„horseradish peroxidase“, Peroxidase aus Meerrettich
hTRPA1	humaner „transient receptor potential receptor A1“
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
LC ₅₀	halbmaximale letale Konzentration
MEM	Minimal Essential Medium
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase Kettenreaktion
PEEP	„positive endexpiratory pressure“, positiver endexpiratorischer Druck

PLC	Phospholipase C
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
RIPA	„Radio immunoprecipitation assay“, Puffer zur Proteinextraktion
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS-PAGE	„Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“, Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAE	Siehe Tris Acetat EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRPA1	TRP-Kanal der Familie A, einziger Vertreter
TRPC	TRP-Kanal der Familie C
TRP-Kanal	„transient receptor potential“-Kanal
TRPM	TRP-Kanal der Melastatin-Familie
TRPML	TRP-Kanal der Mucolipin-Familie
TRPP	TRP-Kanal der Polycystin-Familie
TRPV	TRP-Kanal der Vanilloid-Familie
VE	Voll entsalzt
WST-1	„water soluble tetrazolium salt“ Typ 1, wasserlösliches Tetrazoliumsalz Typ 1
ZIP	ZRT, IRT- like Protein
ZnAc	Zinkacetat
ZnOr	Zinkorotat
ZnT	Zinc Transporter

Zusammenfassung

Der TRPA1-Kanal ist ein wichtiger sensorischer Ionen-Kanal, der hauptsächlich im peripheren bzw. im zentralen Nervensystem, aber auch in epithelialem Gewebe der Lunge exprimiert wird (Büch et al., 2013; Mukhopadhyay et al., 2011). Eine Vielzahl natürlicher oder synthetischer Reizstoffe aktivieren den Kanal, darunter inhalative Schadstoffe wie Acrolein, Ozon, Chlorgas und Zigarettenrauch (Hinman et al., 2006; Jordt et al., 2003; Voets et al., 2005; Zygmunt & Högestätt, 2014). Hu et al. konnten zeigen, dass auch exogene Zink-Ionen zu einer TRPA1 Aktivierung und so zu einem Kalziumstrom in Maus-Neuronen führt (Hu et al., 2009). Trotz seiner wichtigen Rolle als essentielles Spurenelement besitzt Zink toxische Eigenschaften (Holleman, 2008; Plum et al., 2010; Wolfram, 2009; Wu et al., 2013). Das toxische Potential von Zink-Ionen ist dabei für die Exposition der Lunge am größten (Roney, 2005). Die Pathophysiologie der Lungentoxizität von Zink ist dabei noch weitgehend ungeklärt. Ziel der Arbeit war es, *in vitro* zu prüfen, ob die Aktivierung des TRPA1 auch in Alveolar-Epithelzellen relevant ist. Zudem sollte geklärt werden, ob diese Aktivierung in ursächlichem Zusammenhang mit der lungentoxischen Wirkung von Zink steht. Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen über den Äquorin-Assay als Parameter für die TRPA1-Aktivierung zeigten zwar einen durch Zink-Ionen ausgelösten Anstieg der intrazellulären Kalzium-Ionenkonzentration in endogen TRPA1-exprimierenden A549-Zellen. Versuche mit einem spezifischen TRPA1-Inhibitor ließen jedoch den Schluss zu, dass dieser Anstieg nicht TRPA1 vermittelt war. Betrachtungen der Zellvitalität ergaben, dass der TRPA1-Kanal gemäß den Parametern des WST-1 Assays nicht maßgeblich an der Vermittlung der toxischen Eigenschaften von Zink-Ionen beteiligt war. Zinkchlorid zeigte in HEK 293 Zellen ohne TRPA1 und transfizierte HEK 293 Zellen, die TRPA1 im Übermaß exprimierten, dasselbe toxische Potential. Der spezifische TRPA1-Inhibitor A967079 zeigte keinen protektiven Effekt bei einer Exposition aller drei Zelllinien gegenüber Zink-Ionen.

Die Ergebnisse stellen eine Zink-vermittelte TRPA1 Aktivierung bei endogener Expression also in Frage. Zudem scheint der TRPA1-Kanal nicht an der Toxizität von Zink beteiligt zu sein.

1 Einleitung

Zink zählt zu den Übergangsmetallen und bildet zusammen mit Kadmium und Quecksilber die zwölfte Gruppe des Periodensystems. Im Gegensatz zu den giftigen Schwermetallen Kadmium und Quecksilber ist Zink für den menschlichen Organismus lebensnotwendig (Hollemann, 2008; Wolfram, 2009). Trotz seiner wichtigen Rolle als essentielles Spurenelement besitzt Zink auch toxische Eigenschaften (Hollemann, 2008; Plum et al., 2010; Wolfram, 2009; Wu et al., 2013).

Stellt man die verschiedenen Expositionsarten (dermal, gastrointestinal, pulmonal) verschiedenen Zinkverbindungen gegenüber, ist die Exposition der Lunge mit Zinkchlorid besonders schwerwiegend im Hinblick auf die Folgen (El Idrissi et al., 2017; Plum et al., 2010; Roney, 2005).

Es gibt Hinweise darauf, dass exogenes Zink aktivierend auf den TRPA1-Ionenkanal wirkt (Gu & Lin, 2010; Hu et al., 2009).

Der TRPA1-Ionenkanal ist ein wichtiger Sensor chemischer und physikalischer Noxen (Macpherson et al., 2007; Zygmunt & Högestätt, 2014).

TRPA1 wird unter anderem in der Lunge exprimiert (Büch et al., 2013; Mukhopadhyay et al., 2011). Wegen seiner Rolle bei Schmerz und Entzündungsprozessen stellt er derzeit eine wichtige Zielstruktur für die Entwicklung neuer Pharmaka dar (Baraldi et al., 2010). Im Vergleich zu sensorischen Neuronen ist über seine Rolle in Epithelzellen kaum etwas bekannt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, den TRPA1-Kanal in Modellzellen für Alveolarepithel-Zellen Typ II hinsichtlich seiner Aktivierbarkeit durch Zinkchlorid zu charakterisieren und zu überprüfen, ob der TRPA1 Kanal in Verbindung mit der lungentoxischen Wirkung von Zinkchlorid gebracht werden kann.

1.1 TRP-Kanäle

Bei den „*Transient Receptor Potential*“-Kanälen handelt es sich um eine Superfamilie von unspezifischen Kationenkanälen mit gemeinsamen Strukturmerkmalen. Sie haben sensorische und effektorische Funktionen.

Erstmalig beschrieben wurden TRP-Kanäle 1969 von Cosens und Manning (Cosens & Manning, 1969), die eine *Drosophila melanogaster* Mutante entdeckten, deren Photorezeptoren nur eine vorübergehende (transiente) Reaktion auf Lichtreize gaben. 20 Jahre später wurde das TRP-Gen schließlich von Montell und Rubin kloniert (Montell & Rubin, 1989).

Die TRP-Kanal-Superfamilie umfasst in Säugetieren sechs Familien, nämlich die klassische oder „*canonical*“ (TRPC-Kanäle) mit sieben Mitgliedern (TRPC1-TRPC7), die Vanilloid-Rezeptor-Familie mit sechs Vertretern (TRPV1-TRPV6), die Melastatin-Familie (TRPM-Kanäle), welche mit 8 Mitgliedern die größte Gruppe bildet, und schließlich die Mucolipin und Polycystin-Familie (TRPML- bzw. TRPP-Kanäle) mit je drei Vertretern.

Die einzige Familie mit nur einem bekannten Mitglied, nämlich TRPA1, ist die Ankyrin-Familie (Clapham et al., 2005).

Strukturell sind allen TRP-Kanälen vier Untereinheiten gemeinsam, die jeweils sechs transmembranäre Domänen aufweisen. Als Tetramere bilden jeweils die Transmembran-Segmente 1-4 einen Spannungssensor und die Segmente 5 und 6 die eigentliche Kanal-Pore mit Selektivitätsfilter. Je nach TRP-Kanal sind Homo- und Heterotetramere beschrieben (Clapham, 2003; Pedersen et al., 2005).

Die zytosolischen Komponenten der TRP-Kanäle weisen große Diversität auf.

Trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten variieren die Aktivierungsmechanismen und die physiologischen Funktionen innerhalb einer Unterfamilie stark.

Mit Ausnahme von TRPM4 und TRPM5, die beide nur monovalente Kationen leiten, sowie der Kalzium-selektiven Kanäle TRPV5 und TRPV6, sind TRP-Kanäle unselektive Kalzium-Kanäle (Clapham, 2003). Damit sind sie an Kalzium-abhängigen Regulationsmechanismen, die von der Gentranskription bis zum Zelltod reichen, beteiligt.

Extrapoliert man die regulatorischen Funktionen, die TRP-Kanäle auf zellulärer Ebene haben

auf den gesamten Organismus, bilden TRP-Kanäle eine wichtige Instanz in der Detektion und Vermittlung von Reizen wie Hitze, Kälte, Geschmack, Druck und Schmerz.

Unter den Thermosensoren finden sich Vertreter der TRPV- und TRPM-Familien (Bautista et al., 2007; Jordt et al., 2003; Tominaga, 2007).

Für den TRPA1-Kanal sind in Säugern thermo- bzw. chemosensorische Eigenschaften beschrieben worden (Kapitel 1.2.2).

TRPC-Kanäle spielen eine wichtige Rolle in neuronalen Prozessen, sind aber auch an vasomotorischen Regelprozessen im kardiovaskulären System beteiligt (Dietrich et al., 2007).

Eine besondere Eigenschaft weisen TRPM2, TRPM6 und TRPM7 auf: Sie besitzen C-terminale Enzymdomänen und werden deshalb auch als „*chanzymes*“ bezeichnet (Montell, 2003), ein Kunstwort der englischen Begriffe „*channel*“ (Kanal) und „*enzyme*“ (Enzym).

1.2 Der TRPA1-Kanal

Der TRPA1 Kanal ist der bislang einzige bekannte Vertreter der Familie A der „*Transient Receptor Potential*“-Kanäle. Er wurde im Jahr 2003 entdeckt (Story et al., 2003).

Aufgrund seiner Eigenschaft als Sensor chemischer und physikalischer Noxen und vor allem als Nozizeptor ist er als Zielstruktur in der jüngsten Vergangenheit immer mehr in den Fokus der pharmakologischen Forschung gelangt.

1.2.1 Strukturelle Aspekte des TRPA1

Der Gruppe um Brewster gelangen im Jahr 2015 elektronenmikroskopische Aufnahmen des TRPA1-Kanals (Brewster & Gaudet, 2015).

Kennzeichnend für den TRPA1-Kanal ist die N-terminale Ankyrin-Domäne, welche nahezu die Hälfte des Gesamtproteins ausmacht (Abb. 1).

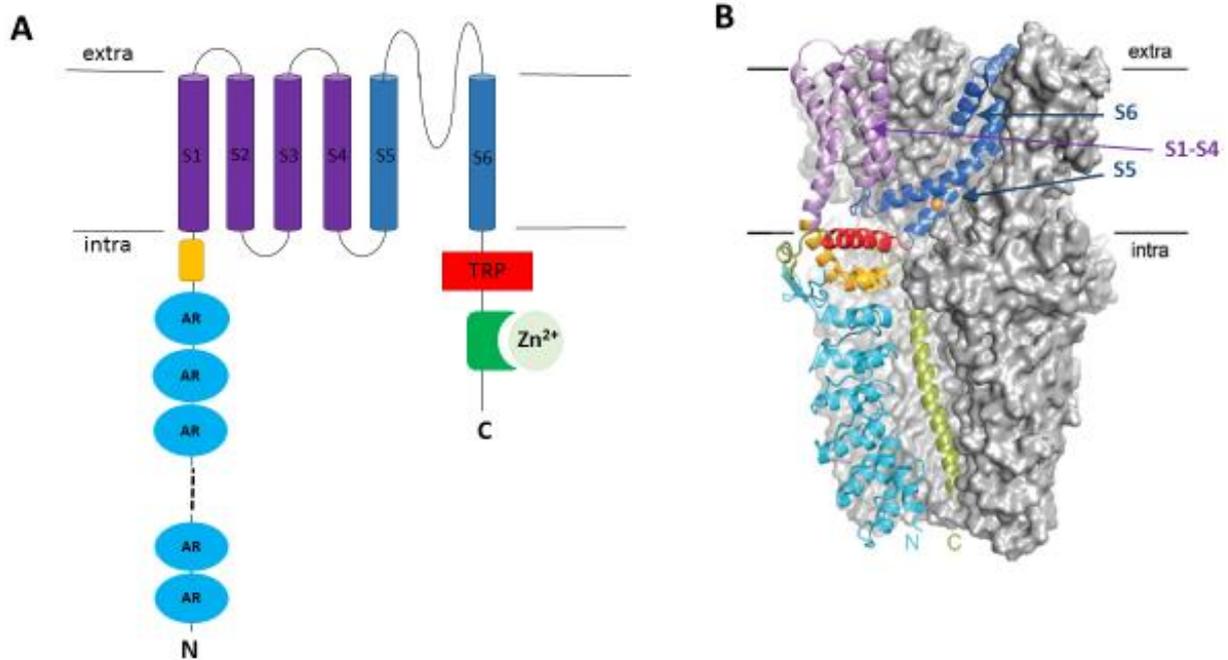


Abb. 1 Struktur des TRPA1-Kanals

(A) Schematische Darstellung einer TRPA1-Untereinheit mit den N- und C-terminalen Domänen. Türkise Ovale: „Ankyrin-Repeat (AR)“-Domäne; oranges Rechteck: Linker; lila Zylinder: Transmembransegmente S1-S4; blaue Zylinder: Transmembransegmente S5 und S6; Rotes Rechteck: TRP-Domäne; grünes Rechteck: Zink-Bindungsdomäne (B) Abb. modifiziert nach Brewster und Gaudet (Brewster & Gaudet, 2015): Darstellung eines TRPA1-Homotetramers: grau im Hintergrund drei TRPA1-Untereinheiten, eine TRPA1-Untereinheit ist farbig im Vordergrund. Das Farbschema folgt demselben Prinzip, wie in (A).

Die Funktion der „ankyrin repeat“-Domäne ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Einige Arbeitsgruppen halten eine Beteiligung des TRPA1 in der Vermittlung mechanischer Reize mit der Ankyrin-Domäne als struktureller Voraussetzung für diese für möglich (Gaudet, 2008).

Weit besser bekannt ist, dass Cystein-reiche, N-terminale Regionen nahe der Plasmamembran primäre Zielstrukturen für elektrophile Aktivatoren darstellen (Brewster & Gaudet, 2015; Macpherson et al., 2007; Wang et al., 2012).

Auf die Ankyrin-Domäne folgen nach einer Verbindungsstruktur die sechs α -helicalen Transmembrandomänen.

Die Transmembransegmente 5 und 6 (Abb. 1) bilden die eigentliche Pore.

Die als rotes Rechteck bzw. rote α -Helix dargestellte TRP-Domäne (Abb. 1), war bisher nur für TRPC-, TRPV- und TRPM-Kanäle bekannt (Venkatachalam & Montell, 2007). Über deren Funktion ist man noch weitgehend im Unklaren.

Der C-Terminus (Abb. 1A) ist wiederum eine Cystein-reiche Region, die eine der wichtigsten Bindungsstellen für TRPA1-Aktivator Zink darstellt (Hu et al., 2009).

1.2.2 Der TRPA1-Kanal als Chemosensor

Während über das Ausmaß und die Art der Beteiligung des TRPA1-Kanals an der Detektion und Vermittlung von thermischen und mechanischen Reizen noch diskutiert wird, ist seine Rolle als Sensor für chemische Reize allgemein akzeptiert.

Die Palette der derzeit bekannten TRPA1-Aktivatoren ist breit gefächert (Zygmunt & Högestätt, 2014). Darunter finden sich zahlreiche sekundäre Pflanzenstoffe wie Scharfstoffe aus Meerrettich, Senf und Kresse, bekannte Arzneistoffe natürlicher (z.B. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol) und synthetischer Herkunft (z.B. Lidocain, Diclofenac, oder Clotrimazol), aber auch inhalative Schadstoffe wie Acrolein, Ozon, Chlorgas, Zigarettenrauch. Auch der chemische Kampfstoff S-Lost ist dieser Liste hinzuzufügen (Stenger et al., 2017; Stenger et al., 2015).

Generell wird unterschieden zwischen kovalent modifizierenden, stark elektrophilen Aktivatoren und nicht elektrophilen Aktivatoren. Starke Elektrophile gehen mit Thiolen spezifischer N-terminaler Cysteine Bindungen ein. Zimtaldehyd, ein Stoff aus *Cinnamomum*-Arten, welcher als α , β -ungesättigter Aldehyd in einer Michael-Addition mit Thiolen reagiert, ist ein klassisches Beispiel (Macpherson et al., 2007).

Scharfstoffe aus Senf- und Meerrettich-Arten mit Isothiocyanat-Struktur aktivieren den TRPA1-Kanal auf ähnliche Weise unter Bildung von Dithiocarbamaten (Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007).

Ein gut charakterisierter TRPA1-Agonist vom Isothiocyanat-Typ ist Allylisothiocyanat (AITC). In dieser Arbeit diente AITC als Referenzsubstanz für die direkte und reversible TRPA1-Aktivierung. Abb. 2 zeigt die chemische Struktur von AITC.

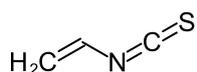


Abb. 2: Strukturformel von Allylisothiocyanat (AITC)
(IUPAC: 3-isothiocyanatoprop-1-ene)

Andere Agonisten am TRPA1 sind keine Elektrophile. Ihre Aktivierungsmechanismen sind größtenteils noch unbekannt.

Einige biogene Agonisten wie Menthol, Campher oder Zimtaldehyd weisen bimodale Eigenschaften auf. Dies bedeutet, sie aktivieren in niedrigen Konzentrationen, höhere Konzentrationen dagegen inaktivieren den Kanal (Alpizar et al., 2013; Karashima et al., 2007).

Die Liste der natürlichen TRPA1-Inhibitoren beschränkt sich derzeit auf Resolvin D2 und 1,8-Cineol (Park et al., 2011; Takaishi et al., 2012).

Spezifische TRPA1-Inhibitoren synthetischer Natur finden sich in der präklinischen Prüfung als Analgetika bzw. Antiphlogistika (Baraldi et al., 2010).

Der selektive TRPA1-Inhibitor A967079 (Abb. 3) kam als etablierter TRPA1-Antagonist in dieser Arbeit zur Anwendung.

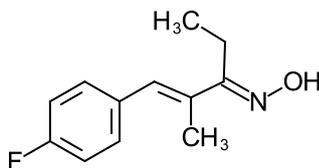


Abb. 3 Strukturformel von A967079
(IUPAC: (1E,3E)-1-(4-Fluorphenyl)-N-hydroxy-2-methyl-1-penten-3-imin)

Bei den beschriebenen Substanzen, die den TRPA1-Kanal als Zielstruktur adressieren, handelt es sich ausschließlich um exogene Verbindungen. Darüber hinaus existieren auch endogene Aktivatoren wie z.B. Sauerstoff, Stickstoffmonoxid, Protonen und zweiwertige Ionen wie Kalzium- oder Zink-Ionen (Zygmunt & Högestätt, 2014).

1.2.3 TRPA1-Aktivierung durch Zink

Die Eigenschaft des TRPA1, bereits durch nanomolare Konzentrationen intrazellulären Zinks aktiviert zu werden, wurde im Jahr 2009 bekannt (Andersson et al., 2009). Kurz darauf zeigten Hu et al. (Hu et al., 2009), dass auch exogenes Zink TRPA1 aktiviert. Der zu Grunde liegende Mechanismus scheint dabei der Influx einer geringen Menge Zink durch den TRPA1-Kanal selbst zu sein. Anschließend führt die intrazelluläre Erhöhung der Zinkkonzentration zur vollen Aktivierung des Kanals. Als wichtigste Interaktionsstellen wurde ein Cystein- bzw. Histidinrest im C-Terminus identifiziert.

Diese Beobachtungen wurden durch die Arbeit von Gu und Lin (Gu & Lin, 2010) gestützt, die die Aktivierung des TRPA1 durch Zinkchlorid am Tiermodell bestätigten.

In-vitro Versuche zur Aktivierung von TRPA1 wurden bislang nur an neuronalen Zellen gezeigt.

1.2.4 Expression des TRPA1

Die bisherigen Erkenntnisse über den TRPA1 Kanal wurden größtenteils an neuronalem Gewebe erlangt. Er stellt eine wichtige Zielstruktur für die pharmakologische Intervention bei neuro-inflammatorischen Vorgängen dar.

In den Atemwegen wird der TRPA1 Kanal hauptsächlich in primären sensorischen Neuronen von trigeminalen, vagalen und spinalen Ganglien exprimiert. Die Vermittlung von Entzündungsprozessen durch TRPA1 ist dabei gut charakterisiert. Einige TRPA1-Inhibitoren befinden sich zurzeit als Therapieoption bei chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Asthma und COPD in klinischer Testung (Preti et al., 2012).

Die Tatsache, dass zahlreiche inhalative Schadstoffe, wie z.B. Acrolein, Chlorgas, Phosgen, Zigarettenrauch und sogar chemische Kampfstoffe wie S-Lost aktivierend wirken (Kapitel 1.2.2), unterstreichen die Relevanz des TRPA1-Kanals als Chemosensor in der Lunge.

Über die Rolle des TRPA1 Kanals in nicht-neuronalem Lungengewebe ist weitaus weniger bekannt.

Die Expression des TRPA1 konnte sowohl in humanen Alveolarepithel-Zelllinien als auch in humanen Lungenschnitten nachgewiesen werden (Büch et al., 2013; Mukhopadhyay et al., 2011; Stenger et al., 2015). Bezüglich seiner Funktion können derzeit nur Spekulationen angestellt werden.

Außer in der Lunge kommt der TRPA1-Kanal u.a. in Keratinozyten der Haut und enterochromaffinen Zellen des Darms vor (Atoyan et al., 2009; Denda & Tsutsumi, 2011; Nozawa et al., 2009).

1.3 Zink im menschlichen Organismus

Zink muss dem menschlichen Körper regelmäßig und in ausreichender Menge zugeführt werden, um essentielle Stoffwechselprozesse aufrechtzuerhalten. Als Interaktionspartner mit Proteinen erfüllt Zink katalytische, strukturgebende und regulatorische Funktionen. Trotz seiner Eigenschaft als essentielles Spurenelement kann Zink toxisch sein.

1.3.1 Zink als essentielles Spurenelement

Nach Eisen ist Zink das zweithäufigste Spurenelement im menschlichen Organismus.

Die Rolle des Zinks in biologischen Systemen ist durch zwei wichtige Eigenschaften geprägt. Zum einen kommt Zink aufgrund seines Standardreduktionspotentials von $-0,76\text{ V}$ ausschließlich als zweiwertiges Kation (Hollemann, 2008) vor und ist im Gegensatz zu Eisen oder Kupfer nicht unmittelbar an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt. Zum anderen reagiert es als Lewis-Säure unter Bildung stabiler Komplexe (McCall et al., 2000).

Als Bestandteil von circa 300 Enzymen ist Zink an vielen essentiellen Stoffwechselprozessen beteiligt (Vallee & Auld, 1990). Reaktionspartner sind unter anderem Lipide, Kohlenhydrate, Proteine und Nukleinsäuren.

Als eines der ersten Enzyme, welches Zink als katalytisch aktiven Kofaktor benötigt, wurde die Carboanhydrase identifiziert (Vallee, 1955). Sie katalysiert die Hydratisierung von Kohlenstoffdioxid zu Kohlensäure und ist für die Säure-Base-Regulation essentiell. Ein prominentes Beispiel für die strukturgebende Eigenschaft sind Zinkfinger-Proteine. Bei dieser Proteinklasse werden durch koordinative Bindung an ein zentrales Zink-Ion Tertiärstrukturen gebildet, die eine Interaktion v.a. mit DNA ermöglicht (Klug & Rhodes, 1987). Wichtige Vertreter dieser Proteine sind unter anderem Steroidhormon-Rezeptoren (Beato, 1989). Ein weiteres Beispiel ist die Stabilisierung des Insulins in seiner Speicherform in den β -Zellen des Pankreas (Li, 2014).

Die Gesamtmenge an Zink im menschlichen Körper beträgt 2–3g.

Die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung empfohlene Tageszufuhr von 7 bzw. 10 mg für gesunde erwachsene Frauen und Männer liegt rund 5 mg unter der Empfehlung der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 2004). Das Bundesinstitut für Risikobewertung sieht die

duldbare Obergrenze für die tägliche Aufnahme derzeit bei 25 mg Zink (Schafft, 2014; Wolfram, 2009).

Die Verteilung der Zink-Ionen erfolgt in der Regel über das Serum, wo Zink gebunden an Albumin, Transferrin oder α -Mikroglobulin transportiert wird (Kaye et al., 2002).

Zink kann durch Vertreter der TRP-Kanal-Superfamilie in bestimmte Zellen gelangen. Die Zinkhomöostase wird darüber hinaus durch Zinktransporter oder weitere Zink-leitende Kanäle aufrechterhalten. Für den Zinkimport verantwortlich sind die 14 Vertreter der ZIP-Familie, welche Zink in das Zytosol schleusen und die 10 Zinktransporter der ZnT-Familie, welche Zink aus dem Zytosol in andere Kompartimente exportieren (Kambe et al., 2004; Lichten & Cousins, 2009).

Einige Zelltypen verfügen über spezialisierte Zinkosome. Diese membrangebundenen vesikulären Strukturen sequestrieren überschüssige freie Zink-Ionen und können diese nach bestimmten Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktoren wieder freigegeben (Plum et al., 2010).

Für die Bindung von rund 20% des intrazellulären Zinks ist das Thionein/Metallothionein-System verantwortlich. Wegen deren sehr hohem Cystein-Gehalt binden Thioneine neben Zink noch andere Spurenelemente wie Kupfer oder giftige Schwermetalle wie Kadmium oder Quecksilber. Metallothioneine scheinen sowohl eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Schwermetallen zu spielen (Vasak & Meloni, 2011), als auch regulatorische Funktionen zu übernehmen (Maret, 2000).

1.3.2 Vergiftungen mit Zink

Abgesehen von der Dosis spielt neben der Art der Zinkverbindung vor allem der Aufnahmeweg eine Rolle hinsichtlich der Schwere und Ausprägung der Symptome.

Von toxikologischer Relevanz sind zwei Eintrittspforten für Zink, nämlich die Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt und die inhalative Aufnahme.

Hinweise auf die Resorption toxischer Mengen an Zink-Ionen über die Haut gibt es nicht, obwohl Zink unter bestimmten Umständen auch über die Haut aufgenommen wird, wie eine dermatologische Studie zur perkutanen Resorption von Zinkoxid gezeigt hat (Agren, 1990).

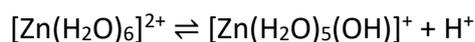
Vergiftungen über die Haut spielen kaum eine Rolle, wohl aber die direkte Schädigung der Haut.

Zink als Lewis-Säure

Einige Zinksalzen wie z.B. Zinkchlorid, Zinksulfat, oder Zinkacetat können zu lokalen Hautreizungen führen (Lansdown, 1991). Zinkchlorid ist laut des global harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS, „*Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals*“) der Vereinten Nationen als Gefahrstoff mit Ätzwirkung auf die Haut und Schleimhäute zu kennzeichnen ("Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006," 2009).

In wässriger Lösung existiert Zink als saures Hexaquo-Ion, aber auch in Form basischer Zinkate.

Die Azidität von Zinkchlorid in wässrigem Millieu ist über die Hydrolyse von Aquakomplexen zu erklären. Für Zinkchlorid sind in niedrigen Konzentrationsbereichen oktaedrische $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ -Ionen, mit steigenden Zinkchlorid-Konzentrationen tetraedrisch gebaute ZnCl_4^{2-} -Ionen beschrieben (Holleman, 2008). Die Hydrolyse kann folgendermaßen formuliert werden:



Orale Intoxikation mit Zink

Über die akute orale Zinkvergiftung existieren einige Fallberichte. Deren Leitsymptomatik ist gekennzeichnet von Übelkeit, Erbrechen und abdominalen Schmerzen mit oder ohne Ulzerationen (Brown et al., 1964; Lewis & Kokan, 1998; Moore, 1978; Samman & Roberts, 1987).

Eine chronische Zinkvergiftung ist aufgrund der stark regulierten Aufnahme von Zink im Jejunum bislang nicht beschrieben. Ein dauerhaftes Überangebot von Zink kann zu Kupfermangel-Zuständen führen (Wolffram, 2009).

Für den Zink-induzierten Kupfermangel wurden sowohl hämatologische als auch neurologische Störungen beschrieben (Duncan et al., 2015; Maret & Sandstead, 2014; Sandstead, 1995).

Inhalative Vergiftung mit Zinkverbindungen

Für die Intoxikation mit Zink über die Lunge gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche klinische Bilder.

Bei der Inhalation von Zinkoxid, aber auch von Dämpfen anderer Schwermetalle, wie u.a. Kadmium, Blei, Eisen, Nickel, Kobalt, oder Mangan, wurde von der Ausbildung eines Gießerfiebers („metal fume fever“) berichtet. Dabei treten grippeähnliche Symptome wie Fieber, Gliederschmerzen und Schüttelfrost auf. In der Regel klingt das Gießerfieber komplikationslos nach 3–4 Tagen wieder ab. Spätfolgen sind nicht bekannt (Atif Ahsan et al., 2009; Kaye et al., 2002).

Im Gegensatz dazu hat die inhalative Aufnahme von Zinkchlorid weitaus schwerwiegendere Folgen. Die Inhalation von Zinkchlorid wurde vor allem in Verbindung mit der Zündung von Nebelgranaten (auch Rauchgranaten oder „smoke bombs“) beschrieben.

Viele westliche Nationen haben Konsequenzen aus dem lungentoxischen Potential von Zinkchlorid gezogen und entsprechende Nebelzündkörper aus dem Waffenarsenal gestrichen (Steinritz et al., 2017). Dennoch ist die Verwendung vor allem in politisch instabilen Regionen wie z.B. dem Nahen Osten nicht ausgeschlossen. Die Rezepturen verschiedener Zündgemische sind problemlos im Internet abrufbar, die Rohstoffe einfach zu beschaffen.

Das Zündgemisch besteht in der Regel aus einer chlorierten Kohlenstoffverbindung, Zinkoxid und einem Katalysator wie Aluminium, oder Magnesium (Van Driel et al., 1998).

Voraussetzung für die Intoxikation über die Lunge ist eine besonders feine Verteilung von Zinkchlorid. Der bei der Zündung entstehende Zinkchlorid-Nebel weist eine durchschnittliche Teilchengröße von $\leq 0,3 \mu\text{M}$ auf (Hjortsø et al., 1988; National Research Council, 1999) und gelangt bis in den Alveolarbereich der Lunge.

Laut Papritz (Papritz, 2015) kam es seit dem zweiten Weltkrieg zu ca. 60 Zwischenfällen, davon 20 mit Todesfolge, bei denen Soldaten, aber auch Zivilisten Zinkchlorid-haltigem Nebel ausgesetzt waren.

Im klinischen Verlauf der Mehrzahl der Fälle waren nach pulmonaler Exposition gegenüber Zinkchlorid schwere Fälle eines „acute respiratory distress syndroms“ (ARDS) protokolliert worden (Gil, 2008; Hjortsø et al., 1988; Homma et al., 1992).

Im mehrstufigen Verlauf des ARDS kommt es zur Ödembildung, überschießenden Entzündungsprozessen, allgemein zu einem massiv gestörten Gasaustausch und letzten Endes zu einer irreversiblen Fibrosierung der Lunge.

Fatalerweise kann die Bedrohlichkeit des Prozesses wegen des symptomarmen Initialstadiums unterschätzt werden. Die medizinischen Maßnahmen orientieren sich derzeit an der Symptomatik und sind beschränkt: künstliche Beatmung mit positivem endexpiratorischem Druck (PEEP) negative Flüssigkeitsbilanz, und Vier-Seiten-Wechselagerung, um die Akkumulation von Ödemen in den Lungenabschnitten zu vermeiden, und um die Resorption des Exsudats zu erleichtern (El Idrissi et al., 2017) (Dushianthan et al., 2011; Johnson & Matthay, 2010).

1.3.3 Pathophysiologie von Zinkchlorid in der Lunge

Die zugrundeliegenden Pathomechanismen der Lungenschädigung durch Zinkchlorid sind noch weitgehend unklar. Eine kausale Therapie steht derzeit nicht zur Verfügung. Ebenso unklar ist bislang, welche Dosis Zinkchlorid zur Entstehung eines ARDS führt. Evans, der von einem militärischen Zwischenfall mit Nebelgranaten während des zweiten Weltkriegs in einem Tunnel berichtet, schätzte die Konzentration, die bei 10 von insgesamt 70 Exponierten innerhalb von vier Tagen zum Tod geführt hatte, auf ca. 33 mg Zink/m³ (Evans, 1945). Über die tatsächliche Expositionszeit wurden keine Aussagen gemacht. Basierend auf Tiermodellen schätzte Cullumbine die tödliche äußere Dosis für den Menschen auf 50.000 mg/m³ min (Cullumbine, 1957).

Die Menge an Zinkchlorid, die tatsächlich in den Alveolarbereich der Lunge gelangt, ist abhängig von den unterschiedlichsten Faktoren wie z.B. Luftfeuchtigkeit, Expositionsort und -Dauer. Es muss davon ausgegangen werden, dass sowohl Reaktionsprodukte, wie z.B. Hexachlorethan, aber auch Nebenprodukte anwesend sind und Einfluss auf die Toxizität von Zinkchlorid in der Lunge nehmen.

Zinkchlorid ist außerordentlich gut wasserlöslich und trifft in der Lunge zunächst auf alveolare Oberflächenflüssigkeit, in der es sich löst.

Die nun freien Zink-Ionen können unter anderem über Ionenkanäle, z.B. den TRPA1-Kanal, in die Zelle gelangen.

Über die pathophysiologische Konsequenz des plötzlichen Zink-Überschusses in der Lunge ist relativ wenig bekannt.

Allgemein betrachtet verursacht Zink in verschiedenen Geweben sowohl apoptotischen als auch nekrotischen Zelltod (Hamatake et al., 2000; Iitaka et al., 2001; Kim et al., 1999). Dabei scheint Zink u.a. einen Einfluss auf die Aktivität der Caspase 3 zu haben (Truong-Tran et al., 2001).

Obwohl Zink aufgrund seines Standardreduktionspotentials von $-0,76\text{ V}$ nicht dazu neigt, in direkter Weise reaktive Sauerstoffspezies zu generieren, übt Zink auf verschiedene Arten oxidativen Stress aus. Zink-Ionen können indirekt über die NADPH-Oxidoreduktase (NOX) zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führen (Noh & Koh, 2000). Einen weiteren Mechanismus zeigten Wilhelm und Walther (Walther et al., 2000; Wilhelm et al., 2001). Zink führte in verschiedenen Lungenzelllinien zu einem erhöhten Spiegel an oxidiertem Glutathion (GSSG) und einer verminderten Aktivität der GSSG-Reduktase.

1.3.4 Lungentoxisches Potential verschiedener Zinksalze

Gemäß des toxikologischen Profils der Gesundheitsbehörden der USA für Zink (Roney, 2005) ist Zinkoxid im Hinblick auf die Lungentoxikologie mit Abstand am besten charakterisiert. Nach der Exposition gegenüber Zinkoxid kam es in der Mehrheit der Fälle zum sogenannten „metal fume fever“.

Für Zinkchlorid hingegen steht neben Irritationen der oberen Atemwege die Ausbildung eines ARDS im Vordergrund (Roney, 2005).

Die unterschiedliche Symptomatik, die eine inhalative Aufnahme von Zinkoxid bzw. Zinkchlorid nach sich ziehen kann, liegt mit großer Wahrscheinlichkeit in ihrer unterschiedlichen Chemie begründet. Zinkoxid ist eine in Wasser schwer lösliche Zinkverbindung. Wie Wu zusammenfassend darstellt (Wu et al., 2013), setzt die Toxizität von Zinkoxid in der Lunge zunächst eine Aufnahme von Zinkoxid-Partikeln über Endocytose voraus. Die durch den niedrigen endosomalen pH-Wert gelösten Zink-Ionen werden schließlich freigesetzt. Zinkchlorid hingegen ist außerordentlich gut wasserlöslich und trifft in der Lunge zunächst auf alveolare Oberflächenflüssigkeit, in der es sich löst. In wässriger Lösung reagiert Zinkchlorid sauer. Dies ist durch die Bildung von Aquakomplexen zu erklären (Kapitel 1.3.2).

Zinkacetat, das Zinksalz der Essigsäure ($\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$) ist ein weiteres gut wasserlösliches Zinksalz. Zinkacetat findet Anwendung als Geschmacksverstärker (Anlage 4 zu §5 Absatz 1 und §7 der ("Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (zuletzt geändert am 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272, 2287)), " 1998).

Interessanterweise weist Zinkacetat sowohl in Ratten als auch in Mäusen eine höhere akute orale Toxizität auf als Zinkchlorid (Domingo et al., 1988). Lungentoxische Effekte sind nicht beschrieben. Laut der Stoffdatenbank des Gefahrstoffinformationssystems des Institutes für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (GESTIS-Stoffdatenbank) wird der „Hinweis auf ein lungenschädigendes Potential von Z[inkacetat]-Stäuben (...) durch Erfahrungen und Ergebnisse aus Tierversuchen mit anderen Zinkverbindungen gestützt.“ (GESTIS-Stoffdatenbank, 2017a).

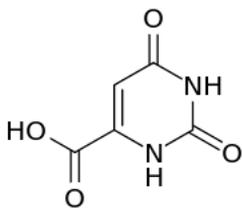


Abb. 4: Strukturformel der Orotsäure

Zinkorotat findet häufige Anwendung in der Medizin als Zinksupplement. Das Zinksalz der Orotsäure ($\text{Zn}(\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_4)_2$) ist im Vergleich zu Zinkacetat relativ schwer löslich. Die Strukturformel der Orotsäure ist in Abb. 4 dargestellt. Obwohl Zinkorotat-haltige Arzneimittel (z.B. Zinkorotat POS, Fa. Ursapharm) bzw. zahlreiche Nahrungsergänzungsmittel zur Zink-Supplementierung im Handel sind, existieren kaum toxikologische Daten zu Zinkorotat. In der GESTIS-Stoffdatenbank findet sich kein Eintrag zu Zinkorotat. Laut Sicherheitsdatenblatt der Firma Sigma Aldrich für Zinkorotat-dihydrat ("MSDS 75515 Zinkorotat," 2012) ist Zinkorotat gemäß der EG-Verordnung (Nr. 1272/2008) kein gefährlicher Stoff bzw. keine gefährliche Substanz oder kein gefährliches Gemisch im Sinne der EG Richtlinien 67/548/EWG oder 1999/45/EG.

1.4 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit

Wie im Abschnitt 1.2 dieser Arbeit dargestellt, ist der TRPA1-Kanal ein wichtiger sensorischer Kanal in der Lunge, der durch eine Vielzahl chemischer Noxen aktiviert wird. Eine davon sind exogene Zink-Ionen (Hu et al., 2009).

Unlängst konnte gezeigt werden, dass TRPA1 nicht nur in neuronalem, sondern auch in epithelalem Gewebe exprimiert wird (Büch et al., 2013; Mukhopadhyay et al., 2011).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu überprüfen, ob

- (1) exogene Zink-Ionen in vitro den TRPA1-Ionenkanal in epithelialen Zellen aktivieren.
- (2) diese Aktivierung relevant für die Toxizität von Zink ist.

Als Quelle für exogene Zink-Ionen wurde Zinkchlorid gewählt, da dieses Salz zu den toxischsten Zinkverbindungen zählt.

Als Parameter für die Aktivierung des TRPA1-Kanals diente die Änderung des intrazellulären Kalzium-Spiegels.

A549 Zellen, eine gut charakterisierte humane Zelllinie mit endogener TRPA1-Expression, wurden als in-vitro-Zellmodell für Alveolarepithelzellen Typ II gewählt.

HEK 293 Zellen ohne TRPA1 (Wildtyp) und transfizierte HEK 293 Zellen (HEK 293 TRPA1), die TRPA1 im Übermaß exprimierten, dienten als Referenz.

Der Einfluss einer TRPA1-Aktivierung auf die Zellintegrität sollte über die kolorimetrische Messung der Vitalität der verschiedenen Zelllinien unter verschiedenen Bedingungen ausgewertet werden.

Als Vergleich zu Zinkchlorid wurden zwei organische Zinksalze herangezogen, für die noch keine lungentoxischen Eigenschaften beschrieben sind, nämlich Zinkacetat und Zinkorotat.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tab. 2-1 Liste der Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Chemilumineszenzdetektor	Odyssey FC	Licor Biosciences, Bad Homburg
CO ₂ Inkubator	HeraCell 150	ThermoFisher Waltham, Massachusetts
Elektrophoresekammer	Mini PROTEAN® Tetra	Biorad, München
Mikroplatten Lesegerät	M200 Pro	Tecan, Männedorf
Mikroskop	Wilover AFL 40 Phako	Hund, Wetzlar
PCR-Apparatur	C1000 Touch Thermo	Biorad, München
pH Meter	pH7310	WTW, Weilheim
qPCR-Apparatur	Lightcycler® 480 II	Roche, Penzberg
Spannungsquelle	PeqPower	Peqlab, Erlangen
Sterilwerkbank	HeraSafe	ThermoFisher, Waltham, Massachusetts
Tischzentrifuge	Haereus Pico 17	Thermo Fisher Waltham, Massachusetts
Wasserbad	AquaLine AL12	Lauda, Königshofen
Zellzähler	TC 20	Biorad, München
Zentrifuge Hettich	Mikro220 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Zellkultur	Haereus Megafuge	ThermoFisher Waltham, Massachusetts

2.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 2-2 Liste der Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
Cellstar® PP-Röhrchen mit Schraubverschluss, steril 50 ml, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Serologische Pipetten, steril 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® TC Filter Top Zellkulturflaschen, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<ul style="list-style-type: none"> • 250 ml, 75 cm² Wachstumsfläche, (T75), • 50 ml, 25 cm² Wachstumsfläche, (T25) • 550 ml, 175 cm² Wachstumsfläche, (T175) 	
Cellstar® Zellkultur Mikroplatten klar, F-Boden, steril mit Deckel, 96 Well,	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Zellkultur Mikroplatten weiß, F-Boden, steril, 96 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Brand GmbH, Wertheim
Reaktionsgefäße, PP, 0,2 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zählkammer Dual Chamber Cell Counting Slides for TC20,	BioRad Laboratories, München

2.3 Chemikalien

Tab. 2-3 Liste der Chemikalien

Produkt	Firma
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
DMSO	Riedel-DdeHaën, Seelze b. Hannover
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Hepes	Carl Roth, Karlsruhe

Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium Azid	Merck, Darmstadt / Sigma-A., Deisenhofen
Ponceau S	AppliChem / PanReac, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Stickstoff (N ₂) flüssig	Linde, München
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe

Alle übrigen Rohstoffe und Feinbiochemika stammten von Sigma Aldrich, Deisenhofen.

2.4 Kits, Enzyme, Marker

Tab. 2-4 Liste der verwendeten Kits und Enzyme

Produkt	Firma
cOmplete Mini Protease-Inhibitor Cocktail	Roche Applied Sciences, Penzberg
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Promofectin	Promocell, Heidelberg
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
RNEasy Mini Kit RNA Isolation Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Thermo Scientific Absolute qPCR SYBR Green Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche Applied Sciences, Penzberg

Tab. 2-5 Liste der Marker

Produkt	Firma
6x DNA Loading Dye	Fermentas, Waltham, USA
DNA GeneRuler 100bp	Fermentas, Waltham, USA
DNA GeneRuler 1kb	Fermentas, Waltham, USA
Full Range Rainbow Proteinstandard	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg

2.5 Oligonukleotide und Antikörper

Tab. 2-6 Liste der verwendeten Oligonukleotide zum Nachweis des *hTRPA1*

Methode	Gen	Oligonukleotidsequenz	T _m [°C]
PCR	hTRPA1	Vorwärts: tcatgagaccatgcttcacag	64,0
		Rückwärts: attgtggctcactgagaaaca	58,1
qPCR	hTRPA1	Vorwärts: tcaccatgagctagcagactattt	59,6
		Rückwärts: gagagcgtccttcagaatcg	58,2
	β-Aktin	Vorwärts: ccaaccgcgagaagatga	57,1
		Rückwärts: ccagaggcgtacaggatag	59,0

Tab. 2-7 Liste der Antikörper

Produkt	Firma / Katalognr.	Typ	Verw. Konzentration
Anti TRPA1	Abnova, #PAB15114	Kaninchen anti- Maus, polyklonal, DyLight 549 gekoppelt	2 µg/ml
Anti Rabbit IgG	Sigma Aldrich, #A0545	Ziege anti- Kaninchen, polyklonal, Peroxidase gekoppelt	5 µg /ml
Anti β-Aktin	Sigma Aldrich, #A3854	Maus, monoklonal, Peroxidase gekoppelt	2 µg /ml

2.6 Zelllinien

Tab. 2-8 Liste der Zelllinien

Linie	Charakteristik	Herkunft
A549:	Humane Adenokarzinom-Zelllinie mit Merkmalen einer Alveolarepithel-Typ-II-Zelle	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
HEK293	Immortalisierte humane embryonale Nieren-Zelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
HEK293 TRPA1	Immortalisierte humane embryonale Nieren-Zelllinie mit stabiler Überexpression des humanen TRPA1	etabliert von Eva A. M. Schäfer AG Prof. Dr. Thomas Büch am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU

2.7 Kulturmedien und Lösungen für die Zellkultur

Tab. 2-9 Liste der Zellkulturmedien und -Lösungen

Produkt	Firma	Zusatz
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe	10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe	
Minimal Essential Medium (MEM)	Invitrogen, Karlsruhe	10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Penicillin / Streptomycin Konzentrat 100x	Invitrogen, Karlsruhe	
Trypsin-Lösung: 0,05% in PBS	Invitrogen, Karlsruhe	

2.8 Puffer und Lösungen

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden in deionisiertem Wasser (VE-Wasser) angesetzt, soweit nicht anders beschrieben. Die angegebenen pH-Werte beziehen sich auf Raumtemperatur und wurden mit 0,1 N Natronlauge bzw. mit 0,1 N Salzsäure eingestellt, soweit nicht anders angegeben. Die Substanzen wurden in Analysequalität von Sigma Aldrich, Deisenhofen, bezogen, sofern sie nicht in Tab. 2-3 gesondert aufgeführt sind.

Tab. 2-10 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung	
Lämmli-Puffer, 5x	4x Tris/ SDS Puffer (pH 6,8)	375 mM
	Glycerin	48%
	SDS (Natriumlaurylsulfat)	6%
	Bromphenolblau	0,03%
	β-Mercaptoethanol	9%
Laufpuffer, 10x	Tris Base	250 mM
	Glycin	1,920 M

	SDS (Natriumlaurylsulfat)	35 mM
Messpuffer (Äquorin-Assay)	NaCl	140,0 mM
pH 7,4	KCl	5,4 mM
	CaCl ₂	1,8 mM
	MgCl ₂	1,0 mM
	HEPES	20,0 mM
	Glukose	10,0 mM
	pH bei 37°C eingestellt	
PBS, 10x	NaCl	1,37 M
	KCl	27 mM
	Na ₂ HPO ₄	101 mM
	KH ₂ PO ₄	18 mM
PBS, 1x	PBS 10x	10% (V/V)
RIPA-Puffer	Igepal CA-630	1,0 %
	Natrium-Deoxycholot	0,5 %
	SDS	0,1 %
	in 1x PBS	
TAE-Puffer, 50x	Tris Base	2 M
	Na-EDTA	50 mM
	pH 8,3 eingestellt mit	
	Essigsäure 100 %	
Transferpuffer (Western Blot)	Tris Base	250 mM
	Glycin	1,920 M
	SDS (Natriumlaurylsulfat)	7 mM
Tris / SDS Puffer, 4x	Tris Base	500 mM
pH 6,8	SDS (Natriumlaurylsulfat)	1 mM
	pH eingestellt bei 4-8 °C	
Tris / SDS Puffer, 4x	Tris Base	1,5 mM
pH 8,8	SDS (Natriumlaurylsulfat)	14,0 mM
	pH eingestellt bei 4-8 °C	

2.9 Zellbiologische Methoden

Alle verwendeten Zelllinien wurden standardmäßig bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator gehalten. Sofern nicht anders beschrieben, wurden Zellkulturflaschen der Firma Greiner Bio-One mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² verwendet (T75).

Alle Arbeitsschritte mit lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.9.1 Subkultivierung von Zellen („splitting“)

Um ein normales Wachstum zu gewährleisten, wurde in regelmäßigen Abständen subkultiviert.

Zum Aufteilen der Zellen wurde zuerst das alte Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift mit 10 ml PBS ohne Calcium- bzw. Magnesium Ionen, bevor 1 ml 0,05% Trypsin gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt wurde. Nach der jeweils erforderlichen Einwirkzeit im Brutschrank wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden abgelöst und in 9 ml des jeweiligen Zellkulturmediums aufgenommen. Das im Medium enthaltene FCS sollte die Enzymreaktion stoppen. Für HEK 293 Zellen betrug die Inkubationszeit mit Trypsin 2-3 min., A549 Zellen benötigten ca. 5-10 min. Die anschließende Zentrifugation der Zellsuspension erfolgte bei Raumtemperatur für 5 min bei 500 x g. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das verdichtete Zellagglomerat in jeweils 9 ml Kulturmedium aufgenommen. Die nun vorhandene Zellsuspension konnte entsprechend der Anwendung weiterverwendet werden.

Für ein reguläres „Splitting“ wurde je ein Drittel der Zellsuspension in frische T75-Zellkulturflaschen überführt und mit temperiertem Medium auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Die jeweiligen Gesamtvolumina betrugen 10 ml für T75, 5 ml für T25, sowie 20 ml für T175 Zellkulturflaschen.

2.9.2 Zellzahlbestimmung

Wenn für den Versuchsaufbau eine definierte Zellzahl benötigt wurde, mussten diese zunächst gezählt werden. Die Konzentration der Zellsuspension wurde mit dem TC20 Automated Cell Counter bestimmt. 10 µl der zuvor gewonnenen Zellsuspension wurden in einen Dual Chamber Cell Counting Slide überführt und mit dem Zellzähler vermessen. Nach

dem Einführen der Zählkammer in das Gerät, wurde die Zellkonzentration ausgelesen. Anhand dieser Kennzahl wurden die erforderlichen Verdünnungsvolumina berechnet.

2.10 Molekularbiologische Methoden

In der vorliegenden Arbeit kamen zwei molekularbiologische Methoden zum Einsatz. Um die Bildung von mRNA als Vorstufe für das TRPA1-Protein zu untersuchen, wurde eine Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Um Aussagen bezüglich der Quantität der TRPA1 mRNA treffen zu können, kam eine quantitative Polymerase Kettenreaktion zum Einsatz. Beiden Methoden gingen eine Isolierung der mRNA und die Umwandlung dieser mRNA in cDNA voraus.

2.10.1 RT-PCR

Bei der Polymerase Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) werden mittels einer Enzym-abhängigen Reaktion DNA Sequenzen amplifiziert, um die Expression bestimmter Genen zu zeigen. Die jeweilige Sequenz wird dabei bestimmt durch zwei definierte Oligonukleotidsequenzen, die sogenannten „*primer*“. Diese binden jeweils in 3′-5′ Richtung an die komplementären DNA-Stränge und definieren den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt.

Der PCR ging die Gewinnung der Gesamt-RNA mit dem RNEasy Mini Kit und das Umschreiben der RNA in cDNA mit RevertAid H minus first strand cDNA Synthesis Kit voraus. Dabei wurde nach Hersteller-Protokollen verfahren. Die Quantifizierung von RNA bzw. DNA erfolgte photometrisch im Plattenlesegerät M200 Pro mittels NanoQuant-Platte ebenfalls nach Angabe des Herstellers.

Für den qualitativen Nachweis des TRPA1-Kanals auf mRNA-Ebene wurden die in Tab. 2-6 aufgeführten Oligonukleotid-Sequenzen verwendet.

Die Zusammensetzung je eines Reaktionsansatzes lautete, wie in Tab. 2-11 angegeben. Pro Zelllinie wurden 3 Replikate angesetzt.

Tab. 2-11 Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x DreamTaq Buffer	2,50 μ l	1x
dNTP-Mix (2mM each)	2,50 μ l	200 μ M
hTRPA1 fwd (5 μ M)	2,50 μ l	0,5 μ M
hTRPA1 rev (5 μ M)	2,50 μ l	0,5 μ M
DreamTaq Polymerase (5U/ μ l)	0,25 μ l	1,25 U
Template DNA	1,00 μ l	-
Wasser, nukleasefrei	13,75 μ l	-

Die Reaktion wurde im C1000 Touch Thermal Cycler durchgeführt und folgte dem in Tab. 2-12 angegebenen Protokoll.

Tab. 2-12 Parameter der PCR

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Initial heat activation	3	95	-
Denaturation	0,5	94	
Annealing	0,5	58	25
Extension	1	72	
Final extension	10	72	-

2.10.2 qPCR

Die quantitative Polymerase Kettenreaktion („*quantitative polymerase chain reaction*“, qPCR) beruht auf dem Prinzip der Reverse Transkriptase-PCR. Bei der qPCR kann durch eine Fluoreszenzmessung in Echtzeit der relative Gehalt der cDNA – und damit auch indirekt der relative Gehalt der Ursprungs-mRNA – bestimmt werden.

Ein Fluoreszenzmarker lagert sich in den DNA-Doppelstrang ein, wodurch ein fluoreszierender DNA-Farbstoff-Komplex entsteht. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Anzahl der PCR-Produkte zu. Die Quantität der PCR-Produkte für den hTRPA1 -Genabschnitt wurde in Relation zu β -Aktin bestimmt.

Die eigentliche Reaktion, sowie die Messung der Fluoreszenzintensitäten wurde im Lightcycler 480 II durchgeführt.

Je ein Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten (Tab. 2-13). Als „*Template-DNA*“ diente die cDNA jeweils einer der verwendeten Zelllinien bzw. Nuklease freies Wasser als Negativkontrolle. Die Oligonukleotidsequenzen für den hTRPA1-Kanal und für das Referenzgen β -Aktin sind der Tab. 2-6 zu entnehmen.

Tab. 2-13 Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [μ l]	Vorverdünnung
Thermo Scientific Absolute	5	-
Oligonukleotid vorwärts	1	1:10
Oligonukleotid rückwärts	1	1:10
Template DNA	2	1:10
Wasser, nukleasefrei	1 μ l	-

Die Ansätze wurden in spezielle 96-well Platten der Firma Roche pipettiert, mit der zugehörigen Klebefolie versiegelt, für 2 min bei 3000 x g zentrifugiert und in den LightCycler 480 II gestellt.

In Tab. 2-14 sind die Parameter der Reaktion zusammengefasst.

Tab. 2-14 Parameter der qPCR

Schritt	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklen
Initial heat activation	15 min	94	-
Denaturation	10 s	94	
Annealing	10 s	55	55
Extension	10 s	72	

Die Fluoreszenzintensitäten wurden nach jedem Elongationsschritt („*Extension*“) bei 521 nm und 72°C gemessen. Angeregt wurde der DNA-SybrGreen- Komplex bei 494 nm. Die LightCycler 480 II Software ermittelte die sogenannten C_p -Werte. Unter einem „*Crossing point*“ versteht man denjenigen PCR-Zyklus, ab dem ein bestimmter Schwellenwert der Fluoreszenzintensität überschritten wird. Über die sogenannte „ $\Delta\Delta C_p$ -Methode“ wurde die

hTRPA1-Genexpression in jeder der drei verwendeten Zelllinien anhand folgender Formel quantifiziert:

$$2^{(Cp \text{ Actin} - Cp \text{ hTRPA1})} \cdot 100 = \text{Expression hTRPA1 [\%]}$$

2.10.3 DNA-Elektrophorese

Als weitere Qualitätskontrolle für die qPCR und zur Auswertung der RT-PCR diente die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarose- Gel. Dabei wurden die Produkte der PCR im elektrischen Feld gemäß ihrer Größe aufgetrennt. Um eine Aussage bezüglich der tatsächlichen Fragmentgröße treffen zu können, wurden neben den Proben spezielle Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

In dieser Arbeit kamen selbst gegossene Gele mit 1 % Agarose in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (1xTAE-Puffer, Tab. 2-10) zur Anwendung. In der Gelmatrix eingelagert war Ethidiumbromid. Dieser DNA-Interkalator ist ein gängiger Fluoreszenzmarker zur Visualisierung der DNA in der Molekularbiologie.

Die Proben wurden im Verhältnis 6:1 mit dem DNA-Laufpuffer 6x DNA Loading Dye gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im TAE-Puffer konstant bei 120 V (ca. 300 mA). Über die Höhe der Lauffront wurde das Ende der Elektrophorese abgeschätzt. Die Auswertung erfolgte über das UV-Dokumentationsgerät.

2.11 Proteinbiochemische Methoden

Die Expression des hTRPA1 auf Proteinebene, wurde in der vorliegenden Arbeit über einen sogenannten „*Western Blot*“ nachgewiesen. Der "*Western Blot*" ist eine Methode zum qualitativen Nachweis spezifischer Proteine. Nach Extraktion des Proteinanteils einer Matrix erfolgten eine Auftrennung des Proteingemisches mittels Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese („*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*“, SDS-PAGE) und anschließend ein Transfer der nach Molekülgröße separierten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran. Das auf der Membran fixierte Protein von Interesse wurde anschließend durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen.

2.11.1 Gewinnung von Proteinlysaten

Die Extraktion der Proteine erfolgte durch einen Aufschluss der Zellen mit RIPA-Puffer („*radio immunoprecipitation assay buffer*“). Die Zusammensetzung ist der Tab. 2-10 zu entnehmen. Konfluente Zellen wurden direkt in einer T75 Zellkulturflasche einmal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und 500 µl eiskalter RIPA-Puffer in die Flasche pipettiert. Mit einem Zellschaber wurde der Zellrasen abgelöst und das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 60 min Inkubation auf Eis und gelegentlichem durchmischen, wurde das Lysat 30 min lang bei 4°C und 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts erfolgte kolorimetrisch mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit nach Anweisung des Herstellers.

2.11.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese beruht auf der Trennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße über ein Polyacrylamid-Gel im elektrischen Feld. Die Eigenladungen der Proteine werden dabei durch SDS maskiert (Laemmli, 1970). Der Elektrophorese des Proteingemisches ging ein reduktiver Aufschluss durch Mischen der Proben mit 5x Lämmli-Puffer im Verhältnis 5:1 voraus.

Die Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels ist in Tab. 2-15 dargestellt.

Tab. 2-15 Zusammensetzung eines 10 %igen Polyacrylamidgel

Inhaltsstoff	Trenngel 10 %	Sammelgel
Acrylamid 30%	5 ml	0,65 ml
4 x Tris / SDS	3,75 ml (pH 8,8)	1,25 ml (pH 6,8)
Millipore-H ₂ O	6,125 ml	3,05 ml
10% APS in H ₂ O	100 µl	50 µl
TEMED	20 µl	10 µl

Die Herstellung der Gele im Mini-PROTEAN Handcast System erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

Die Elektrophorese lief bei 20 mA pro Gel für ca. 60-90 min.

2.11.3 Proteintransfer und Nachweis mittels Antikörper

Der Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf Nitrocellulose wurde mit dem Mini Trans-Blot Cell bei 100 mA und 4°C über 20 h durchgeführt. Danach durchlief die Nitrocellulosemembran ein stets einheitliches Wasch- und Inkubationsprotokoll.

Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 2-7 aufgeführt. Die Visualisierung des spezifisch gebundenen primären Antikörpers erfolgte über eine, an den Sekundäntikörper gekoppelte, Enzym-katalysierte Reaktion mit Meerrettich-Peroxidase (HRP). Der Sekundäntikörper richtete sich hierbei nach der Spezies, in der der Primäntikörper generiert worden war. Durch die Hinzugabe eines HRP-Detektions-Substrat (Luminata Forte Western HRP Substrate, Merck Millipore) kam es zur Chemilumineszenz. Diese wurde am Odyssey FC Imaging System (Licor) detektiert.

2.12 Äquorin-Assay

Das Photoprotein Äquorin wurde 1962 von Shimomura aus biolumineszenten Quallen der Art *Aequorea* isoliert und charakterisiert (Shimomura et al., 1962). Es handelt sich um ein spezielles Enzym, das in Verbindung mit Kalzium-Ionen und seiner prosthetischen Gruppe Coelenterazin in der Lage ist, Photonen zu emittieren.

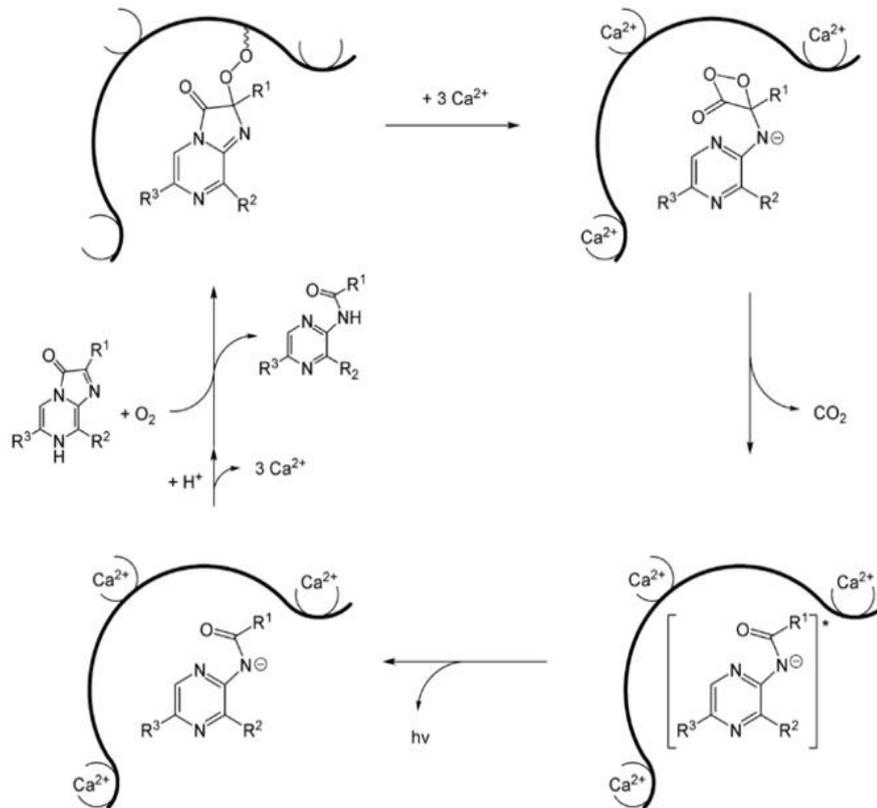


Abb. 5 Schema Enzymreaktion von Äquorin (adaptiert aus Shimomura et al. 1974):

Die Bindung von drei Kalzium-Ionen pro Apoaequorin führt zu einer Konformationsänderung. Über die daraus resultierende Decarboxylierung wird das Coelenterazin in einen energetisch angeregten Zustand versetzt. Das instabile Intermediat relaxiert unter Abgabe von Energie in Form von Lichtquanten zum wesentlich stabileren Coelenterazinamid. Die Reaktivierung des Systems erfolgt oxidativ.

Mit dem Äquorin Assay wurde in dieser Arbeit die Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration nach der Zugabe verschiedener Zinksalzlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Dies geschah entweder in An- oder Abwesenheit des spezifischen TRPA1-Inhibitors A96079.

Die Selektivität von Äquorin für Kalzium wurde bereits vom Entdecker gezeigt. Dabei wurden Zink neben 12 weiteren Kationen getestet (Shimomura et al., 1962). Diese lagen entweder als Chlorid-, Sulfat- oder Acetat-Salz vor.

Mit dieser Eigenschaft war die Äquorin-Methode den klassischen komplexierenden Fluoreszenzfarbstoffen für Kalzium überlegen wie z.B. Fura 2 oder Fluo-4, welche beide eine höhere Affinität zu zweiwertigen Zink Ionen aufweisen (Martin et al., 2006; Ollig et al., 2016). Da Äquorin natürlicherweise in den verwendeten Zelllinien nicht vorkommt, mussten die

Zellen zunächst über Transfektion zur Expression des Photoproteins gebracht werden. Vor der eigentlichen Messung wurden die Zellen suspendiert und mit Coelenterazin beladen.

2.12.1 Transfektion mit Äquorin Plasmid

Bei der Transfektion wurde ein artifizielles Plasmid, welches die Gensequenz für Apoäquorin enthielt, in die verwendeten Zelllinien eingebracht. Dabei wurde nach Herstellerangaben des Transfektions-Reagenzes Promofectin vorgegangen. Die Plasmid DNA wurde freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Andreas Breit aus dem Walther-Straub-Institut der LMU. Tab. 2-16 zeigt die Transfektionsparameter.

Tab. 2-16 Parameter der Transfektion

Zelltyp	Promofectin	Äquorin Plasmid DNA	Modus
HEK WT	12 μ l	10 μ l	5x10 ^{*6} Zellen, suspendiert
HEK TRPA1	12 μ l	10 μ l	5x10 ^{*6} Zellen, suspendiert
A549	36 μ l	60 μ l	konfluente T175 Flasche, adhärent

Alle Zellen wurden 3 Tage nach der Transfektion verwendet, sofern die Transfektionseffizienz mindestens 60 % aufwies. Bei erfolgreicher Transfektion wurde neben dem Äquorin auch das Photoprotein GFP („green fluorescent protein“) exprimiert, welches grünes Licht der Wellenlänge 509 nm emittiert (Shimomura, 2005). Die Überprüfung der Transfektionseffizienz erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop.

2.12.2 Messung der intrazellulären Kalzium-Konzentration

Der Messpuffer und die Zink-haltigen Injektionslösungen wurden in größerer Menge hergestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Rezeptur des Messpuffers ist in der Tab. 2-10 aufgeführt. Der Messpuffer wurde bei 37 °C mit 1M Natronlauge auf pH 7,4 \pm 0,02 eingestellt und diente auch als Grundlage für die Zink-Injektionslösungen. Für deren Herstellung wurden 1200 μ l einer 5 mM wässrigen Lösung von Zinkchlorid, Zinkacetat oder Zinkorotat mit 18,8 ml Messpuffer gemischt. 10 ml Verdünnung wurden nun sukzessive 1:1 mit Messpuffer verdünnt. Die Verdünnungen wurden auf 37 °C erwärmt und der pH-Wert gegebenenfalls wieder auf 7,4 \pm 0,02 korrigiert. Die im Ergebnisteil angegebenen Zinkkonzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration nach der Injektion von 20 μ l Zink-

Injektionslösung zu 100 µl Zellsuspension. Die tatsächlichen Konzentrationen der Aliquots waren also 6x höher.

Vor der Verwendung wurden sowohl der Messpuffer, als auch die Injektionslösungen im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben, trypsinisiert, zentrifugiert und in 3 ml temperierten MEM ohne Phenolrot und ohne weitere Zusätze aufgenommen. Nach Zugabe des Substrates Coelenterazin in einer Endkonzentration von 5 µM zur Zellsuspension folgte eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ für 15 min. Diese wurde durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 min beendet. Die Resuspendierung der Zellen erfolgte in Messpuffer zu 3x10⁶ Zellen / ml. Je 100 µl der Zellsuspension wurden in eine weiße 96-Well Platte pipettiert und die Platte für 15 min im Inkubator äquilibriert.

Sollten Messung in der Anwesenheit des spezifischen TRPA1-Inhibitors A967079 durchgeführt werden, wurden nur 90 µl Zellsuspension pro Well ausgesät. Die Zellzahl wurde entsprechend angeglichen. Die Herstellung der Blocker-Lösungen erfolgte unmittelbar vor Messbeginn aus einer 1 mM Stammlösung von A967079 in Ethanol. Je 10 µl Blockerlösung wurden vor einem Messzyklus in das jeweils nächste Well gegeben. Die Konzentrationsangaben im Ergebnisteil beziehen sich auf die Endkonzentration im Well.

Die Messung der Lumineszenz erfolgte im M200 infinite Pro Plattenlesegerät über das Programm „iControl 1.11“. Jeder Messzyklus dauerte mindestens 90 s und beinhaltete 5 s Aufschütteln der Zellsuspension direkt zu Beginn, und die Injektion von 20 µl Injektionslösung pro Well nach 20 s.

Handelte es sich um die Versuche mit erneuter Injektion einer anderen Lösung in dasselbe Well, so wurde nach 20 s 20 µl der ersten Injektionslösung injiziert und 90 s später 20 µl der Zweiten, ohne dass die Messung unterbrochen werden musste. Die jeweiligen Bedingungen können den jeweiligen Abbildungen im Ergebnisteil entnommen werden. Die Konzentrationsangaben der Injektionslösungen beziehen sich auch hier auf die Endkonzentration nach der Injektion.

2.13 WST-Assay

Der WST-1 Assay („water soluble tetrazolium“) ist ein kolorimetrischer Assay zum Nachweis lebender Zellen. Das Prinzip beruht auf der Umwandlung des schwach orange gefärbten Tetrazoliums in das dunkelorange gefärbte Formazan.

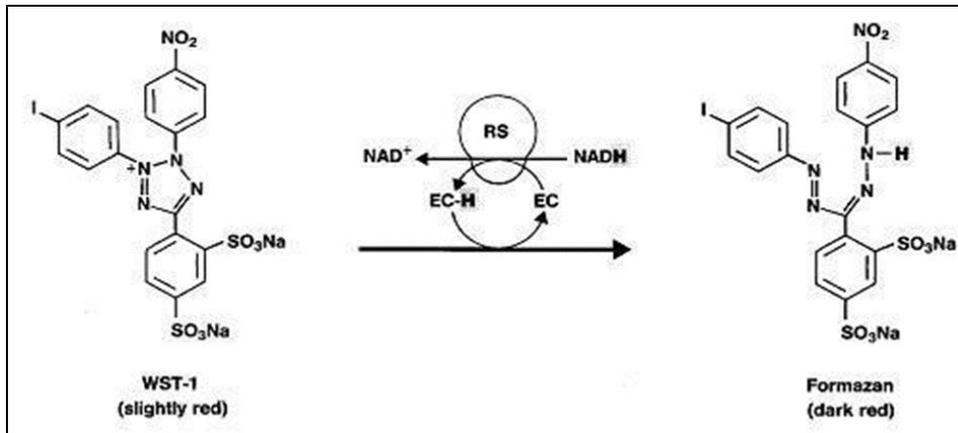


Abb. 6 katalytische Umwandlung von WST-1 zu Formazan.
(Darstellung übernommen von Roche)

Die biochemische Reaktion wird durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System katalysiert und ist abhängig von der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von NAD(P)H über die Glykolyse. Eine rasche Bildung des Formazan ist damit nur in metabolisch aktiven Zellen möglich.

2.13.1 LC₅₀-Bestimmungen

Die Bestimmung der halbmaximalen letalen Konzentration (LC₅₀) von Zinkchlorid (ZnCl₂) bzw. der organischen Zinksalze Zinkacetat (ZnAc) und Zinkorotat (ZnOr) wurde für HEK293, HEK293-TRPA1 und A549 Zellen durchgeführt. Der Versuchsaufbau folgte bei der Betrachtung der Akuttoxizität folgendem Schema:

Tag 1: Aussaat je 40.000 Zellen/Well (HEK Zelllinien) bzw. 10.000 Zellen (A549) in 75 µl des jeweiligen Kulturmediums in einer 96 Well-Platte.

Tag 2: (ca. 70% Konfluenz) Zugabe von 75 µl ZnCl₂ verschiedener Konzentrationen im jeweiligen Kulturmedium.

Die Herstellung der Zinkchlorid-Lösungen erfolgte im Vorfeld durch Mischen der für die

jeweilige Endkonzentration im Well erforderlichen Menge einer 20 mM ZnCl₂-Stammlösung mit dem jeweiligen Zellkulturmedium in 1,5 ml Reaktionsgefäßen.

Tag 3: Zugabe des WST-1- Reagenzes laut Herstelleranweisung. Nach 30 min Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ folgte eine Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 440nm (Referenz-λ = 690 nm) im Tecan Infinite M200 Pro Lesegerät.

Die Bestimmung der Langzeittoxizität wurde nach demselben Prinzip durchgeführt. Die Messung fand jedoch an Tag 5 statt. Um die längere Kultivierung der Zellen zu ermöglichen wurden die Zellzahlen bei den HEK-Zelllinien auf 5000 und bei den A549 auf 2000 verringert.

2.13.2 Versuchsaufbau mit spezifischen TRPA1-Inhibitor A967079

Für die Versuche mit Blocker wurden die Zellen analog zur Bestimmung der LC₅₀ ausgesät. Auch in diesem Versuchsaufbau erfolgte die Stimulation 24 h nach Aussaat. Die Konzentration der Zinksalze lag knapp über der jeweils ermittelten LC₅₀ für die jeweilige Zelllinie und das jeweilige Zinksalz. Die Konzentration des Inhibitors betrug 0, 0.3, 1 oder 10 µM.

Abb. 7 zeigt beispielhaft das Schema der Stimulation der HEK-Zellen für die Versuche unter

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E	Kontrolle	1µM A96	1µM A96 + 175µMZnCl2	1µM A96 + 175µMZnAc	1µM A96 + 175 µMZnOr	175µMZnCl2	175µMZnAc	175µMZnOr	300 nM A96	10µM A96	300 nM A96 + 175µMZnCl2	10µM A96 + 175µMZnCl2
F												
H	BR											

Abb. 7 schematische Darstellung einer Platte mit HEK-Zellen nach der Stimulation für WST-1 Assay mit TRPA1-Inhibitor. (BR = Background-Kontrolle)

TRPA1-Inhibition. A549-Zellen wurden analog mit angepassten Zinksalz-Konzentrationen behandelt. Die Zugabe des WST-Reagenzes und die anschließende Messung wurden wie in 2.13.2 beschrieben an Tag 3 bzw. an Tag 5 durchgeführt.

2.13.3 Statistische Methoden

Die statistische Analyse erfolgte unter Zuhilfenahme der Software Prism 7 der Fa. GraphPad Software Inc (La Jolla, USA). Aus allen Messdaten, die in der jeweils angegebenen Anzahl voneinander unabhängiger Versuche gewonnen wurden, wurden Mittelwerte (M) gebildet und die Standardabweichung (SD) berechnet. Im Anschluss wurde mittels D'Agostino-Pearson oder Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft.

Für die Berechnung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse der quantitativen RT-PCR, der Vergleich der LC₅₀ Werte nach 24 h bzw. 72 h Inkubation der verwendeten Zelllinien wurde ein ungepaarter Zweistichproben t-Test angewendet.

Die Berechnung der statistischen Signifikanz aller übrigen Ergebnisse erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA), sofern diese normal verteilt waren. Als post-hoc-Test diente der Tukey-Test. War die Voraussetzung der Normalverteilung nicht gegeben, wurde der Kruskal-Wallis Test in Verbindung mit dem Dunn's post-hoc Test angewendet.

Als Signifikanzgrenze für die Irrtumswahrscheinlichkeit galt $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Expression des TRPA1 Kanals in den verschiedenen Zellsystemen

Die Expression des TRPA1-Kanals in den drei verwendeten Zelllinien wurde molekularbiologisch mittels PCR bzw. qPCR und proteinbiochemischen mittels Western Blot untersucht.

3.1.1 Qualitativer Nachweis der TRPA1 Expression auf mRNA-Ebene

In Abb. 8 ist das Ergebnis der RT-PCR mit cDNA der HEK293 WT, der HEK293 TRPA1 bzw. der A549 dargestellt. Die HEK293 WT zeigten praktisch keine DNA-Bande und damit keine erkennbare Bildung von TRPA1 mRNA. Für das TRPA1-Überexpressionssystem war eine deutlich ausgeprägte DNA-Bande bei der erwarteten Lauflänge des PCR-Produkts mit einer Größe von rund 600 bp sichtbar. Bei A549 ist ebenfalls eine deutliche DNA-Bande an der zu erwartenden Stelle zu erkennen, jedoch mit schwächerer Intensität. Bei der internen Kontrolle Wasser war keine Bande zu erkennen, so dass die Bildung unspezifischer Oligonukleotid-Addukte ausgeschlossen war.

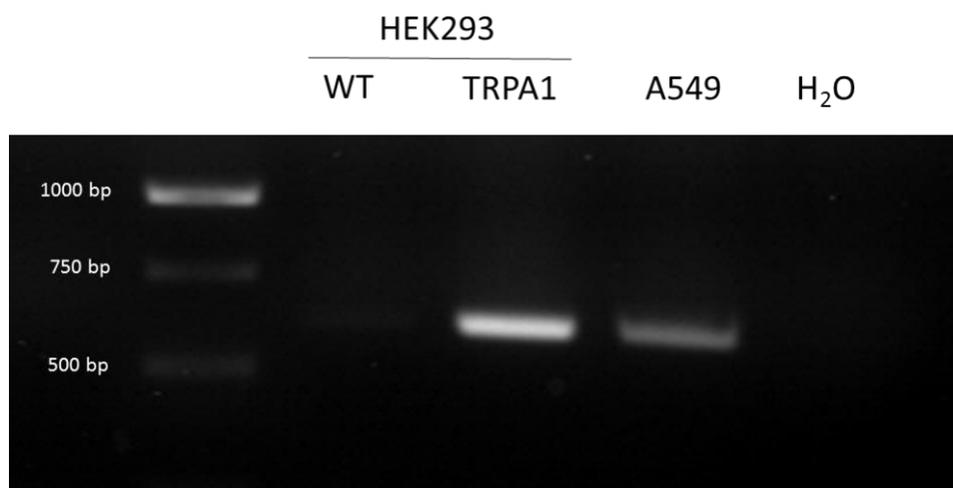


Abb. 8 PCR Produkte von HEK 293 WT, HEK 293 TRPA1 und A549 auf getrennt im 1% Agarosegel

3.1.2 Quantitativer Nachweis der TRPA1 Expression auf mRNA-Ebene.

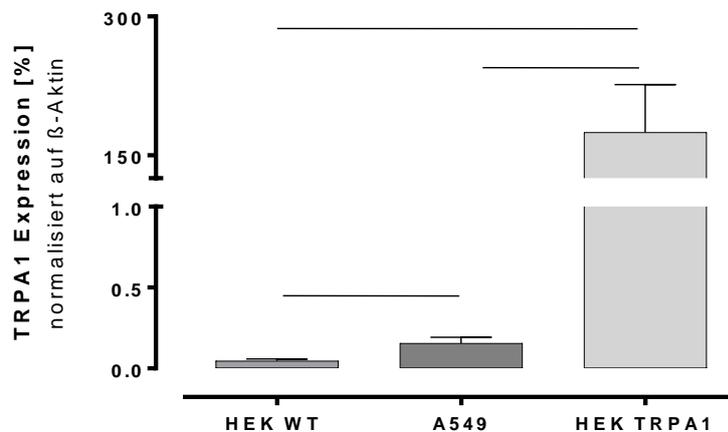


Abb. 9 TRPA1-mRNA Expression in den verwendeten Zelllinien normalisiert auf β -Aktin. Horizontale Linien markieren die statistisch signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$), ($N=3$; $M \pm SD$).

Anhand der quantitativen RT-PCR konnten die Ergebnisse, die in 3.1.1 qualitativ beschrieben wurden auch zahlenmäßig dargestellt werden (Abb. 9). Für das System mit induzierter Expression HEK TRPA1 wurde eine Expression des TRPA1 bezogen auf β -Aktin von $175\% \pm 51,6\%$ ($N=3$; CI: = $131,7\%-217,9\%$) ermittelt. A549 Zellen zeigten mit $0,16\% \pm 0,04\%$ ($N=3$; CI: $0,13\%-0,18\%$) eine schwache, aber deutliche Expression. Mit diesem Versuchsaufbau war auch in HEK 293 WT eine schwache TRPA1-Expression feststellbar. Mit nur $0,05\% \pm 0,01\%$ ($N=3$; CI: $0,04\%-0,06\%$) war diese sowohl im Vergleich zu HEK293 TRPA1 als auch zu A549 signifikant niedriger.

3.1.3 TRPA1 Expression auf Protein-Ebene

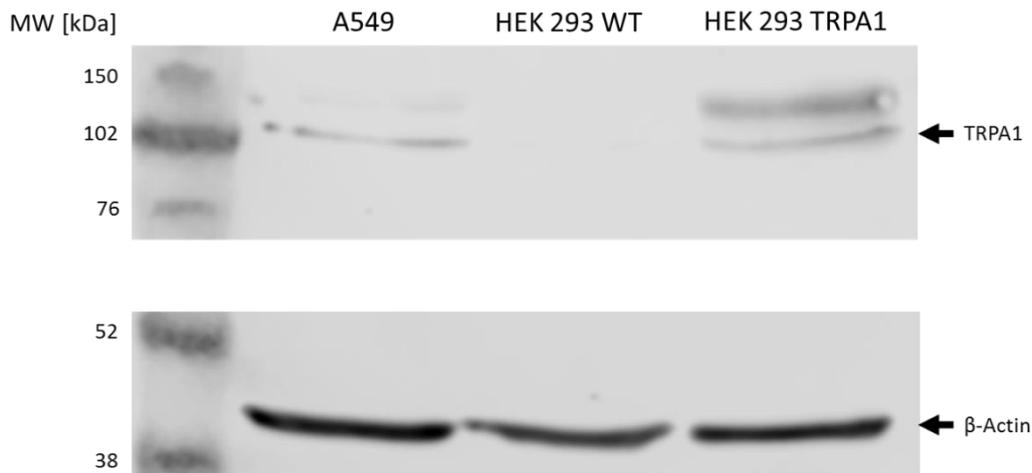


Abb. 10 Western Blot mit jeweils 60 μ g Gesamtprotein der verwendeten Zelllinien

Abb. 10 zeigt einen Western Blot von A549, HEK293 WT und HEK293 TRPA1 Zelllysaten mit jeweils 60 μ g Gesamtprotein. Als Ladekontrolle diente β -Aktin bei 42 kDa (Abb. 10). Laut Angabe des Herstellers des spezifischen TRPA1-Antikörpers (Tab. 2-7) war eine TRPA1-Proteinbande bei 110 kDa zu erwarten. Diese Bande war sowohl bei A549-Zellen als auch bei den HEK293 TRPA1 mit induzierter TRPA1-Expression festzustellen. Die HEK293 WT-Zelllinie zeigte keine Proteinbande für TRPA1.

3.1.4 Fazit

Das TRPA1-Kanalprotein konnte in den relevanten Zelllinien auf verschiedenen Ebenen der Proteinbiosynthese nachgewiesen werden. Die spontane Expression in A549 Zellen war um ein vielfaches geringer als die induzierte Expression in HEK293 TRPA1.

3.2 TRPA1 Aktivierung: Betrachtung der durch Zink-Ionen vermittelten Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Mit der Messung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration durch den Äquorin-Assay sollte der von Hongzhen Hu (Hu et al., 2009) postulierte Mechanismus der Zink induzierten TRPA1-Aktivierung in den hier verwendeten Zelllinien geprüft werden. Um die Beteiligung des TRPA1 näher zu beleuchten, wurden Versuche mit dem spezifischen Blocker A967079 durchgeführt. Durch wiederholte Injektionen wurde untersucht, ob die Zink-induzierte Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration autoregulatorischen Prozessen unterliegt. Als Positivkontrolle diente AITC, ein gut charakterisierter kovalenter Aktivator des TRPA1-Ionenkanals. Zum Vergleich mit Zinkchlorid wurden die Effekte zweier organischer Zinksalze mit niedrigem lungentoxischem Potential untersucht.

3.2.1 Prüfung der Versuchsbedingungen

Aufgrund des hohen Interaktionspotentials von Zink-Ionen mit Bestandteilen von Zellkulturmedien, wie z.B. mit Phosphaten und Karbonaten, Aminosäuren, Proteinen, Vitaminen (Ollig et al., 2016; Weitzel, 1956) wurde der Puffer für die Messung intrazellulärer Kalziumspiegel auf die nötigsten Inhaltsstoffe reduziert (Tab. 2-10). Dadurch standen wichtige Wachstumsfaktoren, Proteine und Vitamine für die Dauer der Versuche nicht zur Verfügung. Tests zur Vitalität der Zellen sollten zeigen, ob der Puffer über die Dauer der Versuche das Überleben der Zellen gewährleistete.

Wahl der Medien

Abb. 11 zeigt den prozentualen Anteil lebender Zellen in HBS Puffer bei 37°C und 5% CO₂ über die Zeit.

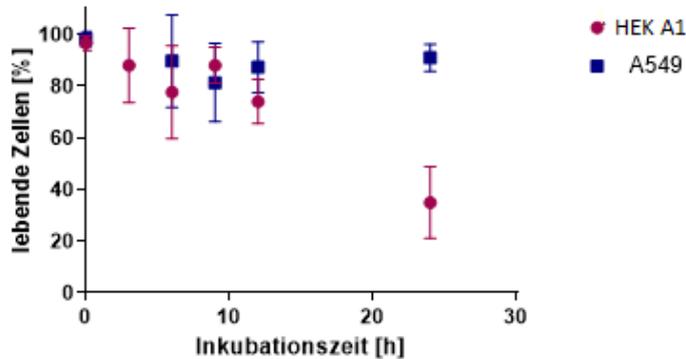


Abb. 11 Überleben von HEK 293 TRPA1 und A549 Zellen in HBS-Puffer.

Mittels Trypanblau-Färbung wurde der Anteil der lebenden Zellen in HBS-Puffer bei 37°C und 5% CO₂ über 24 h hinweg ermittelt.

Bei HEK 293 TRPA1 Zellen waren nach 3 h Inkubationszeit noch rund 90% vital. Nach 12 h lebten noch rund 70%, nach 24 h lediglich 35% der HEK293 TRPA1- Zellen. Bei A549 blieb der Anteil überlebender Zellen über 24 h hinweg konstant bei 90%. Eine Äquorin-basierte Kalziummessung dauerte maximal 3 h. Damit war der HBS-Puffer für die Kalziummessungen geeignet.

Wahl der geeigneten Methode

Parallel zu Kalziummessungen mit Äquorin wurden auch initiale Tests mit dem Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM) durchgeführt. Die initialen Fura-2-Testmessungen zeigten allerdings „*quenching*“-Effekte bei der Injektion von Zinkchlorid in HBS-Puffer, der 1,8 mM Kalzium enthielt. Bei „*quenching*“-Effekten kommt es zur Fluoreszenzlöschung durch strahlungslosen Energietransfer auf ein Akzeptor-Molekül. Eine Testmessung ist exemplarisch in Abb. 12 dargestellt.

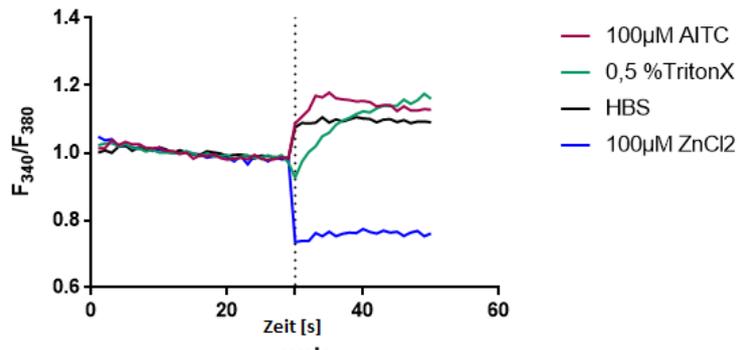


Abb. 12 Testmessung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels Fura-2 in A549.

Nach der Injektion von 100 μM Zinkchlorid nach 30 s (dargestellt als blaue Linie) war ein deutlicher Abfall der Fluoreszenzintensität erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigte die Injektion von 100 μM AITC nach 30 s einen Anstieg der Fluoreszenzintensität.

In der Tat weist Fura-2 eine Affinität zu Zink auf (Gryniewicz et al., 1985; Martin et al., 2006; Ollig et al., 2016). Testmessungen in Abwesenheit von Kalzium (Abb. 13) konnten diese Tatsache bestätigen.

Der Äquorin-Assay erwies sich unter diesen Umständen als die geeignetere Methode. In vorhergehenden Projekten hatte sich die Methode an denselben Zellsystemen als zuverlässig erwiesen (Stenger et al., 2017; Stenger et al., 2015)

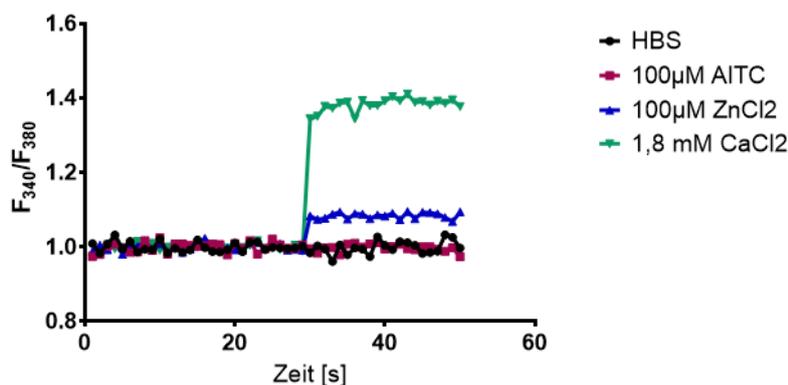


Abb. 13 Interaktion von Fura-2 mit Zink-Ionen.

Testmessung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels Fura-2 in A549 in HBS-Puffer ohne Kalzium. Die Injektion von HBS-Puffer ohne Kalzium (schwarze Linie) sowie die Injektion von AITC (rote Linie) zeigten keinen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Die Injektion von Kalzium-haltigen HBS-Puffer (grüne Linie) zeigte die größte Steigerung der Fluoreszenzintensität. Die Injektion von Zinkchlorid (blaue Linie) in Abwesenheit von Kalzium zeigte ebenfalls eine Signalsteigerung.

3.2.2 Änderung des Kalziumspiegels durch Zink-Ionen in HEK 293 TRPA1 Zellen mit induzierter TRPA1-Expression.

Zink-abhängige Aktivierung/ Inhibition von TRPA1

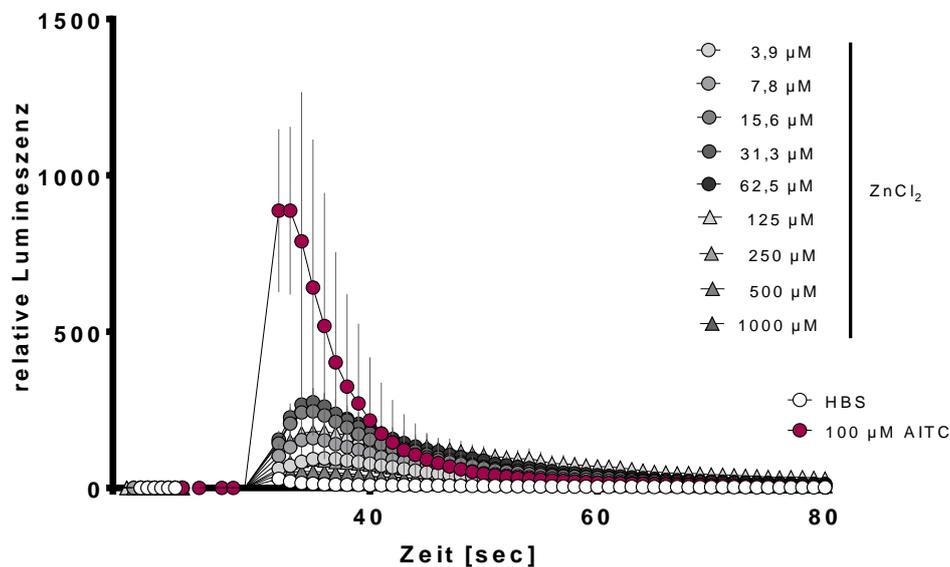


Abb. 14 Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration in HEK TRPA1.

Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration durch Zugabe von Zinkchlorid-Lösungen verschiedener Konzentrationen ($N=7$; $M\pm SD$). Als Positivkontrolle diente AITC. Angegeben sind die jeweiligen Endkonzentrationen im Well.

Betrachtet man die jeweiligen Maxima der Lumineszenz-Kurven normalisiert auf das maximale Signal des Messpuffers (Abb. 15), wurde der sukzessive Anstieg der Kalziumsignale bis zu einem Zehnfachen des Basalwertes nach der Injektion von 20 μl einer Lösung von Zinkchlorid, die eine Endkonzentration von 31,3 μM Zinkchlorid ergab, deutlich sichtbar. Nach dem Überschreiten dieses Maximums fiel die Lumineszenz mit steigenden Zinkkonzentrationen ab. Nach Injektion von Lösungen mit der Endkonzentration von 250 μM Zinkchlorid oder mehr konnte kein signifikanter Unterschied zum Puffer mehr festgestellt werden.

Über eine Dosiswirkungskurve wurde die Konzentration mit dem halbmaximalen Effekt (EC_{50}) von Zinkchlorid von 8,6 μM ($N=7$; CI : 5,4 μM -13,7 μM) berechnet. Berücksichtigt wurden dabei die Peak-Maxima der Kalziumsignale nach Injektion von je 20 μl Zinkchlorid-Lösung bis einschließlich 31,3 μM Zinkchlorid im Well (Abb. 16).

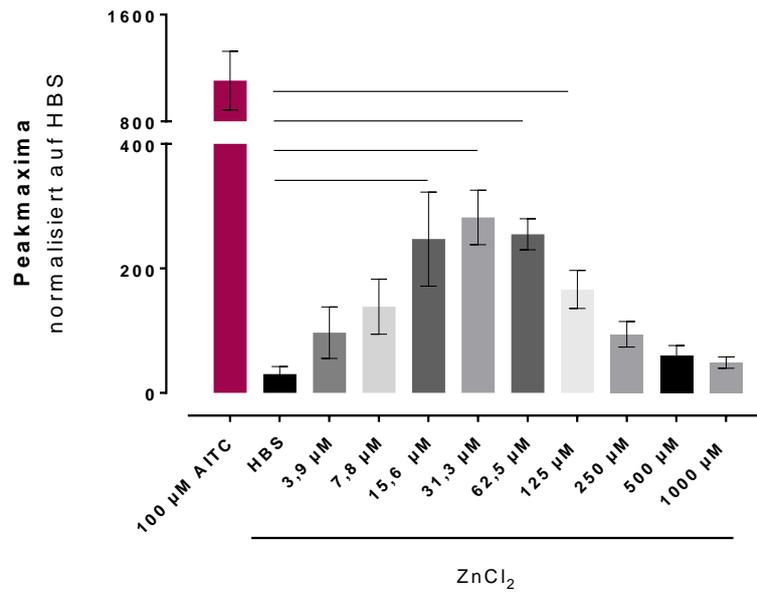


Abb. 15 Peak-Maxima der Zinkchlorid-Injektionskurven gemessen in HEK293 TRPA1. Horizontale Linien markieren die statistisch signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle (HBS-Injektionspeak) ($N=7$; $M \pm SD$).

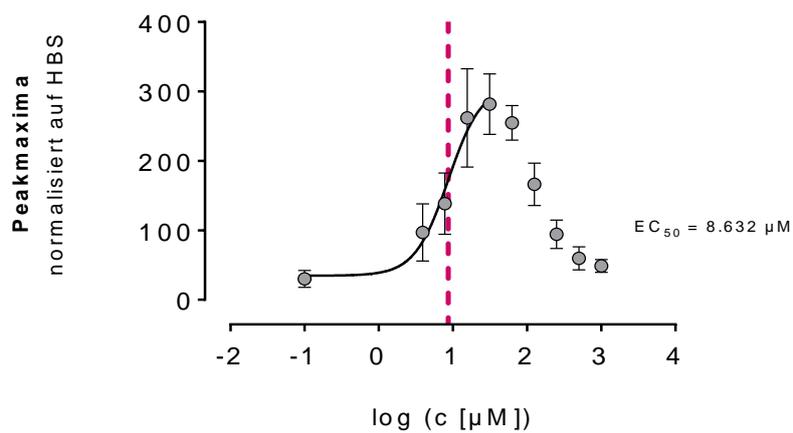


Abb. 16 Dosis-Wirkungskurve von Zinkchlorid bei HEK TRPA1. Die EC_{50} wurde ermittelt anhand der Peak-Maxima der Kalzium-Kurven nach Zugabe von Zinkchlorid unterschiedlicher Konzentration ($N=7$; $M \pm SD$).

Bei HEK293 WT Zellen konnte die oben beschriebene Reaktion auf eine Injektion zweiwertiger Zink-Ionen nicht festgestellt werden, wie Abb. 17 zeigt.

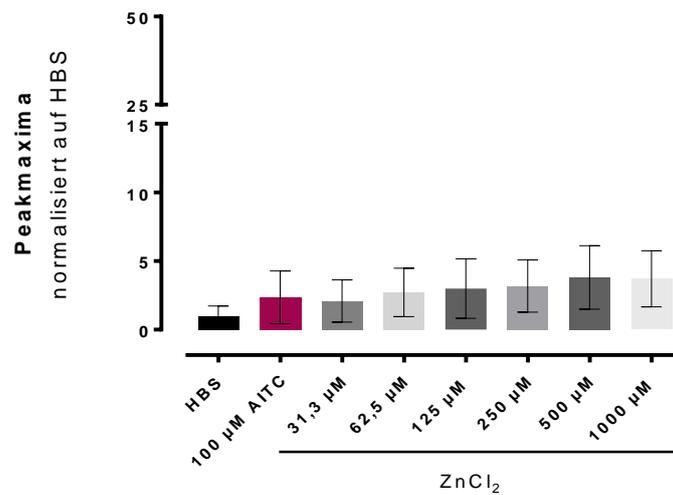


Abb. 17 Peak-Maxima der Zinkchlorid-Injektionskurven gemessen in HEK293 WT.

Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration in HEK293 WT bei der Zugabe von Zinkchlorid-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen ($N=3$; $M\pm SD$). Angegeben sind die jeweiligen Endkonzentrationen im Well.

Inhibition des Zink vermittelten Kalzium -Einstroms

Das Fehlen eines Zink-vermittelten und eines AITC-vermittelten Kalzium-Anstiegs in HEK Zellen ohne TRPA1, gab einen deutlichen Hinweis darauf, dass der TRPA1-Kanal für den Einstrom von Kalzium-Ionen verantwortlich gemacht werden konnte. Durch Zugabe des TRPA1-Inhibitors A967079 sollte dies eindeutig geklärt werden.

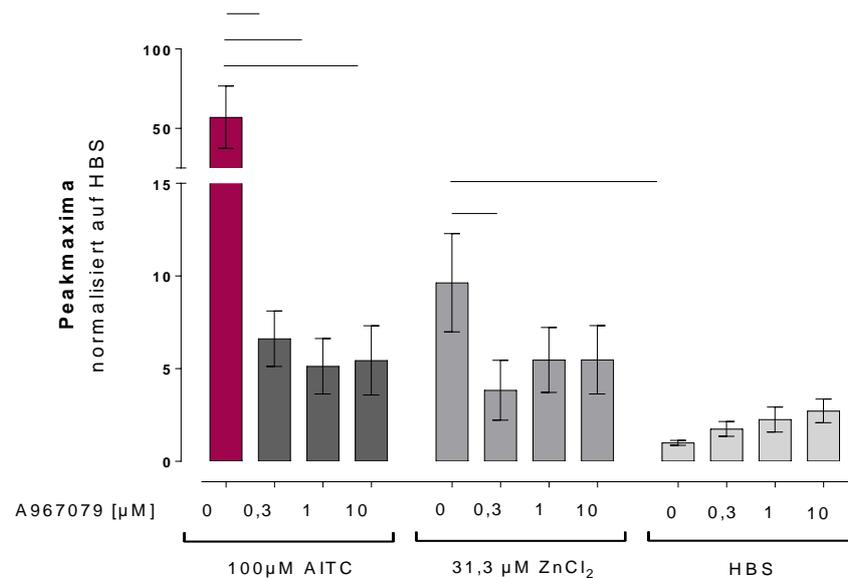


Abb. 18 Inhibition des Kalzium-Einstroms bei HEK TRPA1.

Peak-Maxima der Kalzium-Kurven von HEK TRPA1 nach Injektion von AITC, Zinkchlorid bzw. HBS in Anwesenheit des spezifischen TRPA1-Blockers A967079. Angegeben sind jeweils die Endkonzentrationen im Well. Horizontale Linien markieren statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) ($N=5$; $M \pm SD$).

Das Signal der Positivkontrolle war bereits durch $0,3 \mu\text{M}$ A967079 signifikant reduziert, erreichte dennoch nicht das Kalzium-Niveau der Puffer-Injektion (Abb. 18). Bei der Zugabe von Zinkchlorid mit einer Endkonzentration von $31,3 \mu\text{M}$ war deutlich ein Kalzium-Anstieg zu beobachten. Dieser wurde tendenziell erniedrigt durch die Anwesenheit von A967079 (Abb. 18).

Aktivierbarkeit von TRPA1 bei wiederholter Stimulation

Versuche mit wiederholten Injektionen von Zinkchlorid sollten Aufschluss darüber geben, ob eine Daueraktivierung durch anhaltenden Stimulus zu den toxikologisch relevanten Effekten von Zinkchlorid beitragen könnte. Dazu erfolgte direkt nach Abklingen des initialen Kalziumsignals eine erneute Injektion von Zinkchlorid.

Kalziummessungen nach 24 h Präinkubation mit Zinkchlorid sollten Hinweise auf autoregulatorische Prozesse wie z.B. Desensitisierung des TRPA1 liefern.

Direkte Wiederholung der Stimulation

Für Untersuchung zum Verhalten des TRPA1-Kanals bei wiederholter Stimulation wurden nach 30 s zunächst entweder HBS-Puffer, AITC, oder Zinkchlorid-Lösungen in aufsteigenden Konzentrationen injiziert. Nach weiteren 90 s erfolgte eine zweite Injektion – entweder von AITC oder von Zinkchlorid.

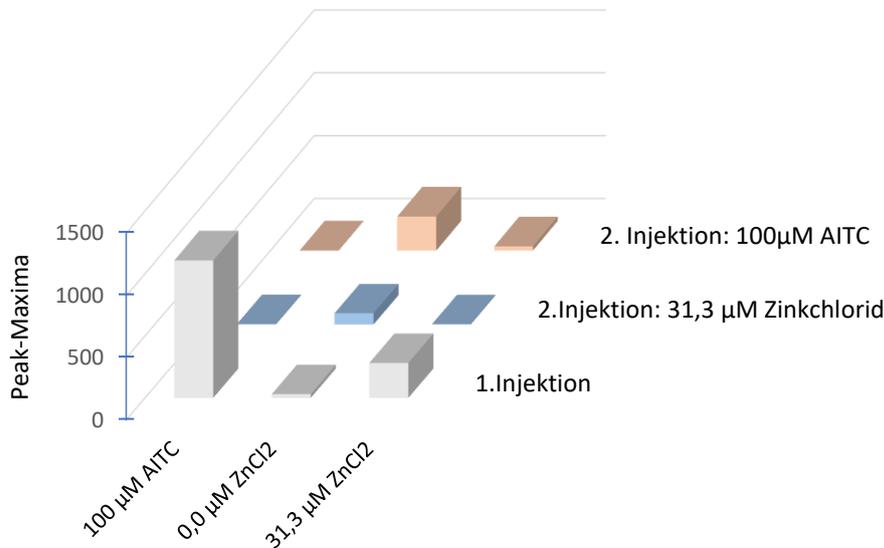


Abb. 19 Peak-Maxima der Kalzium-Kurven bei wiederholter Injektion von AITC bzw. Zinkchlorid bei HEK TRPA1. 90 s nach der Injektion von AITC, Zinkchlorid, oder HBS wurde entweder AITC, oder Zinkchlorid injiziert (2. Injektion). Angegeben sind die jeweiligen Endkonzentrationen im Well.

Die zusammenfassende Darstellung der Versuche zur wiederholten Stimulation von TRPA1 in Abb. 19 zeigt eine Korrelation von Signalintensität bei der Erstinjektion und verminderter erneuter Aktivierung bei einer zweiten Injektion von AITC und bei einer zweiten Injektion von Zinkchlorid.

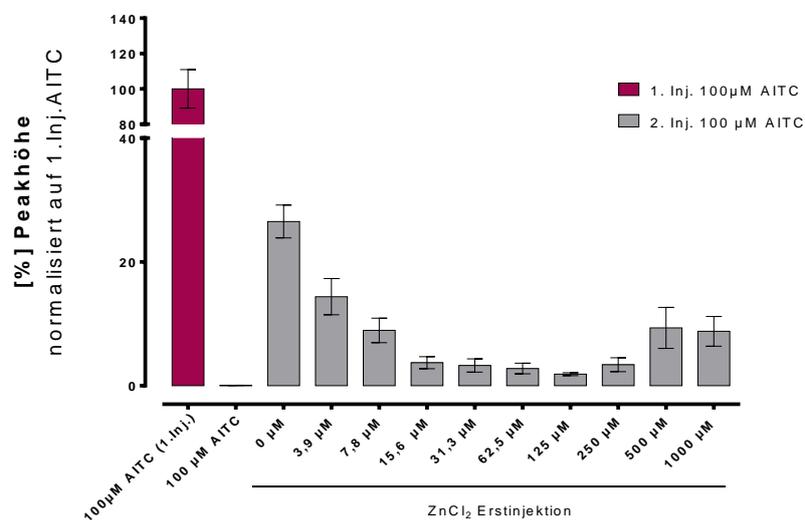


Abb. 20 Prozentuale Darstellung der Peak-Maxima nach wiederholter Injektion von AITC bei HEK TRPA1. 90 s nach Injektion von AITC bzw. Zinkchlorid-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte eine Injektion von AITC (N=3; M±SD). Angegeben ist jeweils die Endkonzentrationen im Well.

Um die Änderungen der Signalintensitäten bei erneuter Injektion deutlicher darzustellen, wurden dem initialen Stimulus 100% Signalintensität zugeordnet und alle folgenden Peaks prozentual dazu dargestellt (Abb. 20 und Abb. 21).

Injizierte man AITC nach 90 s erneut, so war nahezu kein Kalzium-Anstieg zu beobachten. Wurde zuvor Zinkchlorid injiziert, war das Kalzium-Signal zwar deutlich reduziert, aber nicht komplett unterdrückt.

Mit aufsteigender Kalzium-Signalintensität bei der Erstinjektion war auch eine Abnahme der Peak-Höhe bei einer nachfolgenden AITC-Injektion zu beobachten.

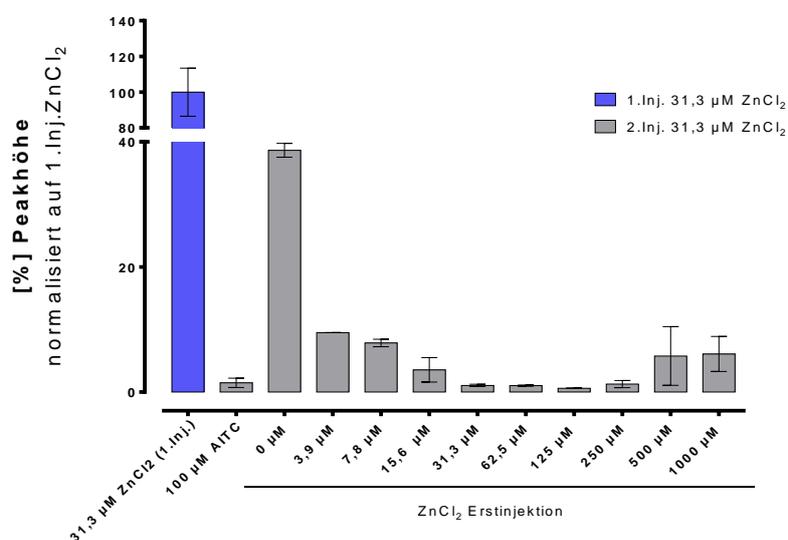


Abb. 21 Prozentuale Darstellung der Peak-Maxima nach wiederholter Injektion von Zinkchlorid bei HEK TRPA1. 90 s nach Injektion von Zinkchlorid (N=3; M±SD). Angegeben sind die jeweiligen Endkonzentrationen im Well.

Für eine Zweitinjektion von Zinkchlorid war ein ähnliches Muster feststellbar wie bei der Zweitinjektion von AITC.

24 h Präinkubation

Um Hinweise auf längerfristige Regulierungsmechanismen für die Aktivität des TRPA1, wie beispielsweise Desensibilisierung zu bekommen, wurden transfizierte Zellen 24 h mit 31,3 µM Zinkchlorid inkubiert und im Anschluss Kalzium-Messungen durchgeführt (Kapitel 2.12.2).

Auch in diesem Versuchsaufbau war eine Aktivierung des TRPA1 Kanals ab 3,9 µM Zinkchlorid auszumachen, die bei 31,3 µM Zinkchlorid ihr Maximum erreichte (Abb. 22). Bei höheren

Zinkchlorid-Konzentrationen war auch hier ein Abfall der Signalintensität zu verzeichnen. Die EC_{50} wurde analog zur EC_{50} bei einmaliger Injektion von Zinkchlorid ohne Vorbehandlung errechnet (Abb. 23). Sie betrug $15,1 \mu\text{M}$ Zinkchlorid ($N=3$; $CI: 8,2 - 27,6 \mu\text{M}$).

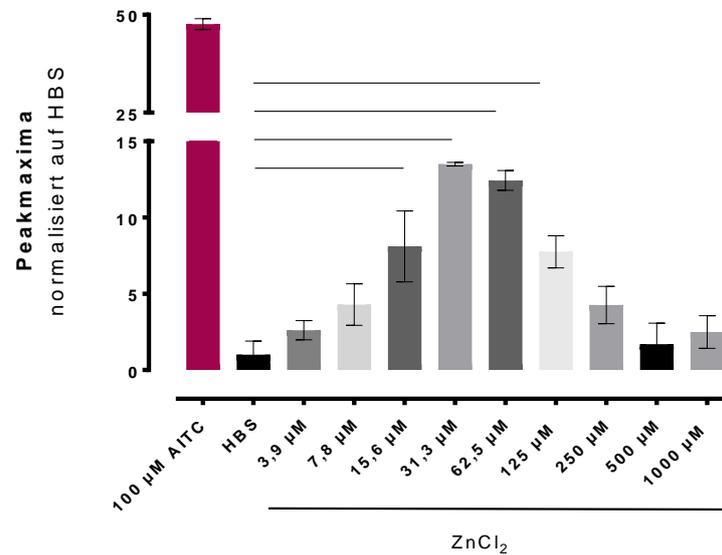


Abb. 22 Kalzium -Signale bei HEK TRPA1 nach 24 h Inkubation mit $31,3 \mu\text{M}$ Zinkchlorid.

Peak-Maxima der Zinkchlorid-Injektionskurven gemessen in HEK293 TRPA1 nach 24 h Inkubation mit $31,3 \mu\text{M}$ Zinkchlorid. Horizontale Linien markieren die statistisch signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle (HBS-Injektionspeak) ($N=3$; $M \pm SD$).

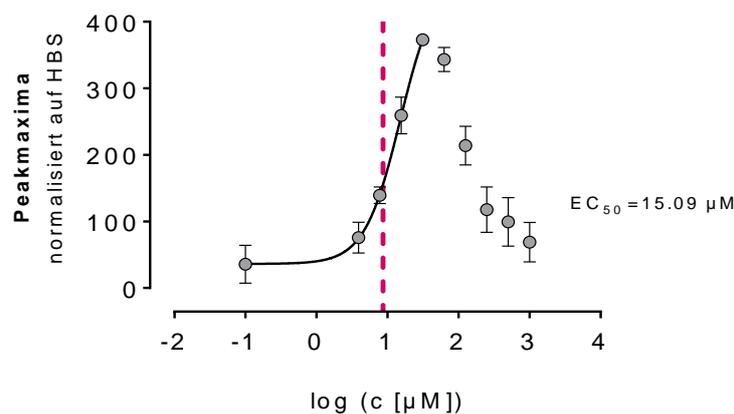


Abb. 23 Dosis-Wirkungskurve von Zinkchlorid bei HEK TRPA1 nach 24 h Präinkubation von $31,3 \mu\text{M}$ Zinkchlorid.

Die EC_{50} wurde ermittelt anhand der Peak-Maxima der Kalzium-Kurven nach Injektion von Zinkchlorid unterschiedlicher Konzentration ($N=3$; $M \pm SD$). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 3 unabhängigen Versuchen.

Effekt weiterer Zinksalze

Neben Zinkchlorid wurden die Wirkung von Zinkacetat und Zinkorotat auf den intrazellulären Kalziumspiegel untersucht. Bei den beiden Verbindungen handelte es sich um organische Zinksalze, deren lungentoxisches Potential bisher nicht näher untersucht wurde (Kapitel 1.3.4).

Nach Injektion von Zinkchlorid, Zinkacetat oder Zinkorotat unterschieden sich die jeweiligen Peak-Maxima nicht.

Der Effekt des spezifischen Blockers A967079 nach Injektion von Zinkacetat, oder -orotat war statistisch nicht signifikant, obwohl ähnlich wie bei Zinkchlorid ein deutlicher Trend vorhanden war (Abb. 24).

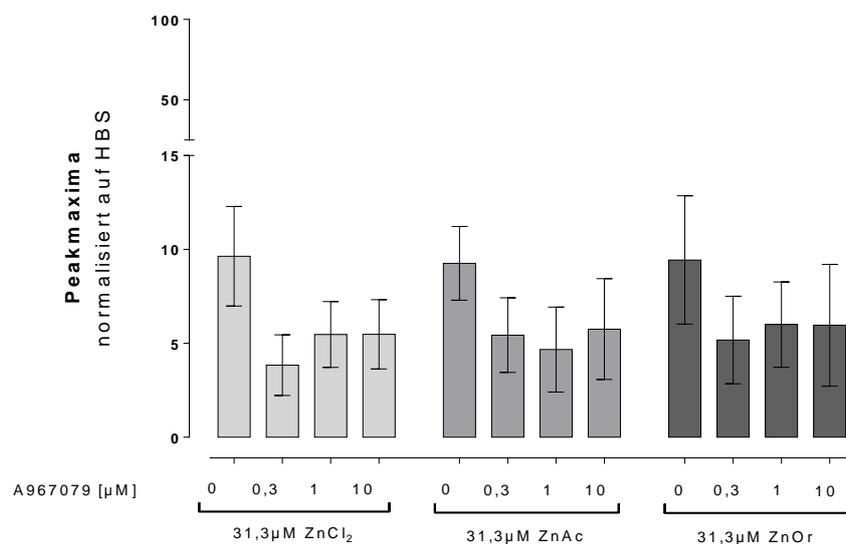


Abb. 24 Peak-Maxima der Kalzium-Kurven von HEK TRPA1 nach Injektion verschiedener Zinksalze ($N=3$; $M\pm SD$). Zinkchlorid ($ZnCl_2$), Zinkacetat ($ZnAc$) bzw. Zinkorotat ($ZnOr$) wurden in Anwesenheit des spezifischen TRPA1-Blockers A967079 in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert. Angegeben sind die jeweiligen Endkonzentrationen im Well.

Zusammenfassung der Ergebnisse für HEK TRPA1

Das von Hu postulierte Aktivierungsmuster für TRPA1 durch Zinksalze konnte bestätigt werden (Hu et al., 2009). Die Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration durch Zink war im direkten Vergleich zur gut charakterisierten Kontrollsubstanz AITC wesentlich geringer. HEK-Zellen ohne TRPA1-Expression zeigten bei beiden Substanzen kein Signal. Der TRPA1-Inhibitor

A967079 blockierte den AITC-induzierten Kalzium-Anstieg signifikant, bei Zinkchlorid war lediglich ein Trend zu beobachten.

Eine Aktivierbarkeit durch wiederholte Injektion von Zinkchlorid konnte nicht festgestellt werden. Das System zeigte keinen Kalzium-Einstrom mehr, wenn 90 s nach der ersten Injektion erneut Zinkchlorid zugegeben wurde. Und zwar in der Konzentration, die bei der ersten Injektion den maximalen Effekt hervorgerufen hatte.

Es kam zu keiner Beeinträchtigung der Kanalfunktion nach 24 h Dauerstimulation mit Zink in der Konzentration, die den maximalen Effekt hervorgerufen hatte.

Die organischen Zinksalze Zinkacetat und Zinkorotat zeigten ein mit Zinkchlorid vergleichbares Kalziumsignal bei Injektion der EC_{100} von $31,3 \mu\text{M}$ und bei Inhibition durch A967079.

3.2.3 Änderung des Kalziumspiegels durch Zink-Ionen in A549

Zinkabhängige Aktivierung von TRPA1

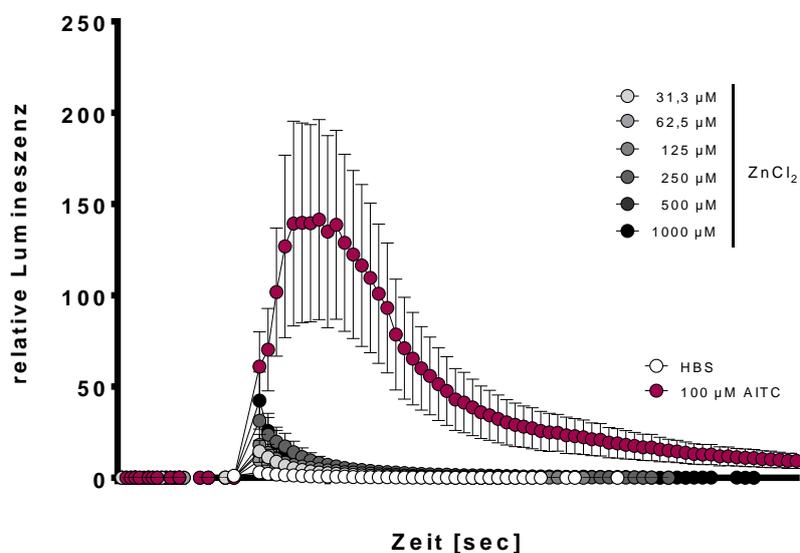


Abb. 25 Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration in A549 bei Zugabe unterschiedlicher Zinkchlorid Konzentrationen. (N=3; $M \pm SD$).

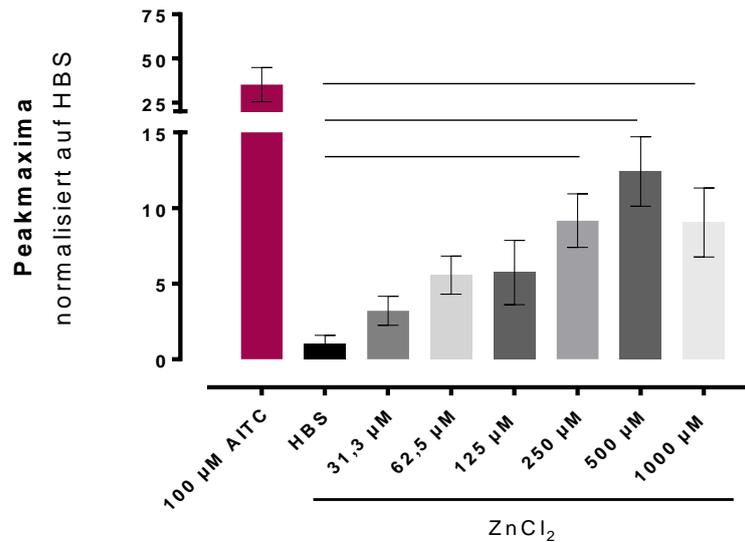


Abb. 26 Peak-Maxima der Zinkchlorid-Injektionskurven gemessen in A549
 Horizontale Linien markieren die statistisch signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle (HBS-Injektionspeak) ($N=6$; $M \pm SD$).

Nach Injektion von AITC war ein deutliches Signal zu erkennen (Abb. 26). Bei Injektion von Zinkchlorid in aufsteigenden Konzentrationen lag die maximale Signalintensität bei 500 µM. Bei 1000 µM Zinkchlorid war das korrespondierende Kalzium-Signal wieder abgeschwächt (Abb. 26). Höhere Konzentrationen konnten in diesem Versuchsaufbau nicht reproduzierbar untersucht werden, da es zu Ausfällungen kam. Diese waren bei der Injektionslösung für 1000 µM mit bloßem Auge nicht sichtbar, aber möglicherweise führten Streueffekte zum Abfall des Signals bei der Lumineszenzmessung.

Wegen des Risikos von Fällungsreaktionen beinhaltete der HBS-Puffer keine Phosphate. Für eine Fällung als schwerlösliches Zinksalz kämen Karbonat-Anionen aus dem CO₂ der Umgebungsluft, oder die Bildung von schwerlöslichen Zinkaten in Frage. Eine sichtbare Trübung durch die Bildung von Zinkaten ist schon für das binäre System Zinkchlorid und Wasser beschrieben worden (Peacock & Peacock, 1918).

Ein Bestandteil des Puffers, der als Agens für die Fällung von Zink zur Verfügung stand, war HEPES. In der Literatur findet sich ein Hinweis auf HEPES-Zinkkomplexe (Anwar, 2005). Laut Ferreira ist HEPES ein Puffer mit gar nicht bis schwach vorhandenen Komplexbildungseigenschaften, der für die meisten Untersuchungen mit Metallionen geeignet ist (Ferreira et al., 2015).

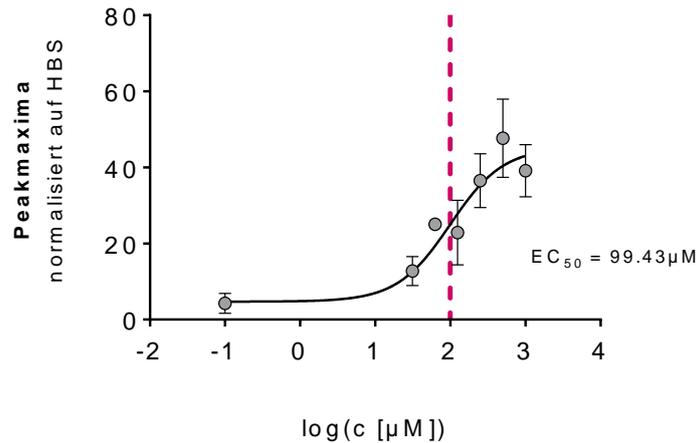


Abb. 27 Dosis-Wirkungskurve von Zinkchlorid bei A549.

Die EC_{50} wurde ermittelt anhand der Peak-Maxima der Kalzium-Kurven nach Injektion von Zinkchlorid unterschiedlicher Konzentration ($N=6$; $M \pm SD$).

Auch für das endogen exprimierende System wurde anhand der zugrundeliegenden Daten eine EC_{50} bestimmt (Abb. 25). Diese betrug $99,4 \mu\text{M}$ ($N=6$; $CI: = 69,5 \mu\text{M}-119,5$).

Inhibition durch A967079

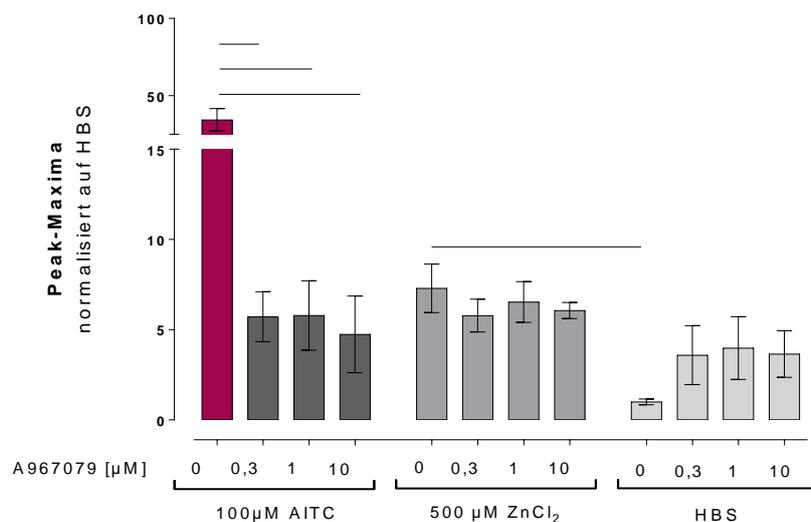


Abb. 28 Inhibition des Kalzium-Einstroms bei A549.

Peak-Maxima der Kalzium-Kurven von A549 nach Injektion von AITC, Zinkchlorid bzw. HBS in Anwesenheit des spezifischen TRPA1-Blockers A967079 in unterschiedlichen Konzentrationen ($N=3$; $M \pm SD$). Horizontale Linien markieren statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Wie im Überexpressionssystem war das AITC-Signal bereits ab 300 nM A967079 signifikant reduziert (Abb. 28). Zinkchlorid allein zeigte eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration, aber der Blocker hatte keinen erkennbaren Effekt (Abb. 28).

Aktivierbarkeit des TRPA1 bei wiederholter Stimulation

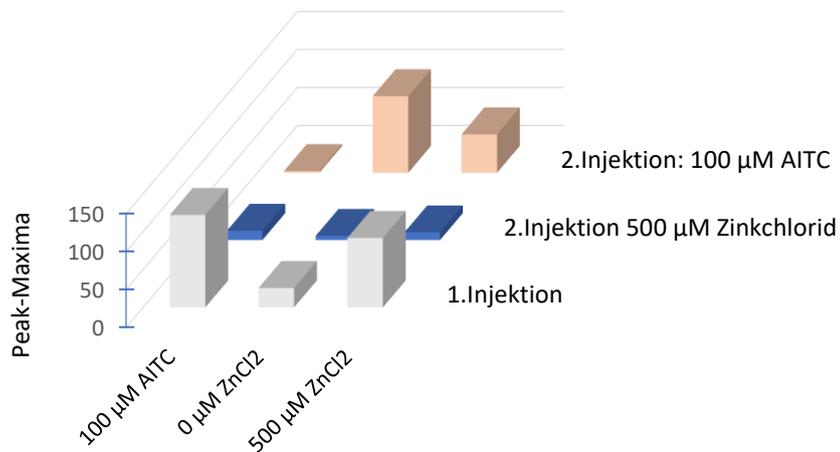


Abb. 29 Wiederholte Injektion von AITC bzw. Zinkchlorid bei A549. 90 s nach Injektion von Zinkchlorid in den angegebenen Konzentrationen wurde erneut AITC bzw. Zinkchlorid injiziert (N=3; M±SD).

Die zusammenfassende Darstellung der Versuche zur wiederholten Stimulation von A549 in Abb. 29 zeigt ein völlig anderes Bild als die entsprechenden Versuche für das System mit induzierter TRPA1-Expression (Kapitel 3.2.1).

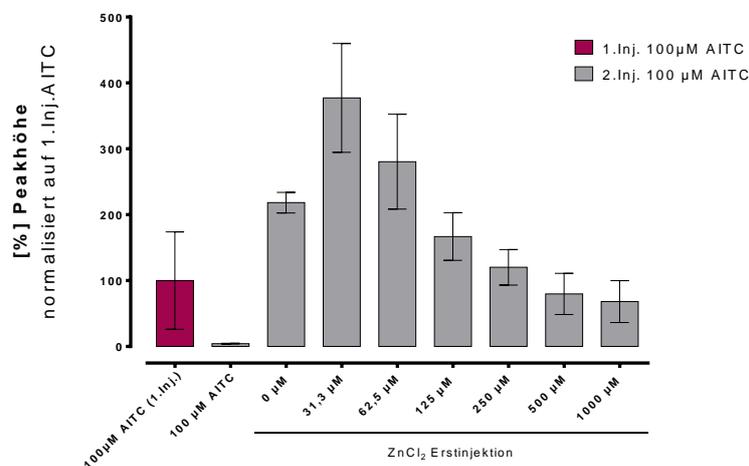


Abb. 30 Wiederholte Injektion von AITC bei A549. Prozentuale Darstellung der Peak-Maxima nach Injektion von AITC 90s nach Injektion von jeweils unterschiedlich hoch konzentrierten Zinkchlorid-Lösungen (N=3; M±SD).

Für die wiederholte Injektion von AITC (Abb. 30) war eine klare Inhibition des Kalzium-Einstroms zu beobachten. Dies entsprach den Ergebnissen derselben Versuche mit HEK TRPA1. Bei vorhergehender Injektion von HBS verdoppelte sich das Kalzium-Signal nach

Injektion von AITC. Nach Injektion der Zinkchlorid-Lösung mit der niedrigsten Konzentration stieg das Kalzium-Signal sogar um das Vierfache an. Bei derjenigen Konzentration Zinkchlorid, die bei der Erstinjektion das höchste Kalzium-Signal gezeigt hatte, erzielte die nachfolgende Injektion von AITC noch 80% des Signals von AITC ohne vorangegangene Zugabe von Zinkchlorid oder AITC.

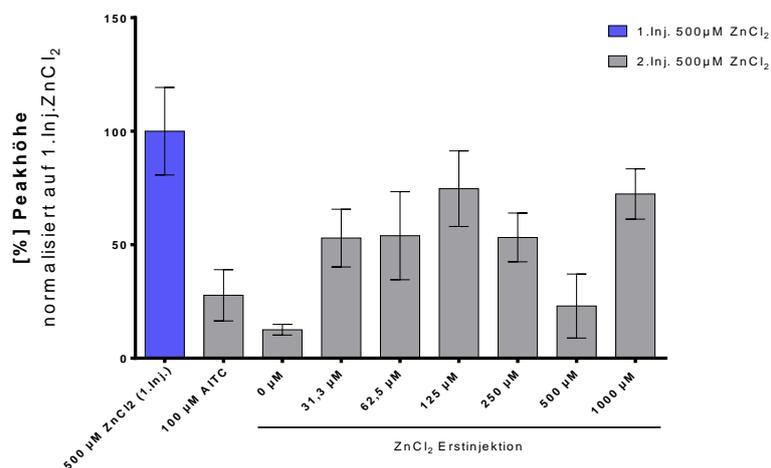


Abb. 31 Wiederholte Injektion von Zinkchlorid bei A549.

Prozentuale Darstellung der Peak-Maxima nach Injektion von Zinkchlorid 90 s nach Injektion von Zinkchlorid ($N=3$; $M\pm SD$).

Auch in den A549-Zellen konnte der Kalzium-Peak nach Injektion von Zinkchlorid in Anwesenheit von 100 µM AITC unterdrückt werden (Abb. 31). Analog zu den Ergebnissen für die Zweitinjektion von AITC (Abb. 30) schien auch hier die Anwesenheit von Zinkchlorid bei der wiederholten Injektion von Zinkchlorid das nachfolgende Kalzium-Signal eher zu verstärken.

Effekt weiterer Zinksalze

Das Ausmaß des Kalziumeinstroms durch organische Zinksalze im Vergleich zum lungentoxischen Zinkchlorid sollte auch in A549-Zellen untersucht werden.

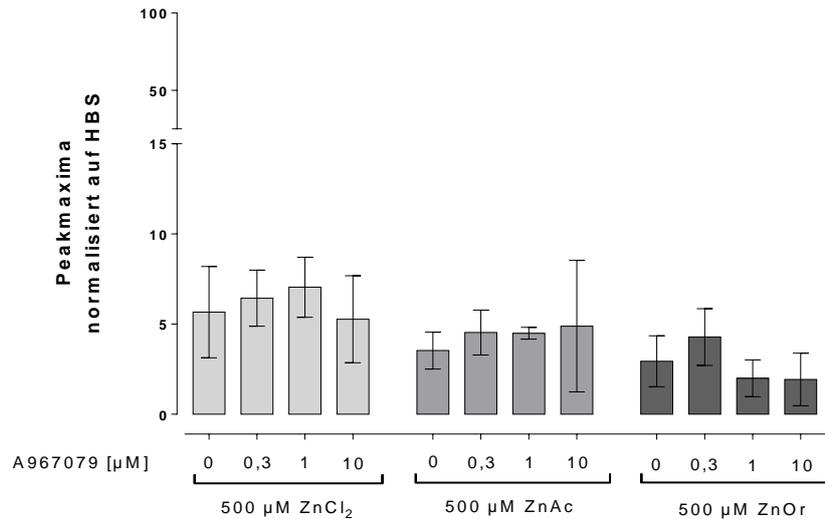


Abb. 32 Peak-Maxima der Kalzium-Kurven von A549 nach Injektion verschiedener Zinksalze Zinkchlorid (ZnCl₂), Zinkacetat (ZnAc), bzw. Zinkorotat (ZnOr) wurden in Anwesenheit des spezifischen TRPA1-Blockers A967079 in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert (N=3; M±SD).

Die Peak-Maxima nach Injektion von Zinkorotat bzw. Zinkacetat unterschieden sich nicht von der maximalen Peak-Höhe nach Injektion von Zinkchlorid in der gleichen Konzentration (Abb. 32). Für den spezifischen Blocker A967079 war kein inhibitorischer Effekt festzustellen.

Zusammenfassung der Ergebnisse für A549

Die Kontrollsubstanz AITC bewirkte bei A549-Zellen einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, welche durch den spezifischen Blocker A967079 unterdrückt wurde. Damit zeigten auch die funktionalen Messungen, dass der TRPA1-Kanal vorhanden und aktivierbar war. Durch die Stimulation mit Zinkchlorid kam es auch zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese konnte durch A967079 nicht inhibiert werden. Die Ergebnisse zu den Versuchen mit wiederholter Injektion zeigten ein völlig anderes Muster als HEK TRPA1-Zellen mit induzierter Expression. Die Signalintensität ließ sich durch eine wiederholte Injektion von Zinkchlorid insgesamt abschwächen, aber nicht blockieren. Für die Zweitinjektion der Kontrollsubstanz AITC schien eine vorangegangene Injektion von Zinkchlorid sogar eine Verstärkung des Signals zu bewirken.

3.2.4 Fazit zur Betrachtung der TRPA1-Aktivierung durch funktionelle Kalziummessungen

Aus den Ergebnissen der Messungen des intrazellulären Kalziumlevels konnte gefolgert werden, dass es auch in der Lungenepithel-Zelllinie durch Zugabe von Zink-Ionen zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration kam.

Die Versuche mit dem spezifischen TRPA1-Blocker bekräftigten jedoch den Verdacht, dass der TRPA1-Ionenkanal in diesem Versuchsaufbau nicht maßgeblich am Einstrom von Kalzium beteiligt ist.

3.3 Betrachtung der Zellvitalität nach Exposition mit Zinkchlorid

Neben den funktionalen Kalziummessungen wurden die toxischen Effekte einer Exposition gegenüber Zinkchlorid bzw. organischer Zinksalze durch eine Bestimmung der Vitalität der Zelllinien untersucht. Durch den WST-1 Assay sollte zunächst geklärt werden, ob der TRPA1 vermittelte Kalzium-Einstrom und Verlust der Vitalität durch Zinkchlorid parallel verlaufen.

Als Parameter diene hierbei die halbmaximale letale Konzentration (LC_{50}). Ein erhöhter toxischer Effekt von Zinkchlorid bei TRPA1-Überexpression beziehungsweise eine verringerte Toxizität durch den Einsatz eines spezifischen Blockers wären dabei starke Indikatoren für eine Beteiligung des TRPA1. Wie auch bei den funktionellen Kalziummessungen wurde der direkte Vergleich mit organischen Zinksalzen angestellt. Die biologische Relevanz wurde durch Untersuchungen am spontan exprimierenden System näher beleuchtet.

3.3.1 LC_{50} -Bestimmungen

Bei induzierter Expression des TRPA1 (HEK TRPA1)

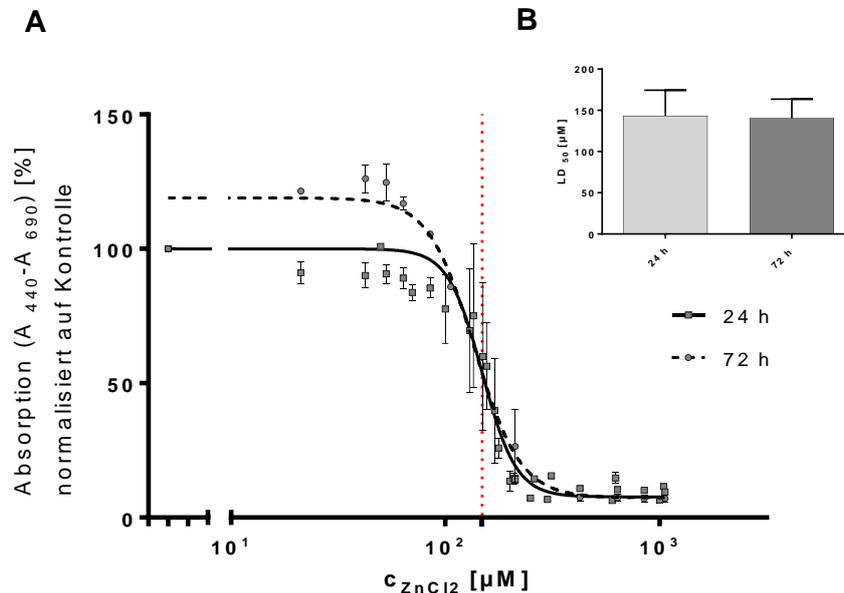


Abb. 33 Ermittlung der LC_{50} für Zinkchlorid bei HEK TRPA1 mit WST-1-Assay.

(A): Ermittlung der LC_{50} für Zinkchlorid bei HEK TRPA1 nach 24 h bzw. 72 h Inkubation (B) Die Gegenüberstellung der LC_{50} Werte zeigt keinen signifikanten Unterschied ($M \pm SD$; $N_{24h}=8$; $N_{72h}=3$).

Die LC_{50} für Zinkchlorid bei HEK TRPA1 lag bei $143,4 \pm 31,0 \mu\text{M}$ ($N=8$; CI: $117,4 - 169,3 \mu\text{M}$) bei 24 h Exposition, und bei $140,4 \pm 23,1 \mu\text{M}$ ($N=3$; CI: $83,0 - 197,9 \mu\text{M}$) nach 72 h Exposition (Abb. 33). Die Expositionsdauer schien keine Auswirkung auf das toxische Potential von Zinkchlorid zu haben. Ein Anstieg der Absorption bei niedrigen Zinkchlorid-Konzentrationen hingegen war nach 72h Exposition zu beobachten. Wie in Abb. 33 ersichtlich, äußerte sich dies durch einen Anstieg der WST-1-Umsetzung bei Zugabe niedriger Zinkkonzentrationen.

Kontrollsystem (HEK WT)

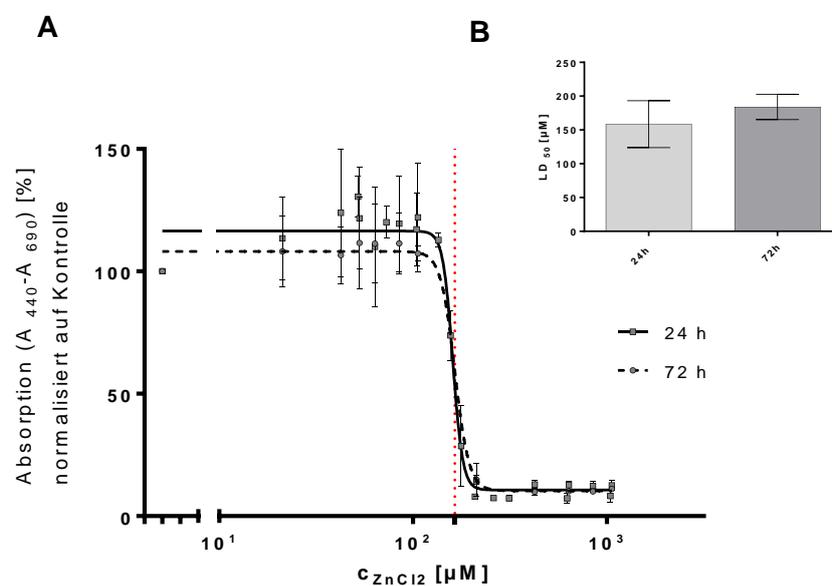


Abb. 34 Ermittlung der LC_{50} für Zinkchlorid bei HEK WT mit WST-1-Assay

(A): Ermittlung der LC_{50} für Zinkchlorid bei HEK WT nach 24 h bzw. 72 h Inkubation (B) Die Gegenüberstellung der LC_{50} Werte zeigt keinen signifikanten Unterschied ($N \geq 3$; $M \pm SD$).

Die LC_{50} für Zinkchlorid bei HEK WT nach 24 h Exposition lag bei $158,5 \pm 34,7 \mu\text{M}$ ($N=8$; CI: $129,5 \mu\text{M}-187,5 \mu\text{M}$). Nach 72 h Exposition lag die LC_{50} bei $184,1 \pm 18,7 \mu\text{M}$ ($N=3$; CI: $137,5 \mu\text{M}-230,6 \mu\text{M}$). Der Vergleich der Werte für die unterschiedlichen Expositionsdauern zeigte keinen signifikanten Unterschied. Der Anstieg der Absorption bei niedrigen Zinkchlorid-Konzentrationen war im Kontrollsystem bereits nach 24 h Exposition zu beobachten.

Der direkte Vergleich von HEK TRPA1 und HEK WT (Abb. 35) zeigte keinen signifikanten Unterschied der ermittelten LC_{50} Werte für Zinkchlorid.

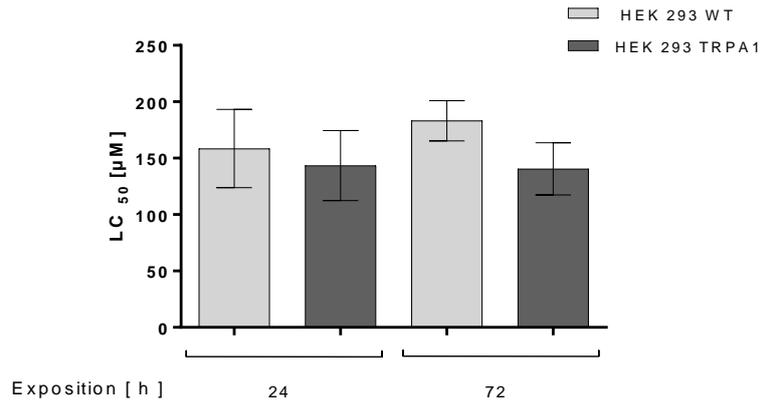


Abb. 35 Zusammenfassende Gegenüberstellung der LC_{50} Werte für Zinkchlorid bei HEK TRPA1 und HEK WT für 24 h bzw. 72 h Exposition. ($N \geq 3$; $M \pm SD$)

Spontane TRPA1-Expression (A549)

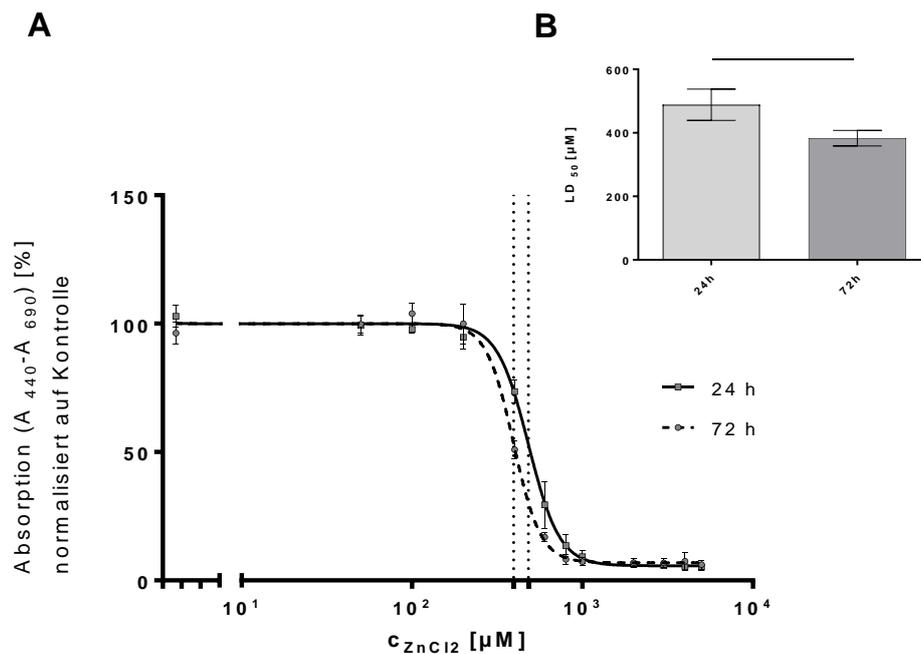


Abb. 36 Ermittlung der LC_{50} für Zinkchlorid bei A549 mit WST-1-Assay

(A): Ermittlung der LC_{50} für Zinkchlorid bei A549 nach 24 h bzw. 72 h Inkubation (B) Gegenüberstellung der LC_{50} Werte zeigt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen 24 h und 72 h Exposition. ($N=6$; $M \pm SD$).

Nach 24 h Expositionsdauer lag die LC_{50} für Zinkchlorid bei A549 Zellen bei $488,7 \pm 49,3 \mu\text{M}$ ($N=6$; CI: $436,9 - 540,4 \mu\text{M}$). Diese Konzentration unterschied sich signifikant ($p < 0,05$) von der

LC₅₀ von 383,2 ± 24,5 µM Zinkchlorid nach einer Exposition über 72 h (N=6; CI: 357,5 – 408,9 µM).

Zusammenfassung der LC₅₀-Bestimmungen

Die HEK293-Ergebnisse zeigten keine erhöhte Toxizität von Zinkchlorid bei induzierter TRPA1-Expression und auch keine zeitliche Abhängigkeit. Bei A549 Zellen dagegen bewirkte eine längere Expositionsdauer auch eine um fast 100 µM erniedrigte LC₅₀ (und damit eine höhere Toxizität von Zinkchlorid).

3.3.2 Zinkchlorid-Toxizität bei TRPA1 Inhibition mit A967079

Sollte der TRPA1-Kanal für die Vermittlung der toxischen Wirkung von Zinkchlorid verantwortlich sein, so wäre zu erwarten, dass eine TRPA1-Inhibition auch einen gewissen Schutz gegenüber einer Zink-Exposition bot. Versuche mit dem TRPA1-Inhibitor A967079 sollten die Frage klären, ob eine Blockade des TRPA1 zu einer gesteigerten enzymatischen Umsetzung von WST-1 führt. Es wurde jeweils diejenige Zink-Konzentration gewählt, die knapp über der jeweiligen LC₅₀ lag, um toxische Effekte zu erzeugen. Im Falle der HEK-Zellen wurden 175 µM, im Falle der A549 wurden 500 µM Zinkchlorid eingesetzt.

HEK TRPA1

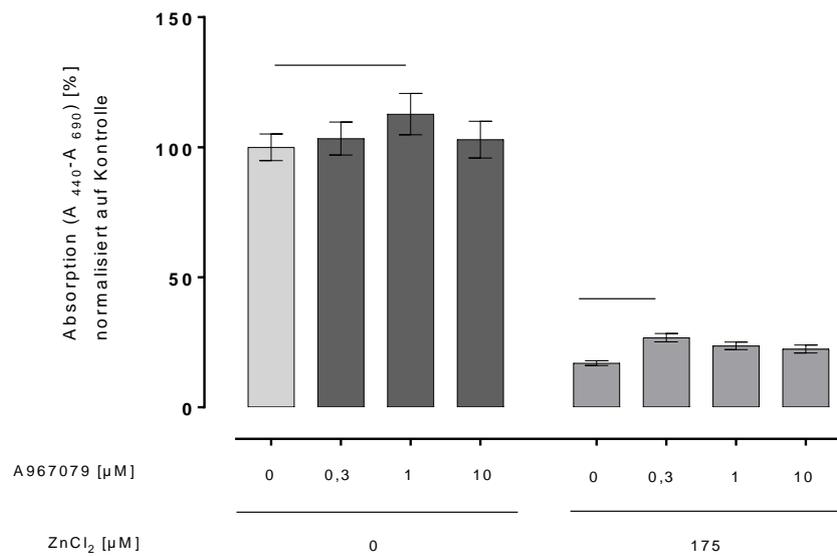


Abb. 37 Toxizität von Zinkchlorid bei HEK TRPA1 nach TRPA1-Inhibition.

Die prozentuale Absorption nach Umsetzung von WST-1 diente als Parameter für die Vitalität nach 24 h Inkubation mit 175 μM Zinkchlorid bzw. Lösungsmittel in Anwesenheit von A967079 in den angegebenen Konzentrationen (N=4; M±SD).

Laut Abb. 37 war ein scheinbar signifikanter protektiver Effekt von 300 nM A967079 bei einer Exposition mit 175 μM Zinkchlorid in HEK-Zellen mit induzierter TRPA1-Expression erkennbar. Die gemessene Absorption erreichte nicht das Niveau der Kontrollgruppe. Bei höheren Konzentrationen des TRPA1-Inhibitors war kein Effekt bei den behandelten Zellen mehr belegbar. Generell schien die Anwesenheit von A967079 die mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität leicht zu steigern. Dies äußerte sich durch die – im Vergleich zur Kontrolle – signifikant erhöhte Absorption in Anwesenheit von 1 μM A967079 ohne Zugabe von Zinkchlorid.

HEK WT

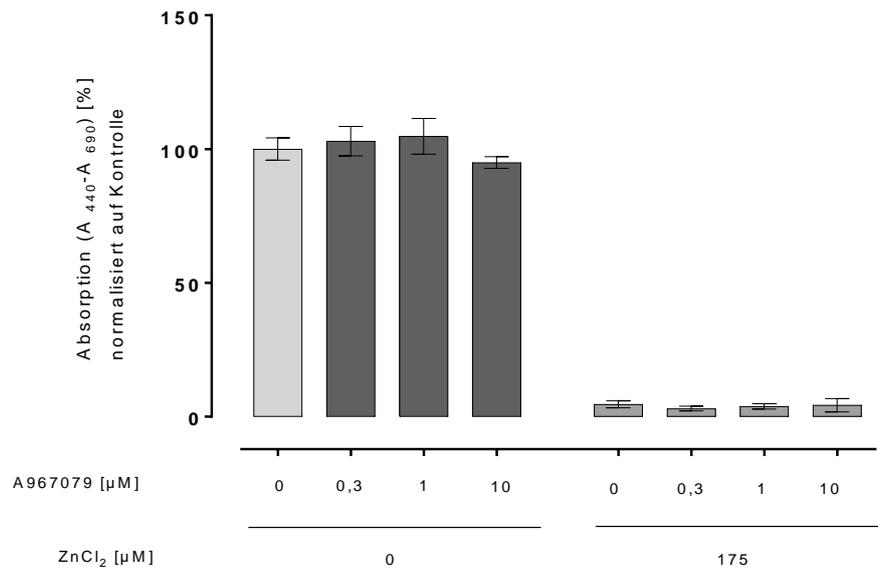


Abb. 38 Toxizität von Zinkchlorid bei HEK WT nach TRPA1-Inhibition.

Die prozentuale Absorption nach Umsetzung von WST-1 diente als Parameter für die Vitalität von HEK WT nach 24 h Inkubation mit bzw. ohne 175 μM Zinkchlorid in Anwesenheit von A967079 in den angegebenen Konzentrationen (N=4; M±SD).

Auch im Kontrollsystem war kein signifikanter protektiver Effekt von A967079 erkennbar. Es kam zu keiner gesteigerten Umsetzung von WST-1 in Anwesenheit des Blockers (Abb. 38). Auffällig war die im Vergleich zu HEK TRPA1 scheinbar gesteigerte Toxizität von 175 μM Zinkchlorid.

A549

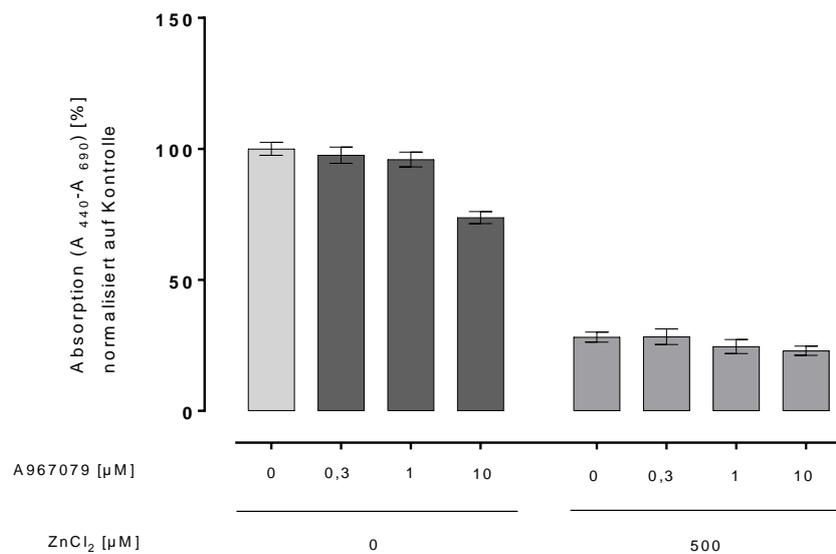


Abb. 39 Toxizität von Zinkchlorid nach 24 h bei A549 nach TRPA1-Inhibition.

Die prozentuale Absorption nach Umsetzung von WST-1 diente als Parameter für die Vitalität von A549 nach 24 h Inkubation mit bzw. ohne 500 µM Zinkchlorid in Anwesenheit von A967079 in den angegebenen Konzentrationen (N=6; M±SD).

Bei A549 Zellen war kein protektiver Effekt von A967079 erkennbar (Abb. 39).

Zusammenfassung der Untersuchungen der Vitalität unter TRPA1-Blockade

In allen untersuchten Zelllinien führte eine Blockade des TRPA1-Ionenkanals durch den spezifischen Inhibitor A967079 nicht zu einer höheren Vitalität der exponierten Zellen.

3.3.3 Vergleichende Betrachtung organischer Zinksalze

Besonders bei den toxikologischen Untersuchungen war der Vergleich des lungentoxischen Zinkchlorids mit Zinksalzen geringeren lungentoxischen Potentials von Interesse. Zwar konnte durch diesen Vergleich kein Rückschluss auf die TRPA1-Beteiligung gezogen werden, jedoch war er unerlässlich, um Hinweise zu erhalten, ob beispielsweise die physikalisch-chemischen Eigenschaften einer Zinkverbindung einen Einfluss auf deren toxisches Potential hatten. Für jede Zelllinie wurden LC₅₀-Bestimmungen für Zinkacetat bzw. Zinkorotat, sowie Versuche mit 1 µM A967079 (Kapitel 3.3.2) durchgeführt.

HEK TRPA1

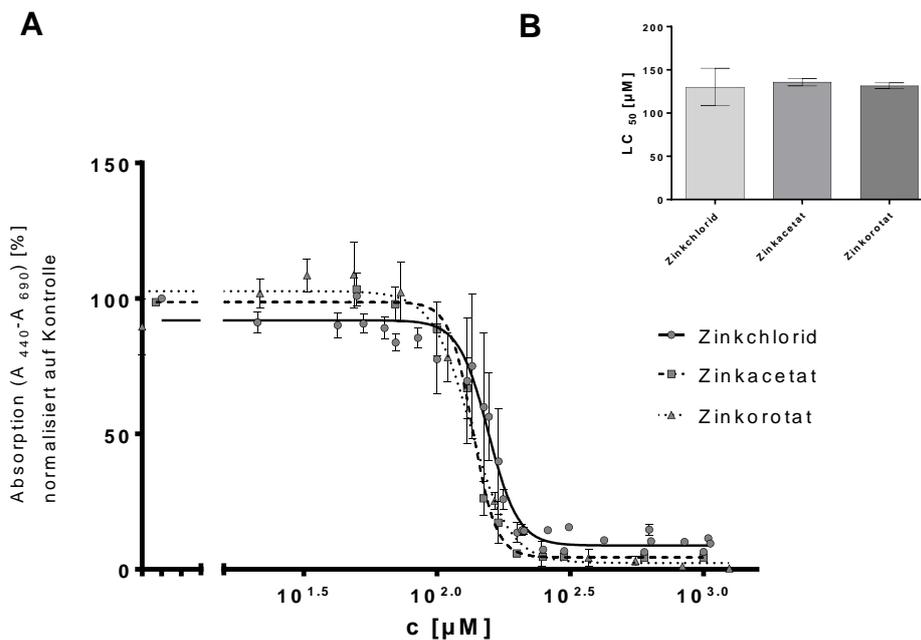


Abb. 40 Ermittlung der LC_{50} verschiedener Zinksalze bei HEK TRPA1 mittels WST-1-Assay.

(A) Ermittlung der LC_{50} für Zinkchlorid, Zinkacetat, sowie Zinkorotat bei HEK TRPA1 nach 24h Inkubation. (B) Die Gegenüberstellung der LC_{50} Werte zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Zinkchlorid und Zinkacetat bzw. Zinkorotat ($M \pm SD$; $N \geq 3$).

Nach einer Exposition gegenüber Zinkacetat über 24 h wurde eine LC_{50} von $135,9 \pm 4,4 \mu\text{M}$ ($N=3$; CI: $128,9 \mu\text{M}$ - $142,9 \mu\text{M}$) ermittelt. Für Zinkorotat wurde nach 24 h Exposition eine LC_{50} von $131,6 \pm 3,3 \mu\text{M}$ ($N=3$; CI: $123,3 \mu\text{M}$ - $139,8 \mu\text{M}$) bestimmt. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander, und nicht zur LC_{50} von Zinkchlorid (Abb. 40).

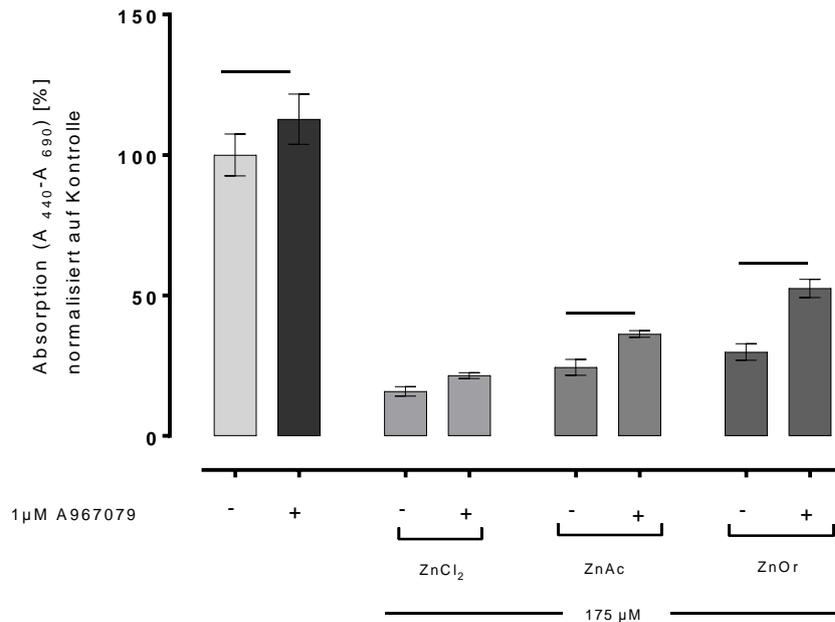


Abb. 41 Toxizität verschiedener Zinksalze bei HEK TRPA1 nach TRPA1-Inhibition.

Die relative Absorption nach Umsetzung von WST-1 dient als Parameter für die Vitalität von HEK TRPA1 nach 24 h Inkubation mit 175 µM Zinkchlorid, Zinkacetat bzw. Zinkorotat mit bzw. ohne Zugabe von 1 µM A967079. (N=3; M±SD). Horizontale Linien markieren statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05).

In den TRPA1 exprimierenden HEK-Zellen waren für die organischen Zinksalze statistisch signifikant erhöhte Absorptionswerte nach Zugabe des Blockers festgestellt worden (Abb. 41).

Bei Zinkacetat erhöhte sich die Formazanbildung in Anwesenheit des Blockers um 12 % (N= 3; CI: 3%-20%), bei Zinkorotat sogar um 23 % (N=3; CI: 14%-31%). Allerdings zeigte auch die Kontrollgruppe eine Steigerung der Vitalität um 13% (N=3; CI: 4%-21%).

Dieser Befund ließ den Rückschluss zu, dass allein die Blockade des induziert exprimierten TRPA1-Kanals schon eine höhere Vitalität der Zellen bewirkte und damit unabhängig war von der Zink-vermittelten Toxizität.

HEK WT

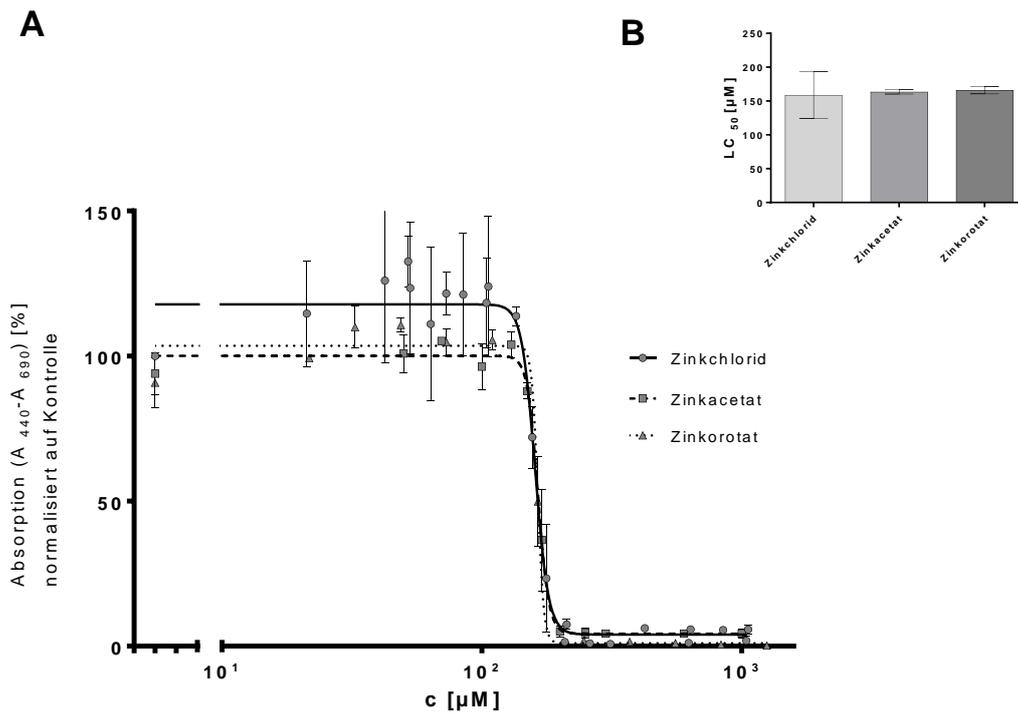


Abb. 42 Ermittlung der LC_{50} verschiedener Zinksalze bei HEK WT mittels WST-1-Assay.

(A) Ermittlung der LC_{50} für Zinkchlorid, Zinkacetat, sowie Zinkorotat bei HEK WT nach 24h Inkubation. (B) Eine Gegenüberstellung der LC_{50} Werte zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Zinkchlorid und Zinkacetat bzw. Zinkorotat. ($M \pm SD$; $N \geq 3$).

Nach einer Expositionsdauer von 24 h wurde für Zinkacetat eine LC_{50} von $163,5 \pm 3,2 \mu\text{M}$ ($N=3$; CI: $155,6 - 171,5 \mu\text{M}$) ermittelt. Für 24 h Exposition gegen Zinkorotat wurde eine LC_{50} von $166,0 \pm 5,5 \mu\text{M}$ ($N=4$; CI: $152,4-179,6 \mu\text{M}$) bestimmt. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander, und nicht zur LC_{50} von Zinkchlorid (Abb. 42)

Auch im Kontrollzellsystem steigerten $1 \mu\text{M}$ A967079 die Intensität der Absorption nicht (Abb. 43).

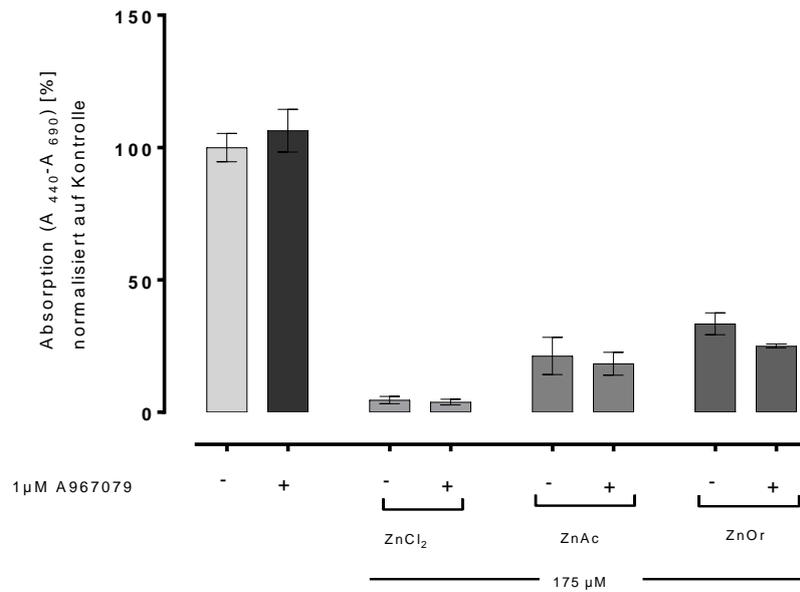


Abb. 43 Toxizität der Zinksalze bei HEK WT nach TRPA1-Inhibition. Die relative Absorption nach Umsetzung von WST-1 diente als Parameter für die Vitalität von HEK WT nach 24 h Inkubation mit 175 μM Zinkchlorid (ZnCl₂), Zinkacetat (ZnAc) bzw. Zinkorotat (ZnOr) mit bzw. ohne 1 μM A967079 (N=3; M±SD).

A549

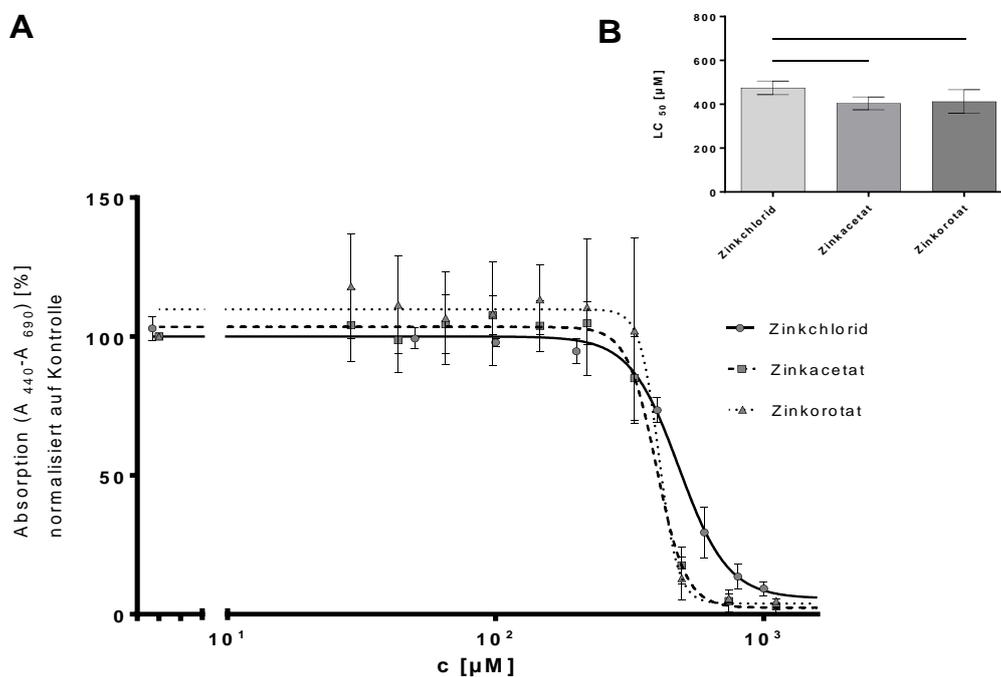


Abb. 44 Ermittlung der LC₅₀ verschiedener Zinksalze bei A549 mittels WST-1-Assay. (A) Ermittlung der LC₅₀ für Zinkchlorid, Zinkacetat, sowie Zinkorotat bei A549 nach 24 h Inkubation (B) Die Gegenüberstellung der LC₅₀ Werte: Signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen Zinkchlorid und Zinkacetat bzw. Zinkorotat sind angezeigt durch horizontale Linien (N≥5; M±SD).

Für Zinkacetat wurde für die Expositionsdauer von 24 h eine LC_{50} von $404,3 \pm 29,3 \mu\text{M}$ ($N=7$; $CI: 377,1 - 431,4 \mu\text{M}$) bestimmt. Die LC_{50} von Zinkorotat betrug $412,5 \pm 54,1 \mu\text{M}$ ($N=5$; $CI: 345,3 - 479,7 \mu\text{M}$). Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander, waren jedoch im Vergleich zur LC_{50} von Zinkchlorid signifikant erniedrigt (Abb. 44).

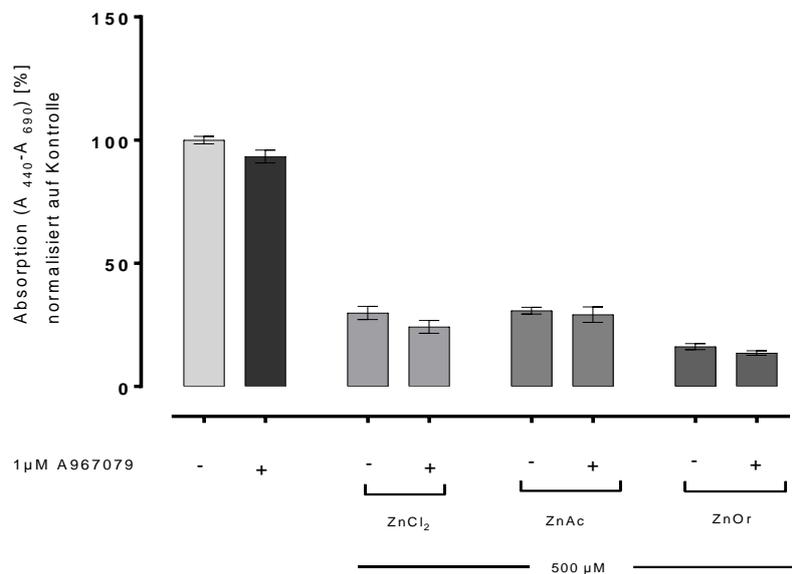


Abb. 45 Toxizität der Zinksalze nach 24 h bei A549 unter TRPA1-Inhibition:

Die relative Absorption nach Umsetzung von WST-1 diente als Parameter für die relative Vitalität von A549 nach 24 h Inkubation mit $500 \mu\text{M}$ Zinkchlorid (ZnCl_2), Zinkacetat (ZnAc) bzw. Zinkorotat (ZnOr) mit oder ohne A967079 ($N=6$; $M \pm SD$).

Auch bei den organischen Zinksalzen war kein protektiver Effekt von A967079 zu erkennen. In Kapitel 3.3.1 wurde bereits eine zeitliche Abhängigkeit für die Toxizität von Zinkchlorid bei A549-Zellen beobachtet. Also folgte auch hier eine Betrachtung der Vitalität von A549-Zellen mit demselben Versuchsaufbau nach 72 h.

Auch nach 72 h hatte A967079 keine Auswirkung auf die Vitalität von A549-Zellen nach einer Vergiftung mit unterschiedlichen Zinksalzen.

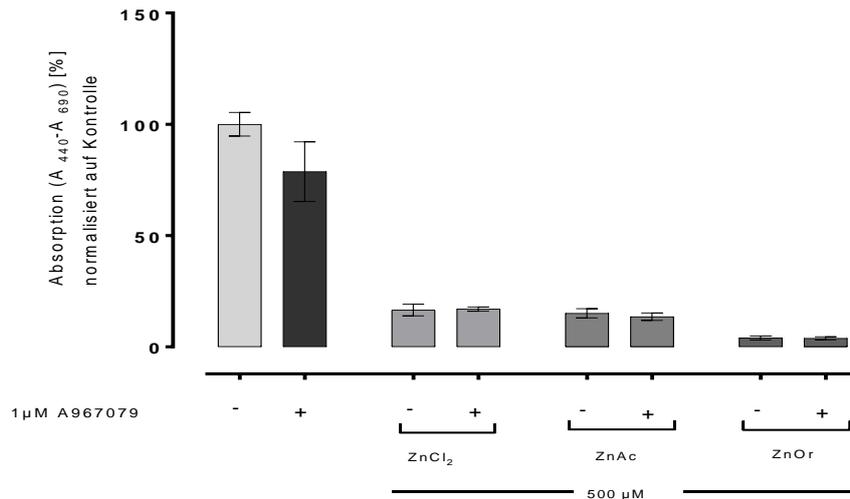


Abb. 46 Toxizität der Zinksalze nach 72 h bei A549 unter TRPA1-Inhibition

Die relative Absorption nach Umsetzung von WST-1 dient als Parameter für die Vitalität von A549 nach 72 h Inkubation mit 500 µM Zinkchlorid (ZnCl₂), Zinkacetat (ZnAc), oder Zinkorotat (ZnOr) mit oder ohne A967079 (N=5; M±SD).

Zusammenfassung

Es war kein Unterschied in der Toxizität der untersuchten organischen Zinksalze zu Zinkchlorid bei HEK-Zellen festzustellen.

In A549 Zellen war die LC₅₀ von Zinkacetat bzw. Zinkorotat gegenüber Zinkchlorid um rund 80 µM erniedrigt, unterschied sich voneinander jedoch nicht signifikant.

Der Einsatz des Blockers zeigte bei beiden organischen Zinksalzen keinen positiven Effekt auf die Vitalität.

3.3.4 Fazit Zink-Toxizität

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen der Zellvitalität deuteten darauf hin, dass die Zink-Toxizität nicht TRPA1 vermittelt ist. Im Vergleich zu HEK293 WT-Zellen zeigten TRPA1 exprimierende HEK-Zellen keine höhere Empfindlichkeit gegenüber Zinkchlorid. Der Einsatz des TRPA1-Blockers A967079 zeigte keinen schützenden Effekt nach Zinkchlorid-Intoxikation. Die Befunde standen im Einklang mit den Ergebnissen der Kalziummessungen und konnten die Eingangshypothese der TRPA1-Beteiligung nicht bestätigen.

4 Diskussion

Der TRPA1-Kanal ist ein wichtiger sensorischer Ionen-Kanal in der Lunge, der durch eine Vielzahl natürlicher oder synthetischer Stoffe aktiviert wird (Hinman et al., 2006; Jordt et al., 2003; Voets et al., 2005; Zygmunt & Högestätt, 2014). Die Aktivierung des Kanals bewirkt einen Einstrom von Kalzium in das Zytosol.

Von besonderem Interesse für diese Arbeit war die Aktivierung durch exogenes Zink. Eine Aktivierung durch exogene Zink-Ionen ist v.a. an neuronalen Zellen bzw. Zelllinien belegt (Gu & Lin, 2010; Hu et al., 2009). TRPA1 wird auch auf epitheliale Gewebe exprimiert (Büch et al., 2013; Mukhopadhyay et al., 2011; Stenger et al., 2015).

Zink ist für Organismen lebensnotwendig, exogen zugeführtes Zink kann dennoch toxische Wirkung haben. Das toxische Potential von Zink-Ionen ist für die Exposition der Lunge am größten (Roney, 2005). Die Pathophysiologie der Lungentoxizität von Zink ist dabei noch weitgehend ungeklärt.

Ziel der Arbeit war es, *in vitro* zu überprüfen, ob die Aktivierung des TRPA1 auch in Alveolar-Epithelzellen relevant ist. Außerdem sollte geklärt werden, ob diese Aktivierung in ursächlichem Zusammenhang mit der Lungen-toxischen Wirkung von Zink steht.

Mittels Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen über den Äquorin-Assay konnte gezeigt werden, dass eine TRPA1-Aktivierung durch Zink-Ionen in A549 Zellen extrem schwach ausgeprägt stattfindet. Betrachtungen der Zellvitalität ergaben, dass der TRPA1-Kanal gemäß den Parametern des WST-1 Assays nicht maßgeblich an der Vermittlung der toxischen Eigenschaften von Zink-Ionen beteiligt ist.

4.1 TRPA1-Aktivierung durch Zink in Zellen mit induzierter TRPA1-Expression

HEK-WT-Zellen ohne TRPA1 zeigten keine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Injektion von Zinkchlorid (Abb. 17). Für HEK-Zellen mit induzierter Expression hingegen war ein deutlicher Kalzium-Anstieg zu beobachten (Abb. 15). Dies entsprach Erwartungen gemäß der Publikation von Hu et al. (Hu et al., 2009). Hu ermittelte eine EC_{50} für Zinkchlorid bei TRPA1-exprimierenden HEK-Zellen von ca. 2 μ M. In der vorliegenden Arbeit wurde eine EC_{50} von ca. 8 μ M errechnet (Abb. 16).

Eine weitere Gemeinsamkeit mit der Literatur zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach TRPA1-Aktivierung durch Zink in HEK 293 TRPA1-Zellen war die Tatsache, dass Zink ab einer gewissen Konzentration wieder geringere intrazelluläre Kalziumspiegel provozierte. Hu stellte eine Abschwächung des Kalziumsignals ab ca. 300 μM Zinkacetat fest (Hu et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit waren diese Effekte ab 125 μM Zinkchlorid zu beobachten. Berechnet man analog zur EC_{50} die IC_{50} von Zinkchlorid für den Konzentrationsbereich, bei dem ein sukzessiver Abfall des Signals festgestellt wurde, ergibt sich ein Wert von ca. 145 μM bei HEK-TRPA1 Zellen (Steinritz et al., 2017). Dieser Effekt war nur in Zellen mit einer übermäßig hohen TRPA1-Expression zu beobachten. Eine mögliche Interaktion hoher Zink Konzentrationen mit Äquorin („*quenching*“-Effekte, Lumineszenz-Löschung) können zu diesem Zeitpunkt nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Hu vermutete eine inhibitorisch wirkende Zink-Bindungsstelle am TRPA1 mit niedriger Affinität. Dies böte eine Erklärung für die TRPA1-Aktivierung ohne toxische Effekte in HEK-TRPA1.

Für Kalzium-Ionen selbst sind TRPA1-regulierende Eigenschaften bekannt (Nilius et al., 2011; Wang et al., 2008b).

Eine weitere Erklärung könnte eine Art Konkurrenz zwischen Kalzium- und Zink-Ionen sein. Mit steigenden extrazellulären Zinkkonzentrationen und gleichbleibenden Kalziumkonzentrationen gelangen ab einem bestimmten Zink-Kalzium-Verhältnis bevorzugt Zink-Ionen durch den TRPA1-Kanal, welche nicht mit Äquorin reagieren. Es ist bekannt, dass TRPA1 unselektiv sowohl mono- als auch divalente Ionen leitet (Clapham, 2003; Nilius et al., 2011; Wang et al., 2008b). Entsprechende Daten für Zink und Kalzium im Vergleich bei TRPA1 gibt es bislang nicht. Für andere Ionenkanäle sind ähnliche Begebenheiten bekannt:

TRPM7 beispielsweise leitet unter physiologischen Bedingungen Kalzium und Magnesium, seine Leitfähigkeit für Zink ist aber viel höher (Monteilh-Zoller et al., 2003).

Im Zusammenhang mit der Neurotoxizität von Zink sind L-Typ-Kalziumkanäle als Haupteintrittswege in Neuronen beschrieben (Kim et al., 2000).

Die AITC-induzierte und die Zinkchlorid-induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ließen sich durch den spezifischen Blocker A967079 signifikant unterdrücken (Abb. 18). Dies bestätigte entsprechende Ergebnisse in der Literatur für AITC-induzierte Kalziumströme durch TRPA1-exprimierende HEK293 Zellen (Chen et al., 2011).

Auffällig war dabei, dass die Kalziumniveaus unter TRPA1-Blockade nicht vollständig auf das basale Kalziumniveau gesenkt wurden (Abb. 18). Dies konnte als Zink-unabhängiger Effekt betrachtet werden, da er auch bei Injektion von AITC oder HBS-Puffer gemessen wurde. A549 Zellen zeigten dieselbe Auffälligkeit (Abb. 28).

Eine (schwache) Aktivierung anderer TRP-Kanäle war unwahrscheinlich, da A967079 laut Chen et al. eine 1000-fach erhöhte Selektivität für TRPA1 gegenüber anderen TRP-Kanälen wie beispielsweise TRPV1 aufweist (Chen et al., 2011). Als Gründe für diese scheinbare Erhöhung der Kalziumkonzentration kamen die Mobilisierung von Kalzium aus intrazellulären Kalziumspeichern durch A967079 oder eine direkte Interaktion mit Äquorin in Frage.

Die funktionelle Charakterisierung des TRPA1 durch wiederholte Injektionen von AITC entsprachen Befunden von Everaerts et al. und Wang et al. für elektrophysiologische Messungen, die für eine Desensibilisierung des TRPA1 im Sinne einer Tachyphylaxie sprechen (Everaerts et al., 2011; Wang et al., 2008a). Nach Stimulation mit 100 μ M AITC war TRPA1 weder durch erneute Injektion von 100 μ M AITC aktivierbar noch durch Injektion von Zinkchlorid. Nach initialer Aktivierung durch Zinkchlorid rief AITC ein schwaches Signal hervor, eine weitere Injektion von Zinkchlorid jedoch nicht (Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 21).

24 h Dauerstimulation des TRPA1 durch Inkubation mit Zinkchlorid in HEK 293-Zellen führte nicht zu einem Funktionsverlust. Der Kanal war nach wie vor aktivierbar in niedrigeren Konzentrationen. Höhere Konzentrationen erniedrigten das korrespondierende Kalzium-Signal (Abb. 22) analog zu HEK293 TRPA1 ohne Vorbehandlung. Die EC_{50} für Zinkchlorid war mit rund 15 μ M fast doppelt so hoch, wie die EC_{50} ohne vorhergehende Inkubation (Abb. 23 und Abb. 16). Dieses Ergebnis, welches eher auf eine Art Funktionsverlust hindeutete, deckte sich nicht mit Befunden zur Aktivierung des TRPA1 durch AITC (Schmidt et al., 2009). Schmidt et al. konnten zeigen, dass eine Aktivierung des TRPA1 durch Senföl eine vermehrte Expression des funktionsfähigen TRPA1 auf der Plasmamembran bewirkte. AITC und Zinkchlorid unterscheiden sich in ihrer Chemie und in ihren Aktivierungsmechanismen. Somit war auch eine unterschiedliche Wirkung auf die TRPA1 Expression nicht ausgeschlossen.

An allen Messungen der Kalzium-Konzentration war auffällig, dass der AITC-vermittelte Kalzium-Anstieg weit höher war als der Zink-vermittelte Kalzium-Anstieg (Abb. 15, Abb. 18). A549-Zellen zeigten denselben Effekt (Abb. 26 und Abb. 28).

Eine mögliche Erklärung wäre, dass AITC neben TRPA1 noch andere Kalziumkanäle aktivierte.

Naheliegender wäre die Koaktivierung von TRPV1, da die Koexpression von TRPA1 und TRPV1 in bestimmten Zelltypen mehrfach beschrieben wurde (Akopian, 2011; Salas et al., 2009; Zygmunt & Högestätt, 2014). Zwar scheint AITC in sehr hohen Konzentrationen nicht nur TRPA1, sondern auch TRPV1 zu aktivieren, bei 100 μM AITC kann jedoch von einer TRPA1-spezifischen Aktivierung ausgegangen werden (Everaerts et al., 2011).

Möglicherweise waren die unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen von AITC bzw. Zink-Ionen ursächlich für diese Diskrepanz. AITC ist aufgrund seiner Lipophilie membrangängig und aktiviert TRPA1 an N-terminalen Cystein-Resten (Hinman et al., 2006). Zink aktiviert TRPA1 auch intrazellulär (Andersson et al., 2009; Hu et al., 2009), kann in ionischer Form jedoch nur durch Transporter oder Kanäle in das Zellinnere gelangen, wo es mit einer Vielzahl von Proteinen interagiert.

Shang et al. (Shang et al., 2016) zeigten, dass eine AITC-induzierte Aktivierung von intrazellulären TRPA1-Kanälen in Spinalganglien eine Kalzium-Freisetzung aus Lysosomen bewirkte. Möglicherweise kam ein ähnlicher Effekt auch in den hier verwendeten Zellsystemen zum Tragen. Rein hypothetisch könnte AITC aufgrund seiner Lipophilie in höherem Maße an intrazelluläre TRPA1-Kanäle gelangen als Zink, dessen Vorkommen als freies Zink-Ion streng reguliert ist. Eine TRPA1 Expression der Zelllinien wurde mittels Western Blot und qPCR zweifelsfrei nachgewiesen (Abschnitt 3.1). Immunocytochemische Untersuchungen könnten Aufschluss darüber liefern, ob das TRPA1-Protein ausschließlich auf der Zellmembran exprimiert wurde, oder auch intrazellulär.

Im Zusammenhang mit den übrigen Ergebnissen dieser Arbeit kann der im Vergleich zum Zink-induzierten Kalzium-Anstieg fast doppelt so hohe AITC-induzierte Kalzium-Anstieg als weiterer Hinweis dafür gewertet werden, dass der TRPA1-Kanal nicht maßgeblich an der toxischen Wirkung von Zink beteiligt ist. AITC ist im Gegensatz zu Zink eine nicht-physiologische, exogene chemische Noxe (Abschnitt 1.2.2). Zink ist im Regelfall physiologisch sinnvoll und die Zinkhomöostase streng reguliert. Nur unter bestimmten Voraussetzungen bewirkt Zink eine Schädigung.

4.2 TRPA1-Aktivierung durch Zink in Zellen mit spontaner TRPA1-Expression

A549 Zellen mit spontaner TRPA1 Expression zeigten den mitigierenden Effekt hoher Zinkchlorid-Konzentrationen auf den Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration nicht (Abb. 26). Nach Zugabe von 1000 μM Zinkchlorid war zwar ein Abfall der Signalintensität zu sehen, diese war aber immer noch signifikant höher als das Kontrollsignal.

Der leichte Abfall der Signalintensität bei 1000 μM könnte in diesem Fall auf die Versuchsbedingungen und nicht auf die Kanalaktivität an sich zurückzuführen sein. Höhere Zink-Konzentrationen als 1000 μM konnten nicht untersucht werden, da es bei der Herstellung der entsprechenden Injektionslösungen zu optisch sichtbaren Ausfällungen kam. Um die Zink-induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in A549-Zellen bei Zinkkonzentrationen größer als 1000 μM zu untersuchen, müssten die Versuchsbedingungen entsprechend angepasst werden. An dieser Stelle sei jedoch angemerkt, dass 1000 μM bereits in den toxischen Konzentrationsbereich von Zinkchlorid bei A549 reicht. Die übrigen Ergebnisse in dieser Arbeit, die durch spezifische TRPA1 Inhibition gewonnen wurden, sprachen dafür, dass die Betrachtung des Kalziumeinstroms bei der Injektion noch höherer Konzentrationen Zinkchlorids als zweitrangig eingestuft werden müssen.

Die spezifische Inhibition des TRPA1 mit A967079 zeigte keinen Unterschied im Kalziumsignal ohne TRPA1-Blocker und ließ die Vermutung zu, dass die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in A549 Zellen nicht ausschließlich über TRPA1 vermittelt wurde. Dafür sprachen auch die Ergebnisse zu den Versuchen mit wiederholter TRPA1-Stimulation (Abb. 29, Abb. 30, Abb. 31).

Wiederholte Injektionen von 100 μM AITC zeigten keine TRPA1-Aktivierung in A549 Zellen. Wie bei HEK293 TRPA1, inaktivierten 100 μM AITC den TRPA1-Kanal für eine weitere Stimulation mit AITC. Wurden nach AITC jedoch 500 μM Zinkchlorid injiziert, war ein leichter Kalzium-Anstieg messbar (Abb. 29 und Abb. 31). Zink schien die intrazelluläre Kalzium-Konzentration in A549-Zellen noch über andere Mechanismen zu erhöhen.

Ein wichtiger Aspekt zur TRPA1 Aktivierung wurde in den Kalzium-Messungen bewusst ausgeklammert, nämlich die Aktivierung durch Protonen. Diese konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden (de la Roche et al., 2013; Stenger et al., 2015). Zink-Ionen bilden in wässriger Lösung azide Hexaaquokomplexe, die zu einer Senkung des pH-Wertes führen (Holleman, 2008). Um allein Zink-bedingte Effekte untersuchen zu können, wurde dies durch

die Verwendung eines Puffers verhindert. Inwieweit Zinkchlorid den TRPA1 Kanal indirekt über die Generierung von Protonen aktiviert, müssen weitergehende Versuche klären, die die Azidität von Zinkchlorid mit einbeziehen.

4.3 TRPA1 Aktivierung durch weitere organischer Zinksalze

Nach Zugabe von Zinkacetat oder Zinkorotat verhielt sich der TRPA1-Kanal sowohl in Zellen mit induzierter Expression, als auch in den A549 Zellen in den Kalziummessungen erwartungsgemäß: Es waren keine Unterschiede zu Zinkchlorid erkennbar. Da die Zinksalze schon vor Kontakt mit den Zellen in Lösung gebracht worden waren, standen bereits beim ersten Kontakt freie Zink-Ionen zur Verfügung. Thermische oder durch den pH-Wert bedingte Einflüsse wurden durch den Versuchsaufbau bewusst minimiert.

4.4 Vitalität der Zelllinien nach Zinkchlorid-Exposition

Die Untersuchungen der Vitalität der Zellen durch den WST-1 zeigten, dass der TRPA1-Kanal keine oder nur eine untergeordnete Rolle in der Vermittlung der toxischen Wirkung von Zink auf das mitochondriale Dehydrogenase-System spielte. Vergleicht man die LC_{50} von Zinkchlorid bei HEK 293 WT mit der LC_{50} von Zinkchlorid bei HEK 293 mit induzierter TRPA1 Expression (Abb. 35) war weder nach 24 h noch nach 72 h Inkubationszeit ein Unterschied feststellbar. Auffällig bei der Bestimmung der LC_{50} bei beiden HEK293-Zelllinien war, dass Zink in den niedrigen Konzentrationsbereichen (zwischen ca. 20 und 120 μ M) eine gesteigerte Umsetzung von WST-1, also eine scheinbar gesteigerte Vitalität gegenüber der Medium-Kontrolle zeigte (Abb. 33 und Abb. 34). Die Daten für die HEK-Zellen unterlagen generell hohen Schwankungen.

Alle Versuche mit WST-1 wurden im Zellkulturmedium mit Zusatz von 10% FCS durchgeführt. Aufgrund des natürlichen Zinkgehalts und der Zinkbindungskapazität der Serumproteine barg dieses ein gewisses Potential für Schwankungen. Neben Wachstumsfaktoren, Vitamine, und Zink enthält FCS wichtige Serumproteine. Serumproteine als Komplexbildungspartner für Zink können den Effekt von zugegebenem Zink verschleiern, indem freie Zink-Ionen gebunden werden. Das bereits enthaltene Zink muss unter Umständen berücksichtigt werden. Da es sich bei fötalem Kälberserum um ein Naturprodukt handelt, unterliegen die Konzentrationen der Inhaltsstoffe natürlichen Schwankungen. Wie Ollig et al zeigten, kann der natürliche

Zinkgehalt von FCS chargenabhängig variieren (Ollig et al., 2016). Der HBS-Puffer, der für die Äquorin-basierten Kalziummessungen eingesetzt wurde kam wegen der geringen Überlebensrate von HEK 293 TRPA1-Zellen nach 24 h nicht für die WST-1 basierten Versuche zur Anwendung. A549-Zellen zeigten diese hohen Standardabweichungen und die scheinbar gesteigerte Vitalität bei niedrigen Zinkkonzentrationen nicht (Abb. 36). Dies sprach für ein Zell-spezifisches Phänomen und nicht für ein technisches. HEK 293 Zellen waren entweder tatsächlich „vitaler“ nach Zugabe von 20-120 μ M Zinkchlorid, oder es fanden unter Zinkeinfluss andere Vorgänge statt, die eine gesteigerte Umsetzung von WST-1 bewirkten.

Im Gegensatz zu den HEK-Zelllinien war bei den A549 Zellen eine Auswirkung der Inkubationszeit auf die Toxizität von Zinkchlorid festzustellen. Diese konnte als unabhängig von TRPA1 betrachtet werden, wie entsprechende Versuche mit A967079 zeigen.

4.5 Kein protektiver Effekt durch TRPA1-Inhibition

Die Inhibition von TRPA1 durch A967079 zeigte im WST-1 Assay in allen verwendeten Zelllinien keinen protektiven Effekt bei Intoxikation der Zellen mit Zinkchlorid. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass der TRPA1-Kanal nicht maßgeblich an der toxischen Wirkung von Zink beteiligt ist. Bei HEK 293 TRPA1 Zellen bewirkte die Inkubation mit A967079 eine signifikante Steigerung der WST-1 Umsetzung mit und ohne Zinkchlorid (Abb. 37). In den Versuchsreihen mit anderen Zinksalzen war dieser Effekt noch ausgeprägter (interessanterweise in umgekehrter Reihenfolge der Löslichkeit der Zinksalze) (Abb. 41). HEK 293 TRPA1 wiesen eine artifizielle, extrem gesteigerte und nicht physiologische TRPA1-Expression auf, die sich negativ auf den Gesamtzustand der Zellen auswirken konnte. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass eine Inhibition des übermäßig exprimierten Kanals im Umkehrschluss positive Auswirkungen auf das Zellsystem hatte.

4.6 Vergleichende Betrachtung der Vitalität nach Exposition mit organischen Zinksalzen

Im WST-1 Assay war bei HEK-Zellen kein Unterschied zwischen Zinkchlorid und den beiden organischen Zinksalzen mit geringerem lungentoxischem Potential feststellbar.

Für A549 Zellen konnte im Vergleich zu Zinkchlorid eine um ca. 80% erniedrigte LC₅₀ für die

beiden organischen Zinksalze ermittelt werden (Abb. 44). Dies zeigte, dass die beiden Salze mit geringerem lungentoxischem Potential im WST-1 Assay scheinbar toxischer waren als Zinkchlorid.

Pavlica et al. untersuchten an der neuronalen Modellzelllinie PC12 7 verschiedene Zinksalze hinsichtlich ihrer Toxizität (Pavlica et al., 2009). Sie gliederten die sieben Salze gemäß ihrer Toxizität in drei Gruppen. Die Gruppe mit der höchsten Zytotoxizität bildeten Zinkzitatrat und Zinksulfat. Zinkorotat, Zinkacetat, Zinkchlorid und Zinkgluconat wurden in einer Gruppe mit moderater Toxizität zusammengefasst. Gering toxisch war Zink-Histidin. Innerhalb der moderat toxischen Gruppe wurden die Zinksalze hinsichtlich ihres toxischen Potentials in absteigender Reihenfolge gegliedert: Zinkorotat > Zinkacetat > Zinkchlorid > Zinkgluconat. Damit bestätigen sich die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit bzgl. der in vitro Toxizität der drei getesteten Zinksalze.

Eine mögliche Erklärung für die geringfügig höhere in vitro Toxizität von Zinkorotat bzw. Zinkacetat gegenüber Zinkchlorid könnte eine höhere „Verfügbarkeit“ der beiden organischen Salze sein: Betrachtet man die chemischen Strukturen im Vergleich, kann davon ausgegangen werden, dass der Chelateffekt bei Zinkorotat am meisten ausgeprägt ist. Betrachtet man die theoretischen Löslichkeiten der Verbindungen in Wasser, gibt Zinkchlorid mit einer sehr hohen Löslichkeit von 4300 g/L bei 20°C (GESTIS-Stoffdatenbank, 2017b) im wässrigen Milieu schneller Zink-Ionen freigibt als Zinkorotat, das als „schwer löslich in Wasser“ klassifiziert ist ("MSDS 75515 Zinkorotat," 2012). Das Zink im Zinkorotat-Komplex wird mit anderen Strukturen nur Komplexe eingehen, der Komplexbildungskonstanten größer sind als die von Zinkorotat.

Laut Pavlica et al. scheint die Zinkaufnahme in neuronalen Zelllinien in Zusammenhang mit der Zytotoxizität zu stehen. Das am meisten toxische Zinksulfat führte zum größten Anstieg intrazellulärer Zinkkonzentrationen. Der verantwortliche Mechanismus wurde nicht untersucht. Es ist aber davon auszugehen, dass die Zinkaufnahme durch verschiedene Faktoren wie z.B. Löslichkeit bedingt ist.

Haupteintrittsweg für Zink-Ionen in PC12-Zellen scheinen L-Typ-Kalzium Kanäle zu sein (Kim et al., 2000; Koh, 2001; Pavlica et al., 2009).

Über die Eintrittswege von Zink in A549 Zellen ist wenig bekannt. Die Kalziummessungen in der vorliegenden Arbeit konnten einen Zink-induzierten TRPA1-vermittelten Kalzium-Einstrom nicht bestätigen. Es konnte aber nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass

Zink in relevanten Mengen durch den TRPA1 gelangte. Entsprechende Messungen der intrazellulären Zinkkonzentrationen parallel zu Kalziumkonzentrationen müssen durchgeführt werden, um diese Frage zu klären. Aufgrund der Tatsache, dass die Zinkbedingte Zytotoxizität durch die Blockade von TRPA1 nicht beeinflusst wurde, scheidet der TRPA1 als Haupteintrittsweg aus. Der spezifische Zinktransporter Zn8 scheint sowohl in humanem Lungenepithel (Napolitano et al., 2012) als auch in A549 Zellen (Mantha et al., 2011) exprimiert zu werden und wäre ein möglicher Eintrittsweg von Zink-Ionen. TRPM7 ist ebenfalls ein unselektiver Kationen-Kanal aus der TRP-Familie, der neben anderen Spurenelementen Kalzium, Magnesium und Zink leitet. Dessen Zink-Leitfähigkeit ist sogar höher als die Leitfähigkeit für Kalzium oder Magnesium (Monteilh-Zoller et al., 2003). TRPM7-Expression in A549-Zellen wurde bereits (Büch et al., 2013). Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen TRPM7 und neuronaler Zink-Toxizität hergestellt werden (Inoue et al., 2010).

Obwohl die vorliegenden Daten zur in vitro Toxizität von Zinkchlorid, Zinkacetat und Zinkorotat der Literatur entsprechen, sind sie nicht mit der Situation in vivo in Einklang zu bringen. Im Gegensatz zu Zinkacetat oder Zinkorotat wird für die Exposition der Lunge gegenüber Zinkchlorid über schwere Reizungen bis hin zur Ausbildung eines ARDS berichtet (Kapitel 1.3). Ein wichtiger Aspekt, welcher in der vorliegenden Arbeit zunächst bewusst ausgeklammert wurde, spielt mit Sicherheit eine Rolle in der Lungentoxizität von Zinkchlorid (und in gewissem Maße vermutlich auch in der TRPA1-Aktivierung), nämlich dessen Azidität. Legt man das Fallbeispiel einer Zinknebelvergiftung zu Grunde, zeigt sich folgendes Szenario: in Relation zu Expositionsort und -zeit gelangt eine gewisse Menge feinstverteilten Zinkchlorids in den Alveolarbereich, wo es sich in einem relativ kleinen Volumen alveolarer Oberflächenflüssigkeit unter Bildung azider Hexaquokomplexe löst (Kapitel 1.3.3 und 1.3.4). Unter submersen Bedingungen ist es schwierig, diesen Sachverhalt realitätsnah darzustellen. Mit In-vitro-Lungen-Expositionsmodellen wie z.B. dem Cultex RFS wäre es möglich, A549-Zellen an der Luft Stäuben definierter Partikelgrößen $< 10\mu\text{M}$ zu exponieren (Aufderheide et al., 2013).

5 Fazit

Bei der Untersuchung des TRPA1 als Zielstruktur bei der Zinkchlorid-Exposition in vitro konnten anhand der Ergebnisse, die unter den beschriebenen Bedingungen gewonnen wurden, folgende Schlüsse gezogen werden:

1. In TRPA1-exprimierenden Alveolarepithel-Typ-II-Modellzellen A549 spielte die Zink-induzierte TRPA1-Aktivierung keine bzw. eine untergeordnete Rolle.
2. TRPA1 ist nicht maßgeblich an der Toxizität von Zink beteiligt.

Die meisten Daten, die Zink mit TRPA1 in der Lunge durch in vitro-Versuche in Verbindung bringen, wurden im Zusammenhang mit artifiziell TRPA1 exprimierenden Zelllinien, neuronalen Zellen oder neuronalen Modellzelllinien gewonnen (Andersson et al., 2009; Gu & Lin, 2010; Hu et al., 2009; Zurborg et al., 2007). Im Hinblick auf die toxischen Eigenschaften von Zink, ist die potentielle Neurotoxizität von Zink ebenfalls eingehend untersucht worden (Inoue et al., 2010; Morris & Levenson, 2017; Pavlica et al., 2009).

Im Lungenepithel bzw. im Alveolarepithel-Typ-II-Modell wird TRPA1 exprimiert. Dies wurde in der Literatur (Büch et al., 2013; Mukhopadhyay et al., 2011; Steinritz et al., 2017; Stenger et al., 2015) und in dieser Arbeit gezeigt. Nach den vorliegenden Ergebnissen muss die physiologische Relevanz jedoch in Frage gestellt werden. Die TRPA1-Aktivierung fand zwar statt, aber weder in dem Maße, welches das Überexpressionssystem gezeigt hatte, noch in der Art und dem Ausmaß, welches in der Literatur für neuronale TRPA1 exprimierende Zellen beschrieben wurde. Dies mag entweder an einer geringeren Expression des TRPA1, oder an Epithel-spezifischen Gegenregulationsmechanismen liegen; es bedarf diesbezüglich weiterer Untersuchungen. Die Betrachtung der Signalkaskade, die durch die TRPA1-Aktivierung ausgelöst wird, liefert tiefere Einsicht in die physiologische Relevanz einer Zink-induzierten TRPA1-Aktivierung in Alveolarepithel-Typ-II-Zellen. Analysen des gesamten Proteoms von A549-Zellen nach TRPA1-Aktivierung mittels 2D-Gelelektrophorese sind bereits in der Etablierungsphase.

Die Tatsache, dass die vorliegenden in vitro Daten zur Toxizität von Zink nicht für eine TRPA1-vermittelte Zink-Toxizität sprechen, steht im Einklang mit den Ergebnissen zur TRPA1-Aktivierung, die in Alveolarepithel-Zellen Typ-II eine untergeordnete Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein Aspekt der in vitro Zink-Toxizität beleuchtet, nämlich die

Wirkung auf das mitochondriale Dehydrogenasesystem. Die Zink-Toxizität umfasst mit Sicherheit noch andere Zielstrukturen.

Aufgrund der sehr speziellen und komplexen chemischen Eigenschaften des Zinks spiegeln in vitro Daten, welche unter submersen Bedingungen gewonnen wurden, die Realität generell nur unzureichend wider. Untersuchungen von Alveolarepithel-Zellen Typ-II in in-vitro-Lungenexpositionsmo­dellen böten tiefere Einblicke in die Rolle von TRPA1 als Zielstruktur bei der Zinkchlorid-Exposition in vitro.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 STRUKTUR DES TRPA1-KANALS	4
Abb. 2: STRUKTURFORMEL VON ALLYLISOTHIOCYANAT (AITC)	5
Abb. 3 STRUKTURFORMEL VON A967079	6
Abb. 4: STRUKTURFORMEL DER OROTSÄURE.....	14
Abb. 5 SCHEMA ENZYMRREAKTION VON ÄQUORIN (ADAPTIERT AUS SHIMOMURA ET AL. 1974):.....	31
Abb. 6 KATALYTISCHE UMWANDLUNG VON WST-1 ZU FORMAZAN.....	34
Abb. 7 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER PLATTE MIT HEK-ZELLEN NACH DER STIMULATION FÜR WST-1 ASSAY MIT TRPA1-INHIBITOR. (BR = BACKGROUND-KONTROLLE)	35
Abb. 8 PCR PRODUKTE VON HEK 293 WT, HEK 293 TRPA1 UND A549 AUF GETRENNT IM 1% AGAROSEGEL	37
Abb. 9 TRPA1-mRNA EXPRESSION IN DEN VERWENDETEN ZELLINIEN NORMALISIERT AUF β -AKTIN.	38
Abb. 10 WESTERN BLOT MIT JEWEILS 60 μ G GESAMTPROTEIN DER VERWENDETEN ZELLINIEN	39
Abb. 11 ÜBERLEBEN VON HEK 293 TRPA1 UND A549 ZELLEN IN HBS-PUFFER.	41
Abb. 12 TESTMESSUNG DER INTRAZELLULÄREN KALZIUMKONZENTRATION MITTELS FURA-2 IN A549.	42
Abb. 13 INTERAKTION VON FURA-2 MIT ZINK-IONEN.	42
Abb. 14 ÄNDERUNG DER INTRAZELLULÄREN KALZIUM-KONZENTRATION IN HEK TRPA1.	43
Abb. 15 PEAK-MAXIMA DER ZINKCHLORID-INJEKTIONSKURVEN GEMESSEN IN HEK293 TRPA1.....	44
Abb. 16 DOSIS-WIRKUNGSKURVE VON ZINKCHLORID BEI HEK TRPA1.	44
Abb. 17 PEAK-MAXIMA DER ZINKCHLORID-INJEKTIONSKURVEN GEMESSEN IN HEK293 WT.....	45
Abb. 18 INHIBITION DES KALZIUM-EINSTROMS BEI HEK TRPA1.	46
Abb. 19 PEAK-MAXIMA DER KALZIUM-KURVEN BEI WIEDERHOLTER INJEKTION VON AITC BZW. ZINKCHLORID BEI HEK TRPA1.	47
Abb. 20 PROZENTUALE DARSTELLUNG DER PEAK-MAXIMA NACH WIEDERHOLTER INJEKTION VON AITC BEI HEK TRPA1.	47
Abb. 21 PROZENTUALE DARSTELLUNG DER PEAK-MAXIMA NACH WIEDERHOLTER INJEKTION VON ZINKCHLORID BEI HEK TRPA1... ..	48
Abb. 22 KALZIUM -SIGNALE BEI HEK TRPA1 NACH 24 H INKUBATION MIT 31,3 μ M ZINKCHLORID.....	49
Abb. 23 DOSIS-WIRKUNGSKURVE VON ZINKCHLORID BEI HEK TRPA1 NACH 24 H PRÄINKUBATION VON 31,3 μ M ZINKCHLORID. .	49
Abb. 24 PEAK-MAXIMA DER KALZIUM-KURVEN VON HEK TRPA1 NACH INJEKTION VERSCHIEDENER ZINKSALZE	50
Abb. 25 ÄNDERUNG DER INTRAZELLULÄREN KALZIUM-KONZENTRATION IN A549 BEI ZUGABE UNTERSCHIEDLICHER ZINKCHLORID KONZENTRATIONEN.	51
Abb. 26 PEAK-MAXIMA DER ZINKCHLORID-INJEKTIONSKURVEN GEMESSEN IN A549	52
Abb. 27 DOSIS-WIRKUNGSKURVE VON ZINKCHLORID BEI A549.	53
Abb. 28 INHIBITION DES KALZIUM-EINSTROMS BEI A549.	53
Abb. 29 WIEDERHOLTE INJEKTION VON AITC BZW. ZINKCHLORID BEI A549.....	54
Abb. 30 WIEDERHOLTE INJEKTION VON AITC BEI A549.	54
Abb. 31 WIEDERHOLTE INJEKTION VON ZINKCHLORID BEI A549.....	55

Abb. 32 PEAK-MAXIMA DER KALZIUM-KURVEN VON A549 NACH INJEKTION VERSCHIEDENER ZINKSALZE.....	56
Abb. 33 ERMITTLUNG DER LC ₅₀ FÜR ZINKCHLORID BEI HEK TRPA1 MIT WST-1-ASSAY.....	58
Abb. 34 ERMITTLUNG DER LC ₅₀ FÜR ZINKCHLORID BEI HEK WT MIT WST-1-ASSAY.....	59
Abb. 35 ZUSAMMENFASSENDE GEGENÜBERSTELLUNG DER LC ₅₀ WERTE FÜR ZINKCHLORID BEI HEK TRPA1 UND HEK WT FÜR 24 H BZW. 72 H EXPOSITION.....	60
Abb. 36 ERMITTLUNG DER LC ₅₀ FÜR ZINKCHLORID BEI A549 MIT WST-1-ASSAY	60
Abb. 37 TOXIZITÄT VON ZINKCHLORID BEI HEK TRPA1 NACH TRPA1-INHIBITION.	62
Abb. 38 TOXIZITÄT VON ZINKCHLORID BEI HEK WT NACH TRPA1-INHIBITION.	63
Abb. 39 TOXIZITÄT VON ZINKCHLORID NACH 24 H BEI A549 NACH TRPA1-INHIBITION.	64
Abb. 40 ERMITTLUNG DER LC ₅₀ VERSCHIEDENER ZINKSALZE BEI HEK TRPA1 MITTELS WST-1-ASSAY.	65
Abb. 41 TOXIZITÄT VERSCHIEDENER ZINKSALZE BEI HEK TRPA1 NACH TRPA1-INHIBITION.....	66
Abb. 42 ERMITTLUNG DER LC ₅₀ VERSCHIEDENER ZINKSALZE BEI HEK WT MITTELS WST-1-ASSAY.	67
Abb. 43 TOXIZITÄT DER ZINKSALZE BEI HEK WT NACH TRPA1-INHIBITION.	68
Abb. 44 ERMITTLUNG DER LC ₅₀ VERSCHIEDENER ZINKSALZE BEI A549 MITTELS WST-1-ASSAY.....	68
Abb. 45 TOXIZITÄT DER ZINKSALZE NACH 24 H BEI A549 UNTER TRPA1-INHIBITION:	69
Abb. 46 TOXIZITÄT DER ZINKSALZE NACH 72 H BEI A549 UNTER TRPA1-INHIBITION	70

Tabellenverzeichnis

TAB. 2-1 LISTE DER GERÄTE.....	17
TAB. 2-2 LISTE DER VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	18
TAB. 2-3 LISTE DER CHEMIKALIEN	18
TAB. 2-4 LISTE DER VERWENDETEN KITS UND ENZYME	19
TAB. 2-5 LISTE DER MARKER.....	20
TAB. 2-6 LISTE DER VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE ZUM NACHWEIS DES HTRPA1	20
TAB. 2-7 LISTE DER ANTIKÖRPER	21
TAB. 2-8 LISTE DER ZELLINIEN.....	21
TAB. 2-9 LISTE DER ZELLKULTURMEDIEN UND -LÖSUNGEN	22
TAB. 2-10 LISTE DER VERWENDETEN PUFFER UND LÖSUNGEN	22
TAB. 2-11 ZUSAMMENSETZUNG EINES PCR-ANSATZES.....	26
TAB. 2-12 PARAMETER DER PCR.....	26
TAB. 2-13 ZUSAMMENSETZUNG EINES QPCR-ANSATZES.....	27
TAB. 2-14 PARAMETER DER QPCR.....	27
TAB. 2-15 ZUSAMMENSETZUNG EINES 10 %IGEN POLYACRYLAMIDGEL.....	29
TAB. 2-16 PARAMETER DER TRANSFEKTION	32

Literaturverzeichnis

- Agren, MS. (1990). Percutaneous absorption of zinc from zinc oxide applied topically to intact skin in man. *Dermatologica*, 180, 36–39.
- Akopian, A. (2011). Regulation of nociceptive transmission at the periphery via TRPA1-TRPV1 interactions. *Curr Pharm Biotech*, 12, 89-94.
- Alpizar, YA, Gees, M, Sanchez, A, Apetrei, A, Voets, T, Nilius, B, Talavera, K. (2013). Bimodal effects of cinnamaldehyde and camphor on mouse TRPA1. *Eur J Physiol*, 465, 853-864.
- Andersson, D, Gentry, C, Moss, S, Bevan, S. (2009). Clioquinol and pyrithione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn²⁺. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 8374-8379.
- Anwar, ZM. (2005). Complexation equilibria of Zn (II), Pb (II) and Cd (II) with reduced glutathione (GSH) and biologically important zwitterionic buffers. *J Chin Chem Soc*, 52, 863-871.
- Atif Ahsan, S, Lackovic, M, Katner, A, Palermo, C. (2009). Metal Fume Fever: A review of the literature and cases reported to the Louisiana Poison Control Center. *J La State Med Soc*, 161, 348-351.
- Atoyan, R, Shander, D, Botchkareva, NV. (2009). Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J Invest Dermatol*, 129, 2312-2315.
- Aufderheide, M, Halter, B, Möhle, N, Hochrainer, D. (2013). The CULTEX RFS: a comprehensive technical approach for the in vitro exposure of airway epithelial cells to the particulate matter at the air-liquid interface. *BioMed Research Internat*, doi 10.1155/2013/734137.
- Baraldi, PG, Preti, D, Materazzi, S, Geppetti, P. (2010). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents. *J Med Chem*, 53, 5085-5107.
- Bautista, DM, Siemens, J, Glazer, JM, Tsuruda, PR, Basbaum, AI, Stucky, CL, Jordt, S-E, Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 448, 204-208.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56, 335-344.
- Brewster, MS, Gaudet, R. (2015). How the TRPA1 receptor transmits painful stimuli: Inner workings revealed by electron cryomicroscopy. *Bioessays*, 37, 1184-1192.
- Brown, MA, Thom, JV, Orth, GL, Cova, P, Juarez, J. (1964). Food poisoning involving zinc contamination. *Arch Environ Health*, 8, 657-660.
- Büch, TRH, Schäfer, EAM, Demmel, M-T, Boekhoff, I, Thiermann, H, Gudermann, T, Steinritz, D, Schmidt, A. (2013). Functional expression of the transient receptor potential channel TRPA1, a sensor for toxic lung inhalants, in pulmonary epithelial cells. *Chem-Biol Interact*, 206, 462-471.
- Chen, J, Joshi, SK, DiDomenico, S, Perner, RJ, Mikusa, JP, Gauvin, DM, Segreti, JA, Han, P, Zhang, X-F, Niforatos, W. (2011). Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. *Pain*, 152, 1165-1172.
- Clapham, D. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426, 517-524.
- Clapham, D, Julius, D, Montell, C, Schultz, G. (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*, 57, 427-450.
- Cosens, D, Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. *Nature*, 224, 285-287.
- Cullumbine, H. (1957). The toxicity of screening smokes. *J R Army Med Corps*, 103, 119-122.
- de la Roche, J, Eberhardt, MJ, Klinger, AB, Stanslowsky, N, Wegner, F, Koppert, W, Reeh, PW, Lampert, A, Fischer, MJ, Leffler, A. (2013). The molecular basis for species-specific activation of human TRPA1 protein by protons involves poorly conserved residues within transmembrane domains 5 and 6. *J Biol Chem*, 288, 20280-20292.
- Denda, M, Tsutsumi, M. (2011). Roles of Transient Receptor Potential Proteins (TRPs) in Epidermal Keratinocytes. In Islam M (Ed.), *Transient Receptor Potential Channels. Advances in Experimental Medicine and Biology* (704 ed.). Dordrecht: Springer.
- Dietrich, A, Kalwa, H, Fuchs, B, Grimminger, F, Weissmann, N, Gudermann, T. (2007). In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. *Cell Calcium*, 42, 233-244.
- Domingo, J, Llobet, J, Paternain, J, Corbella, J. (1988). Acute zinc intoxication: comparison of the antidotal efficacy of several chelating agents. *Vet Hum Toxicol*, 30, 224-228.
- Duncan, A, Yacoubian, C, Watson, N, Morrison, I. (2015). The risk of copper deficiency in patients prescribed zinc supplements. *J Clin Pathol*, 68, 723-725.
- Dushianthan, A, Grocott, MP, Postle, AD, Cusack, R. (2011). Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgrad Med J*, 87, 612-622.
- El Idrissi, A, van Berkel, L, Bonekamp, NE, Dalemans, DJ, van der Heyden, MA. (2017). The toxicology of zinc chloride smoke producing bombs and screens. *Clin Toxicol*, 55, 167-174.

- Evans, EH. (1945). Casualties following exposure to zinc chloride smoke. *Lancet*, *246*, 368-370.
- Everaerts, W, Gees, M, Alpizar, YA, Farre, R, Leten, C, Apetrei, A, Dewachter, I, Van Leuven, F, Vennekens, R, De Ridder, D. (2011). The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Curr Biol*, *21*, 316-321.
- Ferreira, CM, Pinto, IS, Soares, EV, Soares, HM. (2015). (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions—a review. *RSC Adv*, *5*, 30989-31003.
- Gaudet, R. (2008). A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol BioSyst*, *4*, 372-379.
- GESTIS-Stoffdatenbank. (2017a). Zinkacetat. from Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank
- GESTIS-Stoffdatenbank. (2017b). Zinkchlorid. from Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank
- Gil, F, Pla, A, Hernández, AF, Mercado, JM, & Méndez, F. (2008). A fatal case following exposure to zinc chloride and hexachloroethane from a smoke bomb in a fire simulation at a school. *Clin Toxicol*, *46*, 563-565.
- Grynkiewicz, G, Poenie, M, Tsien, RY. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, *260*, 3440-3450.
- Gu, Q, Lin, R-L. (2010). Heavy metals zinc, cadmium, and copper stimulate pulmonary sensory neurons via direct activation of TRPA1. *J Appl Physiol*, *108*, 891-897.
- Hamatake, M, Iguchi, K, Hirano, K, Ishida, R. (2000). Zinc induces mixed types of cell death, necrosis, and apoptosis, in molt-4 cells. *J Biol Chem*, *275*, 933-939.
- Hinman, A, Chuang, H-h, Bautista, DM, Julius, D. (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci USA*, *103*, 19564-19568.
- Hjortsø, E, Qvist, J, Bud, M, Thomsen, J, Andersen, J, Wiberg-Jorgensen, F. (1988). ARDS after accidental inhalation of zinc chloride smoke. *Intensive Care Med*, *14*, 17-24.
- Holleman, A, Wiberg, N. (2008). Die Zinkgruppe *Lehrbuch der anorganischen Chemie* (102 ed., pp. 1484-1492). Berlin: Walter De Gruyter.
- Homma, S, Jones, R, Qvist, J. (1992). Pulmonary vascular lesions in the adult respiratory distress syndrome caused by inhalation of zinc chloride smoke: a morphometric study. *Hum Pathol*, *23*, 45-50.
- Hu, Bandell, M, Petrus, M, Zhu, MX, Patapoutian, A. (2009). Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol*, *5*, 183-190.
- Iitaka, M, Kakinuma, S, Fujimaki, S, Oosuga, I, Fujita, T, Yamanaka, K, Wada, S, Katayama, S. (2001). Induction of apoptosis and necrosis by zinc in human thyroid cancer cell lines. *J Endocrinol*, *169*, 417-424.
- Inoue, K, Branigan, D, Xiong, Z-G. (2010). Zinc-induced neurotoxicity mediated by transient receptor potential melastatin 7 channels. *J Biol Chem*, *285*, 7430-7439.
- Johnson, ER, Matthay, MA. (2010). Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis and treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, *23*, 243-252.
- Jordt, S-E, McKemy, DD, Julius, D. (2003). Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. *Curr Opin Neurobiol*, *13*, 487-492.
- Kambe, T, Yamaguchi-Iwai, Y, Sasaki, R, Nagao, M. (2004). Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci*, *61*, 49-68.
- Karashima, Y, Damann, N, Prenen, J, Talavera, K, Segal, A, Voets, T, Nilius, B. (2007). Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci*, *27*, 9874-9884.
- Kaye, P, Young, H, O'Sullivan, I. (2002). Metal fume fever: a case report and review of the literature. *Emerg Med J*, *19*, 268-269.
- Kim, AH, Sheline, CT, Tian, M, Higashi, T, McMahon, RJ, Cousins, RJ, Choi, DW. (2000). L-type Ca²⁺ channel-mediated Zn²⁺ toxicity and modulation by ZnT-1 in PC12 cells. *Brain Res*, *886*, 99-107.
- Kim, Y-H, Kim, E, Gwag, B, Sohn, S, Koh, J-Y. (1999). Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *J Neurosci*, *89*, 175-182.
- Klug, A, Rhodes, D. (1987). Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *52*, 473-482.
- Koh, J-Y. (2001). Zinc and disease of the brain. *J Mol Neurobiol*, *24*, 99-106.
- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.
- Lansdown, A. (1991). Interspecies variations in response to topical application of selected zinc compounds. *Food Chem Toxicol*, *29*, 57-64.
- Lewis, MR, Kokan, L. (1998). Zinc gluconate: acute ingestion. *Clin Toxicol*, *36*, 99-101.
- Li, YV. (2014). Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine*, *45*, 178-189.

- Lichten, LA, Cousins, RJ. (2009). Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr*, 29, 153-176.
- Macpherson, LJ, Dubin, AE, Evans, MJ, Marr, F, Schultz, PG, Cravatt, BF, Patapoutian, A. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*, 445, 541-545.
- Mantha, M, El Idrissi, L, Leclerc-Beaulieu, T, Jumarie, C. (2011). Fe-and Zn-induced inhibition of Cd uptake in human lung cell lines: Speciation studies with H441 and A549 cells. *Toxicol in Vitro*, 25, 1701-1711.
- Maret, W. (2000). The function of zinc metallothionein: A link between cellular zinc and redox state. *J Nutr*, 130, 1455S-1458S.
- Maret, W, Sandstead, H. (2014). Zinkbedarf und Risiko und Nutzen einer Zinksupplementierung. *Perspect Med*, 2, 3-18.
- Martin, JL, Stork, CJ, Li, YV. (2006). Determining zinc with commonly used calcium and zinc fluorescent indicators, a question on calcium signals. *Cell Calcium*, 40, 393-402.
- McCall, KA, Huang, C-C, Fierke, CA. (2000). Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr*, 130, 1437S-1446S.
- Monteilh-Zoller, MK, Hermosura, MC, Nadler, MJ, Scharenberg, AM, Penner, R, Fleig, A. (2003). TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol*, 121, 49-60.
- Montell, C. (2003). Mg²⁺ homeostasis: the Mg²⁺ nificent TRPM channels. *Curr Biol*, 13, R799-R801.
- Montell, C, Rubin, GM. (1989). Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2, 1313-1323.
- Moore, R. (1978). Bleeding gastric erosion after oral zinc sulphate. *Brit Med J*, 1, 754.
- Morris, DR, Levenson, CW. (2017). Neurotoxicity of zinc. In Aschner M., Costa L. (Eds.), *Neurotoxicity of Metals* (Vol. 18, pp. 303-312). Cham: Springer.
- MSDS 75515 Zinkorotat. (2012). Sigma Aldrich.
- Mukhopadhyay, I, Gomes, P, Aranake, S, Shetty, M, Karnik, P, Damle, M, Kuruganti, S, Thorat, S, Khairatkar-Joshi, N. (2011). Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J Recept Signal Transduct*, 31, 350-358.
- Napolitano, JR, Liu, M-J, Bao, S, Crawford, M, Nana-Sinkam, P, Cormet-Boyaka, E, Knoell, DL. (2012). Cadmium-mediated toxicity of lung epithelia is enhanced through NF- κ B-mediated transcriptional activation of the human zinc transporter ZIP8. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*, 302, L909-L918.
- National Research Council. (1999). *Toxicity of military smokes and obscurants* (Vol. 2). Washington: National Academies Press.
- Nilius, B, Prenen, J, Owsianik, G. (2011). Irritating channels: the case of TRPA1. *J Physiol*, 589, 1543-1549.
- Noh, K-M, Koh, J-Y. (2000). Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 20, RC111.
- Nozawa, K, Kawabata-Shoda, E, Doihara, H, Kojima, R, Okada, H, Mochizuki, S, Sano, Y, Inamura, K, Matsushime, H, Koizumi, T. (2009). TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 3408-3413.
- Ollig, J, Kloubert, V, Weßels, I, Haase, H, Rink, L. (2016). Parameters influencing zinc in experimental systems in vivo and in vitro. *Metals*, 6, 71.
- Papritz, M. (2015). *Schädigung des Lungenepithels durch Zink- und Kadmiumchlorid – Eine Analyse am in-vitro-Modell der alveolar-kapillären Barriere*. (Dissertation), LMU, Medizinische Fakultät, München.
- Park, C-K, Xu, Z-Z, Liu, T, Lü, N, Serhan, CN, Ji, R-R. (2011). Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. *J Neurosci*, 31, 18433-18438.
- Pavlica, S, Gaunitz, F, Gebhardt, R. (2009). Comparative in vitro toxicity of seven zinc-salts towards neuronal PC12 cells. *Toxicol in Vitro*, 23, 653-659.
- Peacock, JC, Peacock, BLD. (1918). Some observations the dissolving of zinc chloride and several suggested solvents. *J Pharm Sci*, 7, 689-697.
- Pedersen, SF, Owsianik, G, Nilius, B. (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium*, 38, 233-252.
- Plum, LM, Rink, L, Haase, H. (2010). The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health*, 7, 1342-1365.
- Preti, D, Szallasi, A, Patacchini, R. (2012). TRP channels as therapeutic targets in airway disorders: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 22, 663-695.
- Roney, N. (2005). *Toxicological profile for zinc*. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Salas, MM, Hargreaves, KM, Akopian, AN. (2009). TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur J Neurosci*, 29, 1568-1578.

- Samman, S, Roberts, D. (1987). The effect of zinc supplements on plasma zinc and copper levels and the reported symptoms in healthy volunteers. *Med J Aust*, 146, 246-249.
- Sandstead, HH. (1995). Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *Am J Clin Nutr*, 61, 621S.
- Schafft, H. (2014). *Bewertung gesundheitlicher Risiken von Blei, Kupfer und Zink*. Paper presented at the BMEL-BfR-Symposium, Berlin.
- Schmidt, M, Dubin, AE, Petrus, MJ, Earley, TJ, Patapoutian, A. (2009). Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron*, 64, 498-509.
- Shang, S, Zhu, F, Liu, B, Chai, Z, Wu, Q, Hu, M, Wang, Y, Huang, R, Zhang, X, Wu, X. (2016). Intracellular TRPA1 mediates Ca²⁺ release from lysosomes in dorsal root ganglion neurons. *J Cell Biol*, 215, 369-381.
- Shimomura, O. (2005). Aequorin and GFP: an historical account. In PES Larry J. Kricka, Akio Tsuji (Ed.), *Bioluminescence and Chemiluminescence: Progress and Perspectives* (Vol. , pp. 27-34). Yokohama: World Scientific Publishing Co Pte Ltd.
- Shimomura, O, Johnson, FH, Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Physiol*, 59, 223-239.
- Steinritz, D, Zehfuß, F, Stenger, B, Schmidt, A, Popp, T, Kehe, K, Mückter, H, Thiermann, H, Gudermann, T. (2017). Zinc chloride-induced TRPA1 activation does not contribute to toxicity in vitro. *Toxicol Letters*, doi 10.1016/j.toxlet.2017.09.008.
- Stenger, B, Popp, T, John, H, Siegert, M, Tsoutsouloupoulos, A, Schmidt, A, Mückter, H, Gudermann, T, Thiermann, H, Steinritz, D. (2017). N-Acetyl-l-cysteine inhibits sulfur mustard-induced and TRPA1-dependent calcium influx. *Arch Toxicol*, 91, 2179-2189.
- Stenger, B, Zehfuß, F, Mückter, H, Schmidt, A, Balszuweit, F, Schäfer, E, Büch, T, Gudermann, T, Thiermann, H, Steinritz, D. (2015). Activation of the chemosensing transient receptor potential channel A1 (TRPA1) by alkylating agents. *Arch Toxicol*, 89, 1631-1643.
- Story, GM, Peier, AM, Reeve, AJ, Eid, SR, Mosbacher, J, Hricik, TR, Earley, TJ, Hergarden, AC, Andersson, DA, Hwang, SW, McIntyre, P, Jegla, T, Bevan, S, Patapoutian, A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 112, 819-829.
- Takaishi, M, Fujita, F, Uchida, K, Yamamoto, S, Maki, S, Chihiro, H, Shimizu, M, Tominaga, M. (2012). 1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. *Mol Pain*, 8, 86.
- Tominaga, M. (2007). The role of TRP channels in thermosensation. In WB Liedtke (Ed.), *TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis.
- Truong-Tran, AQ, Carter, J, Ruffin, RE, Zalewski, PD. (2001). The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals*, 14, 315-330.
- Vallee, BL. (1955). Zinc and metalloenzymes. *Adv Protein Chem*, 10, 317-384.
- Vallee, BL, Auld, DS. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, 29, 5647-5659.
- Van Driel, CA, Leenders, APM, Leeuwenburgh, AB, Schonewille, E. (1998). Niederlande Patent No. WO1998040330A1.
- Vasak, M, Meloni, G. (2011). Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem*, 16, 1067-1078.
- Venkatachalam, K, Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem*, 76, 387-417.
- Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. (2009).
- Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (zuletzt geändert am 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272, 2287)). (1998).
- Voets, T, Talavera, K, Owsianik, G, Nilius, B. (2005). Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol*, 1, 85-92.
- Walther, U, Wilhelm, B, Walther, S, Mückter, H, Fichtl, B. (2000). Zinc toxicity in various lung cell lines is mediated by glutathione and GSSG reductase activity. *Biol trace elem res*, 78, 163-177.
- Wang, L, Cvetkov, T, Chance, M, Moiseenkova-Bell, V. (2012). Identification of in vivo disulfide conformation of TRPA1 ion channel. *J Biol Chem*, 287, 6169-6176.
- Wang, S, Dai, Y, Fukuoka, T, Yamanaka, H, Kobayashi, K, Obata, K, Cui, X, Tominaga, M, Noguchi, K. (2008a). Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain*, 131, 1241-1251.
- Wang, YY, Chang, RB, Waters, HN, McKemy, DD, Liman, ER. (2008b). The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J Biol Chem*, 283, 32691-32703.

- Weitzel, G. (1956). Chemie und Physiologie biogener Zink-Verbindungen. *Angewandte Chemie*, 68 566–573.
- WHO. (2004). *Guidelines for drinking-water quality: recommendations* (Vol. 1). Geneva: World Health Organization.
- Wilhelm, B, Walther, U, Fichtl, B. (2001). Effects of zinc chloride on glutathione and glutathione synthesis rates in various lung cell lines. *Arch Toxicol*, 75, 388-394.
- Wolffram, S. (2009). Spurenelemente: Zink. In K Aktories, Förstermann, U, Hofmann, F, Starke, K (Ed.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (10 ed., pp. 774-775). München: Elsevier Urban und Fischer.
- Wu, W, Bromberg, PA, Samet, JM. (2013). Zinc ions as effectors of environmental oxidative lung injury. *Free Radic Biol Med*, 65, 57-69.
- Zurborg, S, Yurgionas, B, Jira, JA, Caspani, O, Heppenstall, PA. (2007). Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci*, 10, 277.
- Zygmunt, PM, Högestätt, ED. (2014). TRPA1. In B Nilius, V Flockerzi (Eds.), *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels* (1 ed., pp. 583-630). Berlin, Heidelberg: Springer.

Eidesstattliche Versicherung

Zehfuß, Franziska

Name, Vorname

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

Der TRPA1 Kanal als Zielstruktur bei der Zinkchlorid- Exposition in vitro

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

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

München, 05.11.2018

Franziska Zehfuß

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Harald Mückter für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit. Die interdisziplinären Treffen und sozialen Aktivitäten, die regelmäßig von Herrn Mückter organisiert wurden behalte ich in angenehmer Erinnerung.

Natürlich möchte ich an dieser Stelle meinem Betreuer Dr. Dirk Steinritz für seine Unterstützung, sowie meinem Kollegen Bernhard Stenger für die Zusammenarbeit Dank aussprechen.

Herzlicher Dank gilt auch der AG Dietrich und der AG Schredelseker aus dem Walther-Straub-Institut für die wertvolle Unterstützung. Besonders hervorheben möchte ich dabei Herrn Dr. Johann Schredelseker für sein stets offenes Ohr, seine wertvollen praktischen Tipps und seine aufmunternden Worte, sowie Herrn Dr. Andreas Breit für die konstruktiv kritische Betrachtung meiner praktischen Arbeit.

Meiner lieben Freundin Katharina Hofmann danke ich nicht nur für die praktische und emotionale Unterstützung bei meiner Doktorarbeit, sondern auch für die Vermittlung des Kontakts zu Herrn Privatdozent Dr. Mückter.

Meinen Eltern Friederike Stanek-Zehfuß und Werner Zehfuß möchte ich an dieser Stelle herzlich für ihre bedingungslose Unterstützung und ihr Verständnis danken.

Mein besonders tiefer Dank gilt Jonas Weber. Ohne seine wunderbar ehrlichen Worte, seine Geduld und seine Beharrlichkeit wäre diese Dissertation nicht entstanden.